

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**



**CILASTATINA, UNA NUEVA ALTERNATIVA  
TERAPÉUTICA EN LA NEFROTOXICIDAD  
AGUDA INDUCIDA POR CISPLATINO**

Blanca Humanes Sánchez

Madrid, 2012

**Departamento de Bioquímica**  
**Facultad de Medicina**  
**Universidad Autónoma de Madrid**



**CILASTATINA, UNA NUEVA ALTERNATIVA  
TERAPÉUTICA EN LA NEFROTOXICIDAD  
AGUDA INDUCIDA POR CISPLATINO**

Memoria presentada por D<sup>a</sup> Blanca Humanes Sánchez, licenciada en Biología por la Universidad de Alcalá, para optar al grado de Doctor, bajo la codirección del Dr. Alberto Tejedor Jorge y el Dr. Alberto Lázaro Fernández, realizada en la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital General Universitario “Gregorio Marañón” de Madrid.

Madrid, 2012



Hospital General Universitario  
Gregorio Marañón

Comunidad de Madrid

Don Alberto Tejedor Jorge, Doctor en Medicina y  
Don Alberto Lázaro Fernández, Doctor en Bioquímica, Biología Molecular y  
Biomedicina,

#### CERTIFICAN

Que Doña Blanca Humanes Sánchez, Licenciada en Biología por la Universidad de Alcalá, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado *“Cilastatina, una nueva alternativa terapéutica en la nefrotoxicidad aguda inducida por cisplatino”*, que presenta como Tesis Doctoral para obtener el grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

En Madrid a 22 de Marzo de 2012.

Directores

Vº Bº del Tutor

Fdo. Dr. Alberto Tejedor Jorge.

Fdo. Dr. Juan José Aragón.

Fdo. Dr. Alberto Lázaro Fernández.

**Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza.  
Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un  
niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como  
un cuento de hadas.**

Marie Curie

**Nunca dejes de soñar; lo que parecía imposible ayer  
puede convertirse en realidad mañana.**

Charles L. Shepens

**A mis padres**  
**A mi hermano**  
**A Miguel**

## **AGRADECIMIENTOS**

La verdad es que, sobre todo durante este último año y medio, he pensado muchas veces que nunca llegaría a escribir estas líneas. Y de repente aquí estoy, frente a lo que considero lo más complicado de esta tesis, condensar en dos páginas todo mi agradecimiento por su apoyo, dedicación y cariño incondicionales a esa gente que de alguna manera ha estado a mi lado durante estos últimos cuatro años...espero que todos tengáis un hueco aquí.

En primer lugar me gustaría dar las gracias al Dr. Alberto Tejedor, por apostar por mí, por todo su apoyo, por dirigir esta tesis, y sobre todo por enseñarme a disfrutar de la ciencia con el mismo entusiasmo con que lo hace él. A Alberto Lázaro, ¡¡Alfí, madre mía lo que te estoy echando de menos!! Gracias por tu dirección, pero sobre todo gracias por estar ahí en todo momento durante estos cuatro años (incluso en la distancia), tanto en lo profesional, como en lo que es más importante, lo personal. No hace falta que te lo diga, pero aquí tienes una amiga para lo que necesites.

Pero nada de todo esto habría sido posible sin mis padres. Sin su cariño, sus consejos, su apoyo...o sin que me pongan las pilas cuando lo veo todo negro...Papa, eres un ejemplo de fortaleza y superación, aunque a veces no te des cuenta. Mama, siempre con el mundo sobre tus espaldas, la mujer más admirable del mundo, gracias por vuestra confianza en mí, espero que estéis tan orgullosos de mí como yo lo estoy de vosotros. Gracias también a mi hermano Álvaro, uno de los pilares de mi vida y la persona con la capacidad de arrancarme una sonrisa en cualquier momento...que haría yo sin ese humor, sin los ataques de risa, no cambies nunca.

Me gustaría dar las gracias al resto de mi familia, abuelos, tíos y primos. A mi yaya, siempre interesándose por cómo va la cosa. A mi yayo, siempre con su sonrisa en la cara. Aunque estás más desconectado también tienes tu espacio aquí. A mi Cuqui, se que allá donde estés te sentirás orgullosa de mí (y por fin me habrás visto terminar los estudios). A mis tíos Dori, Carlos, Juan Carlos, Ana, Lucía, Pepe, Ana, Ángel y Mercedes, gracias por estar pendientes de todo en mayor o menor medida. A mis primos (y primos políticos) Elena, Juan Carlos, Dani, Susana, Manuel, Jorge, Rosa, Pepe y Ángel, gracias por los ánimos, y por estar siempre dispuestos a ayudar.

A mi otra familia. Gracias Isi y Miguel por esos ánimos en todo momento, a Nacho, Rubén, Tomás, y sobre todo a ti Patri, gracias por hacerme el mejor regalo del mundo.

A mis compañeros del laboratorio de nefro. En primer lugar a Sonia, mi Soni, gracias por haber sido mi maestra pero sobre todo mi amiga, y por estar ahí en los momentos buenos y no tan buenos...eres una persona muy especial, nunca lo olvides. A Jose Lázaro, gracias por las visitas, y por estar siempre pendiente de todo. A Virchun (coincidimos poco tiempo, pero fue intenso. Mucha suerte en la aventura irlandesa), a Marina y Juan Carlos (los últimos en llegar). Gracias chicos por la ayuda incondicional de última hora. Juancar espero poder devolverte la ayuda cuando toque con tu tesis.

A los compañeros del pabellón de Medicina y Cirugía Experimental. A Juanan, ha sido una época de cambios para todos, pero al final los galones son tuyos. Gracias por tus bromas, tu apoyo, tus consejos sobre ciencia (y lo que no es ciencia) y por ayudarme con la bibliografía. A Dani, ya sabes, desde que te fuiste esto no es lo mismo, gracias por tu cariño, y por cuidarme como a una hermanita pequeña. A Bea, Nanobea, mi cangrejito, gracias por los buenos ratos, por esa alegría innata que te caracteriza y por esa risa contagiosa. A Meri, espero haberte demostrado que no soy tan borde, tienes una personalidad arrolladora y conseguirás lo que te propongas (y no te dejes que te líen). Y por último Carol, mi Carola, que decir de ti...eres una de las mejores personas de este mundo, gracias por absolutamente todo, por apoyarme, escucharme, comprenderme, por estar pendiente de mí...sin ti esto no habría sido lo mismo. Siempre me tendrás a tu lado, y espero que dentro de unos años seas tú quien tenga que escribir sus agradecimientos. Al resto de compañeros del experimental, tanto los que están (Javi Vaquero, Pancho, Marichi, M<sup>a</sup> Jesús, Charo, Rosa, M<sup>a</sup> Luisa, Rafa, Miguel, Mercedes, Natalia, Paco, Jose, Fernando, Javi Veterinario, Juan, Mercedes, Mariví y Laura) como los que se marcharon (Yoko, Julio Gallego, Julio Osende, Fer, Hugo y Ainara). Gracias a todos, cada uno a su manera ha puesto su granito de arena.

Gracias a Enrique Lledó (tú también has contribuido a que esto sea posible), a Pablo Martín-Vasallo (siempre tan detallista). Gracias a Gema por su ayuda desinteresada (¡no te libras de mí ni a miles de kilómetros de distancia!).

Quiero agradecer especialmente toda su comprensión y paciencia infinitas a mis amigos (esos que al final cuentas con los dedos de una mano). A Cris (pura dulzura, no sé como agradecerte todo el apoyo que me has dado), Fernan (tendrás que venir a Rivas a celebrarlo, así que echa el bocata y mira la presión de las ruedas), Silvi (es como si nos conociéramos de toda la vida), Óscar (gracias por ayudarme a superar la crisis de última hora, y las conversaciones en la que siempre me das la razón) y por supuesto Adri y César (la alegría de la casa). A mis niñas de yebra: Elena, Arantxa, Vero, Sara y Bea, gracias chicas, porque aunque no nos vemos tanto como nos gustaría, siempre tenéis una palabra de ánimo. A Marta y Nadia. Gracias por las cañas de los martes, me alegro de que hayamos solucionado las cosas. Gracias a todos por vuestro apoyo, pero sobre todo por ser mis amigos.

Y por último, dejo para el final a la persona más importante que ha pasado por mi vida: Miguel. Cariño, sabes que la mitad de esta tesis es tuya. Eres un milagro, y un claro ejemplo de que hasta lo más imposible se puede cumplir si lo deseas lo suficiente. Gracias por estar ahí en todo momento, por respetar mis decisiones (aunque a veces no fueran la opción más cómoda), por la paciencia, la mano izquierda, por hacerme ver que juntos somos capaces de cualquier cosa. No tengo palabras para agradecerte todo lo que has hecho por mí, solo espero poder devolvarte algún día un poquito de todo esto. Gracias por quererme tanto, por el amor y la dedicación incondicionales...ya sabes, siempre me gustó esta canción: "cómo hablar, si cada parte de mi mente es tuya..."...ah!! Y recuerda que tenemos una cita el día 22...

Blanca...

El cisplatino es uno de los más potentes antineoplásicos empleados para el tratamiento de diversos tipos de tumores, cuyo principal inconveniente es la nefrotoxicidad, que limita en ocasiones su uso clínico. En esta tesis hemos estudiado el efecto de cilastatina, un ligando inhibidor de la enzima renal dehidropeptidasa-I, en la toxicidad renal inducida por cisplatino. Estudios *in vitro* en cultivos primarios de células tubulares han demostrado que cilastatina es capaz de proteger frente a la nefrotoxicidad inducida por cisplatino previniendo la aparición de signos apoptóticos y oxidativos (aumento en la síntesis de caspasas y enriquecimiento nucleosomal, liberación de citocromo c, e incremento celular de radical superóxido). Estos resultados han sido confirmados con la realización de un modelo *in vivo* de fracaso renal agudo inducido por cisplatino en ratas. Los animales tratados con cisplatino y cilastatina presentan mejor función y morfología renal, con una reducción significativa del estrés oxidativo y de la activación de vías apoptóticas e inflamatorias, a diferencia de los tratados únicamente con cisplatino. Esta protección ejercida por cilastatina es órgano-específica, no afectando a la capacidad antitumoral del cisplatino sobre sus células diana. Asimismo, cilastatina actúa sin modificar el comportamiento intracelular del cisplatino ni su farmacocinética, lo que redundará en la posibilidad de su posible uso terapéutico. Los resultados presentados apuntan a que cilastatina actúa como protector renal frente a la toxicidad generada por cisplatino mediante su interferencia con la vía extrínseca de la apoptosis a nivel de las balsas de colesterol en la membrana plasmática, además de reducir parcialmente la entrada y acumulación del tóxico en el interior celular. Este estudio sugiere un alto potencial de cilastatina como novedosa herramienta terapéutica para la prevención del fracaso renal agudo tras el tratamiento con cisplatino sin comprometer la eficacia terapéutica antitumoral del mismo.

---

**Summary**

Cisplatin is one of the most potent antineoplastic used in treatments of different kind of tumors whose main inconvenient is nephrotoxicity, which restricts its clinical use. In this thesis we have studied cilastatin effect, a dehydropeptidase-I renal enzyme competitive inhibitor in the cisplatin-induced renal toxicity. *In vitro* assays in primary cultured tubular cells showed that cilastatin protects against cisplatin-induced nephrotoxicity preventing from apoptotic and oxidative signs (caspase synthesis increase and nucleosomal enrichment, cytochrome c release and superoxide radical cellular increase). These results were confirmed performing an *in vivo* cisplatin-induced acute kidney injury model in rats. Cisplatin and cilastatin treated-animals show a better renal function and morphology with a reduction of oxidative stress and apoptotic and inflammatory ways activation in comparison with those treated with cisplatin only. This protection showed to be organ-specific, non-affecting to cisplatin antitumoral capacity into the targeted cells. Also, cilastatin does not modify neither cisplatin intracellular behaviour nor its pharmacokinetic, enabling its therapeutic use. Results point out that cilastatin works as renal protector against cisplatin nephrotoxicity interfering with apoptotic extrinsic way at lipid rafts in the plasmatic membrane, as well as reducing partially the toxic entry and accumulation into the cell. This study suggests cilastatin potential as a new therapeutic tool to prevent acute renal failure after treatment with cisplatin without compromising its antitumoral therapeutic efficiency.



## **ÍNDICE**

<b>I.- ABREVIATURAS .....</b>	<b>- 14 -</b>
<b>II.- INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>- 20 -</b>
1.- ANATOMÍA Y FISIOPATOLOGÍA RENAL.....	- 21 -
1.1.- ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL RIÑÓN.....	- 21 -
1.2.- EL TÚBULO PROXIMAL .....	- 22 -
1.3.- EL FRACASO RENAL .....	- 23 -
1.3.1.- Fracaso renal crónico.....	- 23 -
1.3.2.- Fracaso renal agudo .....	- 24 -
1.3.2.1.- Fracaso renal agudo tóxico .....	- 25 -
2.- CISPLATINO .....	- 26 -
2.1.- MECANISMO DE ACCIÓN DEL CISPLATINO .....	- 27 -
2.2.- CINÉTICA DEL CISPLATINO EN SOLUCIÓN ACUOSA: DINÁMICA INTRACELULAR .....	- 28 -
2.3.- EFECTOS SECUNDARIOS DEL CISPLATINO .....	- 29 -
2.4.- CISPLATINO Y NEFROTOXICIDAD .....	- 29 -
2.4.1.- Captación de Cisplatino y Biotransformación en el Túbulo Proximal.....	- 29 -
2.4.2.- Fenómenos de Muerte Celular.....	- 30 -
2.4.2.1.- Necrosis .....	- 30 -
2.4.2.2.- Apoptosis .....	- 31 -
2.4.2.2.1 Vía Intrínseca o Mitocondrial .....	- 32 -
2.4.2.2.2 Vía Extrínseca o de Receptores de Muerte Celular ..	- 32 -
2.4.3.- Fenómenos de Estrés Oxidativo .....	- 33 -
2.4.4.- Fenómenos de Inflamación.....	- 34 -
3.- CILASTATINA .....	- 35 -
3.1.- IMIPENEM-CILASTATINA.....	- 35 -
3.1.1.- Perspectiva histórica.....	- 35 -
3.1.2.- Cilastatina: estructura y función.....	- 36 -
3.2.- DEHIDROPEPTIDASA I.....	- 37 -
3.2.1.- Estructura, localización y función .....	- 37 -
3.2.2.- Balsas de colesterol .....	- 38 -
3.3.- EVIDENCIAS DE NEFROPROTECCIÓN POR CILASTATINA .....	- 38 -
3.3.1.- Interacción con ciclosporina A.....	- 38 -
3.3.2.- Interacción con vancomicina .....	- 40 -
3.3.3.- Interacción con cisplatino .....	- 40 -
<b>III.- HIPÓTESIS .....</b>	<b>- 41 -</b>
<b>IV.- OBJETIVOS.....</b>	<b>- 43 -</b>

<b>V.- MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>- 45 -</b>
<b>V.I.- EXPERIMENTOS IN VITRO .....</b>	<b>- 46 -</b>
1.- FÁRMACOS EN ESTUDIO .....	- 47 -
1.1.- CISPLATINO .....	- 47 -
1.2.- CILASTATINA .....	- 47 -
2.- CULTIVOS CELULARES.....	- 47 -
2.1.- CÉLULAS RENALES .....	- 47 -
2.1.1.- Aislamiento de Túbulo Proximal .....	- 47 -
2.1.2.- Cultivo Primario de Células de Túbulo Proximal .....	- 48 -
2.1.3.- Cultivo Secundario de Células de Túbulo Proximal .....	- 49 -
2.2.- CÉLULAS NO RENALES.....	- 49 -
3.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS DEHIDROPEPTIDASAS I Y IV.....	- 50 -
4.- ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA CELULAR Y NUCLEAR.....	- 50 -
5.- ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR.....	- 50 -
6.- MEDIDA DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL.....	- 51 -
7.- MEDIDA DE LA TINCIÓN CON ANEXINA V-FITC .....	- 51 -
8.- ENRIQUECIMIENTO NUCLEOSOMAL .....	- 52 -
9.- ENSAYO DE ACTIVIDAD DE CASPASAS .....	- 52 -
10.- DETERMINACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE CITOCROMO C .....	- 53 -
11.- PCR EN TIEMPO REAL .....	- 54 -
11.1.- EXTRACCIÓN DE ARN CELULAR TOTAL.....	- 54 -
11.2.- PCR EN TIEMPO REAL .....	- 55 -
12.- DETERMINACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE LACTATO DESHIDROGENASA .....	- 55 -
13.- ENSAYO DE INMUNOLocalización DE FASL.....	- 56 -
14.- DETERMINACIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO .....	- 56 -
15.- ACUMULACIÓN DE PLATINO Y ANÁLISIS DE SU UNIÓN AL ADN -	- 57 -
15.1.- AISLAMIENTO DE PROTEÍNAS INTRACELULARES TOTALES -	- 57 -
15.2.- AISLAMIENTO DE ADN CELULAR.....	- 57 -
15.3.- DETERMINACION DE PLATINO INTRACELULAR Y PLATINO UNIDO A ADN .....	- 58 -
16.- ANÁLISIS DE ESPECIACIÓN DE LA MOLÉCULA DE PLATINO .....	- 58 -
17.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	- 59 -
<b>V.II.- EXPERIMENTOS IN VIVO .....</b>	<b>60</b>
1.- MODELO DE FRACASO RENAL AGUDO POR CISPLATINO.....	- 61 -
2.- EXTRACCIÓN, PROCESAMIENTO Y ALMACENAJE DE TEJIDOS ..	- 62 -
3.- MEDIDA DE LA PROTEINURIA .....	- 63 -
4.- DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN SUERO Y ORINA .....	- 63 -

5.- ESTUDIOS HISTOPATOLÓGICOS .....	64 -
6.- INMUNOHISTOQUÍMICA.....	64 -
7.- EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES DE CORTEZA RENAL .....	65 -
8.- WESTERN BLOT.....	66 -
9.- ESTUDIO DE LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR NUCLEAR KB.....	67 -
9.1.- EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS NUCLEARES DE TEJIDO .....	67 -
9.2.- MARCAJE DEL OLIGONUCLEÓTIDO CONSENSO .....	67 -
9.3.- ENSAYO DE UNIÓN.....	67 -
10.- EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL DE CORTEZA RENAL; <b>Error! Marcador no definido.</b>	
11.- MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE MALONDIALDEHÍDO .....	68 -
12.- ENSAYO DE TUNEL.....	69 -
13.- MEDIDA DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	69 -
14.- DETERMINACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO .....	70 -
15.- DETERMINACIÓN DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL $\alpha$ .....	70 -
16.- FARMACOCINÉTICA DE CISPLATINO: ÁREA BAJO LA CURVA ....	70 -
17.- ACUMULACIÓN DE PLATINO EN CORTEZA Y MÉDULA RENAL....	71 -
18.- ANÁLISIS DE ESPECIACIÓN DEL PLATINO POR SEC-ICP-MS .....	71 -
19.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	72 -
<b>VI.- RESULTADOS .....</b>	<b>73</b>
<b>VI.I.- ESTUDIOS IN VITRO .....</b>	<b>74 -</b>
1.- EFECTO DE CILASTATINA.....	75 -
1.1.- ESTUDIOS DE DINÁMICA DE CRECIMIENTO .....	75 -
1.2.- ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE DEHIDROPEPTIDASA I.....	76 -
2.- EFECTO DE CISPLATINO. PROTECCIÓN POR CILASTATINA.....	76 -
2.1.- INDUCCIÓN DE CAMBIOS MORFOLÓGICOS .....	76 -
2.2.- EFECTO SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR .....	77 -
2.3.- EFECTO EN EL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL.....	78 -
2.4.- INDUCCIÓN DE NECROSIS CELULAR .....	79 -
2.5.- INDUCCIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO CELULAR .....	80 -
2.5.1.- Cilastatina inhibe la producción de radical superóxido .....	80 -
2.6.- INDUCCIÓN DE APOPTOSIS CELULAR.....	81 -
2.6.1.- Cilastatina reduce la aparición de alteraciones nucleares ..	81 -
2.6.2.- Cilastatina reduce la aparición nucleosomal en el citosol....	82 -
2.6.3.- Cilastatina reduce los cambios en la membrana celular.....	83 -
2.6.4.- Cilastatina impide el aumento de actividad de caspasas ....	84 -
2.6.5.- Cilastatina reduce la liberación de citocromo c .....	86 -
2.6.6.- Cilastatina no afecta a los cambios transcripcionales .....	86 -
2.6.7.- Cilastatina previene la internalización del ligando de Fas....	87 -

2.7.- EFECTO DE CILASTATINA SOBRE LA CAPTACIÓN CELULAR DE CISPLATINO .....	88 -
2.8.- EFECTO DE CILASTATINA SOBRE LA INTERACCIÓN CISPLATINO/ADN .....	89 -
2.9.- EFECTO DE CILASTATINA SOBRE LA ESPECIACIÓN DE CISPLATINO .....	90 -
3.- EFECTO DE CILASTATINA SOBRE LA CAPACIDAD ANTITUMORAL DE CISPLATINO .....	91 -
3.1.- ENSAYO DE ACTIVIDAD DE DEHIDROPEPTIDASA I.....	91 -
3.2.- EFECTO DE CILASTATINA SOBRE LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR CISPLATINO EN CÉLULAS TUMORALES .....	92 -
3.2.1.- Estudio de la morfología nuclear en células tumorales.....	92 -
3.2.2.- Estudio de activación de caspasa 3 en células tumorales ...	93 -
3.3.- EFECTO DE CILASTATINA SOBRE LA UNIÓN DE PLATINO AL ADN EN CÉLULAS TUMORALES.....	93 -
3.4.- EFECTO DE CILASTATINA SOBRE LA CAPACIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE CISPLATINO SOBRE DISTINTOS TUMORES .....	94 -
<b>VI.II.- ESTUDIOS IN VIVO .....</b>	<b>96 -</b>
1.- MODELO ANIMAL DE NEFROTOXICIDAD INDUCIDA POR CISPLATINO. PROTECCIÓN POR CILASTATINA.....	97 -
1.1.- CILASTATINA REDUCE LA PÉRDIDA DE PESO CORPORAL ....	97 -
1.2.- CILASTATINA RESTAURA LA FUNCIÓN RENAL.....	98 -
1.2.1.- Estudio de parámetros bioquímicos en sangre .....	98 -
1.2.2.- Estudio de parámetros bioquímicos en orina .....	99 -
1.2.3.- Estudio de parámetros estimados de función renal.....	100 -
1.2.4.- Estudio de la morfología renal.....	101 -
1.2.4.1.- Morfología cortical .....	101 -
1.2.4.2.- Morfología medular .....	102 -
1.2.4.3.- Score de daño renal .....	102 -
1.3.- CILASTATINA IMPIDE LA APARICIÓN DE APOPTOSIS.....	105 -
1.3.1.- Cilastatina impide la aparición de caspasa 9 .....	105 -
1.3.2.- Cilastatina impide la aparición de caspasa 8 .....	106 -
1.3.3.- Cilastatina impide la aparición de caspasa 3 .....	107 -
1.3.4.- Cilastatina reduce la aparición de Bax pero no de Bcl-2...-	109 -
1.3.5.- Cilastatina impide la activación de la ruta Fas/FasL .....	110 -
1.3.6.- Cilastatina impide la fragmentación del ADN.....	111 -
1.4.- CILASTATINA REDUCE LA APARICIÓN DE ESTRÉS.....	112 -
1.4.1.- Cilastatina reduce la aparición de peróxido de hidrógeno.-	112 -
1.4.2.- Cilastatina restaura la capacidad antioxidante .....	113 -
1.4.3.- Cilastatina inhibe el descenso en la síntesis de catalasa ..-	114 -

1.4.4.- Cilastatina inhibe el aumento en la síntesis de proteínas de shock térmico.....	115 -
1.5.- CILASTATINA REDUCE LA APARICIÓN DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA .....	115 -
1.5.1.- Cilastatina reduce la aparición de 4-hidroxi-2-nonenal ....	116 -
1.5.2.- Cilastatina reduce la síntesis renal de malondialdehído ...	116 -
1.6.- CILASTATINA REDUCE LA INFLAMACIÓN .....	117 -
1.6.1.- Cilastatina reduce la síntesis de TNF $\alpha$ .....	117 -
1.6.2.- Cilastatina reduce la síntesis de factor nuclear $\kappa$ B.....	118 -
1.6.3.- Cilastatina reduce la presencia de monocitos/macrófagos-	119 -
1.7.- CILASTATINA REDUCE LA CONCENTRACIÓN DE PLATINO ACUMULADO EN CORTEZA RENAL.....	120 -
1.8.- CILASTATINA NO AFECTA A LA ESPECIACIÓN DE CISPLATINO EN TEJIDO RENAL .....	121 -
1.9.- EFECTOS DE CILASTATINA SOBRE LA FARMACOCINÉTICA DE CISPLATINO .....	122 -
<b>VII.- DISCUSIÓN .....</b>	<b>123 -</b>
1.- TOXICIDAD RENAL INDUCIDA POR CISPLATINO.....	124 -
1.1.- APOPTOSIS Y NECROSIS.....	124 -
1.2.- ESTRÉS OXIDATIVO E INFLAMACIÓN .....	127 -
2.- EFECTO DE CILASTATINA SOBRE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR CISPLATINO .....	128 -
3.- EFECTO DE CILASTATINA SOBRE LA OXIDACIÓN Y LA INFLAMACIÓN INDUCIDAS POR CISPLATINO .....	132 -
4.- EFECTOS DE CILASTATINA SOBRE EL TRANSPORTE CELULAR DE CISPLATINO .....	134 -
5.- EFECTO DE CILASTATINA SOBRE LA ESPECIACIÓN INTRACELULAR DE CISPLATINO .....	136 -
6.- SUCESIÓN DE EVENTOS EN LA PROTECCIÓN RENAL POR CILASTATINA: PAPEL DE LA DEHIDROPEPTIDASA I.....	136 -
7.- CILASTATINA: UNA ESTRATEGIA PROMETEDORA PARA EL TRATAMIENTO DE LA TOXICIDAD RENAL.....	138 -
<b>VIII.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>139 -</b>
<b>IX.- BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>142 -</b>
<b>X.- ANEXO.....</b>	<b>154 -</b>

## **I.- *ABREVIATURAS***

---

A continuación se recoge la relación de abreviaturas que aparecen en el texto. En ocasiones se ha mantenido la correspondiente abreviatura y definición en inglés debido a su mayor uso en el lenguaje científico:

<b>ABREVIATURA</b>	<b>DEFINICIÓN</b>
<b>A</b>	Adenina
<b>ABC</b>	<i>ATP-binding cassette</i>
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	ADN copia
<b>AIF</b>	Factor de inducción de apoptosis
<b>AINEs</b>	Antiinflamatorios no esteroideos
<b>ALP</b>	Fosfatasa alcalina
<b>ALT</b>	Alanina aminotransferasa
<b>ANOVA</b>	Análisis de la varianza
<b>Apaf 1</b>	Factor activador de proteasas apoptóticas
<b>APES</b>	3-aminopropil-trietoxisilano
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNasa</b>	Ribonucleasa
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferasa
<b>ATP</b>	Adenosin trifosfato
<b>AUC</b>	Área bajo la curva
<b>BCA</b>	Ácido bicinconínico
<b>BDC</b>	Balsas de colesterol
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>C</b>	Citosina
<b>CIP</b>	Cóctel de inhibidores de proteasas
<b>ClH<sub>2</sub>O</b>	Aclaramiento de agua libre
<b>CsA</b>	Ciclosporina A
<b>Ctrl</b>	Transportador de cobre de alta afinidad tipo 1
<b>CYP</b>	Citocromo P450
<b>DAB</b>	3-3'-diamino-bencidina
<b>DAPI</b>	Diclorhidrato de 4'6-diamidino-2-fenilindol

<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>DHP-I</b>	Dehidropeptidasa I
<b>DHP-IV</b>	Dehidropeptidasa IV
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>DPX</b>	Dibutilftalato
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>ECL</b>	Activación de la quimioluminiscencia
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EEM</b>	Error estándar de la media
<b>EFH<sub>2</sub>O</b>	Excreción fraccional de agua
<b>EFNa<sup>+</sup></b>	Excreción fraccional de sodio
<b>EGTA</b>	Ácido etilen-glicol-tetraacético
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<b>EMSA</b>	Ensayo de retardo de movilidad electroforética
<b>EO</b>	Estrés oxidativo
<b>ERK</b>	Quinasa regulada por señales extracelulares
<b>FADD</b>	Dominio de muerte asociado a Fas
<b>FasL</b>	Ligando de Fas
<b>FG</b>	Filtrado glomerular
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>FRA</b>	Fracaso renal agudo
<b>FRC</b>	Fracaso renal crónico
<b>G</b>	Guanina
<b>GGT</b>	Gamma glutamil transpeptidasa
<b>GPI</b>	Glicosil fosfatidil inositol
<b>GTTK</b>	Gradiente transtubular de potasio
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>HEPES</b>	Ácido N-[2-hidroxietil]piperazina-N´-[2-etanosulfónico]
<b>HGUGM</b>	Hospital general universitario Gregorio Marañón
<b>4-HNE</b>	4-hidroxi-2-nonenal
<b>HSP</b>	Proteína de shock térmico
<b>i.m.</b>	Vía intramuscular



<b>i.p.</b>	Vía intraperitoneal
<b>i.v.</b>	Vía intravenosa
<b>I/C</b>	Imipenem/Cilastatina
<b>ICAM</b>	Molécula de adhesión intercelular
<b>ICP-MS</b>	Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo
<b>IECAs</b>	Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina
<b>IFN</b>	Interferón
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>Ir</b>	Iridio
<b>ITDA</b>	Instituto Tecnológico de desarrollo agrario
<b>IκB</b>	Inhibidor del factor nuclear κB
<b>JNK/SAPK</b>	Quinasa Jun-N-terminal/Proteína quinasa activada por estrés
<b>LDH</b>	Lactato deshidrogenasa
<b>LSD</b>	<i>Least significant difference</i>
<b>m/z</b>	masa/carga
<b>MAPK</b>	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
<b>MATE1</b>	<i>Multidrug and toxin extrusion type 1</i>
<b>MCP-1</b>	Proteína quimioatrayente de macrófagos 1
<b>MDA</b>	Malondialdehído
<b>MDR1</b>	<i>Multidrug resistance transport type 1</i>
<b>MRP</b>	Proteína asociada a la resistencia a multidrogas
<b>MTT</b>	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
<b>NAD(P)H</b>	Dinucleótido de adenina nicotinamida (fosfato)
<b>NFκB</b>	Factor nuclear κB
<b>NP-40</b>	Octil fenoxipolietoxiletanol
<b>NPT1</b>	Transportador de sodio/fosfato tipo 1
<b>NTA</b>	Necrosis tubular aguda
<b>NUO</b>	Nitrógeno Ureico en Orina
<b>NUS</b>	Nitrógeno Ureico en Sangre
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	Radical superóxido
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	Oxígeno singlete
<b>OAT</b>	Transportador de aniones orgánicos

<b>OATP</b>	Polipéptido transportador de aniones orgánicos
<b>OCT</b>	Transportador de cationes orgánicos
<b>OH</b>	Radical hidroxilo
<b>ONOO<sup>•</sup></b>	Radical peroxinitrito
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PBST</b>	PBS-Tween 20
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PEPT</b>	Transportador de oligopéptidos
<b>PgP</b>	Glicoproteína P
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>Pt</b>	Platino
<b>PTEC</b>	Células epiteliales tubulares proximales
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>RPLPO</b>	<i>Ribosomal phosphoprotein large PO subunit</i>
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SBF</b>	Suero bovino fetal
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico
<b>SEC</b>	Cromatografía de exclusión por tamaño
<b>SODs</b>	Superóxido dismutasas
<b>T</b>	Timina
<b>TBA</b>	Ácido tiobarbitúrico
<b>TBE</b>	Tris-HCl-ácido bórico-EDTA
<b>TBS</b>	Tampón Tris salino
<b>TBST</b>	TBS-Tween 20
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>TE</b>	Tris-HCl-EDTA
<b>TFG</b>	Tasa de filtración glomerular
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante $\beta$
<b>TNFR</b>	Receptor del factor de necrosis tumoral
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>TRAIL</b>	Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF
<b>TUNEL</b>	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated DUTP nick end labeling</i>

<b>uad</b>	Unidades arbitrarias de densitometrado
<b>UV</b>	Ultravioleta

## **II.- *INTRODUCCIÓN***

---

## **1.- ANATOMÍA Y FISIOPATOLOGÍA RENAL**

### **1.1.- ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL RIÑÓN**

Los riñones son órganos pares excretorios, situados en el retroperitoneo a ambos lados de la columna vertebral. Tienen de 10 a 12 cm de diámetro mayor y en ellos se aprecian dos áreas bien diferenciadas: la corteza más externa y la más interna, la médula.

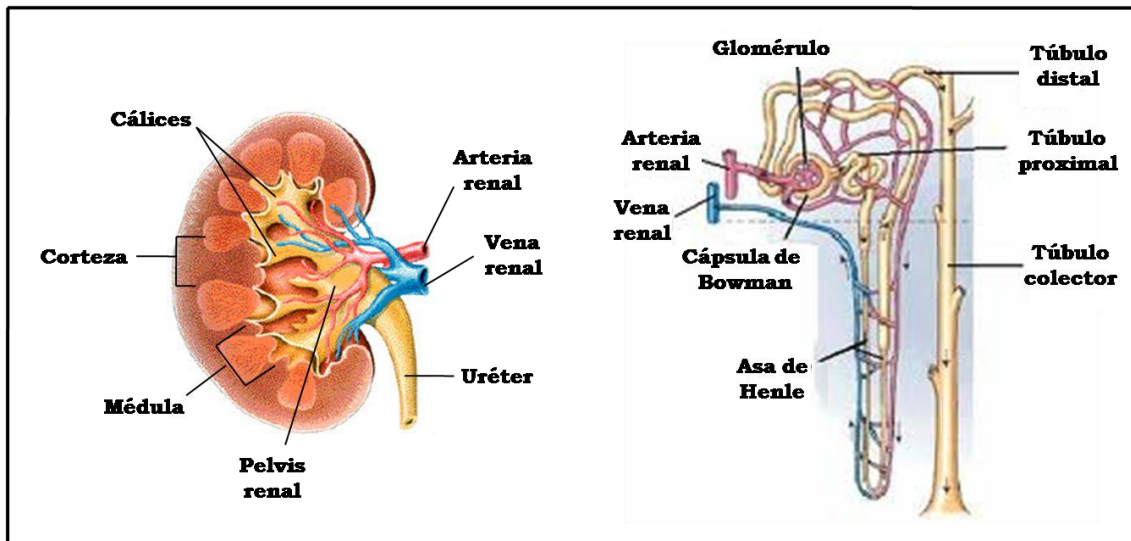
Las principales funciones del riñón son:

- Excreción a través de la orina de productos de desecho del metabolismo (urea, creatinina, ácido úrico...), así como sustancias extrañas introducidas en el organismo como fármacos no modificados, sus metabolitos, etc...
- Regulación del balance hídrico del organismo, y de la osmolaridad de los fluidos corporales.
- Regulación del equilibrio electrolítico y ácido-básico.
- Síntesis de eritropoyetina, prostaglandinas y metabolitos activos de la vitamina D.
- Regulación de la presión arterial a través de la producción y secreción de hormonas del sistema renina-angiotensina.

El riñón ejerce dichas funciones a través de la nefrona, que es su unidad fundamental tanto estructural como funcional. La nefrona se encarga de ultrafiltrar el plasma, secretar residuos metabólicos y reabsorber sustancias útiles que son devueltas a la sangre para su reutilización. De esta forma, el riñón conforma y elimina una orina de composición adecuada a la situación y necesidades del organismo en cada momento. Cada nefrona tiene al comienzo una zona globosa denominada corpúsculo renal o corpúsculo de Malpighi (que a su vez contiene el glomérulo y la cápsula de Bowman). A continuación encontramos el túbulo proximal, seguido por un segmento en forma de U, el asa de Henle, que se continúa con el túbulo distal, y finalmente el túbulo colector. Los túbulos colectores por último confluyen aumentando de calibre a medida que se adentran en la médula. Tanto el corpúsculo renal como los túbulos proximal y distal se encuentran situados en la corteza renal, mientras que el asa de Henle y el túbulo colector se localizan en la zona medular.

El glomérulo es una estructura compuesta por un ovillo de capilares arterio-arteriales originados a partir de la arteriola aferente, de la cual reciben el flujo sanguíneo. Tras formar varios lobulillos a través de los cuales se filtra la sangre para formar la orina primitiva se reúnen para formar la arteriola eferente, que abandona el glomérulo. En los glomérulos se reciben 600 mL de plasma por minuto, de los que se filtran un total de 125 mL. Aproximadamente el 1% del volumen filtrado se excretará finalmente en forma de orina. Este proceso de ultrafiltración, acompañado de la reabsorción y secreción tubular, generará la orina definitiva, ajustando su volumen y

concentración de solutos al volumen y composición de la ingesta para mantener en balance al organismo.



**Figura 1. Fisiología renal.** A la izquierda, corte esquemático de la topografía general renal. A la derecha, localización cortical y medular de los componentes de la nefrona y del sistema de los conductos colectores.

## 1.2.- EL TÚBULO PROXIMAL

El túbulo proximal parte del glómulo, permaneciendo en buena parte de su recorrido en la corteza, y entrando en la médula para continuarse con la rama descendente del asa de Henle. Se encarga de la reabsorción tubular de parte de los metabolitos presentes en el ultrafiltrado y de devolverlos al torrente sanguíneo. El túbulo proximal reabsorbe un 60% del filtrado glomerular (FG), conteniendo glucosa, fosfato y aminoácidos (prácticamente en su totalidad), urea, bicarbonato, agua e iones tales como potasio, cloro y sodio. Esta reabsorción se realiza tanto de forma pasiva por ósmosis y formación de gradientes químicos o eléctricos, como por transportadores secundariamente activos.

Además de la función de reabsorción, el túbulo tiene también capacidad secretora de sustancias como ácido hipúrico, fosfatos o fármacos presentes en sangre.

Las paredes del túbulo proximal están revestidas por una única capa de células de epitelio cúbico simple (células epiteliales tubulares proximales o "PTEC"). Estas células presentan en su cara luminal numerosas microvellosidades ampliamente desarrolladas que constituyen el "borde en cepillo", estructura que confiere al túbulo proximal un considerable aumento en la superficie de absorción (aumenta  $1.5 \mu\text{m}^2$  por cada  $\mu\text{m}^3$  de túbulo). Además, las PTEC ejercen la función secretora del túbulo mediante transportadores presentes tanto en su cara basolateral (en contacto con capilares sanguíneos) como en la porción apical (en contacto con la luz del túbulo). Los transportadores encontrados en el lado basolateral de la célula son de tipos más inespecíficos, como los de las familias de transportadores de aniones y cationes orgánicos (OAT y OCT respectivamente) y la familia del polipéptido transportador de aniones orgánicos (OATP). En la cara luminal, sin embargo, se

localizan también miembros de la familia de los OAT, además del transportador de sodio/fosfato tipo 1 (NPT1), el transportador de péptidos PEPT y mecanismos de transporte activo basados en P-glicoproteínas (PgP) de los tipos MRP (*Multidrug Resistance-associated Protein*) y MDR1 de la superfamilia ABC (*ATP-binding cassette*), especializados en el bombeo de sustancias tóxicas hacia la luz tubular <sup>12</sup>. Recientemente se han descrito otros dos transportadores presentes en la célula tubular proximal e implicados en el transporte de fármacos. Uno en su cara basolateral (transportador de cobre Ctr1) y el otro situado en la membrana del borde en cepillo (MATE1 (*multidrug and toxin extrusion*)) <sup>118,164</sup>. La presencia de estos transportadores, y por tanto de un mecanismo tan especializado de eliminación de fármacos, hace al riñón, y más concretamente a las PTEC, altamente susceptibles a la lesión por toxicidad producida por éstos o por sus metabolitos. Además de los mencionados transportadores, el túbulo proximal presenta al menos dos modalidades de transporte basado en la formación e internalización de vesículas (pinocitosis) especialmente relevantes a nivel del borde en cepillo. Estas son la formación de vesículas recubiertas de clatrina, que contienen bombas de H<sup>+</sup> y contribuyen a la reabsorción de bicarbonato, y la formación de vesículas a partir de caveolas, estructuras ancladas a la membrana del borde en cepillo y constituidas fundamentalmente por colesterol unido a la proteína caveolina. Las caveolas se internalizan en respuesta a distintos estímulos de origen hormonal o enzimático, y están implicadas en el transporte de un gran número de fármacos. Ambos sistemas de pinocitosis son fundamentales en la recuperación de las proteínas de bajo peso molecular (albúmina) que habitualmente escapan de la barrera glomerular.

### **1.3.- EL FRACASO RENAL**

El fracaso renal (o insuficiencia renal) es la situación patológica en la cual los riñones dejan de funcionar correctamente. Esta patología se clasifica en dos grandes grupos: fracaso renal crónico (FRC) y fracaso renal agudo (FRA), dependiendo de la forma de aparición (días, semanas, meses o años) y, sobre todo, de la recuperación o no de la lesión.

#### **1.3.1.- Fracaso renal crónico**

El FRC o insuficiencia renal crónica (IRC) es un proceso progresivo e irreversible que comienza cuando se produce a lo largo de meses o años una pérdida en la funcionalidad y número de nefronas y las nefronas restantes son incapaces de mantener la función renal del paciente. Se caracteriza por una disminución progresiva de la tasa de FG, anemia, insuficiencia cardíaca, osteodistrofia, etc, síntomas asociados a la pérdida total de las diversas funciones renales (excretora, endocrina y reguladora de la presión arterial). El FRC se clasifica en cinco estadios diferentes, dependiendo de la tasa de filtración glomerular. Así, se puede considerar un FRC en estadio I aquel en el que el paciente tiene una tasa de FG mayor o igual al 90%, no

presentando sintomatología clínica, y un FRC en estadio V en el caso de pacientes con menos de un 15% de tasa de FG, que progresa al coma urémico irreversible y la muerte en el caso de no aplicar técnicas sustitutivas (diálisis o trasplante) (Tabla 1).

<b>ESTADIO CLÍNICO</b>	<b>MANIFESTACIONES CLÍNICAS</b>
ESTADIO I Tasa de FG $\geq$ 90%	Ausencia de síntomas. Normalidad bioquímica. Reserva funcional disminuida.
ESTADIO II Tasa de FG entre 89% y 60%	Poliuria (incapacidad para concentrar la orina). Elevación moderada de urea y creatinina. Anemia discreta.
ESTADIO III Tasa de FG entre 59% y 30%	Síntomas de intensidad variable dependiendo de dieta y medicación (astenia, náuseas, vómitos, prurito). Aumento marcado de residuos nitrogenados, <Ca, <Mg. Poliuria con nicturia.
ESTADIO IV Tasa de FG entre 29% y 15%	Sintomatología intensa (alteraciones digestivas, nerviosas, cardiovasculares, cutáneas, etc...). Acentuación de las alteraciones bioquímicas.
ESTADIO V Tasa de FG < 15%	Progresión al coma urémico irreversible y la muerte si no se aplican técnicas sustitutivas (diálisis o trasplante).

**Tabla 1. Estadios clínicos de la Insuficiencia Renal Crónica** (Modificado de Hernando Avendaño <sup>68</sup>).

Las causas principales del FRC son enfermedades sistémicas de carácter crónico, tales como diabetes o hipertensión, capaces de afectar directa o indirectamente al riñón y otras enfermedades específicamente renales, congénitas como poliquistosis e inflamatorias como glomerulonefritis o nefritis intersticial, que desembocan en la fase denominada insuficiencia renal terminal o de estadio V, lo que hace necesario el inicio de tratamiento sustitutivo (diálisis o trasplante).

### **1.3.2.- Fracaso renal agudo**

El FRA es un síndrome reversible caracterizado por una brusca caída en el FG en horas o días, con incapacidad de excretar productos nitrogenados de desecho (azotemia) y de regular la homeostasis de líquidos y electrolitos <sup>148</sup>.

Esta patología se clasifica en diferentes grupos según su etiopatogenia:

- **FRA pre-renal o funcional.** Se da como consecuencia de una inadecuada perfusión renal que compromete el FG. Es, por tanto, una respuesta fisiológica a la hipoperfusión renal, pero el parénquima renal permanece íntegro. Es reversible si se actúa sobre la causa desencadenante de manera precoz.
- **FRA renal, parenquimatoso o intrínseco.** Causado por un daño en las estructuras anatómicas. Se clasifica a su vez en necrosis tubular aguda (NTA), lesión glomerular, lesión túbulointersticial o lesión de grandes vasos, según si la estructura dañada de forma primaria es el glomérulo, túbulo, intersticio o vasos renales, respectivamente.



- **FRA post-renal u obstructivo.** Las causas son lesiones que producen un obstáculo en la vía urinaria que impide la salida de la orina formada, provocando un aumento de presión que se transmite retrógradamente, comprometiendo el FG.

En la tabla 2 se presentan las causas principales de cada una de estas modalidades de FRA:

TIPO DE FRA		CAUSAS
Pre-renal o funcional		Hipovolemia. Disminución del gasto cardiaco. Vasodilatación periférica. Vasoconstricción renal. Alteración de las respuestas autorreguladoras renales.
Renal, parenquimatoso o intrínseco	NTA	Isquemia. Tóxicos (antibióticos, antitumorales, contrastes iodados...).
	Lesión glomerular	Glomerulonefritis. Hipertensión. Vasculitis.
	Lesión túbulointersticial	Alergias a fármacos. Infecciones.
	Lesión de grandes vasos	Obstrucción de arterias o venas renales.
Post-renal u obstructivo		Litiasis, tumores, prostatismo. Vejiga neurógena.

**Tabla 2. Causas y tipos de Fracaso Renal Agudo.**

### 1.3.2.1.- Fracaso renal agudo tóxico

Es el FRA producido por sustancias nefrotóxicas. Estas sustancias pueden ser de muy distinta naturaleza, siendo las más comunes las que se presentan en la tabla 3:

GRUPO	NEFROTÓXICOS
Fármacos	<b>Antibióticos:</b> penicilinas, cefalosporinas, gentamicina, vancomicina, sulfametoxazol... <b>Antivirales:</b> aciclovir, foscarnet. <b>Antiinflamatorios no Esteroideos (AINEs).</b> <b>Contrastes Radiológicos:</b> iopamidol. <b>Inmunosupresores:</b> ciclosporina, tacrolimus. <b>Antineoplásicos:</b> cisplatino, interleuquina-2 (IL-2). <b>Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina (IECAs).</b> <b>Diuréticos:</b> tiazidas, furosemida.
Agentes Ambientales	<b>Hidrocarburos halogenados:</b> herbicidas. <b>Metales pesados:</b> plomo, mercurio. <b>Disolventes orgánicos:</b> gasolina, tricloroetileno. <b>Micotoxinas.</b>
Agentes Endógenos o Metabólicos	<b>Mioglobina.</b> <b>Hemoglobina.</b> <b>Proteínas.</b>

**Tabla 3. Principales sustancias nefrotóxicas.**

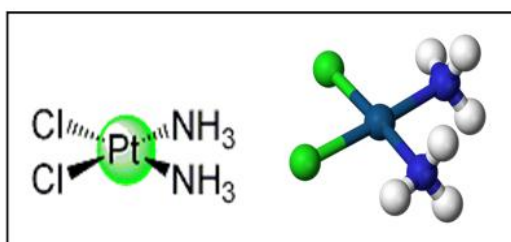
Los mecanismos fundamentales por los cuales se produce la lesión renal por tóxicos son numerosos y muy variados. Así, se pueden diferenciar cinco grandes grupos:

- **Lesión Tubular Aguda.** Es un efecto tóxico directo sobre las células del epitelio tubular renal, afectando principalmente al túbulo proximal.
- **Lesión de la Médula Renal.** La médula renal no es una región especialmente bien perfundida, por lo que es susceptible a situaciones de hipoxia, bajo gasto cardiaco o elevadas concentraciones de fármacos.
- **Obstrucción Intratubular.** Producida por la acción de sustancias que poseen escasa solubilidad en la orina ácida, y que son administradas a altas dosis, produciéndose la precipitación principalmente a nivel del túbulo distal.
- **Nefritis Intersticial Aguda.** Esta lesión se produce cuando fármacos o tóxicos insolubles localizados en el intersticio desencadenan una reacción inflamatoria a cuerpo extraño, siendo en general una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T.
- **Alteraciones de la Regulación del Flujo Sanguíneo Renal.** En muchas ocasiones la lesión del túbulo proximal condiciona un “*feed-back*” (retroalimentación) túbulo-glomerular con cierre de la arteriola aferente de la nefrona correspondiente. Se han atribuido componentes “vasomotores” a las acciones nefrotóxicas de muchos fármacos que en realidad son tóxicos directos para el túbulo proximal o el asa de Henle.

## 2.- CISPLATINO

El cis-diamino-dicloroplatino (II) o cisplatino es un agente quimioterapéutico tetracoordinado basado en platino. Su fórmula empírica es  $\text{cis}-(\text{NH}_3)_2\text{PtCl}_2$  y presenta un peso molecular de 300 Da.

La molécula de cisplatino fue descubierta inesperadamente en 1969 por Rosenberg y colaboradores durante sus estudios del efecto de la corriente eléctrica sobre *Escherichia coli*<sup>130</sup>. Mientras realizaban sus experimentos, pudieron observar que la división celular no se inhibía por la corriente eléctrica aplicada sino por la producción de cisplatino procedente de los electrodos de platino que empleaban para generar la corriente. Desde entonces y hasta ahora ha sido una de las moléculas más usadas en el tratamiento de diferentes tipos de tumores sólidos tales como el de cabeza y cuello, testículo, ovario, vejiga, esófago o pulmón<sup>115,125,131</sup>.

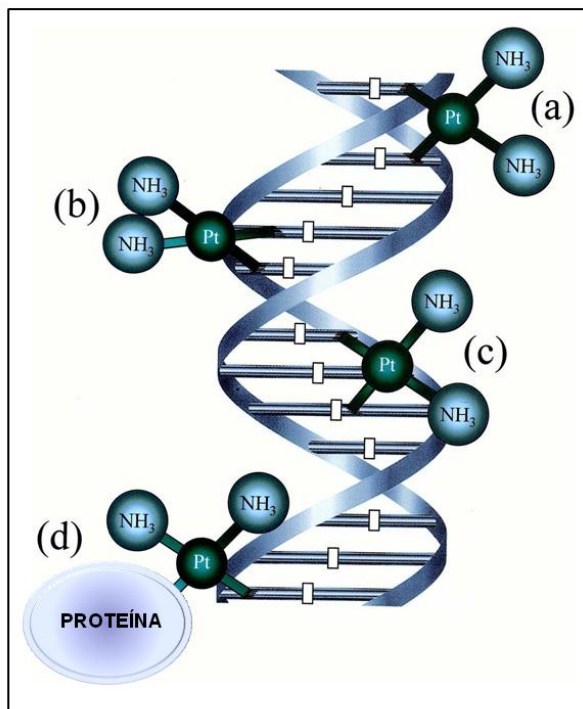


**Figura 2. Estructura química del cisplatino.** Complejo de platino neutro que contiene dos grupos amino terminal ( $\text{NH}_3$ ) y dos ligandos cloruro en geometría cis.

## 2.1.- MECANISMO DE ACCIÓN DEL CISPLATINO

La molécula de cisplatino actúa preferentemente sobre las bases del ADN, en particular sobre el nitrógeno en posición 7 de guanina y adenina <sup>30</sup>. La unión a guanina es más frecuente, probablemente debido a la alta nucleofilia del anillo imidazol situado en posición N7, que queda expuesto en el surco mayor de la doble hélice, ya que no está implicado en el apareamiento de bases guanina-citosina <sup>74</sup>. La unión de cisplatino al ADN genera una marcada curvatura de la doble hélice hacia el surco mayor, lo que se traduce en un desenrollamiento parcial de la molécula de ADN, impidiendo una correcta progresión del ciclo celular <sup>167</sup>. Estas uniones generan además aductos covalentes, siendo los más frecuentes:

- 1,2-d(GpG) intracatenarios entre guaninas adyacentes (47-50%).
- 1,2-d(ApG) intracatenarios entre adeninas y guaninas adyacentes (23-28%).
- d(GNG) intracatenarios, entre guaninas separadas por un número N de bases.
- d(ANG) intracatenarios, entre adeninas y guaninas separadas por un número N de bases.
- Aductos intercatenarios, como por ejemplo G-Pt-G, que unen las dos hebras de la doble hélice de ADN.
- Aductos monofuncionales como Pt(G) y Pt(A).
- Entrecruzamientos proteína-ADN, donde el cisplatino coordina la unión entre una base del ADN y una proteína, como por ejemplo las metalotioneínas (Figura 3) <sup>124</sup>.

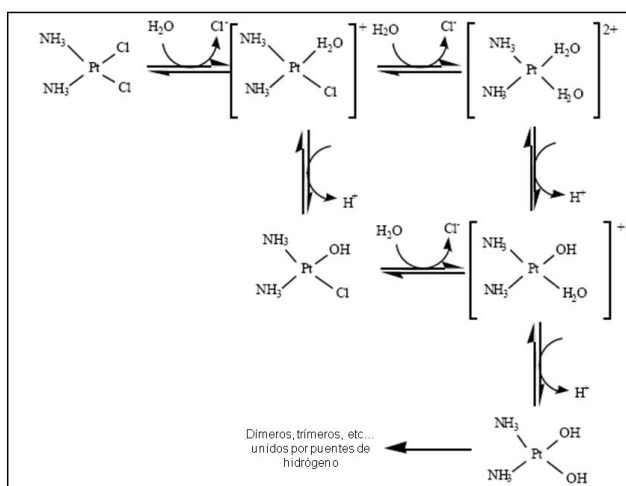


**Figura 3. Aductos formados entre el cisplatino y las bases del ADN.** (a) Unión intercatenaria; (b) unión 1,2 intracatenaria; (c) unión 1,3 intracatenaria; (d) entrecruzamiento proteína-ADN.

## 2.2.- CINÉTICA DEL CISPLATINO EN SOLUCIÓN ACUOSA: DINÁMICA INTRACELULAR

Para ejercer su función, la molécula de cisplatino debe sufrir una serie de modificaciones una vez dentro de la célula tumoral. Dichas modificaciones se engloban en un proceso denominado acuación, basado en el hecho de que el ion platino (II) es capaz de unirse a moléculas en sistemas biológicos que poseen centros donadores de nitrógeno, oxígeno y azufre <sup>103</sup>. El cisplatino es administrado de forma intravenosa (i.v.) como solución en suero salino <sup>124</sup>. Los fluidos extracelulares en la sangre contienen altas concentraciones relativas de cloruros (alrededor de 100 mM), en las cuales el cisplatino permanece en una forma neutra de dicloro no dissociado (Figura 2) <sup>42</sup>. Una vez que el cisplatino entra en la célula (donde existe una concentración mucho más baja de ion cloruro, entre 3 y 20 mM) sufre sucesivas reacciones de hidrólisis, en las cuales los ligandos cloro son sustituidos por moléculas de agua. Las especies mono- y di-acuoaminoplatino (II) cargadas positivamente, son más reactivas que la molécula neutra debido a que la unión Pt-H<sub>2</sub>O es más débil que la unión Pt-Cl <sup>22</sup>. Por lo tanto, las especies acuo reaccionarán más rápidamente con la molécula de ADN, cargada negativamente.

Además de las especies mono y diacuo, otros productos de hidrólisis son también formados dentro de la célula dependiendo del pH, por ejemplo las moléculas de agua unidas pueden desprotonarse para dar complejos hidroxilo. La velocidad de la primera etapa en la hidrólisis del cisplatino es mucho menor que la de reacción de las especies monoacuo con elementos celulares como el ADN. Por lo tanto, esta primera etapa será determinante en la reacción del cisplatino con el ADN. Como se dijo anteriormente, la alta reactividad de las especies acuo se asocia a la debilidad de la unión entre el agua y el platino, lo que hace a estas especies altamente tóxicas <sup>33</sup> y capaces de una coordinación bifuncional (Figura 4) <sup>124</sup>. De todo esto se deduce que la hidrólisis del cisplatino es un proceso necesario para su reacción con el ADN, y por lo tanto para ser efectivo como agente antitumoral <sup>21</sup>.



**Figura 4. Hidrólisis del cisplatino en solución acuosa.** Modificada de Berners-Price *et al.* <sup>22</sup>.

## **2.3.- EFECTOS SECUNDARIOS DEL CISPLATINO**

A pesar de la potente actividad antitumoral del cisplatino su uso en clínica es actualmente limitado, debido tanto a la aparición de resistencias como al desarrollo de numerosos efectos secundarios, siendo los más importantes la nefrotoxicidad, neuropatía periférica, ototoxicidad, alteración de las pruebas sanguíneas (disminución en la concentración de calcio, magnesio y potasio), disminución en el recuento de leucocitos y eritrocitos, náuseas, vómitos y pérdida de apetito <sup>117,132,161</sup>.

Desde el descubrimiento de la capacidad antitumoral del cisplatino (fármaco de primera generación) y su posterior desarrollo como agente anticancerígeno, se han sintetizado multitud de análogos de segunda y tercera generación (carboplatino y oxaliplatino respectivamente) con el fin de ampliar el espectro de acción y, fundamentalmente, de reducir sus efectos secundarios. La realidad de su uso ha mostrado que efectivamente, reducen estos efectos secundarios, aunque también presentan menor eficacia terapéutica <sup>127,161</sup>.

## **2.4.- CISPLATINO Y NEFROTOXICIDAD**

De todos los efectos tóxicos que presenta el cisplatino, uno de los más graves, y en esencia el que más limita su uso clínico, es sin duda la nefrotoxicidad. Aproximadamente, un tercio de los pacientes sometidos a tratamiento con cisplatino experimentan FRA, lo que se traduce en una disminución de la tasa de FG, incremento de nitrógeno ureico (NUS) y creatinina en suero y desbalance electrolítico <sup>65</sup>, que obliga en la mayoría de los casos a detener el tratamiento <sup>55</sup>. De hecho, el 60% de los pacientes se ven obligados a interrumpir su tratamiento en el tercero de los cuatro ciclos habituales de cisplatino. Debido al carácter limitante de la toxicidad renal, en los últimos años se han estudiado numerosos compuestos de muy distinta naturaleza como posibles protectores frente a la nefrotoxicidad producida por cisplatino <sup>38,82,143</sup>, aunque la mayoría de ellos no han superado las pruebas pertinentes para alcanzar su uso en clínica.

### ***2.4.1.- Captación de Cisplatino y Biotransformación en el Túbulo Proximal***

El mecanismo de transporte intracelular de cisplatino no está claramente definido, y se cree que podría variar dependiendo del tipo celular. Estudios previos han concluido que la mitad del cisplatino que entra en las PTEC lo hace mediante difusión pasiva a través de la membrana plasmática <sup>53</sup>. En cuanto al 50% restante, entra en la célula a través de varios sistemas de transportadores, entre los que se encuentran los de la familia de los OCTs, que median el transporte desde la zona basolateral de la célula hasta la zona apical de la misma <sup>32,49,94,117,164</sup>, o el recientemente descrito transportador de cobre de alta afinidad Ctr1, que se sobreexpresa en PTEC, lo que podría explicar la alta toxicidad renal del cisplatino

<sup>69,118</sup>. Además, la concentración de cisplatino en el interior celular también es dependiente de otros transportadores, en este caso encargados de expulsar el fármaco al exterior, y que por lo tanto funcionan como sistemas de detoxificación celular. Entre estos se encuentran los de la superfamilia de transportadores ABC, responsables de la resistencia celular a múltiples fármacos, y el receptor MATE1 <sup>12,164</sup>.

En tumores y otras células con una alta tasa de división los entrecruzamientos cisplatino-ADN son los responsables de producir la lesión citotóxica. Las células no proliferativas sin embargo son menos sensibles a la toxicidad inducida por agentes que dañan el ADN. Aunque las células del túbulo proximal renal son de este tipo, sorprendentemente son selectivamente atacadas por el cisplatino. Se ha afirmado la hipótesis de que esta nefrotoxicidad inducida por cisplatino es resultado de la activación metabólica del mismo en la célula renal. Este metabolismo es iniciado por la conjugación del cisplatino a glutatión. Los conjugados resultantes son metabolizados por las enzimas  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa y cisteína-S-conjugado  $\beta$ -liasa a tioles altamente reactivos, que actúan como potentes nefrotoxinas <sup>151</sup>.

Estos complejos producen nefrotoxicidad dosis-dependiente, desencadenando mecanismos celulares y moleculares de muerte celular, estrés oxidativo (EO) e inflamación <sup>117,163</sup>.

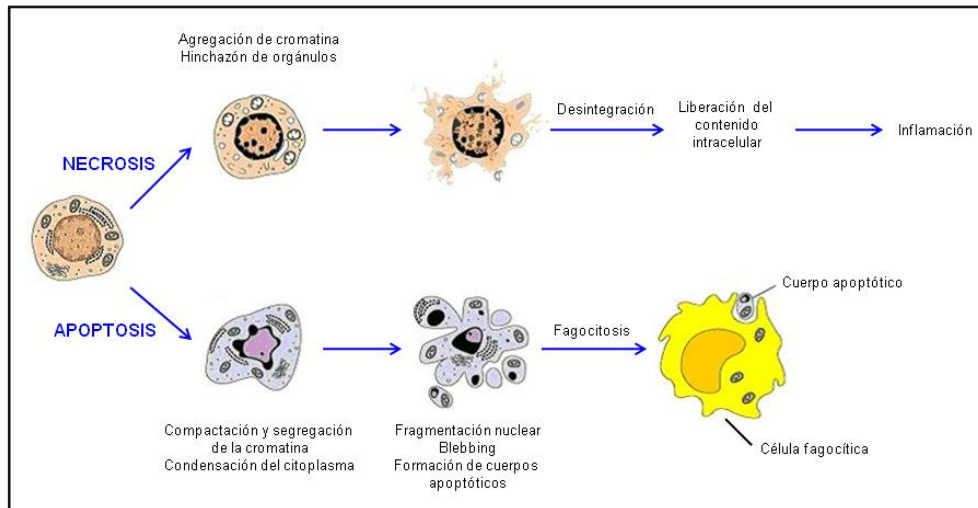
#### **2.4.2.- Fenómenos de Muerte Celular**

La muerte celular puede ser un proceso fisiológico o patológico, que en cualquier caso conduce a la eliminación de la célula. Ocurre tanto en el desarrollo como en el estado adulto, y es un fenómeno necesario para el mantenimiento de la homeostasis en los tejidos sanos y enfermos. El cisplatino induce dos tipos fundamentales de muerte celular: necrosis y apoptosis <sup>98</sup>.

##### **2.4.2.1.- Necrosis**

Es el tipo de muerte celular que ocurre cuando la célula se encuentra en condiciones extremas de lesión celular (condiciones no fisiológicas). Es un proceso pasivo, que no requiere aporte energético por parte de la célula. Se produce un desequilibrio osmótico que altera la membrana plasmática, originando la entrada de agua al interior celular y un aumento del volumen. Esto hace que estallen los orgánulos celulares y que la cromatina forme agregados, produciéndose por último la desorganización tanto de la envoltura nuclear como de la membrana plasmática. Como consecuencia se produce el vertido del contenido intracelular al exterior, lo que desencadena una respuesta inflamatoria local <sup>98</sup>.

En el caso de la nefrotoxicidad inducida por cisplatino, la muerte celular por necrosis únicamente ocurre en presencia de altas concentraciones (milimolar) del fármaco <sup>92</sup>.



**Figura 5. Eventos celulares durante los procesos de necrosis y apoptosis.**

#### 2.4.2.2.- Apoptosis

También denominada muerte celular programada, puede ser un evento natural, o bien inducido por condiciones patológicas. Es un proceso energéticamente activo (dependiente de ATP) en el que se produce una compactación celular, pero manteniendo intacta la estructura de los orgánulos. Además, con el fin de evitar la pérdida del contenido celular, y por lo tanto el daño a células adyacentes, se mantiene durante todo el proceso la funcionalidad de la membrana plasmática. Dicha membrana sufre la aparición de vesículas, burbujas o “blebs” (cuerpos apoptóticos), y experimenta cambios bioquímicos, como variaciones en la disposición de fosfolípidos (externalización de fosfatidilserina, que marcará a los macrófagos la presencia de cuerpos apoptóticos para su fagocitosis) <sup>46</sup>. Otra característica del proceso apoptótico es la condensación citoplasmática producida por la pérdida de iones  $K^+$  y  $Cl^-$ . Dicha pérdida de iones induce una pérdida de agua, lo que se traduce en una disminución del volumen celular <sup>97,98</sup>. Otro rasgo distintivo de la apoptosis es la condensación y posterior fragmentación internucleosomal del ADN observada en el proceso de muerte, que como principal efecto originará la incapacidad celular para la replicación.

Como evento bioquímico más importante durante el proceso de apoptosis, podemos destacar la ruptura específica de un gran número de proteínas, producida por una familia de proteasas denominadas caspasas (cisteín aspartato proteasas), responsables de la eliminación del contacto célula-célula, desestructuración del citoesqueleto, desorganización de la envoltura nuclear, inhibición de la replicación y de las señales de supervivencia o activación de las endonucleasas encargadas de la degradación del ADN.

Una vez concluidos todos estos procesos, los restos celulares son englobados en estructuras denominadas “cuerpos apoptóticos”, que, como se ha comentado anteriormente, serán reconocidos y fagocitados por macrófagos, impidiendo así que se

desencadene una respuesta inflamatoria que resultaría perjudicial para las células adyacentes <sup>98,158</sup>.

Existen dos vías de inducción del mecanismo de apoptosis, la vía intrínseca o mitocondrial y la vía extrínseca o mediada por receptores de muerte.

#### **2.4.2.2.1 Vía Intrínseca o Mitocondrial**

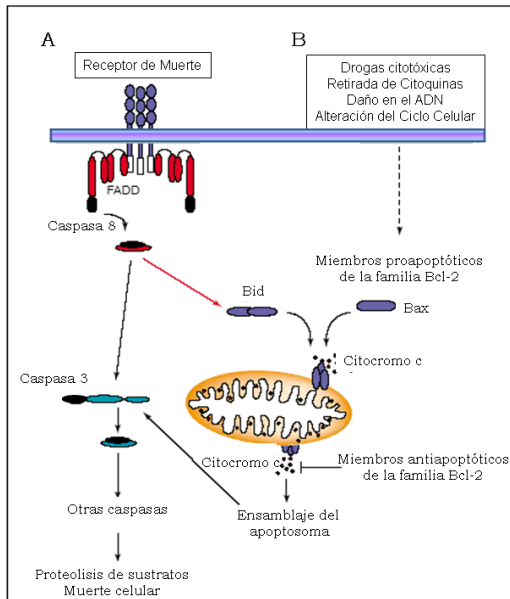
La vía intrínseca es activada en respuesta a un daño en el ADN, alteraciones en el ciclo celular, retirada de citoquinas o factores de crecimiento, o presencia de drogas citotóxicas. La presencia del estímulo activa a los miembros proapoptóticos de la familia de Bcl-2, que promueven la permeabilización selectiva de la membrana mitocondrial, lo que hace que se libere citocromo c y se active la caspasa 9 (iniciadora) a través de Apaf-1 (*Apoptosis Protease-Activating Factor 1*), en un complejo denominado apoptosoma <sup>168</sup>. La caspasa 9 activa rompe sucesivamente las procaspasas 3 y 7, convirtiéndolas en caspasas activas, efectoras finales del proceso de apoptosis <sup>128</sup>. Además del citocromo c, la mitocondria también libera endonucleasa G y el factor de inducción de apoptosis (AIF), que serán transportados al núcleo, donde participarán en la activación de endonucleasas y rotura del ADN <sup>36,75</sup>.

#### **2.4.2.2.2 Vía Extrínseca o de Receptores de Muerte Celular**

Esta vía es desencadenada por la unión de ciertas citoquinas o ligandos a un receptor transmembrana perteneciente a la superfamilia de los receptores para el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), Fas y TRAIL <sup>139</sup>. Una de estas asociaciones es la constituida por el receptor Fas (CD95 o Apo-1) y su ligando (FasL). Este último se une al receptor Fas en la misma célula o en células adyacentes. El complejo Fas-FasL se localiza en las balsas de colesterol. Cuando tres complejos trimerizan, sus dominios de muerte intracelulares se unen a una proteína adaptadora que a su vez contiene un dominio de muerte citosólico FADD (*Fas-associated death domain*) <sup>10</sup>. FADD se fija a la procaspasa 8, que es activada a caspasa 8 y que a su vez activará la caspasa 3, proteasa efectora de la apoptosis.

Ambas vías se relacionan mediante la proteína Bid, que es activada mediante ruptura por caspasa 8, dando como resultado su forma truncada (tBid), que se transloca a la mitocondria activando a las proteínas Bax y Bak (proteínas proapoptóticas de la familia de Bcl-2), desencadenando la vía intrínseca mediante permeabilización de la membrana mitocondrial <sup>4,5</sup>. En cuanto a la vía de los receptores de muerte, esta permeabilización se emplea como un bucle amplificador de la señal para activar las caspasas efectoras (Figura 6) <sup>60,91,96</sup>.





**Figura 6. Rutas de muerte celular por apoptosis.** Modificada de *Adrain et al.* 7. A) Ruta extrínseca o mediada por receptores. B) Ruta intrínseca o mitocondrial

En el proceso de apoptosis existen dos familias de proteínas clave: las caspasas, que actúan como efectores finales del proceso, y la familia de proteínas de Bcl-2, que actúan como reguladoras, y que incluyen tanto elementos proapoptóticos (Bax, Bid) como antiapoptóticos (Bcl-2, Bcl-XL).

En cuanto a la nefrotoxicidad inducida por cisplatino, la apoptosis ocurre en presencia de bajas concentraciones (micromolar) del fármaco, y tiene lugar a través de ambas vías <sup>92,163</sup>.

### 2.4.3.- Fenómenos de Estrés Oxidativo

El EO es el estado en el que existe un desequilibrio entre las especies oxidantes y los sistemas de defensa antioxidante a favor de las primeras <sup>6</sup>.

Los radicales libres de  $O_2$  también denominados especies reactivas de  $O_2$  (ROS), son los principales efectores del EO causando entre otros efectos daño renal <sup>138,150</sup>. Son átomos o moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado en el orbital externo, siendo de esta manera altamente reactivos. Son generados entre otras causas a partir de reacciones redox en el metabolismo aeróbico celular por medio de enzimas como NAD(P)H oxidasa, xantina-oxidasa, el desacoplamiento de la óxido nítrico sintasa, etc <sup>54,59,66</sup>. Entre los más importantes destacan el radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), el hidroxilo ( $\bullet OH$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el  $O_2$  singlete ( $^1O_2$ ) y el peroxinitrito ( $ONOO^{\bullet}$ ). Bajo condiciones patológicas existe una elevada bioactividad de las ROS, reaccionando directamente con componentes celulares y causando daño sobre lípidos, proteínas y ADN, dando lugar a lesiones celulares importantes como peroxidación lipídica o inflamación <sup>51,67</sup>.

El sistema antioxidante protege a los tejidos de las ROS. Los sistemas enzimáticos comprenden a superóxido dismutasas (SODs), que transforman  $O_2^{\bullet-}$  en  $H_2O_2$ , y catalasa y glutatión peroxidasa, que reducen el  $H_2O_2$  hasta agua <sup>159</sup>. La

tioredoxina y tioredoxina reductasa catalizan también la regeneración de diversas moléculas oxidantes <sup>113</sup>.

El EO es ampliamente reconocido como factor que contribuye a la nefrotoxicidad inducida por cisplatino. Se ha observado tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo*, que durante el tratamiento con cisplatino se produce un incremento renal de ROS <sup>117</sup>. Se han propuesto varios mecanismos que podrían explicar dicho incremento de ROS en situaciones patológicas. En primer lugar, que el cisplatino una vez en la célula sufre un proceso de acuación que lo convierte en una forma altamente reactiva que reacciona con moléculas que contienen grupos tiol, como el glutatión, reconocido antioxidante celular <sup>13,141</sup>. Esta reacción hace que o bien disminuya la concentración de glutatión en el medio intracelular, o bien que esta molécula se inactive. En cualquier caso se produce una descompensación del equilibrio redox celular, acumulándose ROS endógenas que producen EO. El segundo mecanismo consiste en el incremento de ROS endógenas producidas por la mitocondria como consecuencia de la interrupción parcial de la cadena respiratoria durante el proceso de apoptosis. Finalmente se ha postulado que la presencia de cisplatino induce la producción de ROS en los microsomas, por la vía del citocromo P450 (CYP), que funciona como fuente de hierro catalítico para la formación de los mismos <sup>18-20</sup>.

#### **2.4.4.- Fenómenos de Inflamación**

La inflamación se define como una respuesta biológica compleja de los tejidos ante estímulos perjudiciales como patógenos, células dañadas, tóxicos o irritantes. Además, puede ser considerada como un “intento” por parte del organismo de retirar el estímulo dañino, así como de iniciar el proceso de recuperación del tejido <sup>28</sup>. No es una respuesta específica, y ocurre fundamentalmente en tejidos altamente vascularizados. Durante el proceso de inflamación son liberados al foco diversos mediadores proinflamatorios, que son moléculas en la mayoría de los casos de estructura elemental (histamina, enzimas proteolíticas, etc...) sintetizadas y liberadas por el mastocito en respuesta a estímulos. Estas moléculas producen alteraciones vasculares y efectos quimiotácticos que favorecen la llegada de células (macrófagos, linfocitos, etc...) y de otros componentes como inmunoglobulinas, factores de coagulación y proteínas de fase aguda. Estas células liberan a su vez citoquinas como interleuquinas (IL), interferones (IFN), factores de necrosis tumoral (TNF), etc, que regulan la respuesta inflamatoria en última instancia <sup>8,85,123</sup>.

La inflamación juega un papel fundamental en la patogenia de la nefrotoxicidad inducida por cisplatino. De hecho, la presencia de cisplatino en la célula activa la vía del factor nuclear kappa B (NFκB), que participa activamente en la respuesta inmune y la inflamación. Cisplatino incrementa la degradación del inhibidor del factor (IκB) por fosforilación, ubiquitinación y entrada en el proteasoma, liberando el dímero p50-p65 (NFκB activo) que viaja hasta el núcleo, donde se une al ADN,

promoviendo la expresión coordinada de numerosos genes que codifican proteínas, citoquinas, moléculas de adhesión y enzimas <sup>146,163</sup>.

Todo esto produce un incremento en la expresión (tanto en PTEC como en células de infiltrado inflamatorio) de TNF $\alpha$ , así como de otras citoquinas proinflamatorias como TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor- $\beta$* ), MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*), ICAM (*Intercellular Adhesion Molecule*), hemooxigenasa-1, y los receptores 1 y 2 de TNF (TNFR1 y TNFR2), receptores de muerte situados en las balsas de colesterol.

TNF $\alpha$  lidera el daño renal en presencia de cisplatino mediante la inducción de apoptosis (por su vía extrínseca ya que sus receptores de muerte se encuentran situados en las balsas de colesterol), producción de ROS y coordinación de un amplio abanico de quimioquinas y citoquinas en el riñón <sup>117,163</sup>.

La nefrotoxicidad inducida por cisplatino es mediada en última instancia por las vías intracelulares de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), que regulan eventos de proliferación celular, diferenciación y supervivencia. Las tres vías principales son las que finalizan en las proteínas ERK (*extracellular regulated kinase*), p38 y JNK/SAPK (*Jun-N-terminal kinase/stress-activated protein kinase*). Estas tres vías son activadas en respuesta a estímulos como la presencia de factores de crecimiento, ROS, radiación ultravioleta (UV), hiperosmolaridad y citoquinas proinflamatorias, y sus principales consecuencias son la activación de caspasa 3 y la estimulación de la producción de TNF $\alpha$ , lo que desemboca en esencia en la muerte celular <sup>163</sup>.

### **3.- CILASTATINA**

#### **3.1.- IMIPENEM-CILASTATINA**

##### **3.1.1.- Perspectiva histórica**

El imipenem fue introducido en el mercado en 1985, siendo el primer antibiótico de la familia de los carbapenemes. Es un derivado de la tienamicina, cuya estructura química fue modificada para aumentar su estabilidad. Pertenece a la clase de los  $\beta$ -lactámicos, y su espectro de acción abarca microorganismos tanto Gram-positivos como Gram-negativos, aerobios, anaerobios, etc...

El imipenem al igual que otros antibióticos de la misma familia, sufre un extenso metabolismo dependiente de la especie, que se traduce en una baja recuperación de la droga activa en orina <sup>23</sup>. Estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro* demostraron que dicho metabolismo ocurría en el riñón, concretamente en el borde en cepillo de las PTEC, a través de una enzima denominada dehidropeptidasa I (DHP-I) <sup>43,162</sup>. Esta enzima, que es la única  $\beta$ -lactamasa conocida en vertebrados superiores, actúa hidrolizando el anillo  $\beta$ -lactámico del imipenem, inactivándolo

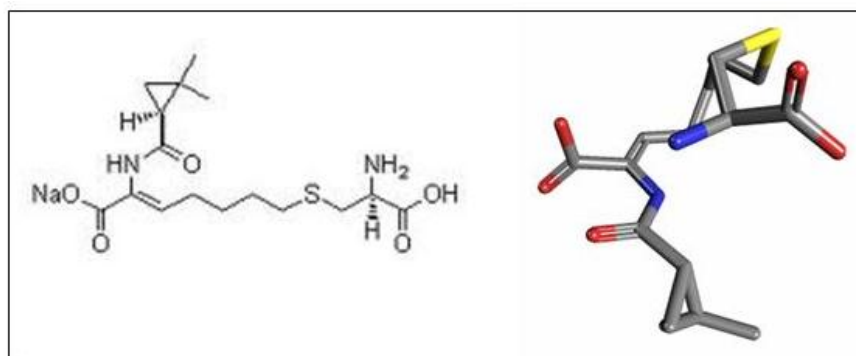
mediante un fenómeno denominado metabolismo post-excretor, que sin embargo no afecta a otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos, como penicilinas o cefalosporinas <sup>76</sup>.

El espectro antibacteriano del imipenem era idóneo para tratar patógenos Gram-negativos, fundamentalmente en sepsis de origen intestinal o renal. Pero la degradación renal del antibiótico provocaba concentraciones subóptimas del fármaco activo en el tracto urinario <sup>81</sup>, limitando su uso en el tratamiento de infecciones sistémicas. Todo esto, unido a que altas concentraciones de imipenem en el túbulo proximal pueden resultar tóxicas, llevó a sintetizar un inhibidor de la DHP-I, lo que desembocó en el desarrollo de la cilastatina <sup>114</sup>.

### **3.1.2.- Cilastatina: estructura y función**

Cilastatina es la sal monosódica del ácido [R-[R\*, S\*-(Z)]]-7-[(2-amino-2-carboxietil)tio]-2-[[[(2,2-dimetilciclopropil)carbonil]amino]-2-heptenoico (Figura 7). Su fórmula empírica es C<sub>16</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>5</sub>S y tiene un peso molecular de 380,44 Da. Es un compuesto amorfo, de color blanquecino a blanco amarillento, higroscópico y muy soluble tanto en agua como en metanol <sup>40</sup>.

La cilastatina actúa como inhibidor competitivo reversible de la DHP-I, impidiendo que ésta hidrolice enlaces peptídicos y que rompa el anillo  $\beta$ -lactámico del imipenem. Esto evita que se metabolice el fármaco a una forma inactiva y que sea absorbido por la célula tubular, aumentando la concentración de imipenem activo en orina <sup>23,34</sup>. De hecho, coadministrando cilastatina con imipenem se alcanza una tasa de excreción urinaria del antibiótico del 70% de la dosis inicial.



**Figura 7. Estructura química de la cilastatina**

Se ha establecido como dosis óptima una relación 1:1 de imipenem/cilastatina (I/C) para mantener inhibida la DHP-I durante un intervalo de 8 a 10 horas <sup>114</sup>. El pico en sangre de I/C se alcanza inmediatamente después de la infusión, manteniéndose durante 4 ó 6 horas. La concentración en suero y la biodisponibilidad parecen aumentar linealmente con la dosis. Además, estudios farmacocinéticos con múltiples dosis han demostrado que el fármaco no se acumula en individuos sanos (Tabla 3).

<b>Valores farmacocinéticos de cilastatina coadministrada con imipenem 1:1*</b>	
Volumen de distribución en el compartimento central	0.14 ± 0.03 L/Kg
Concentración plasmática 1h post-infusión i.v	19.1 ± 46 µg/mL
Vida media de eliminación	0.84 ± 0.1 horas
Aclaramiento plasmático	12.4 ± 1.1 L/hora por 1.73m <sup>2</sup>
Aclaramiento renal	8.0 ± 1.2 L/hora por 1.73m <sup>2</sup>

**Tabla 4. Valores farmacocinéticos de cilastatina con imipenem.** \*Datos extraídos de Drusano *et al* <sup>41</sup>.

Para demostrar que efectivamente existía una interacción entre cilastatina y DHP-I, se midió la conversión de leukotrieno D4 a leukotrieno E4 llevada a cabo por la enzima, comprobando que este proceso se inhibía en presencia de cilastatina y demostrando su especificidad por DHP-I <sup>25,80</sup>.

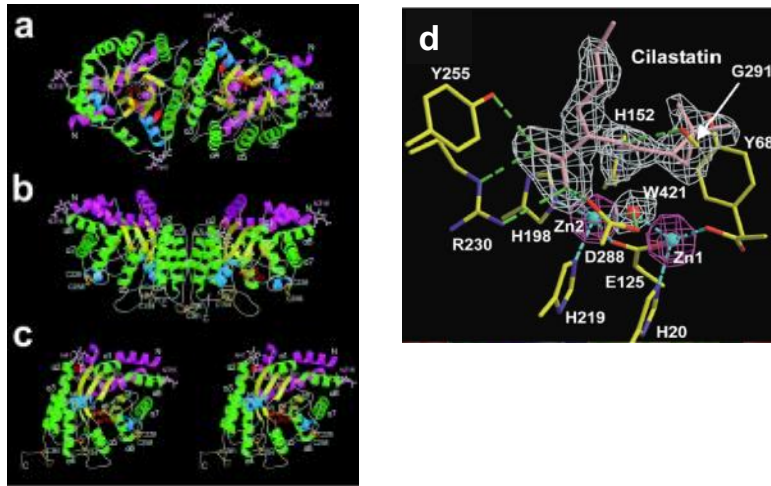
Además, cilastatina también es capaz de inhibir de forma selectiva y dosis-dependiente a los OAT, situados a nivel basolateral en las células del segmento S2 del túbulo proximal renal <sup>44,145</sup> y encargados de la captación activa de fármacos y sustancias endógenas de la sangre y su transporte al interior celular <sup>86</sup>. Este efecto es mínimo a las concentraciones plasmáticas que se alcanzan en la práctica clínica y parece ser independiente del causado sobre DHP-I, pero puede contribuir a elevar las concentraciones de imipenem en plasma bajo condiciones suprafarmacológicas.

### **3.2.- DEHIDROPEPTIDASA I**

#### **3.2.1.- Estructura, localización y función**

La DHP-I (dipeptidasa microsomal ó EC 3.4.13.19) es una glicoproteína encargada de hidrolizar el enlace peptídico en los dipéptidos presentes en la orina. Actúa después de otras proteasas del borde en cepillo y resulta esencial en la recuperación proximal de aminoácidos <sup>3,26</sup>. Se localiza principalmente en el borde en cepillo de las PTEC, aunque también se ha descrito en pulmones, gránulos de zimógeno del páncreas exocrino y adipocitos de humano, cerdo y rata <sup>70</sup>.

Estructuralmente, la DHP-I es un homodímero formado por dos subunidades ( $\alpha,\beta$ ) constituídas cada una por un péptido de 369 aminoácidos (42 KDa). Las subunidades tienen cuatro posibles lugares de glicosilación y puede presentar una forma altamente glicosilada de 63 KDa (Figura 8). El sitio activo de cada una de ellas está compuesto por iones de zinc orientados hacia las microvellosidades del túbulo renal <sup>112</sup>.



**Figura 8. Vista global de DHP-I.** (a) Estructura dimérica de la región de unión a la membrana. (b) Dímeros vistos con una rotación de 90° a lo largo del eje largo. (c) Representación de una subunidad del monómero. (d) Ligando cilastatina unido al centro activo de DHP-I. Tomada de Nitanai *et al.* <sup>112</sup>.

La DHP-I se ancla a la membrana mediante un enlace covalente con un residuo glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) <sup>2,48,144</sup>. Estos residuos se localizan típicamente en dominios de membrana con características especiales, conocidos como balsas de colesterol (BDC) <sup>105</sup>.

### 3.2.2.- Balsas de colesterol

Las BDC son dominios de membrana ricos en colesterol y glicoesfingolípidos, altamente resistentes a su extracción por detergentes no iónicos, que compartimentalizan procesos celulares. Los glicolípidos presentes en estas BDC se asocian por sus largas cadenas aciladas formando agrupaciones compactas estabilizadas por puentes de hidrógeno. El colesterol se intercala entre las cadenas hidrocarbonadas disminuyendo su flexibilidad, compactando la estructura de la bicapa y modificando la fluidez de esta última <sup>101</sup>. Pero las BDC no son estructuras constantes, sino que son grupos heterogéneos de distintos dominios que difieren tanto en su composición lipídica y proteica como en su estabilidad temporal <sup>122</sup>.

Las BDC están implicadas en procesos de transporte a través de la membrana, endocitosis, señalización y transducción de señales <sup>166</sup>, debido tanto a su localización como a su composición (contienen numerosas enzimas, receptores de membrana, etc...) e interaccionan con numerosas vías de transducción de señales implicadas en distintos procesos como apoptosis o señalización celular <sup>37</sup>.

## 3.3.- EVIDENCIAS DE NEFROPROTECCIÓN POR CILASTATINA

Aunque el objetivo inicial del diseño de la molécula de cilastatina era encontrar un compuesto que inhibiera el efecto de DHP-I sobre el imipenem, se han obtenido en la literatura evidencias posteriores de interacciones de cilastatina con otros fármacos a nivel renal.

### 3.3.1.- Interacción con ciclosporina A

La ciclosporina A (CsA) es un endecapéptido cíclico lipofílico descubierto en 1969 como antifúngico. Hasta el año 1972 no se demostró su potente actividad

inmunosupresora, utilizándose por primera vez en la clínica en 1978 <sup>24</sup> y aprobándose su uso definitivo como inmunosupresor en 1983 <sup>1</sup>. Su introducción mejoró notablemente la terapia inmunosupresora tanto en los trasplantes de órganos sólidos y de médula ósea, como en numerosas enfermedades autoinmunes. Sin embargo, CsA presenta un importante efecto secundario, la nefrotoxicidad, que afecta tanto al riñón nativo (trasplante hepático, cardíaco o de médula ósea), como al riñón trasplantado (trasplante renal) <sup>24</sup>.

En 1987 fueron presentadas las primeras evidencias de que la asociación de I/C al tratamiento con CsA producía una disminución de la alteración de la función renal en ratas, modificando el comportamiento farmacocinético de la CsA y disminuyendo su toxicidad a nivel renal <sup>142</sup>. En 1989, Hammer repitió estas experiencias en ratas sometidas a trasplante renal. Las ratas trasplantadas que recibían CsA tenían mejor función renal que las trasplantadas que no la recibían, pero además, si se asociaba I/C a la CsA, la creatinina plasmática en estos animales resultaba ser significativamente inferior <sup>64</sup>. En 1994, Markewitz mostró la primera evidencia del posible efecto protector de I/C contra la nefrotoxicidad por CsA, en humanos sometidos a trasplante cardíaco. Se realizó un ensayo clínico prospectivo, aleatorizado, controlado con placebo y ciego sobre 28 pacientes receptores de trasplante cardíaco y observaron una disminución significativa de la creatinina en los trasplantados que utilizaron I/C. Además, a diferencia del resto de grupos, los pacientes del grupo I/C no precisaron hemofiltración o hemodiálisis, lo que demostró que la administración de I/C podría contrarrestar de manera eficaz la toxicidad renal producida por CsA inmediatamente después de un trasplante cardíaco <sup>99</sup>. El siguiente estudio en humanos fue publicado en 1995, y su objetivo fue deducir si el efecto nefroprotector de I/C observado por Markewitz se debía al uso de un antibiótico cualquiera o bien a I/C en concreto. Así, el ensayo se realizó en 20 pacientes trasplantados de corazón y pulmón y tratados con CsA como inmunosupresor. Los pacientes se dividieron en dos grupos de 10 individuos, siendo uno de los grupos tratado con I/C y el otro con un agente antimicrobiano distinto. El grupo tratado con I/C presentó niveles de creatinina sérica significativamente inferiores a los del otro grupo <sup>17</sup>. En 1996, Gruss realizó un estudio retrospectivo sobre 104 pacientes para valorar los factores de riesgo de fallo renal asociados al trasplante de médula ósea inmunosuprimido con CsA. Encontró un efecto protector significativo asociado al uso de I/C con una disminución significativa en la aparición de FRA <sup>61</sup>. Carmellini en 1997 realizó un estudio aleatorizado sobre 79 trasplantes renales tratados con CsA, tratando a 33 con I/C y observando un efecto protector de I/C frente a la nefrotoxicidad inducida por CsA <sup>27</sup>. Mraz sugirió que el efecto nefroprotector de cilastatina se debía a la reducción de las concentraciones de CsA <sup>107,108</sup>. Sin embargo, Markewitz, Sido y Hammer no encontraron diferencias significativas en las dosis o niveles sanguíneos de CsA o sus metabolitos <sup>64,142</sup>. Por su parte Gruss observó que los

pacientes tratados con I/C tenían niveles de CsA mayores que los pacientes no tratados con I/C. Sin embargo, el efecto protector de cilastatina no se pudo atribuir a cambios en los niveles de CsA. Desde 1997 no se ha publicado ningún otro trabajo (*in vitro* o *in vivo*) destinado a describir posibles interacciones entre CsA e I/C. En 2004 nuestro grupo demostró con experimentos *in vitro* que cilastatina es capaz de proteger a las células renales de la agresión por inhibidores de la calcineurina (CsA y FK506), aportando además nuevos hallazgos con respecto al mecanismo por el cual se lleva a cabo dicha protección, y postulando que esta se debía a que la unión de cilastatina con su ligando (DHP-I) resultaba en cambios estructurales en la membrana que a su vez impedían la entrada del fármaco al interior celular <sup>121</sup>. Por último, en 2006 nuestro grupo realizó una revisión crítica de la literatura, llevando a cabo un metaanálisis sobre los cinco trabajos clínicos y los dos experimentales previamente mencionados. El resultado del metaanálisis mostraba que I/C reducía en un 43% los niveles de creatinina en suero elevados por CsA, y en un 76% el riesgo de desarrollar FRA por CsA <sup>149</sup>.

### **3.3.2.- Interacción con vancomicina**

Vancomicina es un glicopéptido de estructura compleja empleado como bactericida contra bacterias Gram-positivas. La incidencia de nefrotoxicidad asociada al tratamiento con vancomicina es baja (5-15%) cuando la función renal es normal y el antibiótico es administrado solo <sup>56,133</sup>. Sin embargo, esta incidencia aumenta en situaciones de insuficiencia renal y cuando se combina con aminoglucósidos o CsA <sup>29,133</sup>. En 1996, Toyoguchi demostró que la administración de antibióticos tales como fosfomicina ó I/C reducía la nefrotoxicidad de vancomicina en conejos, inhibiendo la acumulación renal de la misma <sup>154</sup>. Un año después, mediante experimentos realizados con cilastatina sola en conejos, consiguió demostrar que esta era capaz de acelerar la eliminación renal de vancomicina, reduciendo su concentración tanto en plasma como a nivel de tejido renal, consiguiendo reducir o incluso eliminar su efecto nefrotóxico <sup>155</sup>. Kusama confirmó en ratas en 1998 los mismos resultados obtenidos por Toyoguchi en conejos <sup>83</sup>, y propuso que la disminución de la toxicidad producida por cilastatina era debida a una interacción competitiva de esta con vancomicina por la vía de entrada a las PTEC. Estos estudios fueron ampliados por Nakamura, que confirmó que I/C y fosfomicina eran capaces de disminuir la toxicidad renal inducida por vancomicina, aunque no fue capaz de proponer un mecanismo definitivo <sup>110,111</sup>.

### **3.3.3.- Interacción con cisplatino**

En toda la literatura tan solo se encuentra un estudio relativo a las interacciones entre I/C y cisplatino. Fue realizado por Nakamura en 1999, quien administró cisplatino (5 y 10 mg/Kg) a ratas en combinación con I/C (150/150 mg/Kg), pero sus resultados no demostraron protección por I/C frente a la toxicidad renal producida por cisplatino <sup>111</sup>.



### **III.- *HIPÓTESIS***

---

## **HIPÓTESIS I**

Cilastatina es capaz de reducir la toxicidad renal dosis-dependiente inducida por el tratamiento con cisplatino tanto *in vitro* (en cultivos de células epiteliales de túbulo proximal) como *in vivo* (en un modelo de toxicidad renal en rata), sin afectar al efecto anticancerígeno del fármaco.

## **HIPÓTESIS II**

La protección renal llevada a cabo por cilastatina se relaciona directamente con su característica de ligando de la dehidropeptidasa I, presente de forma específica en las balsas de colesterol del borde en cepillo de las células del túbulo proximal renal. Así, al interactuar con la enzima, cilastatina interfiere con dos aspectos fundamentales en la toxicidad por cisplatino:

- En primer lugar con la fracción del transporte y acumulación intracelular del fármaco, que se produce a través de las balsas de colesterol.
- En segundo lugar con las vías reguladoras de muerte celular por apoptosis mediadas a nivel de las balsas de colesterol, interactuando con los receptores de muerte, desencadenantes de estas vías y presentes en dichas estructuras de la membrana celular.

## **IV.- OBJETIVOS**

---

## **OBJETIVO PRINCIPAL**

El objetivo principal de esta tesis es estudiar las bases celulares y moleculares del efecto protector de cilastatina frente a la toxicidad renal inducida por el tratamiento con cisplatino. Este objetivo general se puede desglosar en los siguientes objetivos concretos:

## **OBJETIVOS CONCRETOS**

- Comprobar experimentalmente mediante un modelo celular de toxicidad renal por cisplatino el efecto de cilastatina sobre la apoptosis y el estrés oxidativo.
- Demostrar la especificidad de la protección de cilastatina a nivel de túbulo proximal.
- Comprobar a través de un modelo *in vitro* en células tumorales, que cilastatina no interfiere con la acción tumoricida de cisplatino.
- Estudiar la nefroprotección llevada a cabo por cilastatina *in vivo*, en un modelo de fracaso renal agudo tóxico inducido por cisplatino. Efectos sobre la apoptosis, inflamación y estrés oxidativo.

## ***V.- MATERIALES Y MÉTODOS***

---

## **V.I.- *EXPERIMENTOS IN VITRO***

---

## **1.- FÁRMACOS EN ESTUDIO**

### **1.1.- CISPLATINO**

Agente quimioterapéutico basado en platino, adquirido como solución inyectable (concentración 1 mg/mL) a Pharmacia (grupo Pfizer, Nueva York, EEUU).

### **1.2.- CILASTATINA**

Fue amablemente cedida en forma de polvo por Merck Sharp & Dohme (MSD, Madrid, España).

## **2.- CULTIVOS CELULARES**

### **2.1.- CÉLULAS RENALES**

Los estudios *in vitro* fueron realizados en su mayor parte en PTEC obtenidas a partir de cultivos primarios de riñones de cerdos enanos (estirpe *Maryland*). Estos cerdos se caracterizan por ser homocigotos para el Complejo Mayor de Histocompatibilidad, y han sido seleccionados genéticamente para realizar estudios de trasplante de órganos<sup>134</sup>. Los animales procedían de la granja especializada del Complejo Agropecuario de Aranjuez del Instituto Tecnológico de Desarrollo Agrario (ITDA) de la Consejería de Medio Ambiente de la Comunidad de Madrid.

Los animales seleccionados para los estudios tenían una edad media de 3 meses y un peso medio de  $31,3 \pm 0,7$  kg, siendo indistintamente machos o hembras.

Todo el manejo de los animales de experimentación se realizó siguiendo la normativa legal vigente (Real Decreto 1201/2005, del 10 de Octubre, 252/2005), con ayuda de personal cualificado y bajo la supervisión directa del veterinario responsable.

#### **2.1.1.- Aislamiento de Túbulo Proximal**

Doce horas antes de la intervención, los cerdos fueron sometidos a ayuno con agua *ad libitum*. El animal fue premedicado 15 minutos antes de la cirugía con ketamina 10 mg/kg peso y atropina 0.025 mg/kg i.m., anestesiado con una dosis de inducción de propofol 10 mg/kg i.v. e intubado. La anestesia durante la cirugía se mantuvo con peróxido de nitrógeno/oxígeno (4 L/min NO<sub>2</sub> y 2 L/min O<sub>2</sub>), propofol (Diprivan®) 15 mg/kg/h, fentanilo (Fentanest®) 0.75 mg/20min y bromuro de pancuronio (Pavulon®) 2 mg/20 min. Tras la intervención el animal se sacrificó con sobredosis anestésica y KCl.

El riñón se extrajo en quirófano bajo condiciones de esterilidad mediante nefrectomía simple unilateral por vía transperitoneal. Una vez extraído, se sumergió inmediatamente en HAM'S F12 frío (Bio-Whittaker Verviers, Bélgica) a 4°C con penicilina (100U/mL) / estreptomina (100µg/mL) (Bio-Whittaker).

Bajo una campana de flujo laminar (Gelaire Flow Laboratories, modelo BSB 3A), el riñón se decapsuló y se separaron corteza y médula. La corteza se cortó en finas láminas con ayuda de un microtomo Steadie-Riggs (Thomas Scientific, EEUU). Las láminas se incubaron con colagenasa A (30 mg/riñón) (Sigma-Aldrich, S. Louis, MO, EEUU) (30 mg/riñón) diluida en HAM'S F12 (50 mL/riñón, concentración final de colagenasa 0.6 mg/mL) durante 20 ó 30 minutos en agitación a 37°C, equilibradas con carbógeno a saturación. La digestión se paró con HAM'S F12 frío. El producto digerido se filtró a través de una malla metálica de 250 µm (Endecotts LTD) y se lavó tres veces con HAM'S F12 a 1000 revoluciones por minuto (rpm) en una centrifuga (Jouan BR4i, DJB Labcare, Buckinghamshire, Reino Unido) durante 2 minutos. El sedimento final presenta una pureza del 80% de túbulos proximales.

Para aumentar la pureza y eliminar contaminantes, el sedimento se sometió a un gradiente de Percoll (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Suecia) isotónico al 45% en tampón Krebs-bicarbonato (NaCl 112 mM, KCl 3.3 mM, PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K 1.2 mM, MgSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O 1.2 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM, 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>) centrifugándose a 13000 rpm a 4°C durante 30 minutos (Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, Rotor SS-34), generándose un gradiente de densidad en el que se separan en diferentes fracciones los segmentos corticales de la nefrona (Figura 9). En la cuarta banda desde el menisco se encuentran los túbulos proximales con una pureza superior al 98%. Esta banda se recogió con pipeta Pasteur estéril y se lavó 3 veces con HAM'S F12 frío a 1000 rpm para eliminar los restos de Percoll. Para conocer el rendimiento se pesó el sedimento resultante del último lavado.



**Figura 9. Aislamiento de túbulos proximales.** Gradiente de Percoll isotónico al 45% obtenido tras la centrifugación a 20000 g durante 30 minutos a 4°C. El tubo de la izquierda contiene marcadores de densidad. En el tubo de la derecha se ha cargado la corteza de un riñón digerida con colagenasa. La fracción 1 contiene glomérulos, 2 y 3 túbulos distales de distinta longitud y 4 túbulos proximales con una pureza del 98%. A la derecha, túbulos proximales obtenidos en la fracción 4.

### **2.1.2.- Cultivo Primario de Células de Túbulo Proximal**

Los túbulos proximales obtenidos, se resuspendieron a una concentración final de 0.66 mg/mL en un medio de cultivo compuesto de HAM'S F12:DMEM (Bio-Whittaker) en proporción 1:1 y suplementado con HEPES 25 mM (Bio-Whittaker), glutamina 2.5 mM (Bio-Whittaker), aminoácidos no esenciales 1% (Bio-Whittaker),



penicilina 100 U/mL, estreptomina 100 µg/mL (Bio-Whittaker), suero bovino fetal (SBF) 2% (Sigma-Aldrich), bicarbonato sódico 20 mM (Merck), hidrocortisona  $5 \cdot 10^8$  M (Sigma-Aldrich), insulina 5 µg/mL, transferrina 5 µg/mL y selenio 5 ng/mL (Sigma-Aldrich). Finalmente se repartieron 5 mL de la suspensión en placas de cultivo de 60 mm de diámetro con una superficie tratada para una óptima adherencia celular (Corning, Nueva York, EEUU). Las placas se mantuvieron en un incubador (Heraeus) a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Hasta el cuarto día no se realizó el primer cambio de medio para permitir la adhesión de las PTEC. A partir del cuarto día, el medio de cultivo se renovó cada 2-3 días. Las células alcanzaron la confluencia entre 8-10 días y comenzaron a presentar senescencia a los 12-13 días.

### **2.1.3.- Cultivo Secundario de Células de Túbulo Proximal**

Las células no utilizadas de inmediato fueron congeladas. Una vez alcanzada la confluencia, se retiró el medio de cultivo y se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) 1X (AccuGENE, Verviers, Bélgica). Se retiró éste y se añadió 1 mL de tripsina (Invitrogen Carlsbad, CA, EEUU), por placa de 60 mm. Se dejó actuar la tripsina hasta que las células comenzaron a despegarse (1-2 minutos). Se recogieron en medio de cultivo y se lavaron a 1500 rpm durante 2 minutos. Por cada grupo de tres placas de 60 mm, se añadió al sedimento 1,5 mL de SBF repartiéndose en viales de congelación con dimetil-sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) al 10% para preservar las estructuras celulares. Las PTEC fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido.

El proceso de descongelación de las células se llevó a cabo pasando el vial de congelación directamente del nitrógeno líquido a un baño a 37°C. Cuando el contenido empezó a descongelarse, se diluyó en medio de cultivo y se centrifugó a 1500 rpm durante 2 minutos para eliminar el DMSO. El sedimento resultante tras la centrifugación se diluyó en medio de cultivo (1 vial/100 mL) y se sembró en placas.

## **2.2.- CÉLULAS NO RENALES**

Para la mayoría de los experimentos con células no renales se emplearon las células HeLa, línea celular establecida de cáncer de útero humano. Las células fueron cedidas amablemente por el laboratorio del Dr. Fernando Valdivieso del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa.

Con el fin de apoyar los resultados obtenidos en los experimentos con células HeLa, se utilizaron otras líneas celulares procedentes de distintos tumores, en este caso de mama (SK-BR-3 y MDA-MB-231), colon (LoVo y HCT-116) y vejiga (253J), todos ellos diana terapéutica de cisplatino. Estas líneas celulares fueron cedidas por el laboratorio del Dr. Francisco del Real del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO).

### **3.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS DEHIDROPEPTIDASAS I Y IV**

Cultivos confluentes de PTEC fueron incubados durante 18 horas en presencia/ausencia de cilastatina (200 µg/mL) con los sustratos gly-phe-*p*-nitroanilida o gly-pro-*p*-nitroanilida 1 mM (Sigma-Aldrich) en PBS para la determinación de la actividad de DHP-I o DHP-IV respectivamente. El producto resultante de la actividad enzimática (*p*-nitroanilida) fue cuantificada en los sobrenadantes celulares mediante medida de la absorbancia a 410 nm y posterior interpolación en una recta patrón de concentraciones conocidas.

Para la determinación de la actividad de DHP-I en células HeLa se procedió del mismo modo que para las PTEC, siempre en ausencia de cilastatina.

### **4.- ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA CELULAR Y NUCLEAR**

Para detectar evidencias de muerte celular se observó la morfología de las células usando un microscopio de contraste de fases Olympus IX70 (Olympus, Hamburgo, Alemania), tras su tratamiento con cisplatino (1, 10 y 30 µM) en presencia/ausencia de cilastatina (200 µg/mL) durante 24 horas.

Asimismo se analizaron los núcleos, que fueron visualizados tras teñir el ADN con el agente fluorescente diclorhidrato de 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma-Aldrich). Para ello, las células fueron sembradas sobre cristales en placas de 24 pocillos, fijadas en formaldehído al 4% durante 10 minutos y permeabilizadas con Tritón X-100 al 0,5%. Tras lavarlas con PBS, fueron incubadas con DAPI (12,5 µg/mL) durante 15 minutos. Finalmente se retiró el exceso de colorante y los cristales con las células fueron montados en portaobjetos con medio de montaje (Dako Norteamérica Inc., Vía Real, Carpintería, CA, EEUU), para su observación. Las imágenes fueron adquiridas mediante un microscopio confocal Leica SP2 (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania) empleando un objetivo 20XPL-APO NA 0.7 de inmersión en glicerol. El DAPI fue excitado con un láser-diodo de 405 nm. Se examinaron 6 campos con aproximadamente 200 células cada uno por cada condición, para estimar el porcentaje de núcleos con apariencia apoptótica.

### **5.- ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR**

El ensayo de supervivencia se basa en la capacidad de las células metabólicamente activas de reducir el bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-ilo)-2, 5-difeniltetrazol (MTT) (Calbiochem, CA, EEUU) a un compuesto coloreado de color azul (formazán), a través de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa. PTEC o células HeLa fueron sembradas hasta semiconfluencia en placas de 96 pocillos e incubadas con cisplatino solo o en combinación con cilastatina durante 24, 48 ó 72 horas. Una vez transcurrido este tiempo se añadió MTT 0.5 mg/mL y se incubaron las

placas durante 3 horas en oscuridad a 37°C. Tras la incubación se añadieron 100 µL de buffer de lisis (20% Dodecil sulfato sódico (SDS) en 50% N,N-dimetilformamida, pH 4.7) y se incubó durante toda la noche en oscuridad a 37°C. Finalmente se cuantificó la absorbancia a 595 nm y se calculó el porcentaje de viabilidad mediante la siguiente relación:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{DO células tratadas} \times 100}{\text{DO células control}}$$

DO: Densidad óptica

## **6.- MEDIDA DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL**

Para determinar la depolarización de la membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) se empleó el colorante JC-1 (Molecular Probes, OR, EEUU), cuantificándolo por citometría de flujo.

El JC-1 es un marcador catiónico que se acumula tanto en el citosol (emitiendo en verde a 525 nm (FL-1)) de forma monomérica, como formando agregados a nivel mitocondrial (emitiendo en rojo a 590 nm (FL-2)). Esta conformación en agregados se da en células sanas, sin embargo, a medida que las células pierden el potencial de membrana (y por lo tanto sufren un daño), se pierden los agregados, reduciéndose así el porcentaje de emisión en rojo y pudiendo aumentar el verde por el paso de monómeros al citosol.

Como controles del experimento se emplearon el CCCP (50 mM) y la camptotecina (50 µg/mL). El CCCP es un ionóforo que actúa perforando la membrana mitocondrial y por lo tanto desacoplando su potencial, y la camptotecina es un compuesto que desencadena la muerte celular por apoptosis.

Los resultados fueron adquiridos con la ayuda de un citómetro FACScan™ (Beckton Dickinson, Madrid, España), determinando tanto la fluorescencia verde (530 ± 15 nm) como la roja (585 ± 21 nm), y representados empleando el software de análisis WinMDI, teniendo en cuenta los primeros 10.000 eventos por muestra.

## **7.- MEDIDA DE LA TINCIÓN CON ANEXINA V-FITC**

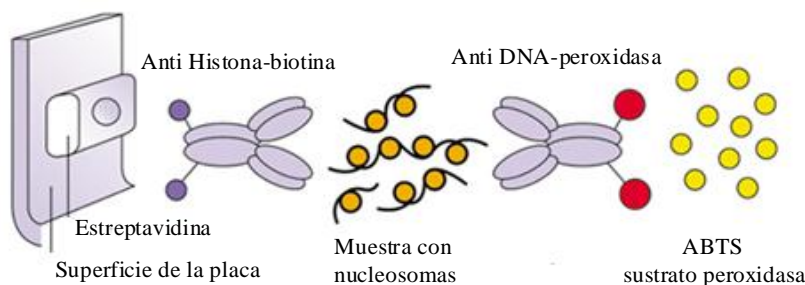
Las PTEC fueron tratadas durante 12, 24 y 48 horas con cisplatino 30 µM en presencia/ausencia de cilastatina 200 µg/mL. Tanto las células adheridas a la placa como las presentes en el sobrenadante fueron recogidas y centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos. Se lavaron 2 veces con buffer de unión (HEPES 10 mM, pH 7.4, NaCl 140 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM), se resuspendieron a una densidad final de 1-2 x 10<sup>6</sup> células/mL y fueron incubadas con 5 µL de Anexina V-isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Biotium Inc, Hayward, CA) durante 15 minutos a temperatura ambiente en

oscuridad. A continuación, las células fueron fijadas en formaldehído al 2% durante 15 minutos a temperatura ambiente, lavadas y montadas en un portaobjetos para ser visualizadas.

Las imágenes fueron adquiridas con la ayuda de un microscopio confocal Leica SP2 (Leica Microsystems). Las diferentes medidas de fluorescencia emitida por la Anexina V-FITC fueron realizadas con el programa Leica Confocal Software LCS-1537 (Leica Microsystems).

## **8.- ENRIQUECIMIENTO NUCLEOSOMAL**

Para evaluar la fragmentación del ADN en el contexto de la apoptosis inducida por cisplatino 1, 10 y 30  $\mu\text{M}$ , se incubaron PTEC bajo condiciones de presencia/ausencia de cilastatina 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 24 horas. Tras este periodo las células fueron lisadas y centrifugadas a 200 g durante 10 minutos con el fin de retirar los restos celulares.



**Figura 10. Esquema general del procedimiento.**

Las histonas y el ADN presentes tanto en mono como en oligonucleosomas en la fracción citosólica de los lisados celulares, fueron cuantificados empleando el kit *Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup>* (Boehringer-Mannheim, Roche, Mannheim, Alemania) para medir muerte celular basado en la técnica de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (Figura 10).

## **9.- ENSAYO DE ACTIVIDAD DE CASPASAS**

Las actividades de las caspasas 3, 8 y 9 fueron determinadas usando los sustratos DEVD-pNA, IETD-pNA y LEHD-pNA respectivamente, siguiendo los protocolos contenidos en los kits colorimétricos *APOPCYTO Caspase-3, Caspase-8 y Caspase-9* (MBL, Naka-ku Nagoya, Japón).

Pasadas 24 ó 48 horas de tratamiento con cisplatino 1, 10 y 30  $\mu\text{M}$ , en presencia/ausencia de cilastatina (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), tanto las células adheridas como no adheridas a la placa fueron recogidas, resuspendidas en 120  $\mu\text{L}$  de buffer de lisis (MBL) e incubadas a 4°C durante 10 minutos. A continuación se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 minutos.

Se recogieron alícuotas de 50  $\mu$ L de los sobrenadantes, pasándolas a una placa de 96 pocillos y añadiéndoles posteriormente 5  $\mu$ L del sustrato correspondiente. La placa se incubó a 37°C durante 2 horas, y a continuación se cuantificó la absorbancia a 405 nm con la ayuda de un lector de placas (Synergy HT, BioTek, Winooski, VT, EEUU), y se comparó con la recta patrón generada en la misma placa.

## **10.- DETERMINACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE CITOCROMO C**

Cultivos de PTEC fueron llevados a semiconfluencia y tratados durante 12 horas con cisplatino 30  $\mu$ M en presencia/ausencia de cilastatina 200  $\mu$ g/mL. Transcurrido este tiempo las células presentes en la monocapa fueron separadas con EDTA 0.5M, pH 8, recogidas en tubos y centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente se decantó el sobrenadante y el pellet fue lavado con PBS y resuspendido en 100  $\mu$ L de buffer de lisis [KCl 80 mM, sacarosa 0.25 M, digitonina 2.5  $\mu$ g/mL, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0.1M, 1  $\mu$ L/mL, cóctel de inhibidores de proteasas (CIP) 1  $\mu$ L/mL y ditiotreitól (DTT) 1  $\mu$ L/mL]. Se colocaron las muestras a 4°C durante 10 minutos y se centrifugaron durante 5 minutos a 4°C y a 14000 rpm. Tras dicha centrifugación se separaron el sobrenadante (fracción citosólica) y el pellet (fracción mitocondrial). Este último fue lavado con PBS y resuspendido el buffer de lisis sin DTT, CIP ni PMSF, en un volumen semejante al obtenido para la correspondiente fracción citosólica. Una vez separadas las dos fracciones se cuantificó la concentración de proteína presente en las muestras mediante la técnica de BCA (Pierce, Rockford, EEUU).

Las fracciones proteicas mitocondrial y citosólica fueron separadas mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 15% bajo condiciones reductoras. Posteriormente fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) en Tris 25 mM pH 8.8, glicina 150 mM y metanol 20% (vol/vol). Estas membranas fueron bloqueadas con leche desnatada en polvo al 5% en PBS-Tween 20 (Sigma-Aldrich) durante 1 hora e incubadas toda la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos:

<b>ANTICUERPO</b>	<b>ORIGEN</b>	<b>DILUCIÓN</b>	<b>CASA COMERCIAL</b>
Policlonal anti-citocromo c	Cabra	1/500	Santa Cruz Biotechnology
Policlonal anti-VDAC	Cabra	1/500	Santa Cruz Biotechnology
Policlonal anti-tubulina	Ratón	1/10000	Sigma, clone B-512

**Tabla 5. Anticuerpos primarios y diluciones empleados en la técnica de Western blot.**

Después de lavar para eliminar el exceso de anticuerpo primario, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa:

<b>ANTICUERPO</b>	<b>ORIGEN</b>	<b>DILUCIÓN</b>	<b>CASA COMERCIAL</b>
Policlonal anti-IgG de ratón	Oveja	1/5000	Amersham
Policlonal anti-IgG de cabra	Burro	1/5000	Santa Cruz Biotechnology

**Tabla 6. Anticuerpos secundarios y diluciones empleados en la técnica de Western blot.**

Después de lavar para eliminar el exceso de anticuerpo secundario, se identificaron las proteínas mediante quimioluminiscencia (ECL, Amersham Pharmacia Biotech.), con la ayuda del revelador Alliance 4.7 (Uvitec, Cambridge, Reino Unido).

Las cuantificaciones de las señales se llevaron a cabo con el programa de análisis de imágenes *ImageJ* (*Image Processing and Analysis in Java*) (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>). Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias de densitometrado (uad).

## **11.- PCR EN TIEMPO REAL**

### **11.1.- EXTRACCIÓN DE ARN CELULAR TOTAL**

Tras tratar cultivos subconfluentes de PTEC con cisplatino 30  $\mu$ M en presencia o ausencia de cilastatina 200  $\mu$ g/mL, se rascaron las células de cada placa en 1 mL de Trizol™ Reagent (Life Technologies, Invitrogen, Paisley, Reino Unido). Para la extracción del ARN total se siguieron las indicaciones del fabricante, manteniendo los homogeneizados 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la completa disociación de los complejos núcleo-proteicos. Posteriormente se añadieron 200  $\mu$ L de cloroformo por cada muestra y se agitaron los tubos vigorosamente durante 15 segundos, incubando después durante 2-3 minutos a temperatura ambiente. A continuación, los tubos se centrifugaron a 11400 rpm, 20 minutos a 4°C, separándose tres fases; la de cloroformo-fenol, la interfase y la fase acuosa. Se recogió esta última transfiriéndose a tubos limpios, y se añadieron 500  $\mu$ L de isopropanol a cada tubo, agitando los mismos arriba y abajo. Después, se incubaron las mezclas a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se desecharon los sobrenadantes conservando el pellet, al que se añadió 1 mL de etanol 75% con el que se mezcló vigorosamente, centrifugándose después a 8700 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante añadiendo al pellet 1 mL de etanol 100%, procediendo de igual manera que en el paso anterior. Por último, se decantó el sobrenadante y el pellet se secó resuspendiéndolo entonces en 10-12  $\mu$ L de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC).

La cuantificación de la concentración de ARN en las muestras se realizó por medida de la absorbancia a 260 nm con la ayuda de un Nanodrop (Nucliber), teniendo en cuenta que 1 unidad de absorbancia corresponde a 40 µg/mL de ARN. Se calculó la pureza de los extractos por la medida de la relación entre las absorbancias a 260 y 280 nm, observando que en todos los casos era cercana a 2, lo que indica ausencia de contaminación por proteínas en la muestra.

### **11.2.- PCR EN TIEMPO REAL**

El paso de ARN a ADNc (transcripción inversa) se realizó con 2 µg de ARN utilizando kit comercial *iScript cDNA Sintesis Kit* (Bio-Rad), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La cuantificación de la concentración de ADNc se calculó con la ayuda de un nanofotómetro (Implen, Schatzbogen, Munich, Alemania).

La PCR en tiempo real se realizó mediante el sistema de detección secuencial *iQ5 Multicolor Real Time PCR Detection System* (BioRad). En paralelo, junto con el gen de interés, se amplificó el ADNc de la enzima “*ribosomal phosphoprotein large PO subunit*” (RPLPO), para utilizarlo como *house-keeping* o control interno de la técnica. Los resultados de la amplificación del gen de interés se normalizaron con los datos obtenidos de RPLPO. Los cebadores fueron obtenidos por revisión bibliográfica (Invitrogen). Todas las medidas se realizaron por duplicado. Los genes ensayados y los cebadores empleados en su análisis se recogen en la siguiente tabla:

<b>GEN</b>	<b>SECUENCIA</b>
Fas (sentido)	CAG CCA TGC CCT CCT GGC AA
Fas (antisentido)	CCC CTT CAG AGC AAG GCA CAC AC
FasL (sentido)	ACC AGC CCC TGA GTC ACA AGG T
FasL (antisentido)	CGG GCC CAC ATT TGG CCA GT
TNFα (sentido)	CGT CGC CCA CGT TGT AGC CAA T
TNFα (antisentido)	CCG TTG GCC AGG AGG GCA TT
RPLPO (sentido)	TGA TGC GCA AGG CCA TCC GAG
RPLPO (antisentido)	ACA AAG CCC ACG TTC CCC CG

**Tabla 7. Genes ensayados y cebadores empleados en la técnica de PCR en tiempo real.**

## **12.- DETERMINACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE LACTATO DESHIDROGENASA**

Se midió la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) desde las PTEC al medio de cultivo tras el tratamiento con cisplatino en presencia/ausencia de cilastatina (200 µg/mL) durante 24 y 48 horas. La concentración de LDH se midió automáticamente con la ayuda de un autoanalizador modular Cobas 711 (Roche Farma, Madrid, España). La liberación de LDH se expresó en términos relativos con

respecto al valor de LDH total liberada por el tratamiento con Tritón X-100 (Sigma) 0.1% (100% de liberación).

### **13.- ENSAYO DE INMUNOLocalIZACIÓN DE FasL**

Cultivos subconfluentes de PTEC fueron crecidos en cristales (en placas de 24 pocillos) y tratados durante 0,0.5 y 2 horas con cisplatino 30  $\mu\text{M}$  en presencia/ausencia de cilastatina 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento, las células fueron fijadas en formaldehído al 4% en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente, y se realizaron 2 lavados de 10 minutos cada uno con PBS. A continuación se colocaron los cristales en una cámara húmeda, donde se realizó el resto del procedimiento. Posteriormente las células se incubaron con solución de bloqueo [PBS 1X-Tween 20 0.1% (PBST, Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU) y albúmina de suero bovino 1% (BSA, Sigma-Aldrich)] a 37°C durante 45 minutos. Tras el bloqueo las células se mantuvieron en contacto con el anticuerpo primario anti-FasL (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EEUU) durante 1 hora a 37°C (dilución 1/50 en solución de bloqueo), y se lavaron 3 veces con PBST, después de lo cual se incubaron con anticuerpo secundario anti-rabbit (dilución 1/200 en solución de bloqueo) marcado con FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. West Grove, PA, EEUU), durante 1 hora a 37°C. Tras lavar los cristales con PBST (para eliminar el exceso de anticuerpo secundario) se incubaron con DAPI 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 5 minutos a temperatura ambiente, con el fin de marcar los núcleos celulares.

Finalmente, tras sendos lavados con PBST y agua destilada para eliminar los restos de sales, se montaron los cristales en portaobjetos con medio de montaje (Dako Norteamérica Inc.).

Las imágenes fueron adquiridas mediante microscopía confocal (Leica Microsystems), y la cuantificación fue realizada con el programa Leica Confocal Software LCS-1537 (Leica Microsystems).

### **14.- DETERMINACIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO**

Cultivos subconfluentes de PTEC fueron obtenidos en cristales contenidos en placas de 24 pocillos y tratados durante 24 y 48 horas con cisplatino 10 y 30  $\mu\text{M}$  en presencia/ausencia de cilastatina 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Una vez concluidos dichos tratamientos, se retiró el medio de cultivo y se añadieron 500  $\mu\text{L}/\text{pocillo}$  del reactivo MitoSOX (Molecular Probes, Invitrogen) 2.5  $\mu\text{M}$  en HBSS/Ca/Mg (Gibco, Invitrogen) para cubrir las células adheridas a los cristales, y se incubaron durante 10 minutos a 37°C protegidas de la luz. Posteriormente se lavaron las células 3 veces con HBSS/Ca/Mg templado, y se fijaron en formaldehído al 4% en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente, realizando después 2 lavados de 10 minutos cada uno con PBS. A continuación se incubaron las células con DAPI 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 5 minutos a



temperatura ambiente, y se lavaron nuevamente con PBS en 2 ocasiones, y una vez más con agua destilada para retirar los restos de sales. Por último, se montaron los cristales en portaobjetos con medio de montaje (Dako Norteamérica Inc.).

Las imágenes fueron adquiridas con la ayuda de un microscopio confocal Leica SP2 (Leica Microsystems).

## **15.- ACUMULACIÓN DE PLATINO Y ANÁLISIS DE SU UNIÓN AL ADN**

### **15.1.- AISLAMIENTO DE PROTEÍNAS INTRACELULARES TOTALES**

Cultivos primarios subconfluentes de PTEC fueron sometidos durante 24 horas a concentraciones crecientes de cisplatino en presencia o ausencia de cilastatina (200 µg/mL).

Tras la incubación se añadió a cada placa 400 µL de buffer de lisis a 70°C [SDS 2.2% (p/v); glicerol 22% (v/v); Tris HCl 170 mM pH 6.8, PMSF 0.1M, 1 µL/mL y CIP 10 µL/mL]. Las células se desprendieron de la placa con la ayuda de un rascador y se recogió el volumen obtenido, sometiéndolo a choque térmico mediante un calentamiento a 100°C durante 5 minutos, y posterior incubación en hielo. A continuación, las muestras se sometieron a descompresión brusca y se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 minutos, tras lo cual se recuperaron los sobrenadantes, determinándose la concentración de proteínas mediante la técnica colorimétrica del BCA (Pierce).

### **15.2.- AISLAMIENTO DE ADN CELULAR**

Cultivos subconfluentes de PTEC y HeLa fueron tratados durante 24 horas con cisplatino 30 µM en presencia/ausencia de cilastatina 200 µg/mL. Tanto las células adheridas a la placa como las presentes en el sobrenadante fueron recogidas, lavadas con PBS y centrifugadas a 13000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue desechado y el pellet celular resuspendido en PBS/buffer de lisis [EDTA 20 mM pH 8 (v/v), Tritón X-100 0.5%, Tris 5 mM pH 8] e incubado durante 30 minutos a 37°C con ARNasa A 10 mg/mL (Invitrogen). Después, las muestras fueron tratadas con proteinasa K 10 mg/mL (Applied Biosystems, Ambion, Foster City, CA, EEUU) a 55°C durante 3 horas, y posteriormente con fenol (equilibrado con Tris pH 8, Sigma-Aldrich) en agitación durante 2 minutos. Tras una centrifugación a 12000 rpm las fases fueron separadas aislándose la fase acuosa. La extracción del ADN se realizó 2 veces mediante tratamiento con fenol-cloroformo:isoamilalcohol (1-24:1, v/v), y finalmente con cloroformo:isoamilalcohol (24:1, v/v). El ADN presente en la fase acuosa fue precipitado mediante la adición de etanol 100% a -20°C y acetato sódico 3M (pH 5.3), seguido de una incubación durante toda la noche a -80°C. El ADN se recogió mediante centrifugación durante 15 minutos a 12000 rpm y fue lavado con 1 mL de etanol 70%,

secado y resuspendido en 300  $\mu$ L de Tris 10 mM pH 7.6, EDTA 0.1 mM en agua estéril. La concentración de ADN fue estimada cuantitativamente mediante medida de la absorbancia a 260 nm con la ayuda de un Nanodrop UV-Vis (Nucliber, Madrid, España).

### **15.3.- DETERMINACION DE PLATINO INTRACELULAR Y PLATINO UNIDO A ADN**

Tanto la concentración intracelular de cisplatino como el cisplatino unido al ADN se determinaron mediante espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (cuadrupolo ICP-MS, Thermo X-Series, Thermo Electrón, Windsford, Cheshire, Reino Unido), utilizando las muestras extraídas mediante los dos procedimientos anteriores.

Previamente al análisis, las muestras fueron diluidas 5 veces en una solución acuosa de HCl 2%, la cual hace posible estabilizar el platino (Pt). La cuantificación fue realizada por calibración externa. Se utilizó iridio (Ir) como estándar interno, que fue adicionado tanto a las muestras como a los estándares, alcanzando una concentración final de 20  $\mu$ g/L.

Los datos de ICP-MS fueron adquiridos en modo continuo, monitorizando las señales masa/carga ( $m/z$ ) de los isótopos  $^{194}\text{Pt}$ ,  $^{195}\text{Pt}$  e  $^{191}\text{Ir}$ , y los resultados fueron expresados como  $\mu$ g Pt/g proteína y  $\mu$ g Pt/g ADN.

## **16.- ANÁLISIS DE ESPECIACIÓN DE LA MOLÉCULA DE PLATINO**

Se obtuvieron extractos celulares a partir de cultivos de PTEC tratados durante 24 horas con cisplatino (10  $\mu$ M) con y sin cilastatina (200  $\mu$ g/mL), siguiendo el mismo procedimiento que en apartado anterior. Dichos extractos fueron centrifugados a 15000 g durante 40 minutos con el fin de aislar la fracción citosólica presente en el sobrenadante. Tras dicha centrifugación, los sobrenadantes fueron filtrados a través de filtros de nylon de 0.22  $\mu$ m y sometidos a cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), introduciendo 100  $\mu$ L de muestra en una columna cromatográfica Superdex 75 10/300 GL (Pharmacia, Amersham, Uppsala, Suecia) acoplada al ICP-MS, utilizándose como fase móvil Tris-NO<sub>3</sub> 10 mM, NaCl 25 mM (pH 7.4) a un caudal de 0.8 mL/min. En paralelo, la columna de SEC fue calibrada usando diversas proteínas de distinto peso molecular: azul dextrano (>2000 kDa), BSA (66 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), citocromo c (12.4 kDa) y aprotinina (6.5 kDa) (Sigma-Aldrich Chemie), con un detector UV-Vis. Estos pesos moleculares pueden ser usados como referencia de la capacidad de separación de la columna, aunque hay que tener en cuenta que las interacciones secundarias con la fase estacionaria pueden alterar los tiempos de retención.

Las diferentes especies de cisplatino fueron obtenidas por ICP-MS mediante la monitorización del valor  $m/z$  del isótopo  $^{195}\text{Pt}^{45}$ .

## **17.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Las variables de interés estudiadas han sido todas cuantitativas continuas, y sus valores se presentan como la media  $\pm$  error estándar de la media (EEM). Todas las mediciones se han realizado por duplicado, y cada resultado presentado se ha obtenido en al menos tres preparaciones procedentes de animales diferentes.

Las diferencias han sido consideradas estadísticamente significativas siempre y cuando el estudio presentara un valor de alfa bilateral por debajo de 0.05.

En el caso de que se haya considerado más de un factor, se ha empleado para el análisis un modelo de ANOVA factorial.

Cuando un solo factor presentó más de dos niveles, se empleó un análisis post-hoc (mínima diferencia significativa).

Los efectos de cilastatina sobre las variables modificadas por cisplatino se han evaluado mediante ensayos factoriales de medias repetidas. Los resultados se han analizado mediante un modelo general de ANOVA de dos vías para medidas independientes. Los dos factores habituales en cada estudio han sido el “factor cilastatina”, con dos niveles (sí, no), y el factor “dosis del tóxico”, habitualmente con cuatro niveles correspondientes a las dosis (en tal caso, el ensayo se controlaba con una dosis de “0” en el primer nivel del factor). En los modelos mencionados se ha incluido siempre el factor interacción “cilastatina\*dosis del tóxico”, así como un análisis a posteriori de las diferencias entre niveles, utilizando el test LSD (“least significant difference”) como discriminante. Se ha usado un  $\alpha$  bilateral de 0.05 como índice de significación. Cuando se han encontrado diferencias significativas para el factor de protección por cilastatina, se ha procurado confirmar dicha diferencia mediante comparación de los ajustes no lineales de las dosis-respuesta correspondientes.

En el caso de datos extremos, se ha considerado como criterio de exclusión la separación de la mediana por más de dos rangos intercuartílicos.

Para comparación de porcentajes se han utilizado tablas de  $2 \times n$ , y la significación se ha establecido mediante el test de  $\chi^2$  o la proporción exacta de Fisher si no se cumplían las condiciones para aplicar el primero.

## **V.II.- *EXPERIMENTOS IN VIVO***

---

## **1.- MODELO DE FRACASO RENAL AGUDO POR CISPLATINO**

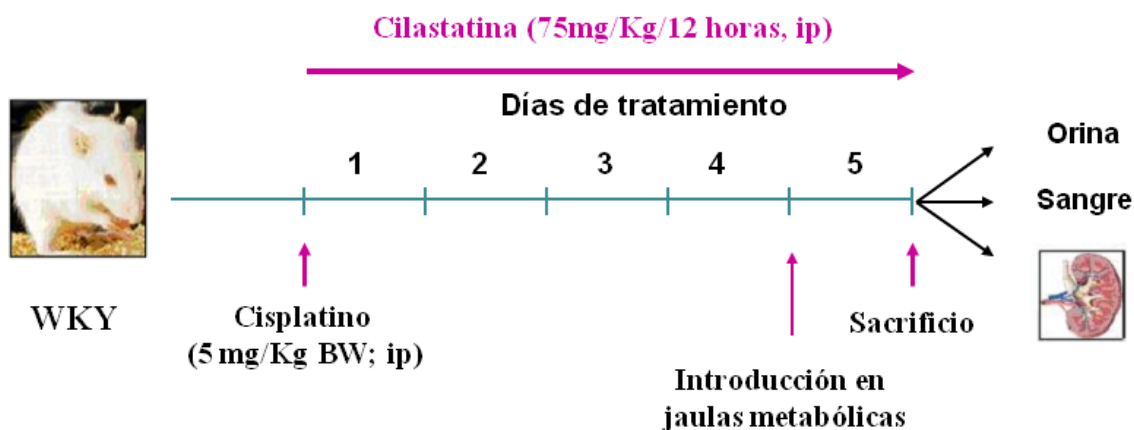
Para la realización del modelo experimental *in vivo* (Figura 11) se utilizaron ratas macho de la estirpe *Wistar* (WKY) con un peso medio de  $260 \pm 15$  g, y 7-8 semanas de edad, criadas y estabuladas en el animalario del Pabellón de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM).

Tanto el tamaño muestral de los diferentes grupos en estudio como las dosis de fármacos y los regímenes de tratamiento fueron establecidos por revisión bibliográfica.

En total se utilizaron 28 animales, que fueron distribuidos de forma aleatoria en los siguientes 4 grupos:

- **Grupo Control.** Animales que recibieron suero salino en los mismos volúmenes y regímenes que en los grupos tratados con cisplatino y/o cilastatina (n=6).
- **Grupo Control + Cilastatina** Animales tratados con administración única intraperitoneal (i.p.) de suero salino en el mismo volumen que los grupos tratados con cisplatino, más cilastatina (disuelta en suero salino) a dosis de 75 mg/Kg de peso cada 12 horas i.p. desde el momento de la administración de suero salino y hasta el momento del sacrificio (n=6).
- **Grupo Cisplatino.** Animales tratados con administración única i.p. de cisplatino (5 mg/Kg de peso, disuelto en suero salino) en dosis única, más suero salino i.p. cada 12 horas en los mismos volúmenes que los grupos tratados con cilastatina (n=8).
- **Grupo Cisplatino + Cilastatina.** Animales tratados con administración única i.p. de cisplatino (5 mg/Kg de peso), más cilastatina a una concentración de 75 mg/Kg de peso cada 12 horas i.p. desde el momento de la administración del cisplatino y hasta el momento del sacrificio (n=8).

Los animales fueron mantenidos con vida durante 5 días desde la inyección de cisplatino o su vehículo, y durante este tiempo tuvieron libre acceso tanto al agua como a la comida (dieta estándar), en un ambiente controlado de luz, temperatura y humedad. Un día antes del sacrificio, los animales fueron introducidos en jaulas metabólicas para recoger la orina de 24 horas con la finalidad de cuantificar la diuresis y la concentración de proteínas.



CONTROLES: WKY sin tratamiento de cisplatino ± cilastatina.

**Figura 11. Modelo experimental de nefroprotección por cilastatina frente al fracaso renal agudo tóxico causado por cisplatino.** BW: peso corporal, ip: intraperitoneal.

El estudio fue llevado a cabo en las instalaciones del animalario del HGUGM tras su aprobación por el Comité Ético de Experimentación Animal, y contó con la supervisión directa del veterinario responsable. Toda la manipulación de los animales se llevó a cabo según la normativa legal vigente recogida en el Real Decreto 1201/2005 de 10 de Octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

## **2.- EXTRACCIÓN, PROCESAMIENTO Y ALMACENAJE DE TEJIDOS**

En el momento del sacrificio los animales (previamente pesados) se anestesiaron con ketamina (10 mg/kg) y diazepam (4 mg/kg) y se les extrajo la sangre a través de la canulación de la aorta abdominal a la altura de la bifurcación. Ésta se incubó primero durante 30 minutos a 37°C, seguido de una hora a 4°C. Una posterior centrifugación a 2000 rpm durante 15 minutos a 4°C permitió la obtención del suero sanguíneo, que fue congelado a -80°C hasta el momento de su uso.

Tras la exanguinación se clampó la aorta cortando su flujo por encima de los riñones, y se perfundieron éstos a través de la cánula con suero salino frío (Braun Medical S.A., Barcelona, España) tras perforar la vena cava inferior.

Posteriormente los riñones fueron extraídos, decapsulados y mantenidos en suero salino frío durante su manipulación para minimizar la degradación del tejido.

Los riñones derechos fueron seccionados transversalmente por encima de la arterial renal, introduciendo el polo renal superior en paraformaldehído al 4% en PBS durante 24 horas para su fijación y posterior inclusión en parafina. El resto del riñón, así como el riñón izquierdo completo fueron separados en corteza y médula, congelando ambas muestras en nitrógeno líquido y almacenándolas a -80°C hasta el momento de su utilización.

También se obtuvieron muestras de corazón, arteria aorta e hígado, que fueron convenientemente procesadas y almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Las muestras renales inmersas en paraformaldehído se fijaron durante 24 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente fueron deshidratadas con concentraciones crecientes de etanol e incluidas finalmente en parafina en el procesador de tejidos Histolab ZX (Especialidades Médicas MYR S.L, Tarragona, España). Las muestras parafinadas fueron cortadas en un microtomo HM 325 (Microm) en secciones de  $4\ \mu\text{m}$  de grosor que se montaron sobre portaobjetos pretratados con 3-aminopropil-trietoxisilano (APES, Sigma-Aldrich) al 2% en acetona y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su utilización en los estudios morfológicos y de inmunohistoquímica.

### **3.- MEDIDA DE LA PROTEINURIA**

La excreción de proteínas en orina de 24 horas se determinó por el método del ácido sulfosalicílico <sup>63</sup>. La orina fue recogida mediante la colocación de los animales en jaulas metabólicas 24 horas antes del sacrificio.

### **4.- DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN SUERO Y ORINA**

Los diferentes parámetros bioquímicos fueron medidos en suero y orina mediante un autoanalizador Dimension RxL (Dade-Behring, Siemens, Eschborn, Alemania), siguiendo las indicaciones del fabricante. A partir de estos datos se calcularon los principales parámetros de función renal, mediante la aplicación de las siguientes ecuaciones:

- Anión GAP

$$\text{Anión GAP} = [\text{Na}^+] + [\text{K}^+] - [\text{Cl}^-] - [\text{HCO}_3^-]$$

- Carga Urinaria

$$\text{Carga Urinaria} = ([\text{Na}^+]_{\text{Orina}} + [\text{K}^+]_{\text{Orina}}) - [\text{Cl}^-]_{\text{Orina}}$$

- Aclaramiento de agua libre ( $\text{ClH}_2\text{O}$ )

$$\text{ClH}_2\text{O} = V_{\text{Orina}} \times (1 - [\text{Na}^+]_{\text{Orina}}) + ([\text{K}^+]_{\text{Orina}} / [\text{Na}^+]_{\text{Plasma}})$$

- Excreción fraccional de agua ( $\text{EFH}_2\text{O}$ )

$$\text{EFH}_2\text{O} = \frac{V_{\text{Orina}}}{\text{TFG}} \times 100$$

- Excreción fraccional de sodio (EFNa<sup>+</sup>)

$$EFNa^+ = \frac{[Na^+]_{Orina} \times [Cr]_{Plasma}}{[Na^+]_{Orina} \times [Cr]_{Plasma}} \times 100$$

- Tasa de filtración glomerular (TFG)

$$TFG = \frac{[Cr]_{Orina} \times V_{Orina}}{[Cr]_{Plasma}}$$

- Gradiente transtubular de potasio (GTTK)

$$GTTK = ([K^+]_{Orina} / [K^+]_{Plasma}) \times (Osm_{Plasma} / Osm_{Orina})$$

Na<sup>+</sup>: Ion sodio

Cl<sup>-</sup>: Ion cloro

V: Volumen

K<sup>+</sup>: Ion potasio

HCO<sup>-</sup>: Ion bicarbonato

Cr: Creatinina

Osm: Osmolalidad

## **5.- ESTUDIOS HISTOPATOLÓGICOS**

La morfología renal se estudió por medio de microscopía óptica convencional. Secciones de tejido incluidas en parafina de 4 μm de grosor previamente desparafinadas e hidratadas, se tiñeron con hematoxilina/eosina (Sigma-Aldrich), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La valoración del daño fue realizada por dos patólogos cualificados del HGUGM, sin conocimiento previo del grupo al que pertenecían los animales. El daño renal se evaluó utilizando el siguiente índice semicuantitativo: 0) = sin cambios; 1) = cambios focales que afectan a menos del 25% de la muestra; 2) = cambios que afectan del 25% al 50% de la muestra; 3) = cambios que afectan al 50-75% de la muestra y 4) = lesiones que afectan a más del 75% de la muestra.

La valoración fue aplicada en la medida del daño glomerular (proliferación de células mesangiales, esclerosis y expansión de la matriz), daño túbulointersticial (dilatación y/o atrofia tubular, necrosis tubular, blebbing, presencia de cilindros proteicos intratubulares, mitosis y vacuolización), fibrosis intersticial e infiltrado de células inflamatorias, siendo por tanto la puntuación (score) del daño renal para cada corte evaluado el sumatorio de todos estos valores obtenidos.

## **6.- INMUNOHISTOQUÍMICA**

Las inmunolocalizaciones fueron realizadas en secciones renales de 4 μm de grosor incluidas en parafina, que fueron previamente desparafinadas y rehidratadas



en concentraciones decrecientes de etanol. En los casos en los que fue necesario, los cortes se calentaron en tampón citrato sódico 10 mM (pH 6.0) durante 10 minutos para desenmascarar el antígeno de interés y facilitar su unión al anticuerpo. La actividad peroxidasa endógena se inactivó mediante tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en metanol (Merck, Darmstadt, Alemania) (1:1) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después se bloquearon los cortes para eliminar las uniones inespecíficas durante una hora a temperatura ambiente con una solución de PBS o TBS que contenía BSA al 4% y suero de cabra al 8%.

A continuación se incubaron los cortes durante toda la noche a 4°C en atmósfera húmeda con los siguientes anticuerpos primarios diluidos en PBS o TBS con BSA al 4% y suero de cabra al 1%:

ANTICUERPO	ORIGEN	TAMPÓN CITRATO	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL
Monoclonal anti-CD68 (monocito/macrófago)	Ratón	Si	1/125 (en PBS)	AbD Serotec (Oxford, Reino Unido)
Monoclonal anti-4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE)	Ratón	No	1/75 (en TBS)	Oxis Health Products, (Portland, OR, USA)
Policlonal anti-caspasa 3 activa	Conejo	No	1/50 (en TBS)	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EEUU)

**Tabla 8. Anticuerpos primarios empleados en la técnica de inmunohistoquímica.**

Tras lavar abundantemente los cortes para eliminar el exceso de anticuerpo primario, se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente con ambas soluciones del sistema LSAB2 System-HRP (Dako).

Para revelar las inmunolocalizaciones se utilizó el cromógeno 3-3'-diaminobencidina (DAB; Sigma-Aldrich) diluido al 0.05% en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.03%. Finalmente se contrastaron los tejidos con hematoxilina de Mayer (Sigma-Aldrich), se deshidrataron y se montaron en DPX (EMS, Washington, Pennsylvania, USA). La especificidad de los anticuerpos primarios fue verificada mediante la realización de controles negativos por la omisión de dichos anticuerpos, obteniendo como resultado en cada caso la completa ausencia de señal.

## **7.- EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES DE CORTEZA RENAL**

Las piezas de corteza renal congeladas se pulverizaron dentro de un mortero metálico en presencia de nitrógeno líquido, y se resuspendieron en 1 mL de solución de lisis fría [Tris 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, Tritón X-100 0.2%, NP40 0.3%, CIP (10 µL/mL) y PMSF 0.1 mM (1 µL/mL)]. Posteriormente se mantuvieron en hielo durante 20 minutos, y se colocaron a 4°C en agitación durante 30 minutos más. Tras este proceso, se centrifugaron a 4°C durante 15 minutos a

12000 rpm, recogiendo los sobrenadantes que contienen los extractos proteicos. La concentración de proteína se determinó por el método colorimétrico de BCA (Pierce), y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su uso.

## 8.- WESTERN BLOT

Las muestras (80  $\mu\text{g}$  de proteína por carril) fueron separadas en geles de SDS-poliacrilamida al 12.5 o 15% bajo condiciones reductoras. Posteriormente fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) en Tris 25 mM pH 8.8, glicina 150 mM y metanol 20% (vol/vol). Estas membranas fueron bloqueadas con leche desnatada en polvo ó BSA (Sigma-Aldrich) al 5% en PBST ó TBS-Tween 20 0.1% (TBST) durante 1 hora e incubadas toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  con los siguientes anticuerpos:

ANTICUERPO	ORIGEN	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL
Policlonal anti-procaspasa 3	Cabra	1/200	Santa Cruz Biotechnology
Policlonal anti-caspasa 3 activa	Conejo	1/1000	Cell Signaling Technology
Policlonal anti-caspasa 8 activa	Conejo	1/1000	Cell Signaling Technology
Policlonal anti-caspasa 9	Conejo	1/1000	Cell Signaling Technology
Policlonal anti-Bax	Conejo	1/500	Santa Cruz Biotechnology
Policlonal anti-Bcl-2	Conejo	1/200	Santa Cruz Biotechnology
Policlonal anti-MDA	Conejo	1/500	Alpha Diagnostic Int. (San Antonio, Tejas, EEUU)
Policlonal anti-catalasa	Cabra	1/1000	Santa Cruz Biotechnology
Policlonal anti- $\beta$ -actina	Ratón	1/5000	Sigma-Aldrich
Policlonal anti-Fas/Apo1	Conejo	1/300	BioVision (CA, EEUU)
Policlonal anti-HSP 27	Cabra	1/200	Santa Cruz Biotechnology
Policlonal anti-FasL	Conejo	1/200	Santa Cruz Biotechnology

**Tabla 9. Anticuerpos primarios y diluciones empleados en la técnica de Western blot.**

Después de lavar para eliminar el exceso de anticuerpo primario, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa:

ANTICUERPO	ORIGEN	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL
Policlonal anti-IgG de ratón	Oveja	1/5000	Amersham
Policlonal anti-IgG de cabra	Burro	1/5000	Santa Cruz Biotechnology
Policlonal anti-IgG de conejo	Burro	1/5000	Amersham

**Tabla 10. Anticuerpos secundarios y diluciones empleados en la técnica de Western blot.**

Después de lavar para eliminar el exceso de anticuerpo secundario, se identificaron las proteínas mediante quimioluminiscencia (ECL, Amersham Pharmacia Biotech.), con la ayuda del revelador Alliance 4.7 (Uvitec, Cambridge, Reino Unido).

Las cuantificaciones de las señales se llevaron a cabo con el programa de análisis de imágenes *ImageJ* (*Image Processing and Analysis in Java*) (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>). Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias de densitometrado (uad).

## **9.- ESTUDIO DE LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR NUCLEAR KB**

La técnica empleada para este estudio es el ensayo de retardo de movilidad electroforética (EMSA), basado en la diferente movilidad electroforética que presentan los complejos del NFκB-oligonucleótido consenso y oligonucleótido libre.

### **9.1.- EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS NUCLEARES DE TEJIDO**

Las piezas de corteza renal congeladas se pulverizaron dentro de un mortero metálico en presencia de nitrógeno líquido, y se resuspendieron en 500 μL de solución de lisis fría [HEPES-NaOH 20 mM, pH 7.6; glicerol 20% (v/v); NaCl 0.35 M; MgCl<sub>2</sub> 5 mM; EDTA 0.1 mM; DTT 1 mM; PMSF 0.5 mM y CIP 10 μL/mL]. Posteriormente se mantuvieron en hielo durante 30 minutos agitándolas cada 5 y se centrifugaron a 4°C durante 30 minutos a 12000 rpm. Tras eliminar el precipitado (materiales insolubles e histonas), se aislaron los sobrenadantes conteniendo los extractos proteicos y se dializaron toda la noche a 4°C en un tampón de unión [HEPES-NaOH 20 mM, pH 7.8; glicerol 20% (v/v); KCl 50 mM; EDTA 0.1 mM; DTT 1 mM y de PMSF 0.5 mM]. La concentración de proteína se determinó en los dializados obtenidos por el método colorimétrico de BCA (Pierce), y se almacenaron a -80°C hasta el momento de su uso.

### **9.2.- MARCAJE DEL OLIGONUCLEÓTIDO CONSENSO**

El oligonucleótido consenso del NFκB (5'-AGTTGAGGGGACTTCCAGGC-3') se marcó radiactivamente con 10 μCi de γ-[<sup>32</sup>P]-ATP (3000 Ci/mmol, Amersham), empleando 10 U de la polinucleótido quinasa T4 (Promega Corp. Madison, WI) en Tris-HCl 70 mM pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM y DTT 5 mM a 37°C durante 10 minutos. Finalmente la reacción se detuvo con EDTA hasta una concentración final de 0.05 M y se llevó hasta un volumen final de 100 μL con tampón TE (Tris-HCl-EDTA).

### **9.3.- ENSAYO DE UNIÓN**

Los extractos proteicos tisulares (60-80 μg) se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos con 0.035 pmoles del oligonucleótido marcado en un tampón de unión (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5; NaCl 150 mM; MgCl<sub>2</sub> 1 mM; glicerol 4%;

EDTA 0.5 mM y DTT 0.5 mM) que contenía 50 µg/mL de poli-(dI-dC). La reacción se detuvo añadiendo tampón de carga (Tris-HCl 250 mM, pH 8.3; glicerol 20%; azul de bromofenol 0.2% y de xileno cianol 0.2%). Mediante ensayos de retardo de EMSA, los complejos proteína-ADN se separaron del exceso de oligonucleótido no unido en un gel no desnaturizante de poliacrilamida al 4% en TBE 0.25% (Tris-HCl- ácido bórico-EDTA), a 150 V y durante dos horas a temperatura ambiente. Al final de la electroforesis los geles se secaron en el secageles Gel Dryer modelo 583 (Bio-Rad) y se expusieron a una película de rayos X para autorradiografía.

Para establecer la especificidad de la reacción, se realizaron ensayos de competición en los cuales las muestras se incubaron previamente durante 10 minutos en presencia de un exceso (100 veces) de sonda fría (NFκB no marcado). Posteriormente se añadió la sonda marcada continuándose el experimento en las mismas condiciones. Como controles negativos, las muestras se prepararon como se ha descrito excepto que no se añadió extracto nuclear, siguiendo posteriormente el mismo protocolo.

Las cuantificaciones de las señales se llevaron a cabo con el programa de análisis de imágenes *ImageJ*. Los resultados se expresaron en uad.

## **10.- MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE MALONDIALDEHÍDO**

La determinación de malondialdehído (MDA) presente en la corteza renal de los animales fue realizada mediante la técnica de *Recknagel* y colaboradores <sup>160</sup>. Ésta consiste en un método colorimétrico en que se detectan productos de degradación de lípidos, como el MDA, basándose en el hecho de que dos moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) reaccionan con una molécula de MDA para generar un agente cromógeno que absorbe a 523-535 nm.

La corteza renal fue homogeneizada en nitrógeno líquido del mismo modo que en el punto 7 del apartado *Materiales y Métodos-Estudios In Vivo*. Posteriormente se midió la concentración de proteínas en los extractos mediante el método de BCA (Pierce).

Las mezclas de reacción fueron preparadas en tubos eppendorf de 2 mL, añadiendo a 200 µL de homogenado 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) 20%, y 1 mL de TBA 0.67%. En paralelo se generó una recta patrón de concentraciones decrecientes de MDA tratadas con ambos ácidos, a partir de un stock 20 µM.

Las mezclas de reacción, así como los estándares se incubaron durante 15 minutos a 100°C, tras lo cual se centrifugaron a 10500 rpm durante 5 minutos para eliminar el precipitado. Se cargaron 200 µL de sobrenadante (por duplicado) en una placa de 96 pocillos, y se midió la absorbancia a 530 nm con la ayuda de un lector de microplacas (Synergy, BioTek).

Las concentraciones de MDA en las muestras fueron cuantificadas por interpolación de sus medidas de absorbancia en la curva estándar corregidas por su concentración proteica y expresadas como nmoles MDA/mg proteína.

## **11.- ENSAYO DE TUNEL**

El ensayo de TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated DUTP nick end labelling*) se realizó en tejido incluido en parafina mediante el empleo del kit *Fluorescein FragEL™ DNA fragmentation* (Calbiochem, Darmstadt, Alemania), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Tras la desparafinación y rehidratación, secciones renales de 4  $\mu\text{m}$  de grosor fueron tratadas con proteinasa K 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 20 minutos, y lavadas posteriormente con TBS 1X. Los cortes fueron sumergidos en tampón de equilibrado y después incubados con la mezcla de reacción conteniendo la enzima durante 1 hora y media a 37°C. Tras los correspondientes lavados para eliminar el exceso de señal, los cortes fueron contrateñidos con DAPI y montados en portaobjetos con ayuda del medio de montaje proporcionado por el kit.

Para generar los controles negativos, se sustituyó la enzima por agua destilada en la mezcla de reacción.

La visualización de la fluorescencia fue realizada con la ayuda de un microscopio confocal Leica SP-2 (Leica Microsystems). Para cada sección renal, las células que presentaban apoptosis fueron cuantificadas en ciego, por el conteo de las células fluorescentes en toda la muestra. El resultado es expresado como células TUNEL-positivas/ $\text{mm}^2$ .

## **12.- MEDIDA DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE**

La medida de la capacidad antioxidante se realizó en orina de 24 horas mediante el empleo del *Antioxidant Assay Kit* (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, EEUU) disponible comercialmente, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Tras diluir las muestras 1/15, se mezclaron 10  $\mu\text{L}$  de la misma con 10  $\mu\text{L}$  de metamioglobina y 150  $\mu\text{L}$  de cromógeno. A continuación se añadieron a todos los pocillos 40  $\mu\text{L}$  de solución de trabajo de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y se incubó la placa en agitación durante 5 minutos a temperatura ambiente. Por último, se determinó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 750 nm con la ayuda de un lector de placas (Synergy, BioTek).

Para hallar el resultado final del experimento, las medidas de absorbancia de las muestras se interpolaron en una recta patrón generada con concentraciones crecientes del reactivo Trolox, tratadas de la misma forma que las muestras con metamioglobina y el cromógeno. Los resultados se expresan como capacidad antioxidante (mM).

### **13.- DETERMINACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO**

Los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fueron medidos en orina de 24 horas mediante el empleo del *Colorimetric Hydrogen Peroxide Kit* (Assay Designs, Stressgen, Ann Arbor, MI), siguiendo las indicaciones del fabricante.

El kit está diseñado para detectar bajas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en fluidos biológicos, mediante la reacción que produce uno de los reactivos que contiene el colorante naranja xilenol, que, en presencia de sorbitol y sulfato ferroso amónico, y en contacto con la muestra produce un color púrpura proporcional a la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presente en ella.

Las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presentes en las muestras fueron cuantificadas por interpolación de las lecturas de absorbancia en una curva estándar generada con los estándares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> proporcionados por el kit, y expresadas en unidades de ng/mL.

### **14.- DETERMINACIÓN DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL $\alpha$**

Se determinó la concentración de TNF $\alpha$  en los sueros de los animales mediante el empleo del *Rat TNF $\alpha$  ELISA Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La concentración de TNF $\alpha$  correspondiente a cada muestra fue cuantificada por interpolación de la diferencia de las lecturas de absorbancia a 450 nm y 550 nm en una curva estándar generada con los estándares proporcionados por el kit, y expresadas en unidades de pg/mL.

### **15.- FARMACOCINÉTICA DE CISPLATINO: ÁREA BAJO LA CURVA**

Para la determinación de los parámetros farmacocinéticos de cisplatino se utilizaron ratas macho WKY con un peso medio de 322  $\pm$  25 g, criadas y estabuladas en el animalario del Pabellón de Medicina y Cirugía Experimental del HGUGM.

Se utilizaron 4 animales, distribuidos de forma aleatoria en los siguientes grupos:

- **Grupo Cisplatino.** Estos animales recibieron cisplatino (5 mg/Kg de peso) en dosis única i.p. disuelto en suero salino. Además, se les administró suero salino (vehículo de cilastatina) i.p. en los mismos volúmenes que el grupo tratado con cilastatina (n=2).
- **Grupo Cisplatino + Cilastatina.** Estos animales fueron tratados con administración única i.p. de cisplatino (5 mg/Kg de peso) disuelto en suero salino, más cilastatina (disuelta en suero salino) a una concentración de 75 mg/Kg de peso (n=2).

Al inicio de la intervención los animales se anestesiaron con ketamina y xilacina (50-80 mg/kg), procediendo a la dilatación de la vena de la cola por aplicación de calor, y posterior canulación con un catéter intravenoso de 24G por el cual se inyectó heparina (5000 UI/mL) cada 5 minutos, para evitar el colapso de la vena.

A través de dicho catéter se extrajeron 0.4 mL de sangre a tiempos 0, 15 y 30 minutos y 1, 2 y 4 horas tras la inyección de los fármacos.

Las muestras de sangre se incubaron primero durante 30 minutos a 37°C, seguido de una hora a 4°C, y después se centrifugaron a 2000 rpm durante 15 minutos a 4°C, con el fin de extraer el suero sanguíneo, que fue congelado a -80°C hasta el momento de su uso.

Las concentraciones de platino presentes en los distintos sueros se determinaron mediante ICP-MS (Thermo X-Series). Los parámetros farmacocinéticos fueron calculados con la ayuda del programa Microsoft Excel, equipado con las funciones PK, escritas para Excel por Joel I. Usansky, Atul Desai y Diane Tang Liu, del Departamento de Farmacocinética y Metabolismo de Drogas (Allergan, Irvine, California, EEUU) ([http:// www.boomer.org/pKin/xcel/pkf/pkf.doc](http://www.boomer.org/pKin/xcel/pkf/pkf.doc)).

## **16.- ACUMULACIÓN DE PLATINO EN CORTEZA Y MÉDULA RENAL**

La concentración de cisplatino en la corteza y médula renales se determinó mediante ICP-MS (Thermo X-Series). Los extractos de tejido fueron obtenidos según el procedimiento descrito en el punto 7 del apartado *Materiales y Métodos-Estudios In Vivo*.

Los datos de ICP-MS fueron adquiridos en modo continuo, monitorizando las señales  $m/z$  de los isótopos  $^{194}\text{Pt}$ ,  $^{195}\text{Pt}$  e  $^{191}\text{Ir}$ , y los resultados fueron expresados como  $\mu\text{g Pt/g}$  proteína tisular.

## **17.- ANÁLISIS DE ESPECIACIÓN DEL PLATINO POR SEC-ICP-MS**

Se realizaron extractos de tejido renal pulverizando dicho tejido en un mortero metálico en presencia de nitrógeno líquido, y se resuspendieron en 1 mL de la misma solución de lisis fría empleada en la extracción de proteínas totales (punto 7, apartado *Materiales y Métodos-Estudios In Vivo*). Los extractos fueron centrifugados a 15000 g durante 40 minutos con el fin de aislar la fracción citosólica presente en el sobrenadante. Tras la centrifugación se procedió de manera similar que en el punto 21 del apartado *Materiales y Métodos-Estudios In Vitro*.

## **18.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para calcular la igualdad de varianza entre los grupos se utilizó el test de Levene. Aquellas variables continuas que presentaban igualdad de varianza y una distribución que se ajustaba a la normal se analizaron mediante el test de ANOVA de una vía. En ningún caso fue necesario utilizar tests no paramétricos. Los resultados son expresados como media  $\pm$  EEM. Valores de  $p \leq 0.05$  se consideraron significativos. Todos los test estadísticos utilizados se realizaron con el programa informático SPSS.



## **VI.- *RESULTADOS***

---

## **VI.1.- *ESTUDIOS IN VITRO***

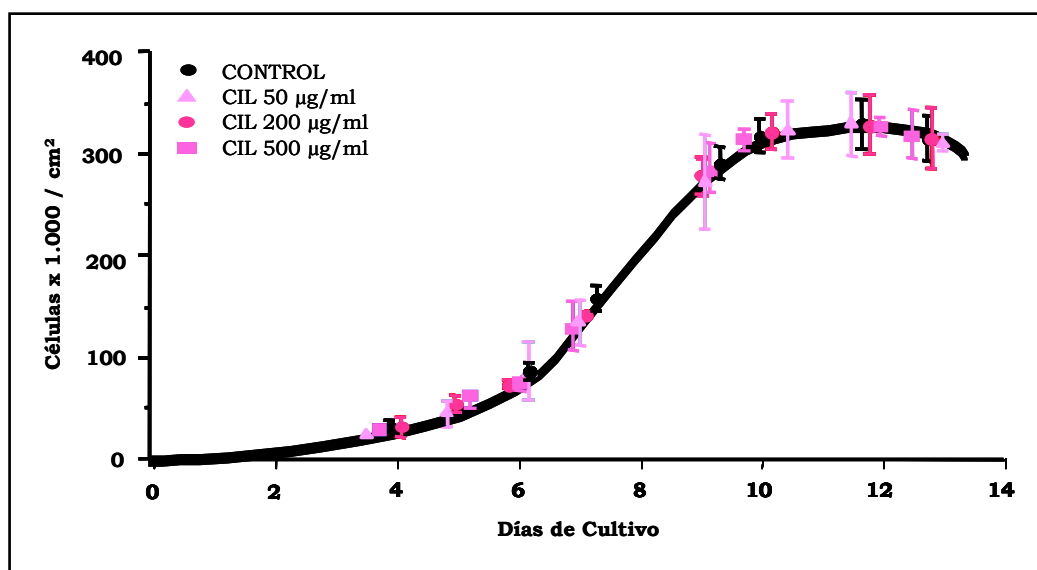
---

## 1.- EFECTO DE CILASTATINA

Para la realización de los ensayos *in Vitro* se utilizaron distintos tipos celulares: cultivos primarios de PTEC, que reproducen las propiedades de las células en el riñón como la presencia de borde en cepillo, transporte polarizado de agua y solutos, etc, células HeLa, línea establecida de células de cáncer de útero, empleada para comprobar la ausencia de interferencia de cilastatina con la capacidad antitumoral del cisplatino y una batería de 5 líneas tumorales, para complementar los resultados obtenidos en células HeLa.

### 1.1.- ESTUDIOS DE DINÁMICA DE CRECIMIENTO

Estudios previos de nuestro laboratorio ya indicaron que cilastatina era una molécula inocua para las PTEC <sup>121</sup>. Para demostrarlo, se determinó la dinámica de crecimiento del cultivo mediante cuantificación *in situ* del número de células. Se pudo observar que el cultivo presentaba una primera fase de adhesión celular a la placa (2-3 días tras la siembra), seguida de una fase de crecimiento exponencial (días 4-9), una fase de confluencia en que las células entran en estado estacionario (hasta el día 12), y por último una fase de senescencia (Figura 12).

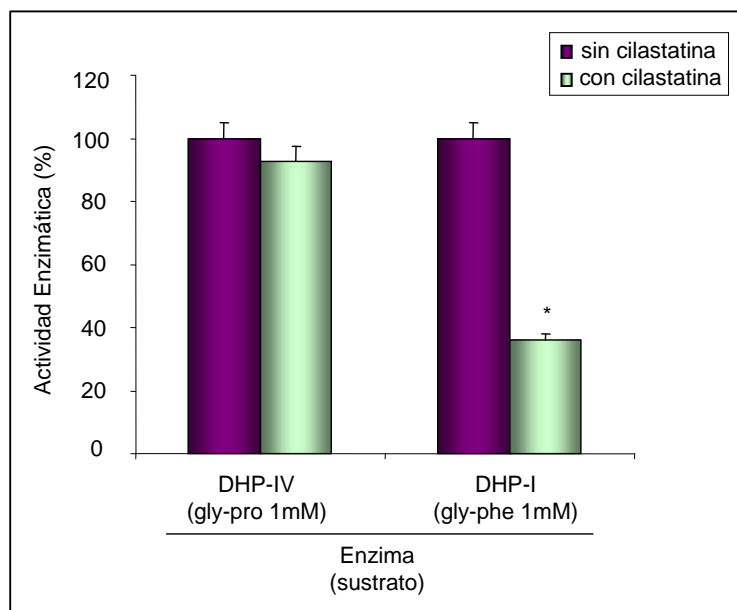


**Figura 12. Dinámica de crecimiento en cultivos de PTEC en presencia de cilastatina a dosis crecientes (50, 200 y 500 µg/mL).** Cilastatina no ejerció ningún efecto sobre el crecimiento celular. Los resultados se expresan como la media ± EEM de células viables contadas por cm<sup>2</sup>. La cuantificación de células se llevó a cabo en un microscopio de contraste de fases (magnificación 40X).

Estas características propias del cultivo de PTEC se ponían de manifiesto tanto en ausencia de cilastatina como en presencia de concentraciones crecientes de la misma, siendo estas seleccionadas desde la dosis terapéutica hasta la más alta alcanzada en sangre. Esto demuestra que cilastatina es un fármaco seguro para las células del epitelio proximal, ya que no modifica su dinámica de crecimiento y por lo tanto no ejerce ningún efecto beneficioso ni nocivo sobre ellas.

## 1.2.- ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE DEHIDROPEPTIDASA I

Para demostrar que la unión cilastatina/DHP-I es específica de esta enzima y no común a todas las DHPs, se midió la actividad de DHP-I y DHP-IV (enzima distribuida uniformemente por todo el organismo) en PTEC tras incubarlas durante 18 horas con los sustratos de ambas enzimas, en presencia y ausencia de cilastatina 200 µg/mL. Como puede observarse en la figura 13 la actividad de DHP-IV no se ve modificada por el tratamiento con cilastatina, mientras que la actividad de DHP-I se ve drásticamente disminuida en su presencia.

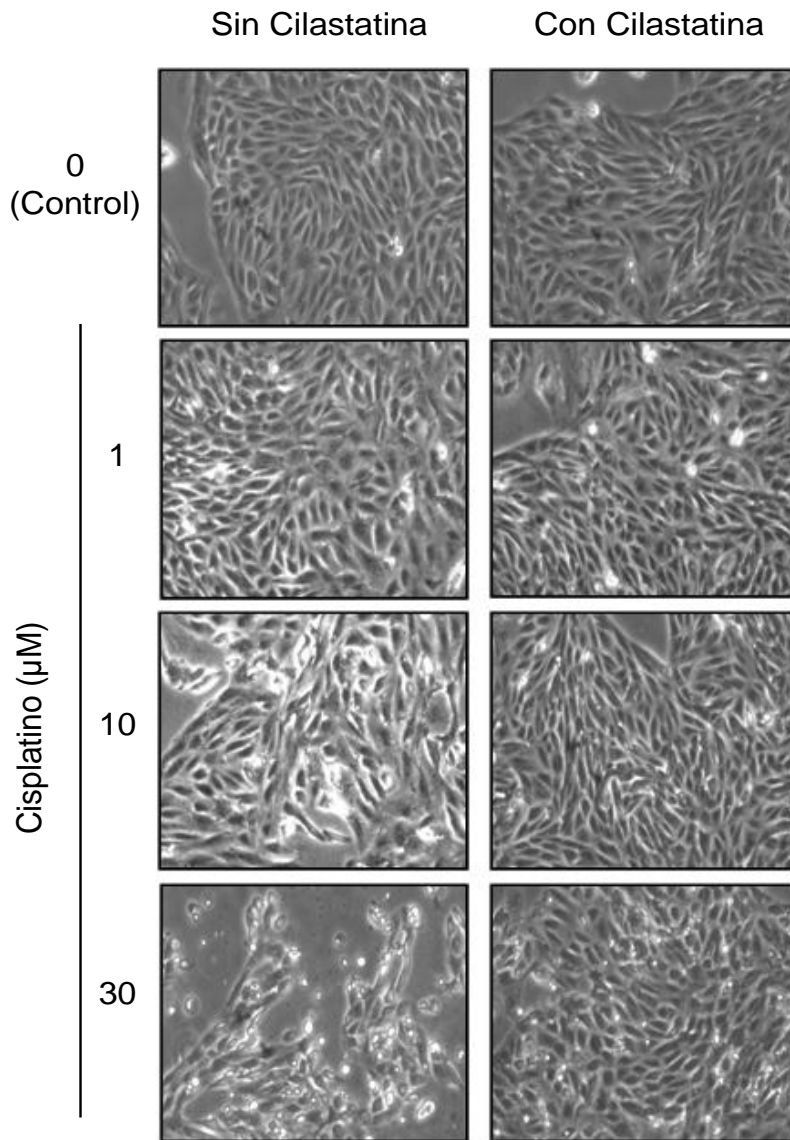


**Figura 13. Actividad enzimática de DHP-I y DHP-IV en cultivos de PTEC control o tratados con cilastatina (200 µg/mL).** En presencia de cilastatina se inhibe en más de un 60% la actividad de DHP-I, mientras que la actividad de DHP-IV permanece intacta. Los resultados se expresan como porcentaje de actividad enzimática frente al control sin tratamiento (considerado 100% de actividad), y representan la media ± EEM de 3 experimentos. ANOVA:  $p < 0.0001$  para el modelo. Análisis post-hoc: \*  $p < 0.01$  vs el mismo dato sin cilastatina.

## 2.- EFECTO DE CISPLATINO. PROTECCIÓN POR CILASTATINA

### 2.1.- INDUCCIÓN DE CAMBIOS MORFOLÓGICOS

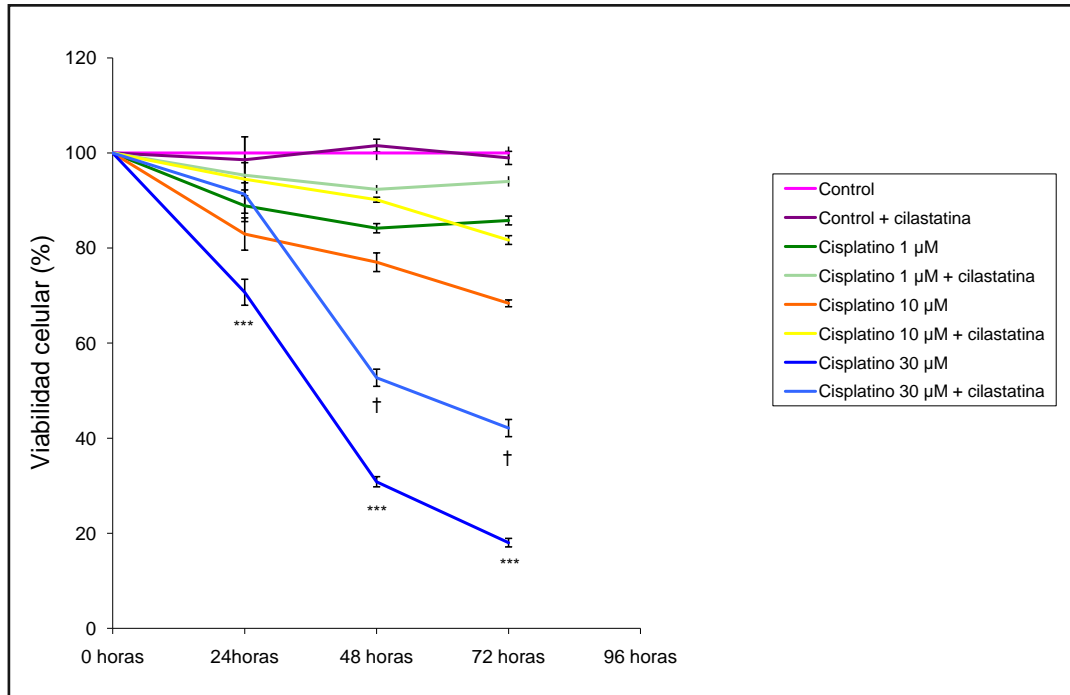
El tratamiento con cisplatino induce una muerte celular tiempo- y dosis-dependiente en cultivos primarios de PTEC. Cuando observamos dichos cultivos mediante microscopía de contraste de fases, podemos ver cómo las células tras 24 horas de tratamiento con cisplatino presentan una morfología redondeada y se desprenden de la placa de cultivo, características propias de células que están sufriendo un proceso de muerte. En cambio, la coincubación con cilastatina muestra una reducción del daño a nivel morfológico producido por cisplatino, evitando que las células se desprendan al sobrenadante y permitiendo que los cultivos alcancen la confluencia (Figura 14).



**Figura 14. Efecto de cilastatina en la morfología de PTEC tratadas con cisplatino.** Se cultivaron PTEC en presencia de cisplatino (1, 10 y 30  $\mu\text{M}$ ) y cisplatino + cilastatina (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 24 horas. Las células tratadas sólo con cisplatino mostraron un mayor grado de muerte (en las dosis altas) que las tratadas con cisplatino + cilastatina (magnificación 40X).

## 2.2.- EFECTO SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR

La alteración del paso de electrones a través de la cadena de transporte mitocondrial es probablemente uno de los signos de daño más significativo detectable en la célula tras el contacto con cisplatino. En la figura 15 se muestran los resultados de la medida de la transferencia electrónica mitocondrial (mediante determinación de la reducción de MTT a azul de formazán) en cultivos de PTEC tras 24, 48 y 72 horas de tratamiento con cisplatino, en presencia o ausencia de cilastatina. Como se muestra en la figura, el tratamiento con cisplatino reduce el porcentaje de células viables de forma significativa con respecto a los controles, siendo además este efecto más marcado a medida que avanza el tiempo. Se puede comprobar cómo la administración de cilastatina en combinación con cisplatino preserva parcialmente la mitocondria de las alteraciones producidas por el citostático, manteniendo un porcentaje de viabilidad celular más cercano a los controles.



**Figura 15. Efecto de cilastatina sobre la viabilidad celular de cultivos de PTEC tratados con cisplatino.** La viabilidad se determinó mediante medida de la capacidad de reducción de MTT a azul de formazán. Cilastatina (200 µg/mL) preservó parcialmente la función mitocondrial de la agresión por cisplatino (1, 10 y 30 µM) a 24, 48 y 72 horas. Los resultados son expresados como porcentaje del valor obtenido en relación al control. Los datos representan la media ± EEM de 4 experimentos. ANOVA:  $p < 0.0001$  para el modelo. Efecto dosis de cisplatino  $p < 0.0001$ , efecto cilastatina  $p < 0.0001$ , efecto tiempo  $p < 0.0001$ , cilastatina x tiempo ns. Análisis post-hoc: \*\*\*  $p < 0.0001$  todos los datos vs control (excepto 30 µM + cilastatina, 10 µM + cilastatina y 1 µM ± cilastatina a 24 horas  $p=ns$ ), †  $p < 0.0001$  para cada condición + cilastatina vs la misma condición sin cilastatina (excepto 10 µM + cilastatina y 30 µM + cilastatina a 24 horas  $p < 0.05$ ).

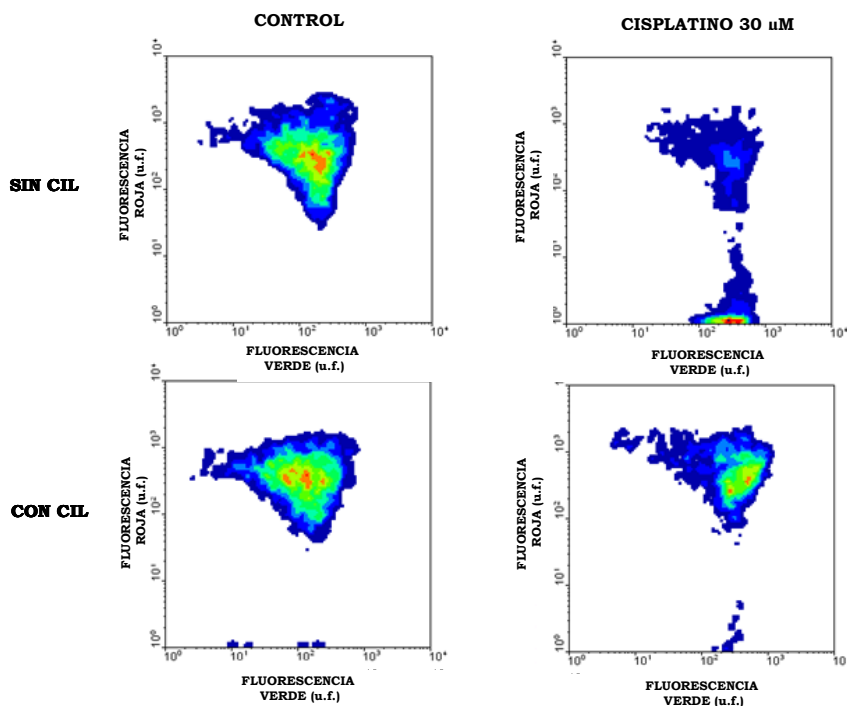
### 2.3.- EFECTO EN EL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

Como se ha podido comprobar en el punto anterior, el cisplatino reduce la viabilidad de las células mediante la alteración de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Para comprobar si el tóxico era capaz de afectar también al potencial de membrana mitocondrial, y si la coadministración de cilastatina tenía algún efecto sobre estas alteraciones, se cuantificó dicho potencial mediante citometría de flujo, empleando el colorante JC-1.

El JC-1 es un marcador catiónico que se acumula tanto en el citosol (emitiendo en verde) de forma monomérica, como a nivel mitocondrial formando agregados (emitiendo en rojo). Esta situación se da en células sanas. Sin embargo, a medida que las células sufren un daño pierden el potencial de membrana y se pierden los agregados, reduciéndose así el porcentaje de emisión en rojo y pudiendo aumentar el verde por el paso de monómeros al citosol.

En la figura 16 se muestran los diagramas de densidad obtenidos mediante citometría de flujo de células tratadas durante 24 horas con cisplatino en combinación

o no con cilastatina. Dichos diagramas muestran un número constante de células distribuidas en función de su fluorescencia. Se puede observar cómo el tratamiento con cisplatino hace que desaparezca casi por completo la fluorescencia roja. Por el contrario, el cotratamiento con cisplatino y cilastatina mantiene la intensidad de fluorescencia en un patrón similar al de los grupos control y control más cilastatina.



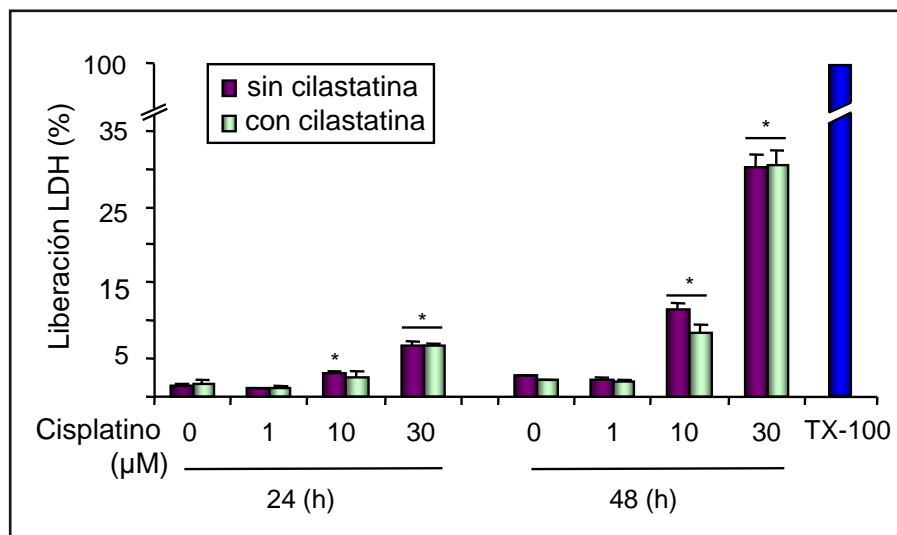
**Figura 16. Efecto de cilastatina sobre la pérdida de potencial de membrana inducido por cisplatino en cultivos de PTEC.** Las células fueron incubadas con cisplatino 30  $\mu\text{M}$  en combinación o no con cilastatina 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 24 horas. El tratamiento con cisplatino produce una caída en la emisión de fluorescencia roja (pérdida del potencial de membrana). La coadministración con cilastatina mantiene el patrón de emisión rojo/verde semejante a los de ambos grupos control.

## 2.4.- INDUCCIÓN DE NECROSIS CELULAR

Como se comentó anteriormente, el tratamiento con cisplatino produce tanto muerte por apoptosis como por necrosis en cultivos celulares, dependiendo de la dosis de fármaco empleada. Para comprobar si durante el tratamiento de las células con las dosis elegidas de cisplatino existía algún otro tipo de muerte celular además de la apoptosis, y si cilastatina era capaz de impedirla de algún modo, se determinó la liberación por parte de las PTEC de LDH al medio de cultivo. La presencia de esta enzima en el exterior celular indica muerte celular por necrosis, en la que se produce una pérdida de la integridad de la membrana liberando al medio externo todo el contenido celular.

La figura 17 muestra la concentración de LDH en el medio de cultivo de PTEC tratadas con distintas concentraciones de cisplatino durante 24 y 48 horas. Asumiendo como el 100% de liberación de LDH (y por lo tanto de necrosis), la producida por el tratamiento de las células con el detergente Tritón X-100, se puede

observar cómo a 24 horas la generación de necrosis no supera en ningún caso el 5%, mientras que a 48 horas el porcentaje de liberación de LDH máximo alcanzado es del 30% aproximadamente. La administración de cilastatina en combinación con cualquiera de las dosis de cisplatino no reduce la muerte celular por necrosis inducida por cisplatino.



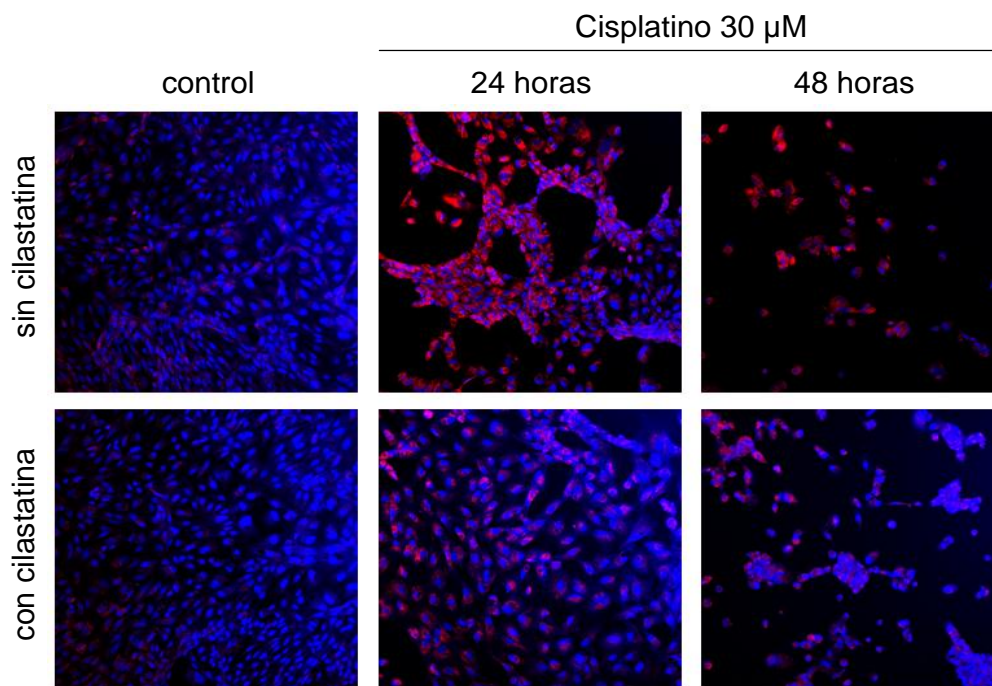
**Figura 17. Efecto de cilastatina sobre la necrosis inducida por cisplatino en cultivos de PTEC.** La necrosis se determinó mediante medida de la liberación de LDH al sobrenadante. Los datos son expresados como porcentaje del total de LDH liberada (obtenida por tratamiento celular con Tritón X-100). Los datos representan la media ± EEM de 3 experimentos separados. ANOVA:  $p < 0.0001$  para el modelo. Efecto dosis de cisplatino  $p < 0.0001$ , efecto cilastatina ns, efecto tiempo  $p < 0.0001$ , cilastatina x tiempo ns. Análisis post-hoc: \*  $p < 0.05$  vs control (cisplatino 0  $\mu\text{M}$ ).

## 2.5.- INDUCCIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO CELULAR

### 2.5.1.- Cilastatina inhibe la producción de radical superóxido

Se cultivaron PTEC en presencia de cisplatino durante 24 y 48 horas en presencia/ausencia de cilastatina. Durante el tratamiento con cisplatino, en las células renales se produce un daño progresivo, con aumento del radical superóxido (representado por la tinción en rojo) y disminución del número de células (los núcleos celulares aparecen teñidos en azul). El radical superóxido se produce cuando el oxígeno acepta un electrón, que queda desapareado. Esto tiene lugar principalmente en las mitocondrias, y se produce como consecuencia del desequilibrio redox producido por el cisplatino. Debido a su alta toxicidad, el radical superóxido es continuamente destruido por los mecanismos antioxidantes de la célula, formándose un residuo secundario, el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , menos reactivo que el superóxido. La coadministración de cilastatina impidió parcialmente la aparición de radical superóxido, así como el desprendimiento de las células al sobrenadante (Figura 18).





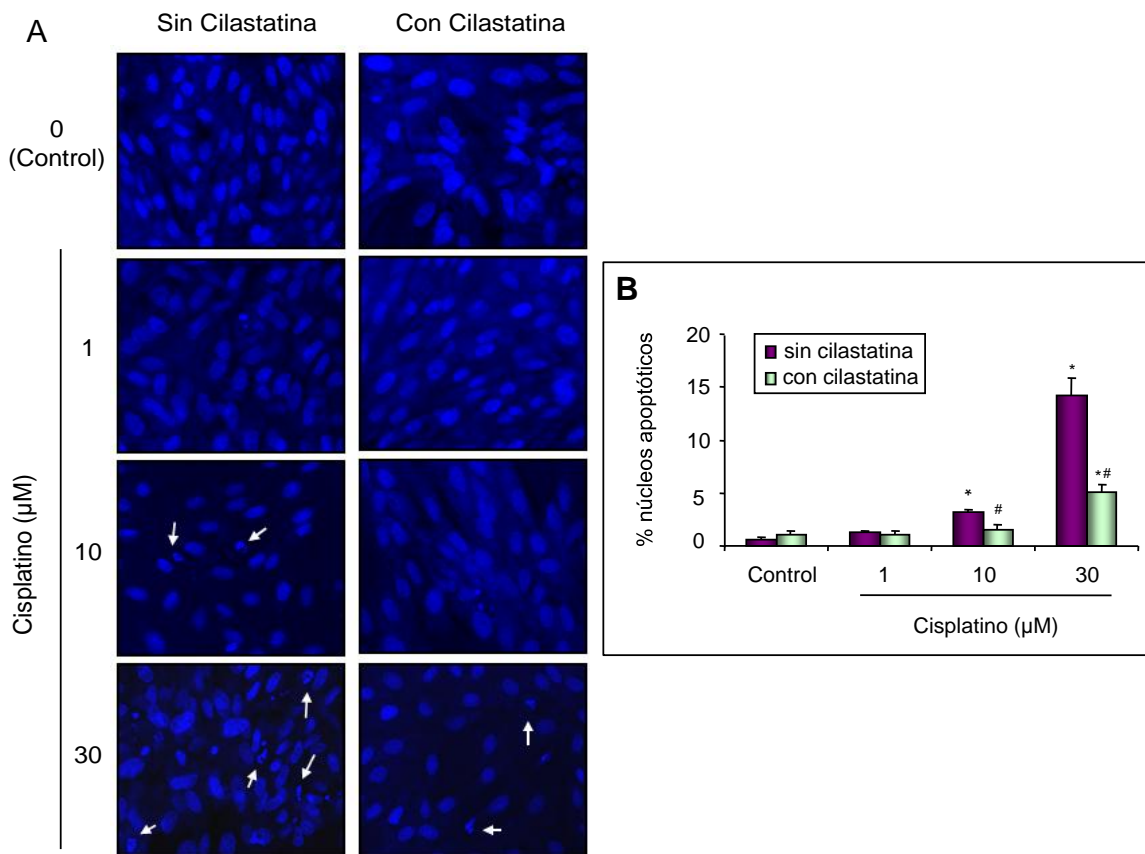
**Figura 18. Efecto de cisplatino y cilastatina sobre la generación de radical superóxido mitocondrial.** Se trataron PTEC con cisplatino 30  $\mu$ M o cisplatino + cilastatina 200  $\mu$ g/mL durante 24 y 48 horas. El tratamiento con cisplatino incrementó progresivamente la formación de radical superóxido. La administración de cilastatina inhibió parcialmente este aumento. La formación de radical superóxido se determinó mediante tinción con MitoSOX Red®, visualizada en color rojo. La presencia de células se determinó mediante tinción de los núcleos con DAPI.

## 2.6.- INDUCCIÓN DE APOPTOSIS CELULAR

Los resultados expuestos anteriormente indican que cilastatina protege a las células frente a la agresión por cisplatino tanto a nivel estructural como a nivel funcional. Teniendo en cuenta dichos resultados, y que cilastatina no es capaz de reducir la generación de necrosis en la célula pero sí la de estrés oxidativo (EO), nos planteamos si esta protección se produce por interferencia en alguno de los puntos de las vías de muerte por apoptosis, fenómeno bien documentado en la patogenia de la nefrotoxicidad producida por cisplatino.

### 2.6.1.- Cilastatina reduce la aparición de alteraciones nucleares

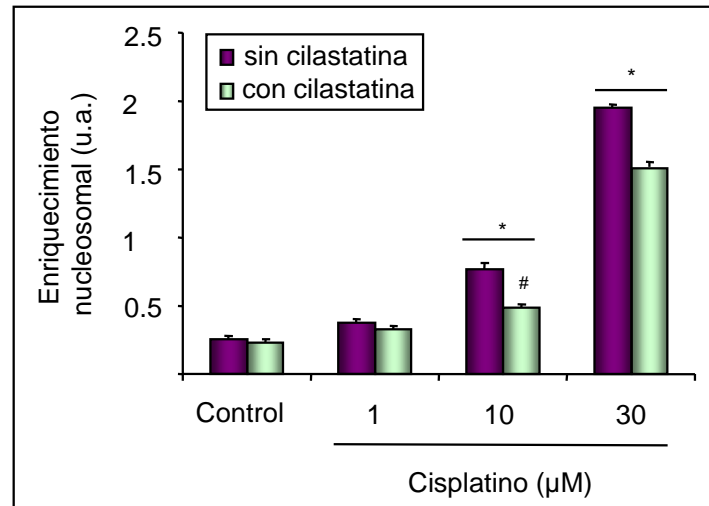
Durante la apoptosis son características las alteraciones morfológicas del núcleo, como la condensación de la cromatina o la fragmentación nuclear. Si visualizamos cultivos de PTEC teñidos con DAPI, fluoróforo que se une fuertemente al ADN y que por lo tanto tiñe los núcleos, con ayuda de un microscopio confocal podemos observar que las células tratadas con cisplatino presentan núcleos característicamente apoptóticos en las dos concentraciones más altas, y de forma dosis-dependiente. Sin embargo, la coadministración con cilastatina reduce en gran medida la fragmentación nuclear (Figura 19A). Esto se corroboró mediante la cuantificación de células con el núcleo alterado con respecto al total (Figura 19B).



**Figura 19. Efecto de cilastatina sobre las alteraciones nucleares producidas por cisplatino.** A, Tinción nuclear con DAPI. PTEC tratadas con cisplatino 1, 10 y 30 μM y cisplatino + cilastatina (200 μg/mL) durante 24 horas fueron teñidas con DAPI y observadas al microscopio confocal. Las células tratadas sólo con cisplatino mostraron un mayor número de núcleos apoptóticos (a 10 y 30 μM) que las tratadas con cisplatino + cilastatina. Las flechas indican la presencia de núcleos con morfología apoptótica. B, cuantificación de núcleos apoptóticos. Los resultados se expresan como porcentaje de núcleos con apariencia apoptótica con respecto al total. Los datos representan la media ± EEM de al menos 3 experimentos independientes. ANOVA:  $p < 0.0001$  para el modelo. Análisis post-hoc: \*  $p < 0.05$  vs control, #  $p < 0.05$  vs los mismos datos sin cilastatina.

### 2.6.2.- Cilastatina reduce la aparición nucleosomal en el citosol

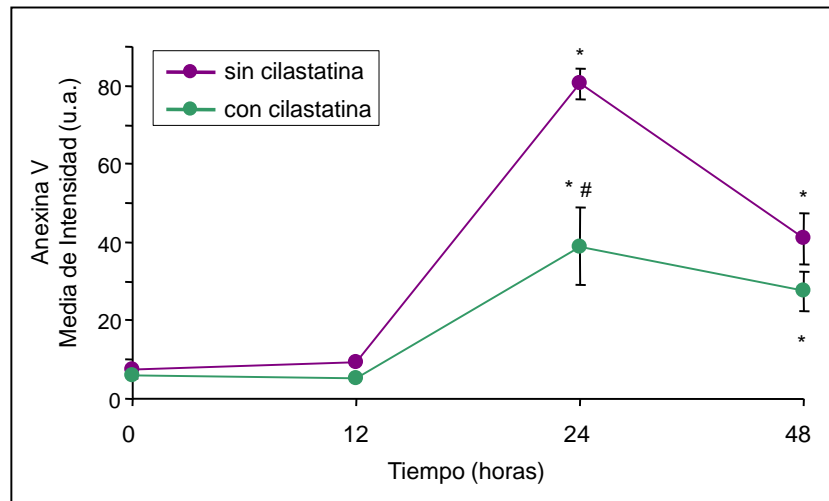
La liberación de nucleosomas al citosol se genera como consecuencia de la fragmentación del ADN producida durante la apoptosis. En la figura 20 se representa la fragmentación nucleosomal del ADN sufrido por las PTEC en cultivo tras 24 horas de tratamiento con cisplatino y/o cilastatina. Las PTEC expuestas a cisplatino presentan un incremento dosis-dependiente de nucleosomas liberados al citosol. Este enriquecimiento nucleosomal se ve significativamente reducido cuando las células son tratadas simultáneamente con cilastatina (Figura 20).



**Figura 20. Efecto de cilastatina sobre el enriquecimiento nucleosomal inducido por cisplatino en cultivos de PTEC.** Los oligonucleosomas presentes en la fracción soluble de las células tras 24 horas de tratamiento con cisplatino (1, 10 y 30 μM) y cisplatino + cilastatina (200 μg/mL) fueron detectados mediante un ensayo de ELISA. El tratamiento con cilastatina redujo parcialmente la aparición de nucleosomas inducido por el tratamiento con cisplatino. Los datos se representan como la media ± EEM de 4 experimentos independientes. ANOVA:  $p < 0.0001$  para el modelo. Efecto dosis de cisplatino  $p < 0.0001$ , efecto cilastatina  $p < 0.0001$ . Análisis post-hoc: \*  $p < 0.05$  vs control, #  $p < 0.05$  vs los mismos datos sin cilastatina.

### 2.6.3.- Cilastatina reduce los cambios en la membrana celular

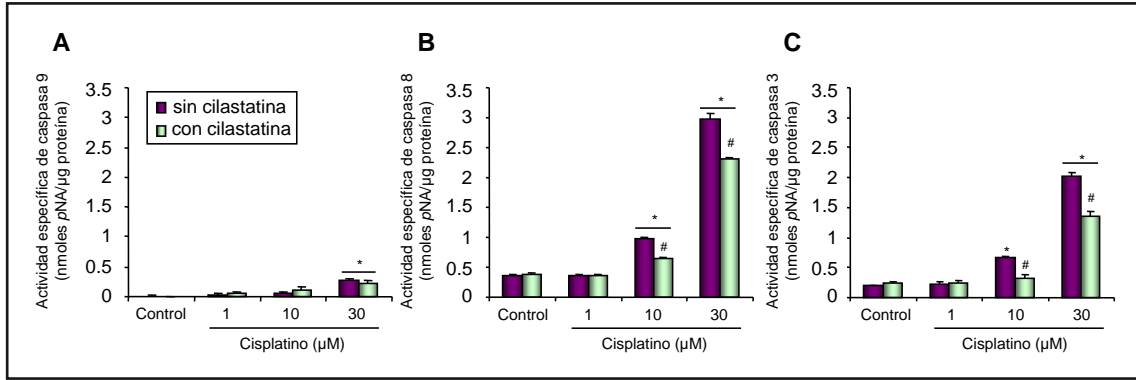
Durante las etapas tempranas de la apoptosis es característica la pérdida de asimetría de los fosfolípidos de la membrana plasmática, que permite la exposición de fosfolípidos aniónicos (habitualmente restringidos a la cara interna de la bicapa lipídica) en la cara externa de la membrana plasmática, frente a los fosfolípidos neutros que predominan en condiciones normales. Uno de estos fosfolípidos aniónicos es la fosfatidilserina, para la cual los macrófagos poseen receptores, y que por lo tanto actuará como “señalizador” para la fagocitosis de la célula apoptótica<sup>129</sup>. La presencia de fosfatidil serina en la cara externa de la bicapa lipídica se puede detectar mediante tinción con anexina V-FITC. La anexina V es una proteína que se une con avidéz y de forma específica a los radicales de fosfatidilserina, permitiendo cuantificar las células apoptóticas mediante medida de la tinción de las mismas con anexina V marcada con FITC. Cultivos de PTEC fueron tratados con cisplatino 30 μM en presencia o ausencia de cilastatina durante 12, 24 o 48 horas, pudiendo observar que el tratamiento con cisplatino produjo un incremento en la tinción con anexina V/FITC que alcanza su máximo a 24 horas y persiste hasta las 48 horas. La coincubación con cilastatina muestra una reducción de un 53% en la tinción con anexina V/FITC (Figura 21).



**Figura 21. Efecto de cilastatina sobre la externalización de fosfatidilserina producida durante el tratamiento con cisplatino.** Tras 12, 24 y 48 horas de tratamiento con cisplatino 30  $\mu\text{M}$  y cisplatino + cilastatina (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) se determinó la externalización de fosfatidilserina mediante tinción con anexina V/FITC de células no adherentes y posterior cuantificación por microscopía confocal. El tratamiento con cilastatina impidió la externalización de fosfatidilserina inducida por cisplatino de forma significativa tras 24 y 48 horas de tratamiento. Los resultados se expresan como la media de intensidad de anexina V/FITC, y representan la media  $\pm$  EEM de 3 experimentos independientes. ANOVA:  $p < 0.0001$  para el modelo. Efecto cilastatina  $p < 0.0001$ , efecto tiempo  $p < 0.0001$ , cilastatina x tiempo ns. Análisis post-hoc: \*  $p < 0.05$  vs el mismo dato sin cilastatina a tiempo 0, #  $p < 0.0001$  vs los mismos datos sin cilastatina.

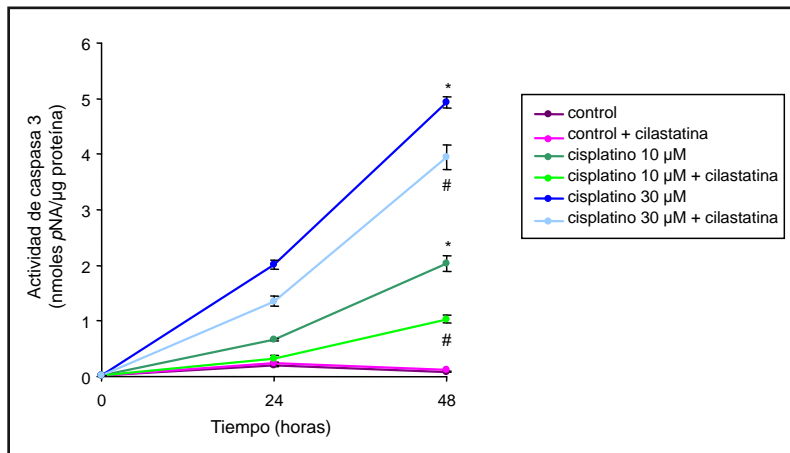
#### 2.6.4.- Cilastatina impide el aumento de actividad de caspasas

Hasta el momento, los experimentos realizados permiten confirmar que cilastatina es capaz de impedir la generación de apoptosis a nivel general; pero dichos experimentos no nos permiten determinar en cual de las vías apoptóticas está interfiriendo cilastatina. Para intentar determinarlo estudiamos la activación de tres caspasas: una iniciadora de la vía intrínseca: caspasa 9; una caspasa iniciadora de la vía de los receptores de muerte: caspasa 8, y finalmente caspasa 3, una de las efectoras finales del proceso. En la figura 22 se muestra la actividad de las caspasas iniciadoras (8 y 9) de ambas vías, y de la ejecutora (3) tras 24 horas de tratamiento con cisplatino en presencia/ausencia de cilastatina. Se puede observar cómo tras 24 horas, los tratamientos con cisplatino 10 y 30  $\mu\text{M}$  producen un aumento significativo de la actividad de las caspasas 8 y 3 en PTEC, y cómo la coadministración con cilastatina es capaz de inhibir parcialmente esta activación. Este aumento no se observa en el caso de la caspasa 9 por el tratamiento con 10  $\mu\text{M}$  de cisplatino, y el tratamiento con cisplatino 30  $\mu\text{M}$  solamente produce un discreto aumento en la actividad de la enzima. Este comportamiento diferencial en caspasa 9 puede deberse posiblemente a una activación más temprana o tardía de la misma, por lo que tras el tratamiento con cisplatino durante 24 horas ha sido prácticamente imposible de detectar. Sin embargo, es evidente la participación de la vía intrínseca en la apoptosis inducida por cisplatino, y la interferencia de cilastatina en dicha vía.



**Figura 22. Efecto de cisplatino y cilastatina sobre la actividad de caspasas.** Actividad de caspasa 9, 8 y 3 (A, B y C respectivamente) tras tratamiento con cisplatino (1, 10 y 30  $\mu\text{M}$ ) solo o en combinación con cilastatina (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 24 horas. El tratamiento con cisplatino 30  $\mu\text{M}$  aumentó significativamente los niveles de actividad de las 3 caspasas. Cisplatino 10  $\mu\text{M}$  aumentó los niveles de actividad de las caspasas 8 y 3, pero no de la 9. El tratamiento con cisplatino 1  $\mu\text{M}$  no aumentó la actividad de las enzimas. La coadministración de cilastatina 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  inhibió parcial o totalmente el incremento en la actividad de las enzimas, excepto en el caso de la caspasa 9. Los resultados se expresan como nmoles de pNA liberados por hora/ $\mu\text{g}$  de proteína. Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 4 experimentos. ANOVA:  $p < 0.0001$  para el modelo. Efecto dosis de cisplatino  $p < 0.0001$ , efecto cilastatina  $p < 0.0001$ , cilastatina x cisplatino  $p < 0.0001$ . Análisis post-hoc: \*  $p < 0.01$  vs control, #  $p < 0.01$  vs los mismos datos sin cilastatina.

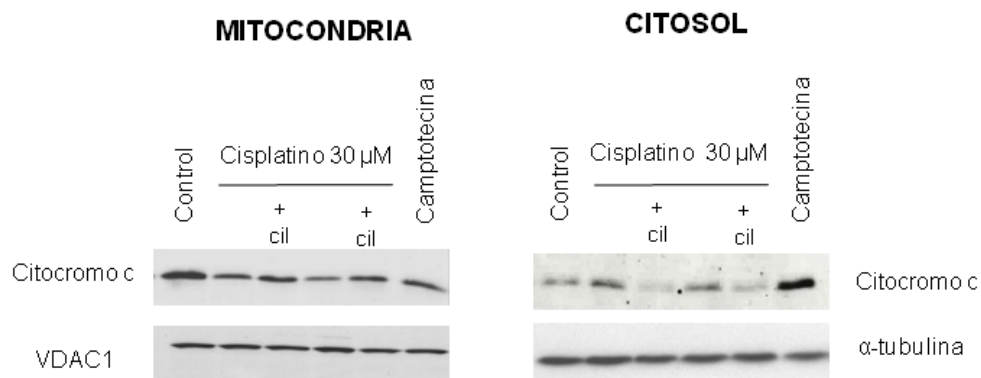
A la vista de estos resultados se determinaron los niveles de actividad de caspasa 3 también a 48 horas, para comprobar si aun existía aumento y protección en la misma a tiempos más largos. Tras 48 horas de tratamiento con cisplatino 10 y 30  $\mu\text{M}$  y/o cilastatina 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se observó un aumento progresivo de la actividad de caspasa 3 a ambas dosis de cisplatino. Como se había mostrado anteriormente a 24 horas, la administración de cilastatina también fue capaz de inhibir parcialmente el aumento a 48 horas (Figura 23).



**Figura 23. Curso temporal de activación de caspasa 3 en presencia de cisplatino y/o cilastatina.** Se midió la actividad de caspasa 3 en PTEC tras tratamiento de 24 y 48 horas con cisplatino 10 y 30  $\mu\text{M}$ , y cisplatino + cilastatina (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). El tratamiento con cisplatino aumentó la actividad de caspasa 3 de forma dosis-dependiente, siendo más alta a medida que avanzaba el tiempo. La coadministración con cilastatina inhibió parcialmente la activación de caspasa 3. Los resultados se expresan como nmoles de pNA liberados por hora/ $\mu\text{g}$  de proteína. Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 4 experimentos. ANOVA:  $p < 0.0001$  para el modelo. Efecto dosis de cisplatino  $p < 0.0001$ , efecto cilastatina  $p < 0.0001$ , cilastatina x cisplatino  $p < 0.0001$ . Análisis post-hoc: \*  $p < 0.0001$  vs control, #  $p < 0.01$  vs los mismos datos sin cilastatina.

### 2.6.5.- Cilastatina reduce la liberación de citocromo c

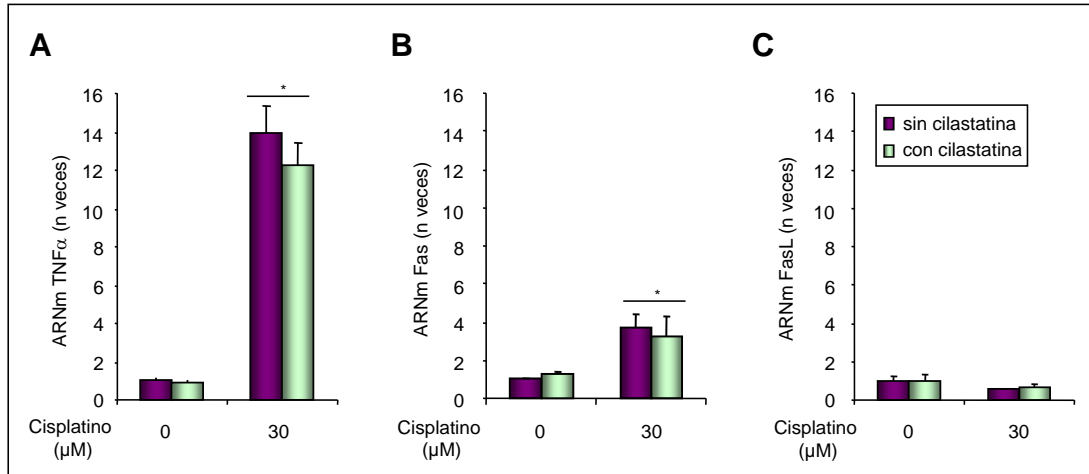
Como consecuencia de la activación de caspasa 8, o bien por la presencia de señales extracelulares inductoras de apoptosis, se produce la liberación de citocromo c al citosol, contribuyendo a la formación del apoptosoma. En la figura 24 se muestra la presencia de citocromo c tanto a nivel mitocondrial como citosólico, tras tratar PTEC durante 12 horas con cisplatino en presencia/ausencia de cilastatina. Se puede observar cómo en ausencia de cisplatino el citocromo c se localiza a nivel mitocondrial, mientras que el tratamiento con cisplatino induce la traslocación del mismo desde la mitocondria al citosol. Sin embargo, la administración simultánea de cisplatino y cilastatina hace que esta proteína permanezca en la mitocondria, quedando prácticamente ausente en la fracción citosólica.



**Figura 24. Efecto de cisplatino y cilastatina sobre la liberación de citocromo c.** Se determinó la presencia de citocromo c en fracción mitocondrial y citosólica de PTEC tras tratamiento de 12 horas con cisplatino 30  $\mu$ M, y cisplatino + cilastatina (200  $\mu$ g/mL). El tratamiento con cisplatino produjo la liberación de citocromo c desde la mitocondria al citosol. La coadministración con cilastatina inhibió dicha liberación. Se empleó el tratamiento con camptotecina como control positivo (100% de liberación).

### 2.6.6.- Cilastatina no afecta a los cambios transcripcionales

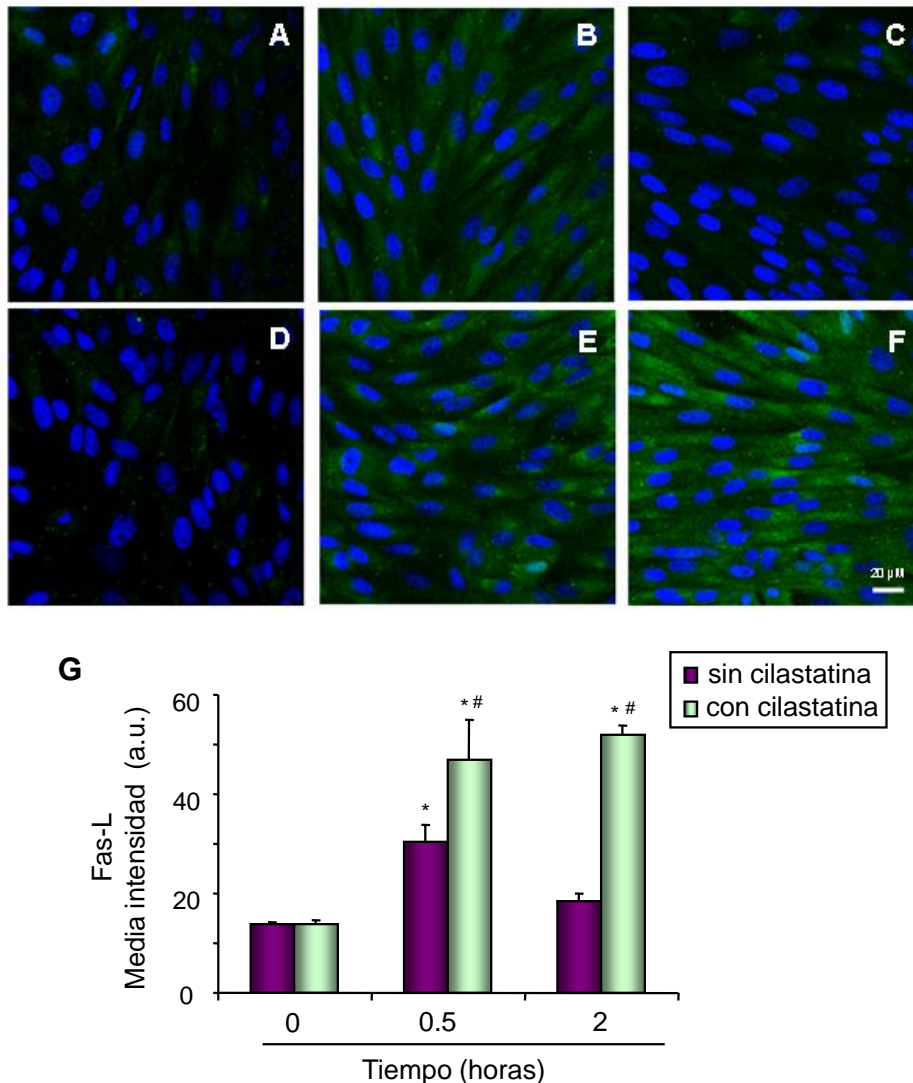
Durante la apoptosis inducida por cisplatino la célula renal sufre diversos cambios, entre los que se encuentran los producidos a nivel transcripcional, modificando la expresión de multitud de genes que se verán implicados en el proceso. Con el fin de comprobar si cilastatina era capaz de modificar los cambios a nivel transcripcional producidos durante la nefrotoxicidad inducida por cisplatino, se decidió estudiar mediante PCR la expresión génica a tiempo real de tres mediadores fundamentales en la vía extrínseca de la apoptosis: TNF $\alpha$ , Fas y FasL. El tratamiento con cisplatino durante 24 horas incrementó la transcripción de TNF $\alpha$  y Fas en PTEC, pero por el contrario no modificó los niveles en el ARNm de FasL. Cilastatina no ejerció ningún efecto en la expresión de los genes estudiados, sugiriendo que la nefroprotección por cilastatina ocurre posteriormente a las modificaciones transcripcionales inducidas por cisplatino (Figura 25).



**Figura 25. Efecto de cisplatino y cilastatina sobre la regulación transcripcional de genes apoptóticos en PTEC.** Se cultivaron células PTEC en presencia de cisplatino 30  $\mu$ M y cisplatino + cilastatina (200  $\mu$ g/mL) durante 24 horas. La expresión de TNF $\alpha$  (A), Fas (B) y FasL (C) fue analizada por RT-PCR cuantitativa. Los resultados representan la media  $\pm$  EEM de 4 experimentos independientes. ANOVA:  $p < 0.0001$  para el modelo. Análisis post-hoc: \*  $p < 0.05$  vs control.

### 2.6.7.- Cilastatina previene la internalización del ligando de Fas

Para confirmar la posibilidad de que la interacción cilastatina/DHP-I pudiera afectar a etapas post-transcripcionales de la vía extrínseca de la apoptosis, y localizar el nivel de la interacción, se analizó mediante microscopía confocal la localización de FasL a lo largo de su proceso de unión a Fas y su internalización durante las primeras dos horas tras la agresión por cisplatino. En las imágenes se puede comprobar cómo, en presencia de cisplatino, aumenta la presencia de FasL en la superficie celular tras 30 minutos de tratamiento, pero desaparece de la membrana tras 2 horas. En presencia de cilastatina no se modifica el patrón de distribución observado a los 30 minutos. Sin embargo, después de 2 horas de tratamiento FasL continua anclado a la membrana, sugiriendo una inhibición de cilastatina sobre la internalización del complejo Fas-FasL (Figura 26). Estos datos se corroboraron por la cuantificación de la tinción, realizada a todos los tiempos estudiados (Figura 26G).

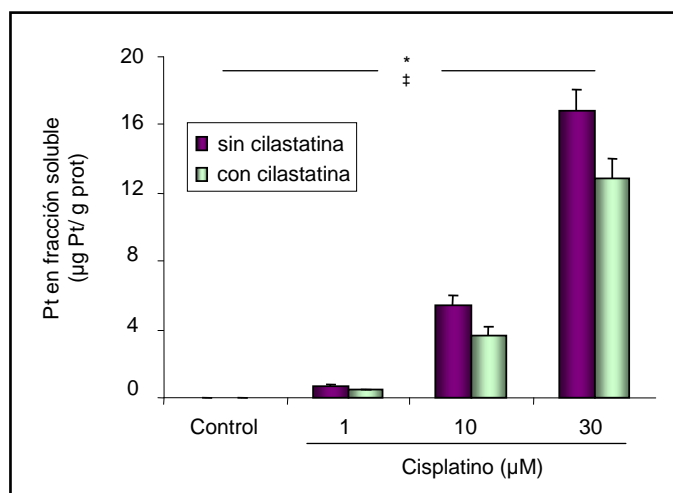


**Figura 26. Efecto de cisplatino y cilastatina en la internalización de FasL.** Imágenes representativas de 3 inmunolocalizaciones independientes de FasL tras tratamiento con cisplatino 30 µM durante 0, 0.5 y 2 horas (A, B y C) o cisplatino + cilastatina 200 µg/mL a los mismos tiempos (D, E y F). El tratamiento con cisplatino muestra presencia de FasL en la membrana tras 0.5 horas y desaparición del mismo al cabo de 2 horas. La coadministración de cilastatina impide la internalización de FasL tras 2 horas de tratamiento. Las imágenes fueron adquiridas por microscopía confocal. G, cuantificación de la intensidad de fluorescencia de FasL. Los resultados representan la media ± EEM de 3 experimentos. ANOVA:  $p < 0.0001$  para el modelo. Análisis post-hoc: \*  $p < 0.05$  vs control, #  $p < 0.05$  vs los mismos datos sin cilastatina

## 2.7.- EFECTO DE CILASTATINA SOBRE LA CAPTACIÓN CELULAR DE CISPLATINO

La nefrotoxicidad inducida por cisplatino depende en parte de la concentración intracelular del fármaco alcanzada en las PTEC. Tras 24 horas de incubación con cisplatino solo o en combinación con cilastatina, se midió la acumulación de fármaco en la fracción soluble celular, pudiendo observar que dicha acumulación presenta un patrón de incremento dosis-dependiente. La coincubación con cilastatina redujo de manera significativa la captación celular de cisplatino en las dosis altas de fármaco (Figura 27).

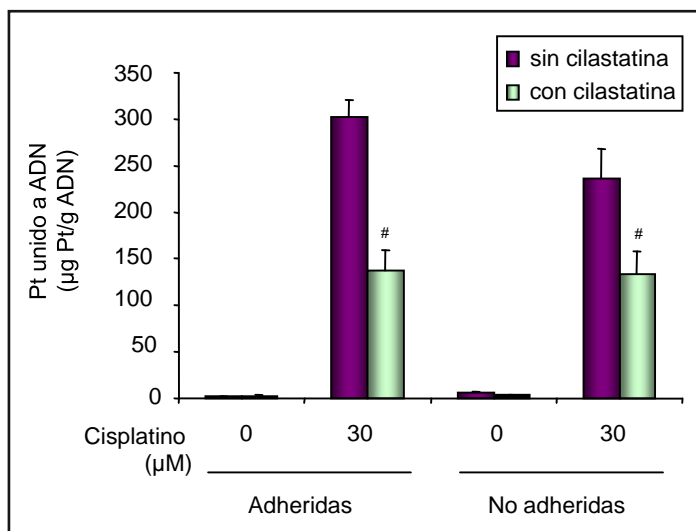




**Figura 27. Acumulación de cisplatino en la fracción soluble celular.** Se trataron PTEC con cisplatino 1, 10 y 30 µM y cisplatino + cilastatina 200 µg/mL durante 24 horas, y se midió la concentración de Pt (µg Pt/g proteína) en la fracción soluble celular por espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo. La concentración de Pt aumentó de forma dosis-dependiente. La coadministración con cilastatina impidió parcialmente este aumento. Los valores se expresan como la media ± EEM de 4 experimentos. ANOVA:  $p < 0.0001$  para el modelo. \* efecto cilastatina  $p < 0.05$ , ‡ efecto dosis  $p < 0.05$ .

## 2.8.- EFECTO DE CILASTATINA SOBRE LA INTERACCIÓN CISPLATINO/ADN

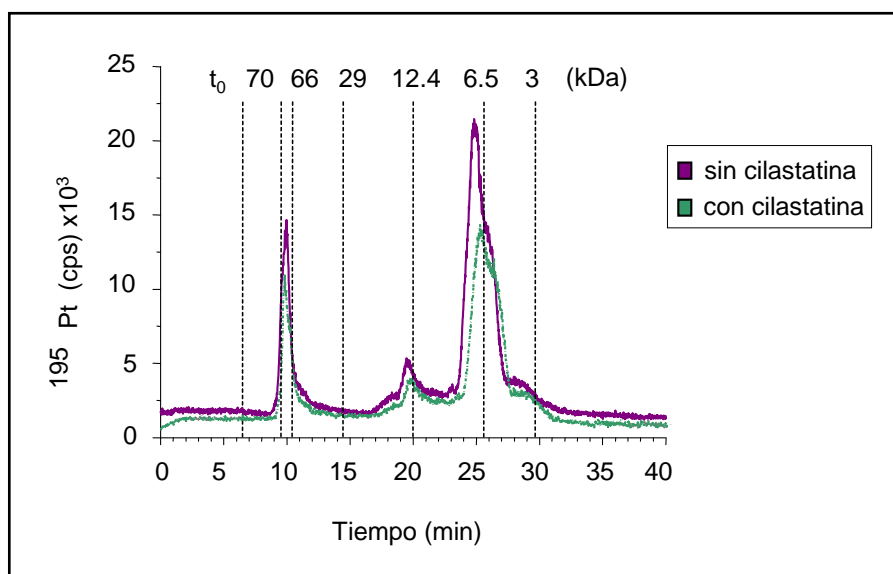
La molécula de cisplatino se une a la de ADN para ejercer su acción farmacológica o terapéutica. Sin embargo, esta unión es la que produce en gran medida la nefrotoxicidad secundaria al tratamiento con cisplatino, ya que desencadena toda una serie de fenómenos que llevan a la muerte de la célula renal. Debido al gran desprendimiento celular de la placa de cultivo observado en experimentos anteriores, se decidió medir la concentración de cisplatino unido a ADN tanto en PTEC adheridas a la placa como en células desprendidas al sobrenadante (no adheridas), después de tratarlas durante 24 horas con cisplatino sólo o cisplatino con cilastatina. Se pudo observar que las células desprendidas al sobrenadante no presentaban concentraciones de cisplatino unido a ADN mayores que las adheridas a la placa. La coadministración de cilastatina redujo en aproximadamente un 55% (en células adheridas) y un 44% (en células desprendidas) la concentración de Pt unido a la molécula de ADN. Tampoco se observan diferencias en la unión de cisplatino a ADN tras el tratamiento con cilastatina entre las células adheridas a la placa y las células desprendidas al sobrenadante (Figura 28).



**Figura 28. Concentración de cisplatino unido a ADN.** Se trataron PTEC con cisplatino 30 µM y cisplatino + cilastatina 200 µg/mL durante 24 horas, y se midió la concentración de Pt unido a ADN (µg Pt/g ADN) por espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo, en PTEC tanto adheridas como desprendidas en la placa de cultivo. La concentración de Pt unido a ADN disminuyó de forma significativa en presencia de cilastatina en ambos casos. Los valores se expresan como la media ± EEM de 4 experimentos. ANOVA: #p < 0.05 vs los mismos datos sin cilastatina.

### 2.9.- EFECTO DE CILASTATINA SOBRE LA ESPECIACIÓN DE CISPLATINO

En la figura 29 se muestra la especiación del cisplatino en el interior celular tras tratamientos de 24 horas con cisplatino 10 µM o cisplatino en combinación con cilastatina 200 µg/mL. Como se puede comprobar la presencia de cilastatina no induce ningún cambio en el perfil de proteínas unidas a platino. Se observó platino unido a proteínas a lo largo de todo el rango de separación (3-70 kDa), y los picos más intensos se correspondieron con complejos cisplatino-biomoléculas entre 7 y 70 kDa. Además, no se hallaron picos significativos correspondientes al cisplatino intacto o al complejo intracelular monoacuo, indicando que todo el platino se encuentra unido a biomoléculas.



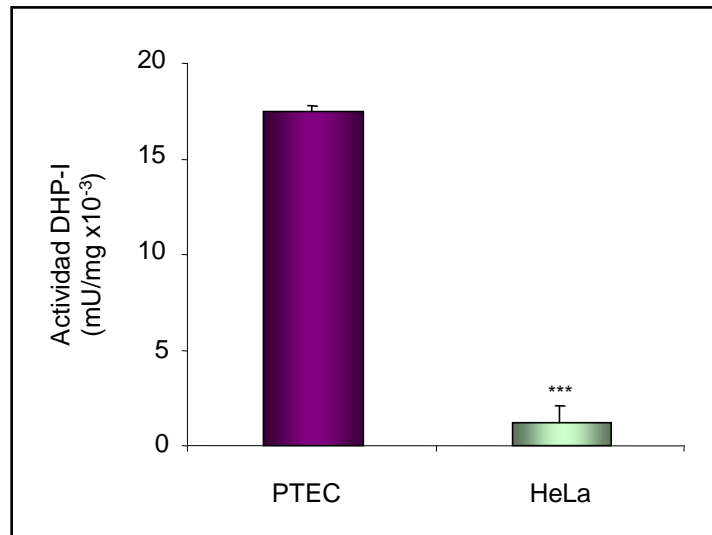
**Figura 29. Cromatograma de la especiación de cisplatino en extractos citosólicos de células del túbulo proximal.** La señal de <sup>195</sup>Pt fue monitorizada por SEC/ICP/MS en extractos citosólicos de PTEC tratadas durante 24 horas con cisplatino 10 µM o cisplatino + cilastatina 200 µg/mL. Los picos de ambos cromatogramas presentan los mismos tiempos de retención e intensidades relativas similares. La gráfica es representativa de 3 experimentos independientes.

### 3.- EFECTO DE CILASTATINA SOBRE LA CAPACIDAD ANTITUMORAL DE CISPLATINO

Para evaluar si cilastatina era capaz de interferir con la capacidad tumoricida de cisplatino se realizaron diversos experimentos en células HeLa, línea celular establecida de carcinoma de útero producido por el virus del papiloma humano, cáncer para cuyo tratamiento se emplea el cisplatino. Además, se ha estudiado una batería de células tumorales, procedentes de tumores diana de cisplatino, con el fin de corroborar los resultados obtenidos en células HeLa.

#### 3.1.- ENSAYO DE ACTIVIDAD DE DEHIDROPEPTIDASA I

Como se ha comentado anteriormente, cilastatina se une de forma específica a DHP-I, inactivándola, y dicha unión parece ser responsable de la capacidad nefroprotectora de cilastatina frente a diferentes de tóxicos. La distribución de DHP-I está restringida a las PTEC (mayoritariamente) y a las células del epitelio intestinal, no pudiendo por tanto encontrarla en principio en otro tipo celular. Debido a esto, se puede suponer que la actividad protectora de cilastatina se observará únicamente en células que posean actividad DHP-I. Para confirmar estas hipótesis se realizó un ensayo de actividad de la enzima DHP-I en células PTEC y HeLa mediante adición de su sustrato al medio de cultivo durante 18 horas, pudiendo observar cómo en el caso de las células HeLa esta actividad es casi inexistente en comparación con las PTEC (Figura 30), por lo que cilastatina no debería interaccionar con estas células en ningún momento.



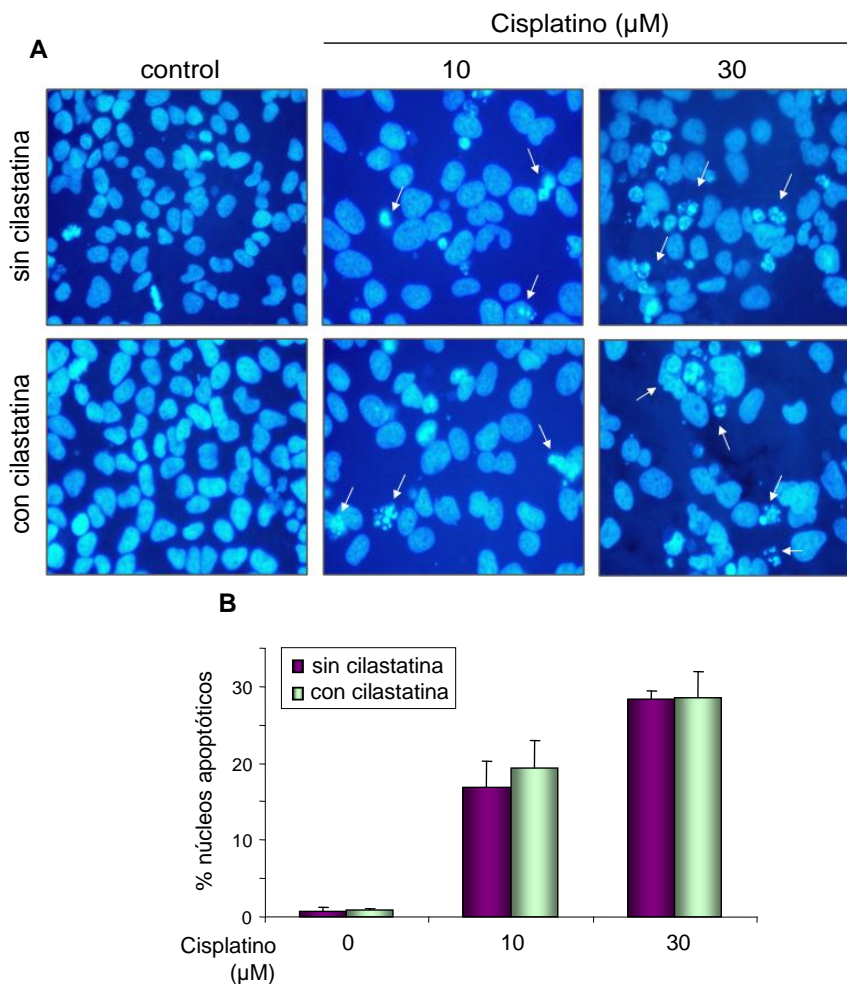
**Figura 30. Actividad específica de DHP-I en PTEC y HeLa.** La actividad del enzima se determinó por la hidrólisis del sustrato de DHP-I Gly-Phe-*p*-nitroanilida 1 mM tras incubación durante 18 horas. La absorbancia de *p*-nitroanilida fue medida a 410 nm. No se observa actividad DHP-I en células HeLa pero sí en PTEC. \*\*\*  $p < 0.0001$  vs actividad en PTEC.

### 3.2.- EFECTO DE CILASTATINA SOBRE LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR CISPLATINO EN CÉLULAS TUMORALES

Para ejercer su función como fármaco quimioterápico, el cisplatino activa una serie de mecanismos en la célula tumoral que tienen como resultado la inducción de muerte celular por apoptosis.

#### 3.2.1.- Estudio de la morfología nuclear en células tumorales

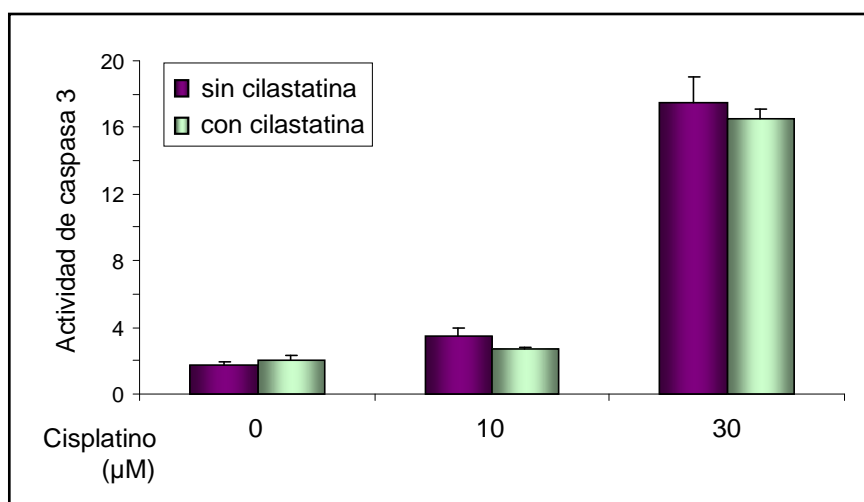
Para comprobar que cilastatina no afecta de ningún modo a la inducción de muerte celular en células tumorales por parte de cisplatino, se incubaron células HeLa en presencia de cisplatino sólo o en combinación con cilastatina durante 24 horas, observando y cuantificando después la presencia de núcleos con morfología apoptótica. El porcentaje de núcleos picnóticos (apoptóticos) aumentó de manera dosis-dependiente con el tratamiento con cisplatino. Este porcentaje no se vio modificado por la presencia de cilastatina (Figura 31).



**Figura31. Efecto de cilastatina sobre las alteraciones nucleares producidas por cisplatino en células tumorales.** A, Tinción nuclear con DAPI. Células HeLa tratadas con cisplatino 10 y 30 µM y cisplatino + cilastatina (200 µg/mL) durante 24 horas fueron teñidas con DAPI y observadas al microscopio de fluorescencia. Las células tratadas sólo con cisplatino mostraron el mismo índice de núcleos apoptóticos que las tratadas con cisplatino + cilastatina. Las flechas indican la presencia de núcleos con morfología apoptótica. B, cuantificación de núcleos apoptóticos. Los resultados se expresan como porcentaje de núcleos con apariencia apoptótica con respecto al total de núcleos presentes en el campo. Los datos representan la media ± EEM de 3 experimentos independientes.

### 3.2.2.- Estudio de activación de caspasa 3 en células tumorales

Para confirmar que efectivamente cilastatina no interfiere en la inducción de apoptosis por parte de cisplatino en células tumorales, se estudió la activación de la enzima caspasa 3 en las mismas en presencia de cisplatino 10 y 30  $\mu\text{M}$  en combinación o no con cilastatina. La figura 32 muestra cómo la activación de caspasa 3 inducida por cisplatino se produce de forma dosis-dependiente, siendo mucho más marcada en la dosis de 30  $\mu\text{M}$  y más cercana al control en la de 10  $\mu\text{M}$ . Se puede observar cómo cilastatina en ningún caso influyó en la inducción de actividad de caspasa 3 por parte de cisplatino.

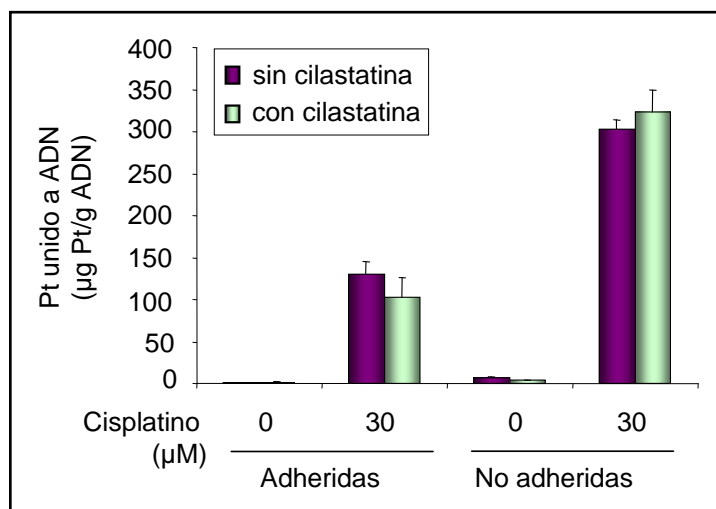


**Figura 32. Efecto de cilastatina sobre la actividad de caspasa 3 en células tumorales.** Se cultivaron células HeLa en presencia de cisplatino 10 y 30  $\mu\text{M}$  en combinación o no con cilastatina 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 24 horas. Cisplatino a dosis 10  $\mu\text{M}$  indujo una discreta activación de caspasa 3, mientras que dicha activación fue notable a dosis de 30  $\mu\text{M}$ . Cilastatina no afectó a la activación de caspasa 3 inducida por cisplatino. Los valores se expresan como la media  $\pm$  EEM de 4 experimentos independientes.

### 3.3.- EFECTO DE CILASTATINA SOBRE LA UNIÓN DE PLATINO AL ADN EN CÉLULAS TUMORALES

Como ya se ha comentado, la capacidad de unión a la molécula de ADN es la característica fundamental que confiere al cisplatino su efecto anticancerígeno. Por lo tanto, la efectividad del fármaco está supeditada a la concentración del mismo que es capaz de unirse al ADN de las células tumorales. Se cultivaron células HeLa en presencia de cisplatino o cisplatino más cilastatina, y se midió la concentración de platino que permanecía unido al ADN transcurridas 24 horas, tanto en las células que permanecían adheridas a la placa como en las desprendidas al sobrenadante. En las células adheridas (vivas) la concentración de platino unido a ADN es de aproximadamente 125  $\mu\text{g}$  de platino por g de ADN, mientras que en las células no adheridas (muertas) la concentración es de más del doble (300  $\mu\text{g}$  de platino por g de

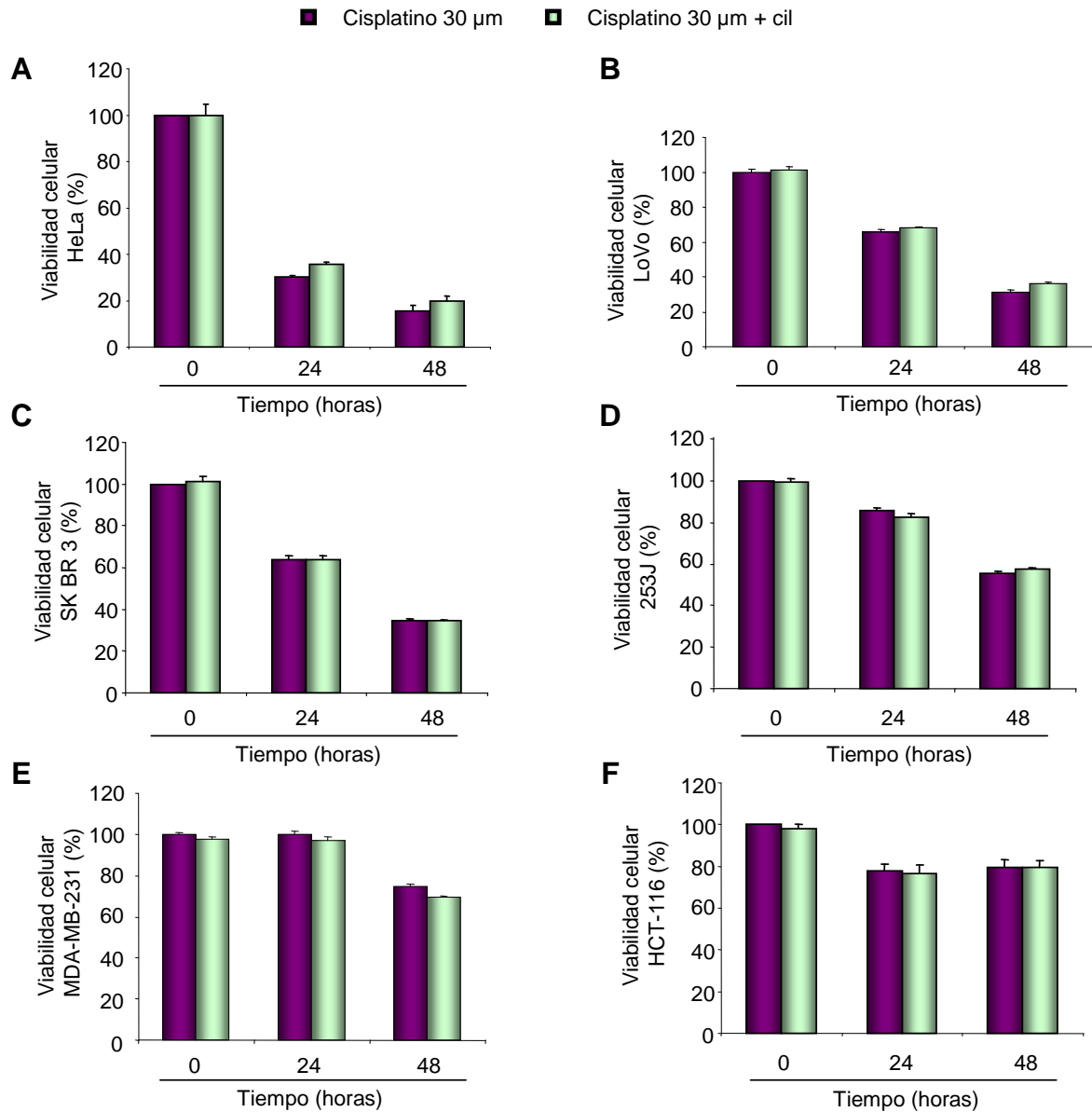
ADN). La presencia de cilastatina no ejerció efecto alguno sobre la interacción platino/ADN en células HeLa (Figura 33).



**Figura 33. Efecto de cilastatina sobre la concentración de cisplatino unido a ADN en células tumorales.** Se trataron células HeLa con cisplatino 30 µM y cisplatino + cilastatina 200 µg/mL durante 24 horas, y se midió la concentración de Pt unido a ADN (µg Pt/g ADN) por espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo, en HeLa tanto adheridas como no adheridas a la placa de cultivo. La concentración de Pt unido a ADN fue mayor en células muertas (no adheridas a la placa), y en ningún caso se vio modificada por la presencia de cilastatina en el medio. Los valores se expresan como la media ± EEM de 4 experimentos independientes.

### 3.4.- EFECTO DE CILASTATINA SOBRE LA CAPACIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE CISPLATINO SOBRE DISTINTOS TUMORES

Por último, y para constatar que los fenómenos observados en células HeLa se corresponden con otros tipos de células cancerígenas, se determinó la viabilidad celular de esta y otras líneas tumorales de diversa naturaleza en presencia de cisplatino con y sin cilastatina durante 24 y 48 horas. Se pudo comprobar como todas las líneas tumorales, independientemente de su procedencia, sufren una reducción de su viabilidad celular cuando son incubadas en presencia de cisplatino. Cilastatina en este caso no fue capaz de ejercer ningún efecto sobre la pérdida de viabilidad celular inducida por cisplatino, lo que correlaciona perfectamente con las evidencias observadas en los experimentos previos realizados en células HeLa (Figura 34).



**Figura 15. Efecto de cilastatina sobre la viabilidad celular en líneas tumorales.** La viabilidad se determinó mediante medida de la capacidad de reducción de MTT a azul de formazán en células HeLa (A), LoVo (B), SK BR 3 (C), 253J (D), MDA-MB-231 (E) y HCT-116 (F). Cilastatina (200 µg/mL) no ejerció ningún efecto sobre la pérdida de la función mitocondrial inducida por cisplatino (30 µM) a 24 y 48 horas. Los resultados son expresados como porcentaje del valor obtenido en relación al control. Los datos representan la media ± EEM de 4 experimentos. ANOVA:  $p < 0.0005$  para el modelo. Efecto cisplatino  $p < 0.0005$ , efecto cilastatina ns, efecto tiempo  $p < 0.0005$ , efecto tipo celular  $p < 0.0005$ . Interacciones: tipo celular x cisplatino  $p < 0.0005$ , cisplatino x cilastatina ns, cilastatina x tiempo ns.

## **VI.II.- *ESTUDIOS IN VIVO***

---



## **1.- MODELO ANIMAL DE NEFROTOXICIDAD INDUCIDA POR CISPLATINO. PROTECCIÓN POR CILASTATINA**

Los experimentos realizados hasta el momento en las células (*in vitro*) parecían indicar que cilastatina era capaz de proteger frente a la toxicidad celular producida por cisplatino sin interferir en la capacidad antitumoral del mismo. Pero la disfunción renal inducida por cisplatino implica interacciones más complejas que las observadas *in vitro* entre sistemas moleculares y celulares que necesitan ser estudiadas en el animal entero. Por esta razón, y por avanzar un paso más en los estudios preclínicos de protección con cilastatina, se ha diseñado un modelo de nefrotoxicidad por cisplatino en ratas Wistar.

### **1.1.- CILASTATINA REDUCE LA PÉRDIDA DE PESO CORPORAL**

Como ya se ha comentado en el apartado *Materiales y Métodos*, el modelo animal de nefrotoxicidad realizado se compone de cuatro grupos: Control, Control más Cilastatina, Cisplatino y Cisplatino más Cilastatina. El diseño experimental consistió en una inyección única de cisplatino 5 mg/Kg al inicio del estudio a los grupos cisplatino y cisplatino más cilastatina, así como inyecciones de cilastatina a una concentración de 75 mg/Kg cada 12 horas y durante 5 días a los grupos correspondientes.

Tanto el primer día del ensayo (en el que se administra el cisplatino) como el último (en el que se efectúa el sacrificio) se obtuvieron los pesos de los animales, calculando la diferencia de peso del animal al inicio y final del estudio. Durante el periodo de observación, los animales control o los que recibieron únicamente cilastatina ganaron un 6% de peso. En cambio, los animales tratados con cisplatino finalizaron el estudio con una pérdida de peso casi del 9%, significativa con respecto a los controles. Sin embargo, como se puede observar en la tabla 9, la pérdida de peso del grupo tratado conjuntamente con cilastatina y cisplatino fue la mitad de la del grupo con cisplatino. Esta diferencia fue estadísticamente significativa.

GRUPO	PESO INICIAL (g)	PESO FINAL (g)	DIFERENCIA PESOS (g)
CONTROL	264 ± 3	279 ± 2	15 ± 1
CONTROL + CIL	259 ± 8	273 ± 7	14 ± 2
CISPLATINO	272 ± 4	249 ± 5	- 23 ± 3*
CISPLATINO + CIL	272 ± 5	259 ± 3	- 13 ± 4* #

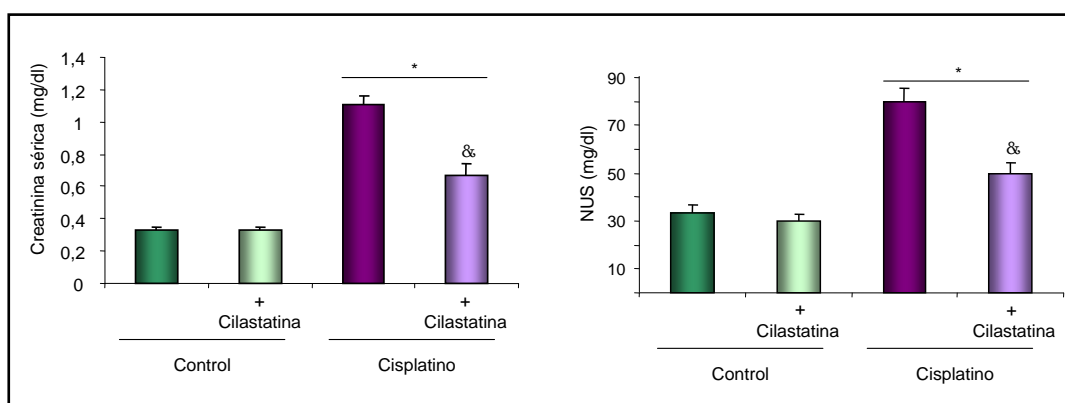
**Tabla 9. Diferencia de pesos entre el inicio y el final del estudio.** Todas las ratas tratadas con cisplatino perdieron peso durante el estudio, pero la pérdida de peso del grupo cisplatino + cilastatina fue significativamente menor que la experimentada por el grupo cisplatino. Ambos grupos control ganaron peso durante el estudio. Los datos representan la media ± EEM, n=6-8 animales por grupo. \* p ≤ 0.0001 vs control ± cilastatina, # p ≤ 0.05 vs cisplatino. CIL = Cilastatina.

## 1.2.- CILASTATINA RESTAURA LA FUNCIÓN RENAL

### 1.2.1.- Estudio de parámetros bioquímicos en sangre

Como consecuencia del tratamiento con cisplatino se produce un notable deterioro de la función renal, caracterizado por una alteración en los parámetros bioquímicos tanto en sangre como en orina.

Para comprobar el efecto de cisplatino y cilastatina sobre dichos parámetros, en primer lugar se estudiaron los dos principales indicadores de función renal habitualmente empleados en clínica: creatinina y NUS. En el caso de los animales del grupo tratado con cisplatino, se produjo un aumento estadísticamente significativo tanto de la creatinina como del NUS con respecto a los grupos control. En el caso del grupo cisplatino más cilastatina dicho aumento fue significativamente menor, quedando más cercano a los valores control (Figura 33).



**Figura 33. Efecto de cisplatino y cilastatina sobre la creatinina y el NUS en suero.** Los animales tratados con cisplatino (5 mg/Kg peso) sufrieron un aumento significativo de ambos parámetros. La coadministración con cilastatina (150 mg/Kg peso) con cisplatino impidió parcialmente el aumento tanto de creatinina como de NUS. Los resultados representan la media ± EEM de n=6-8 animales por grupo. \* p ≤ 0.005 vs control ± cilastatina, & p ≤ 0.0001 vs cisplatino.

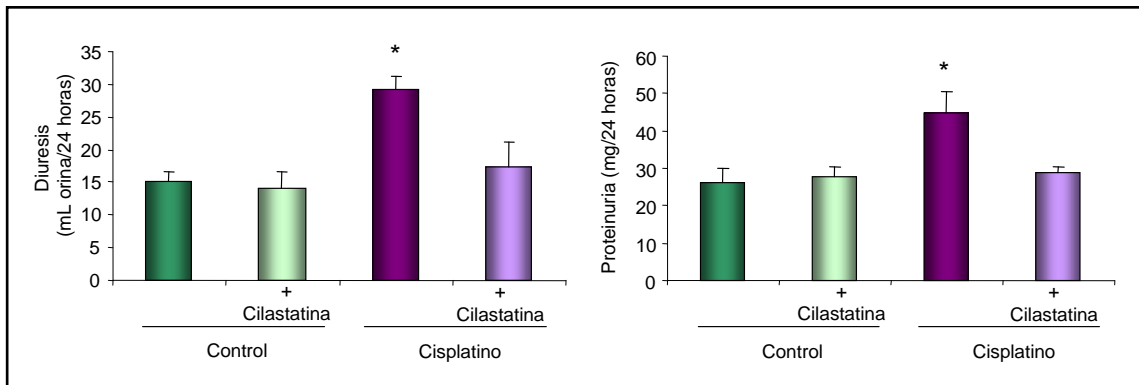
PARÁMETROS SÉRICOS	CONTROL	CONTROL + CILASTATINA	CISPLATINO	CISPLATINO + CILASTATINA
Albúmina (g/dL)	1.15 ± 0.03	1.12 ± 0.07	1.10 ± 0.03	1.05 ± 0.04
ALP (U/L)	377 ± 22	387 ± 34	<b>249 ± 31*</b>	<b>246 ± 15*</b>
ALT (U/L)	21.33 ± 1.43	20.60 ± 1.70	22.83 ± 1.56	20.25 ± 2.81
AST (U/L)	121 ± 9	124 ± 14	145 ± 4	126 ± 17
Calcio (mg/dL)	10.12 ± 0.15	10.02 ± 0.40	9.57 ± 0.10	9.54 ± 0.29
Colesterol (mg/dL)	77.6 ± 1.4	67.0 ± 3.8	<b>56.0 ± 4.6#</b>	<b>56.1 ± 3.9#</b>
Cloro (mmol/L)	104 ± 0.73	100 ± 0.20	102 ± 1.14	99 ± 2.80
CO <sub>2</sub> (mmol/L)	21.0 ± 0.9	21.6 ± 0.7	20.5 ± 0.8	20.2 ± 0.6
Glucosa (mg/dL)	164 ± 7	180 ± 11	<b>202 ± 12†</b>	174 ± 13
Potasio (mmol/L)	4.50 ± 0.10	4.64 ± 0.42	4.37 ± 0.10	4.60 ± 0.32
Sodio (mmol/L)	144 ± 0.3	141 ± 0.8	143 ± 1.1	138 ± 3.7
Fosfato (mg/dL)	8.82 ± 0.47	9.74 ± 0.62	<b>6.37 ± 0.38&amp;</b>	8.67 ± 0.45
Triglicéridos (mg/dL)	80.4 ± 6.7	61.6 ± 10.8	75.3 ± 9.3	74.3 ± 8.2
Bilirrubina total (mg/dL)	0.08 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.01

**Tabla 10. Parámetros bioquímicos en suero.** Los animales tratados con cisplatino sufrieron un descenso significativo de los valores de ALP, colesterol y fosfato, y un aumento de glucosa en suero. El tratamiento con cisplatino y cilastatina restauró los niveles de fosfato a valores normales. ALP: fosfatasa alcalina; ALT: alanina aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa. Los resultados representan la media ± EEM de n=6-8 animales por grupo. \* p < 0.005 vs control y control + cilastatina, # p < 0.005 vs control, † p < 0.05 vs control, & p < 0.005 vs resto de grupos.

Del resto de los parámetros bioquímicos en sangre se observó una reducción consistente en los niveles de colesterol en todos los animales tratados con cisplatino (con o sin cilastatina), y un aumento en los niveles de glucosa del grupo cisplatino. El fósforo y la fosfatasa alcalina (ALP) experimentaron asimismo pequeños cambios sin relevancia clínica (Tabla 10).

### 1.2.2.- Estudio de parámetros bioquímicos en orina

Durante el último día del estudio, los animales fueron introducidos en jaulas metabólicas con el fin de recoger la orina de 24 horas. En la figura 34 se presenta el volumen urinario y la proteinuria durante las 24 horas de recolección. Puede observarse cómo las ratas tratadas con cisplatino presentan un aumento significativo tanto del volumen de diuresis como de la excreción de proteínas en orina con respecto a los grupos control. Sin embargo, en el caso del grupo tratado con cisplatino en combinación con cilastatina los valores de ambos parámetros fueron semejantes al control.



**Figura 34. Efecto de cisplatino y cilastatina sobre el volumen de orina y la proteinuria.** Los animales tratados con cisplatino presentan valores de ambos parámetros significativamente mayores que los grupos control. Los animales tratados con cisplatino + cilastatina presentan valores de proteinuria y diuresis cercanos al control. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM de n = 6-8 animales por grupo. \*p  $\leq$  0.005 vs resto de grupos.

Otros parámetros determinados en las muestras de orina de los animales se representan en la tabla 11. Como se puede observar los animales del grupo tratado con cisplatino presentan orinas más diluidas (osmolalidad más baja y mayores volúmenes), lo que tiende a reducir las concentraciones de electrolitos. De nuevo el tratamiento en combinación con cilastatina consiguió mantener los niveles de creatinina y NUO en valores cercanos a los controles.

PARÁMETROS URINARIOS	CONTROL	CONTROL + CILASTATINA	CISPLATINO	CISPLATINO + CILASTATINA
NUO (mg/dL)	3502.0 $\pm$ 318.3	3551.8 $\pm$ 386.6	1305.4 $\pm$ 120.6*	2053.7 $\pm$ 197.4# †
Cloro (mmol/L)	221.5 $\pm$ 18.6	226.3 $\pm$ 26.2	94.7 $\pm$ 7.1*	112.4 $\pm$ 13.4*
Creatinina (mg/dL)	68.3 $\pm$ 7.2	73.7 $\pm$ 11	27.4 $\pm$ 2.9#	46.9 $\pm$ 6.1# †
Potasio (mmol/L)	198.7 $\pm$ 17.9	198.8 $\pm$ 23.3	60.4 $\pm$ 5.5*	93.2 $\pm$ 11.3*
Sodio (mmol/L)	150.7 $\pm$ 13.5	157.0 $\pm$ 18.0	55.4 $\pm$ 4.7*	77.8 $\pm$ 11.2*
Osmolalidad (mOsm/Kg)	1350.2 $\pm$ 119.3	1386.0 $\pm$ 154.5	603.7 $\pm$ 52.4*	833.8 $\pm$ 90.2*

**Tabla 11. Parámetros bioquímicos en orina.** Los animales tratados con cisplatino sufrieron un descenso significativo de los valores de todos los parámetros medidos. El tratamiento con cisplatino y cilastatina restauró los niveles de creatinina y NUO a valores cercanos al control. Los resultados representan la media  $\pm$  EEM de n=6-8 animales por grupo. # p  $\leq$  0.05 vs grupos control, \* p < 0.0001 vs grupos control, † p  $\leq$  0.05 vs grupo cisplatino.

### 1.2.3.- Estudio de parámetros estimados de función renal

A partir de los datos anteriores en sangre y orina, se estimaron otros parámetros de función renal, mediante las ecuaciones descritas en *Materiales y Métodos* (Tabla 12). El tratamiento con cisplatino redujo en un 80% la tasa de filtración glomerular, subiendo la excreción fraccional de sodio por encima del 1%.

Aumentó asimismo la pérdida urinaria de agua, con una excreción fraccional de agua 10 veces más alta que la de sus controles. La reducción observada en la carga urinaria se debió a una dilución de la misma. Estos resultados sugerían lesiones tanto a nivel del túbulo proximal como de la neurona distal. Incluso el gradiente transtubular de potasio resultó significativamente reducido. En los animales tratados conjuntamente con cisplatino y cilastatina, la tasa de filtrado glomerular se restauró parcialmente y la orina volvió a ser concentrada. El manejo distal de sodio y potasio también se normalizaron, lo que indica de nuevo una mejor función renal que en los animales tratados únicamente con cisplatino.

PARÁMETRO	CONTROL	CONTROL + CILASTATINA	CISPLATINO	CISPLATINO + CILASTATINA
Anión GAP (mEq/L)	19.95 ± 0.59	18.98 ± 0.62	19.60 ± 0.36	19.21 ± 0.57
Carga Urinaria (mEq/L)	127.88 ± 14.10	129.48 ± 15.60	25.53 ± 4.50*	83.33 ± 25.90 <sup>®</sup>
ClH <sub>2</sub> O (mL H <sub>2</sub> O/día)	-49.78 ± 2.60	-44.97 ± 4.40	-23.70 ± 4.10 <sup>#</sup>	-34.20 ± 4.40 <sup>**</sup>
EFH <sub>2</sub> O (%)	0.46 ± 0.03	0.52 ± 0.05	4.63 ± 0.37*	1.60 ± 0.40*
EFNa <sup>+</sup> (%)	0.47 ± 0.04	0.53 ± 0.04	1.65 ± 0.16 <sup>†</sup>	0.75 ± 0.08 <sup>®</sup>
TFG (ml/min/100g)	0.83 ± 0.06	0.72 ± 0.06	0.20 ± 0.02 *	0.38 ± 0.04 <sup>®</sup>
TTKG	9.94 ± 0.35	9.26 ± 0.52	7.32 ± 0.23*	8.00 ± 0.46*

**Tabla 12. Parámetros estimados de función renal.** Los animales tratados con cisplatino sufrieron una alteración significativa de los valores de todos los parámetros calculados excepto del anión GAP. El tratamiento con cisplatino y cilastatina restauró parcial o totalmente los niveles de todos los parámetros a valores cercanos al control. Los resultados representan la media ± EEM de n=6-8 animales por grupo. \* p < 0.05 vs control y control + cilastatina, #p ≤ 0.001 vs control y control + cilastatina, \*\* p ≤ 0.01 vs control, † p < 0.0001 vs control y control + cilastatina, & p < 0.05 vs cisplatino.

#### **1.2.4.- Estudio de la morfología renal**

##### **1.2.4.1.- Morfología cortical**

El FRA inducido por cisplatino incide fundamentalmente en las células del túbulo proximal. Este túbulo se encuentra situado a nivel de la corteza renal y por lo tanto esperamos observar la lesión mayoritaria en esta zona. Se estudió la morfología en secciones de corteza renal incluidas en parafina y teñidas con hematoxilina/eosina, pudiendo observar daño renal en el grupo de animales tratados con cisplatino, caracterizado por la acumulación de depósitos de proteínas en la luz tubular que obstruyen el túbulo (Figura 35C). En el caso de ambos grupos control y del grupo cisplatino más cilastatina no se observó daño a nivel histológico (Figura 35A, B y D).

Además, si observamos la morfología cortical en más detalle podemos encontrar en los riñones de las ratas tratadas con cisplatino otros signos más concretos de daño tisular tales como vacuolización citoplasmática, descamación del

epitelio y formación de cuerpos apoptóticos o presencia de mitosis (división celular como consecuencia de la regeneración celular en respuesta al daño) (Figura 35). Asimismo, se pudo comprobar cómo en estos animales no existió daño glomerular. En el caso de los riñones de las ratas tratadas con cisplatino en combinación con cilastatina no se observa ninguna de estas lesiones.

#### **1.2.4.2.- Morfología medular**

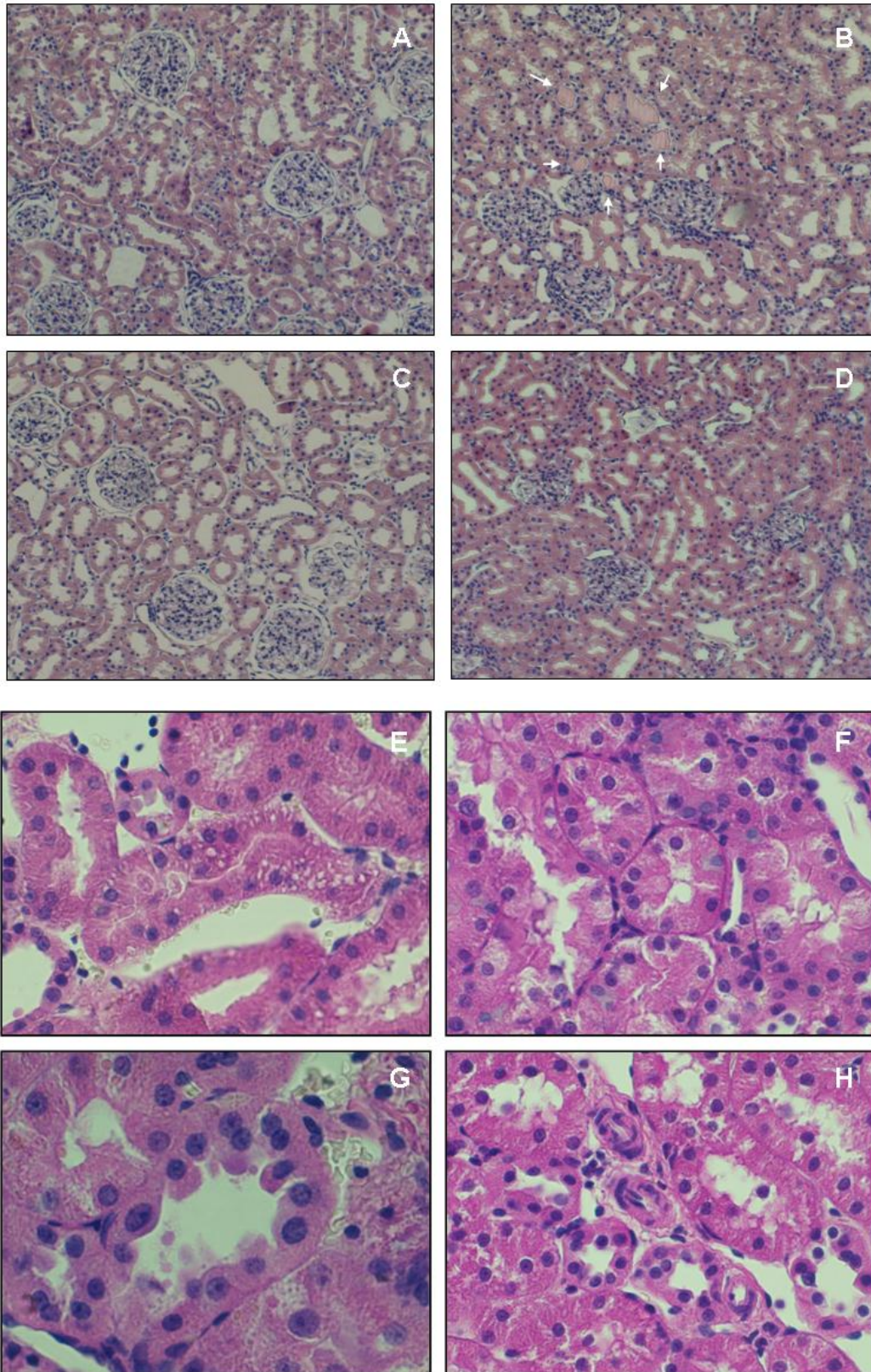
Una vez comprobado que existía daño a nivel de la corteza tras el tratamiento con cisplatino, se observaron secciones de médula renal teñidas con hematoxilina/eosina con el fin de estudiar posibles daños a nivel medular. Puede observarse cómo los animales control y control más cilastatina no presentan daño, mientras que en el grupo de animales tratados con cisplatino vuelven a aparecer depósitos proteicos en la luz de los túbulos, en este caso probablemente no como lesión primaria sino como consecuencia del daño a nivel del túbulo proximal. En el caso de los animales tratados con cisplatino y cilastatina no se observaron depósitos proteicos a nivel medular (Figura 36).

#### **1.2.4.3.- Score de daño renal**

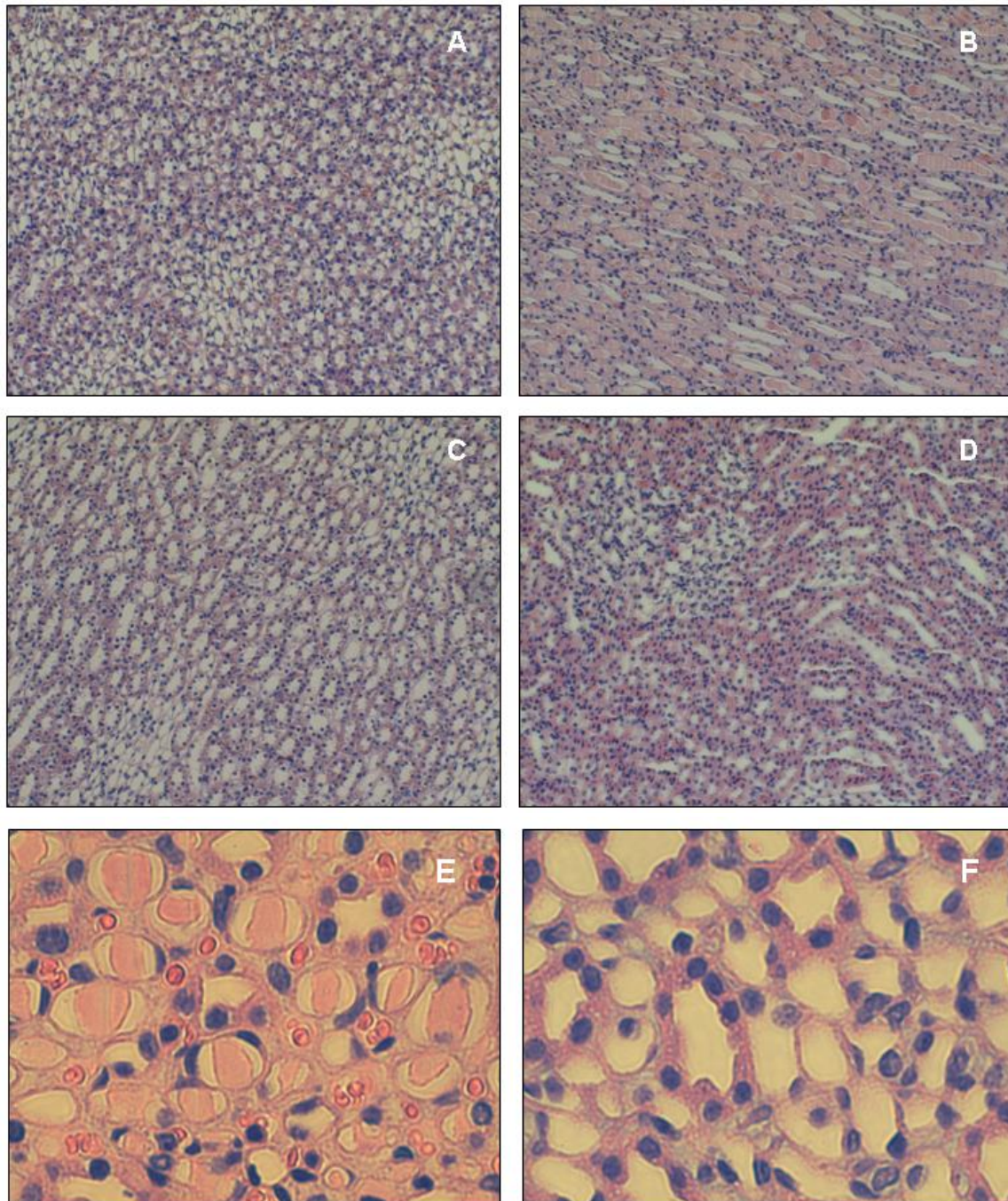
Observando la morfología del riñón se evaluaron los siguientes signos de lesión renal, realizando con ellos un “score” de daño renal utilizando el siguiente índice semicuantitativo: 0 = ausencia de lesión, 1 = menos del 25% del área dañada, 2 = 25-50% del área dañada, 3 = 50-75% del área dañada, 4 = más del 75% del área dañada.

- Lesión glomerular: mesangio, aparato yuxtglomerular, esclerosis, otras lesiones...
- Lesión vascular: trombo, infiltración leucocitaria, alteraciones de otro tipo...
- Lesión tubular: cilindros proteicos, vacuolización, blebbing, necrosis tubular, mitosis...

Se pudo comprobar cómo con el tratamiento con cisplatino los riñones de los animales presentan un alto score de daño, mientras que en el grupo que recibió cisplatino en combinación con cilastatina los riñones de los animales muestran un menor índice de daño que éstos (Figura 37).

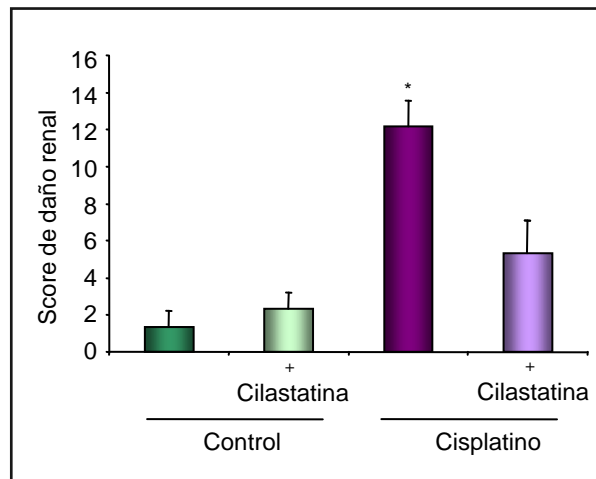


**Figura 35. Efecto de cisplatino y cilastatina sobre la morfología cortical. Detalles de la histología cortical renal.** Imágenes representativas de los grupos control (A), control + cilastatina (C), cisplatino (B) y cisplatino + cilastatina (D) (tinciones de hematoxilina/eosina, magnificación 10X). Las flechas indican la presencia de depósitos proteicos en la luz de los túbulos proximales de los animales tratados con cisplatino. Imágenes representativas de las lesiones renales producidas por el tratamiento con cisplatino: (E) vacuolización citoplasmática, (F) descamación del epitelio tubular por generación de cuerpos apoptóticos. G y H: Imágenes representativas de la morfología tubular en animales tratados con cisplatino + cilastatina. Tinciones de hematoxilina/eosina, magnificación 60X.



**Figura 36. Efecto de cisplatino y cilastatina sobre la morfología medular. Detalles de la histología medular renal.** Imágenes representativas de los grupos control (A), control + cilastatina (C), cisplatino (B) y cisplatino + cilastatina (D) (tinciones de hematoxilina/eosina, magnificación 10X). Se observa la presencia de depósitos proteicos en la luz de los túbulos de los animales tratados con cisplatino. Imágenes detalladas de los depósitos proteicos en la luz de los túmulos de los animales tratados con cisplatino (E). Estas lesiones no se observan en los riñones de los animales del grupo cisplatino + cilastatina (F). Tinciones de hematoxilina/eosina, magnificación 60X.



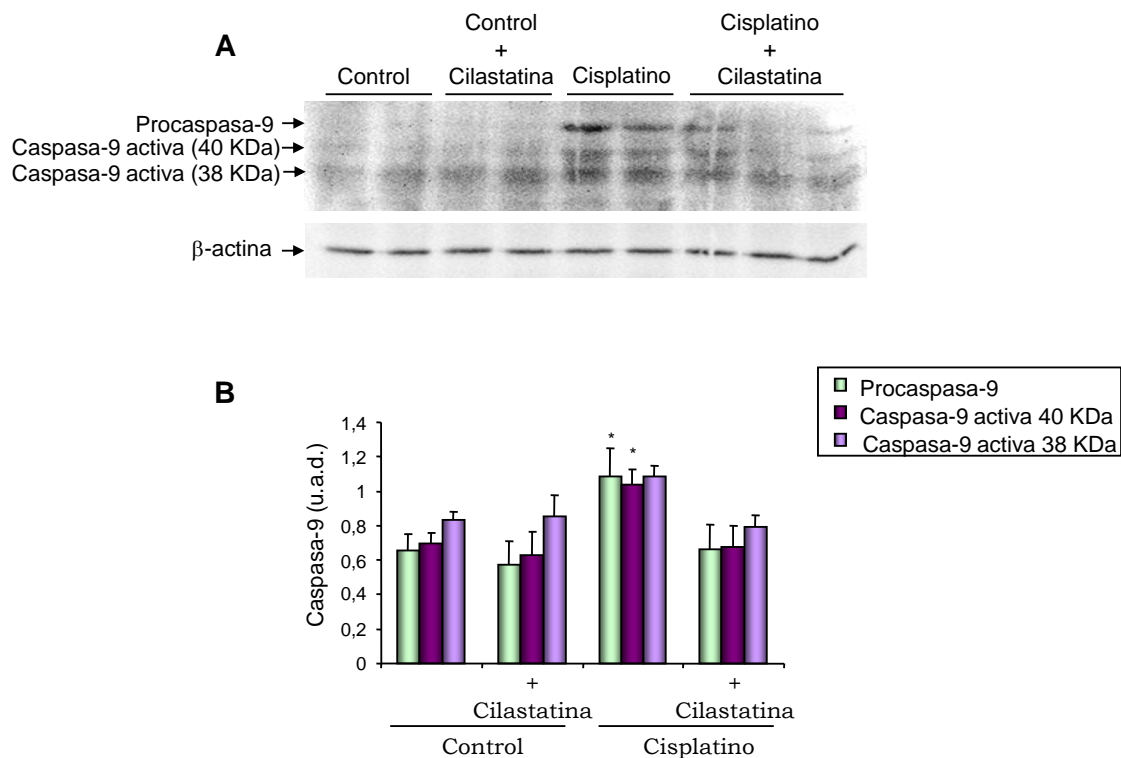


**Figura 37. Score de daño renal.** Se cuantificó el daño renal mediante una escala semicuantitativa teniendo en cuenta múltiples signos histológicos de daño renal. Los animales tratados con cisplatino presentan un score en torno a 10 veces superior que los grupos control y control + cilastatina. El tratamiento con cisplatino + cilastatina mantuvo el score en valores cercanos a ambos grupos control. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM de  $n=6-8$  animales por grupo. \*  $p \leq 0.005$  vs resto de grupos.

### 1.3.- CILASTATINA IMPIDE LA APARICIÓN DE APOPTOSIS

#### 1.3.1.- Cilastatina impide la aparición de caspasa 9

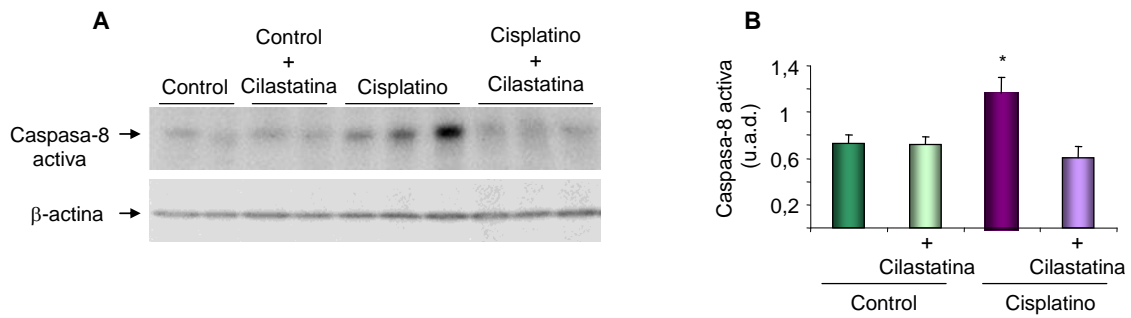
Las caspasas son proteínas fundamentales para el desarrollo y progresión del proceso de apoptosis. Por esta razón, se estudió la síntesis en corteza renal de procaspasa 9 y caspasa 9 activa, proteasa iniciadora en la ruta intrínseca de la apoptosis mediada por la mitocondria. Como se puede observar en la figura 38, se analizaron mediante western blot tanto la procaspasa 9 como dos fragmentos de la caspasa 9 activa, uno de 40 y otro de 38 kDa. En la imagen se puede comprobar cómo en presencia de cisplatino aumenta la síntesis cortical de la procaspasa 9 y del fragmento de caspasa 9 activa correspondiente a 40 kDa en comparación con los grupos control, mientras que en el grupo tratado con cisplatino en combinación con cilastatina se impide el aumento de estos péptidos, siendo similares a los grupos control y control más cilastatina. En el caso del fragmento de 38 kDa, su síntesis parece mantenerse más constante en todos los grupos, aunque sí se observa un ligero aumento en los riñones de los animales tratados con cisplatino (Figura 38A). Estos resultados mostraron ser significativos y reproducibles al confirmarlos mediante densitometría (Figura 38B).



**Figura 38. Efecto de cisplatino y cilastatina sobre la síntesis de procaspasa 9 y caspasa 9 activa en tejido renal.** A: Imágenes representativas de western blot de procaspasa 9, caspasa 9 activa, fragmentos de 40 y 38 kDa, y β-actina (control de carga) en muestras de corteza renal. B: cuantificación de los densitometrados del western blot corregidos por el control de carga. Se observa un aumento en la síntesis de procaspasa 9 y caspasa 9 activa (fragmento de 40 kDa) en los riñones de animales tratados con cisplatino. El tratamiento con cisplatino en combinación con cilastatina impidió el aumento en la síntesis de ambas proteínas. Los resultados se expresan como la media ± EEM de n=6-8 animales por grupo. \* p ≤ 0.05 vs resto de grupos.

### 1.3.2.- Cilastatina impide la aparición de caspasa 8

Se determinó la síntesis de caspasa 8, cuya función es actuar como caspasa iniciadora en la vía apoptótica de los receptores de muerte. Se determinó la proteína mediante western blot en extractos de corteza renal de los animales, donde se puede observar un claro aumento en la síntesis de caspasa 8 activa en los riñones del grupo cisplatino en comparación con los grupos control y control con cilastatina. La coadministración de cilastatina con cisplatino impidió el aumento en la síntesis de caspasa 8, presentando niveles basales, semejantes a los de los controles (Figura 39A). Estos resultados fueron confirmados mediante la cuantificación de los densitometrados, expresados en relación a su control de carga (Figura 39B).

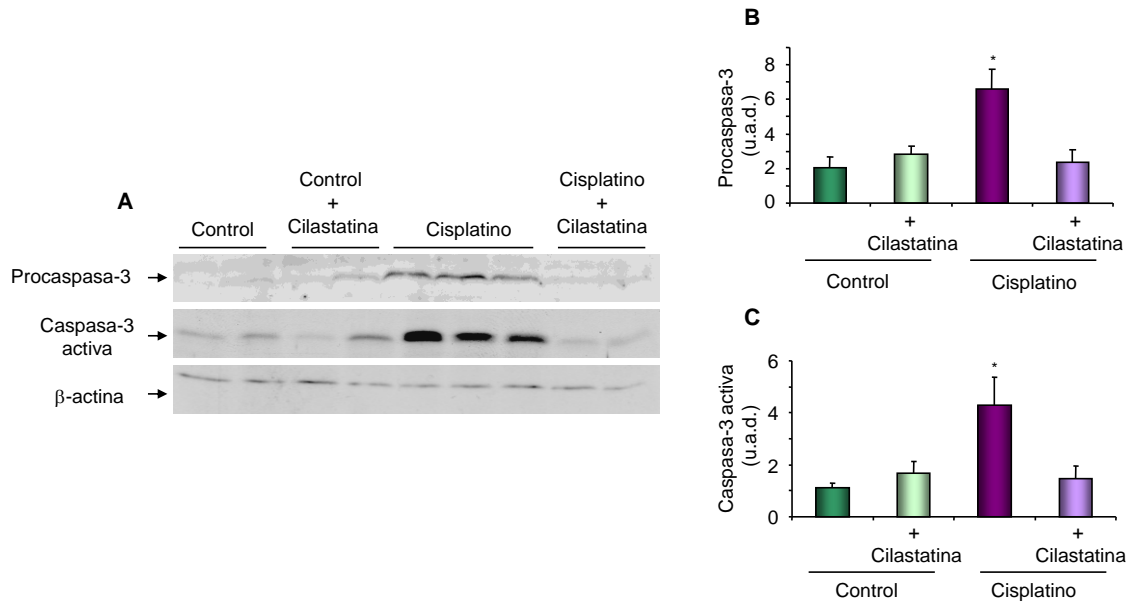


**Figura 39. Efecto de cisplatino y cilastatina sobre la síntesis de caspasa 8 activa en tejido renal.** A: Imágenes representativas de western blot de caspasa 8 activa y  $\beta$ -actina (control de carga) en muestras de corteza renal. B: cuantificación de los densitometrados del western blot corregidos por el control de carga. Se observa un aumento en la síntesis de la proteína en los riñones de animales tratados con cisplatino. El tratamiento con cisplatino en combinación con cilastatina impidió el aumento en la síntesis de caspasa 8 activa. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM de n=6-8 animales por grupo. \*  $p < 0.05$  vs resto de grupos.

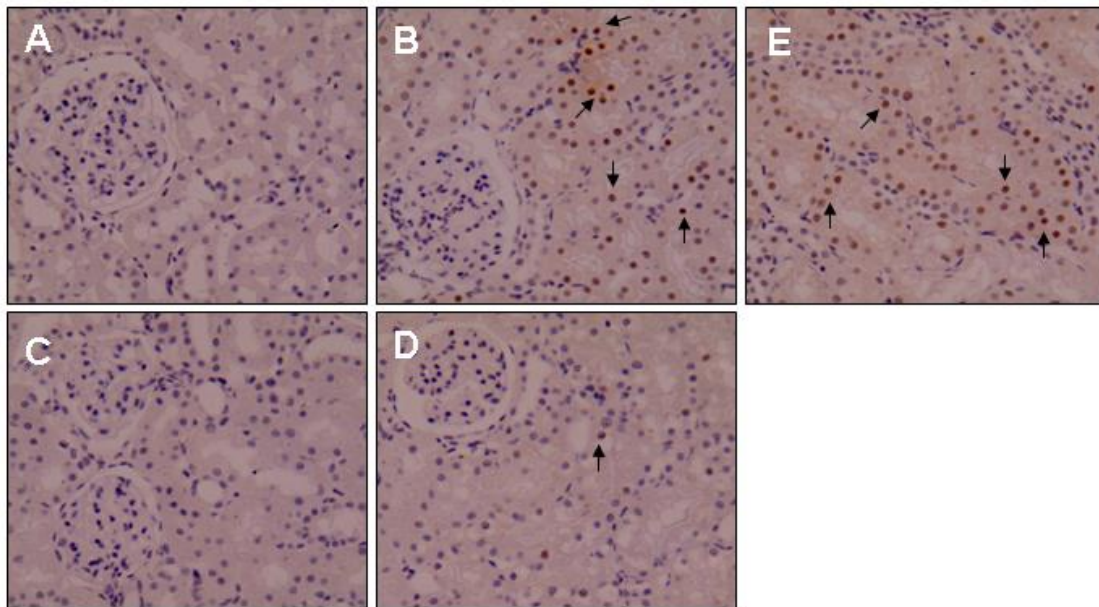
### 1.3.3.- Cilastatina impide la aparición de caspasa 3

Como se puede observar en los experimentos *in vitro*, el tratamiento con cisplatino producía una activación de caspasa 3 (caspasa efectora final de la apoptosis), que era inhibida de forma parcial con la coadministración de cilastatina (ver apdo. *Resultados: activación de caspasa 3, figura 23*). Debido a estos hallazgos se estudió la presencia tanto de procaspasa 3 como de caspasa 3 activa en corteza renal mediante western blot, observando que ambas proteínas se encuentran aumentadas en los riñones de los animales tratados con cisplatino, mientras que en los animales tratados con cisplatino y cilastatina no hubo activación, presentando valores semejantes a los hallados en los grupos control y control más cilastatina (Figura 40).

Además, en vista de los resultados obtenidos en el western blot de caspasa 3 activa, se decidió inmunolocalizar la proteína en secciones de tejido renal, con el fin de comprobar en qué zona concreta del riñón aparecía. Como se puede observar, la caspasa 3 activa aparece de forma generalizada en los núcleos de las células de túbulo proximal de animales tratados con cisplatino. En los grupos control y control con cilastatina no se observa presencia de caspasa 3 activa, mientras que en el grupo tratado con la combinación de cisplatino y cilastatina se observa tinción de caspasa 3 activa de forma discreta en núcleos aislados (Figura 41). No se observa tinción a nivel glomerular en ninguno de los casos.



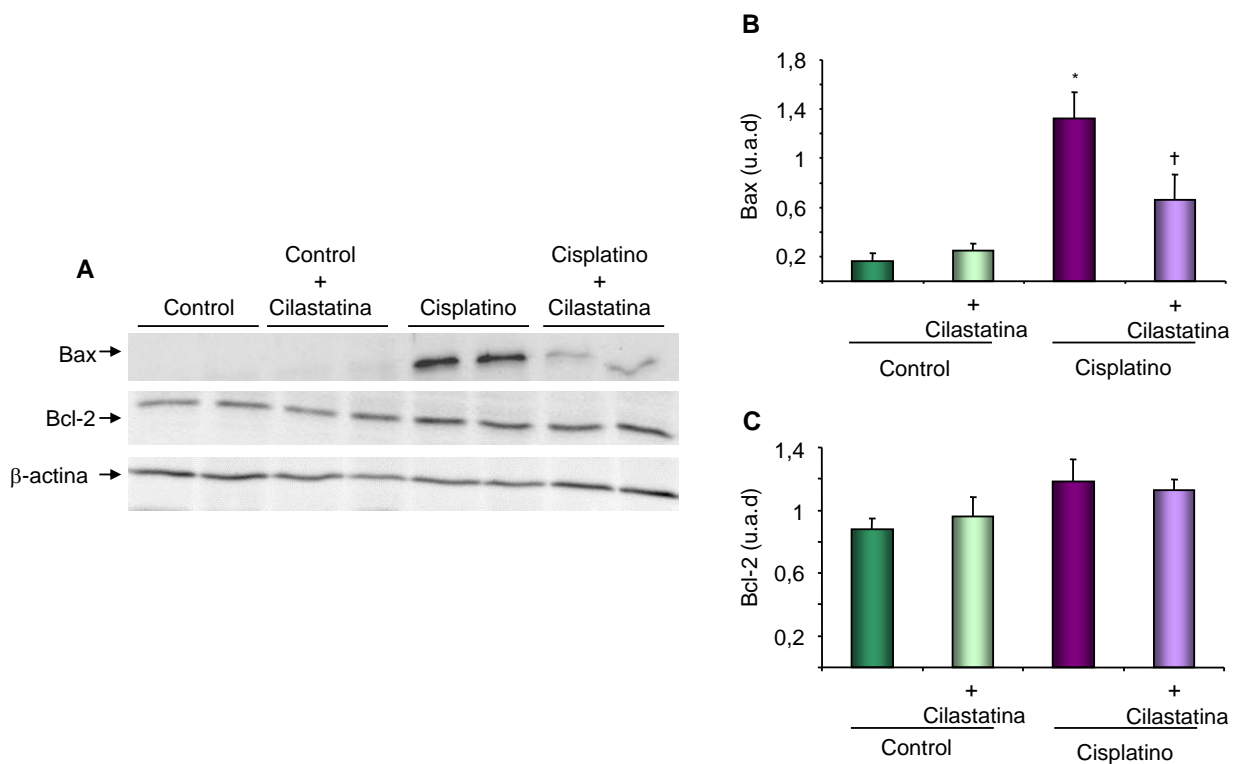
**Figura 40. Efecto de cisplatino y cilastatina sobre la síntesis de procaspasa 3 y caspasa 3 activa en tejido renal.** A: Imágenes representativas de western blot de procaspasa 3, caspasa 3 activa y β-actina (control de carga) en muestras de corteza renal. B y C: cuantificación de los densitometrados de ambos western blot corregidos por el control de carga. Se observa un aumento en la síntesis de ambas proteínas en los riñones de animales tratados con cisplatino. El tratamiento con cisplatino en combinación con cilastatina impidió el aumento en la síntesis de procaspasa 3 y caspasa 3 activa. Los resultados se expresan como la media ± EEM de n=6-8 animales por grupo. \* p ≤ 0.01 vs resto de grupos.



**Figura 41. Efecto de cisplatino y cilastatina sobre la síntesis y distribución de caspasa 3 activa en tejido renal.** Imágenes representativas de inmunolocalizaciones de caspasa 3 activa en secciones de corteza renal. A: grupo control, B: control + cilastatina, C y E: cisplatino, D: cisplatino + cilastatina. Se observa un aumento en la síntesis de caspasa 3 activa en los riñones de animales tratados con cisplatino (indicado con flechas). El tratamiento con cisplatino en combinación con cilastatina impidió el aumento en la síntesis de caspasa 3 activa. La proteína se localiza a nivel nuclear. Magnificación 20X.

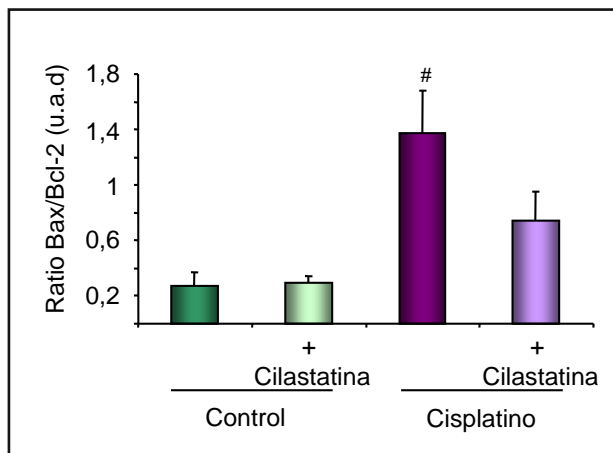
### 1.3.4.- Cilastatina reduce la aparición de Bax pero no de Bcl-2

Las proteínas de la familia de Bcl-2 son reguladoras del proceso de apoptosis. Existen tanto elementos proapoptóticos (Bax) como antiapoptóticos (Bcl-2). Se estudió el efecto de cisplatino y cilastatina sobre la síntesis de estas dos proteínas mediante western blot en corteza renal, pudiendo observar cómo en los riñones de los animales tratados con cisplatino se produce un aumento significativo de la síntesis de Bax. Este aumento fue bloqueado parcialmente con el tratamiento de cisplatino en combinación con cilastatina, pero sin llegar al nivel de los grupos control (Figura 42A y B). En el caso de la proteína Bcl-2 el tratamiento con cisplatino y/o cilastatina no produjo alteración alguna en su síntesis, presentando todos los grupos valores similares (Figura 42A y C).



**Figura 42. Efecto de cisplatino y cilastatina sobre la síntesis de Bax y Bcl-2 en tejido renal.** A: Imágenes representativas de western blot de Bax, Bcl-2 y  $\beta$ -actina (control de carga) en muestras de corteza renal. B y C: cuantificación de los densitometrados de los western blot de Bax y Bcl-2 respectivamente corregidos por el control de carga. Se observa un aumento en la síntesis de Bax en los riñones de animales tratados con cisplatino. El tratamiento con cisplatino en combinación con cilastatina impidió el aumento en la síntesis de esta proteína. Ningún tratamiento afectó a la síntesis de Bcl-2. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM de n=6-8 animales por grupo. \*  $p \leq 0.01$  vs resto de grupos, †  $p < 0.05$  vs grupo control.

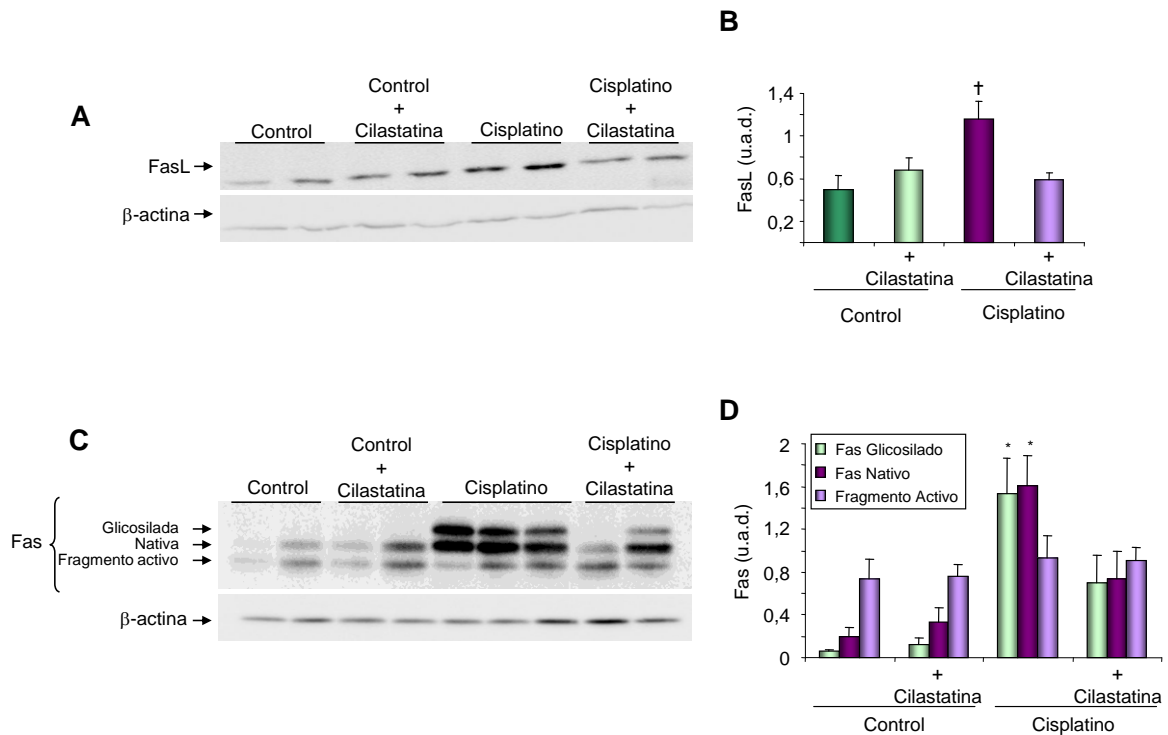
Habitualmente en la medida del daño suele emplearse, además de cada valor por separado, el ratio Bax/Bcl-2. Este dato da idea del estado de susceptibilidad hacia la apoptosis de la célula o el tejido. Así, al ser una proteína proapoptótica frente a otra antiapoptótica, un ratio Bax/Bcl-2 alto indica una baja resistencia celular a estímulos apoptóticos. En la figura 43 se representa el ratio Bax/Bcl-2 en la corteza renal de los animales. Se puede comprobar cómo el tratamiento con cisplatino aumenta la susceptibilidad del tejido renal a la apoptosis, mientras que la combinación de cisplatino y cilastatina consigue restaurar de forma parcial el ratio Bax/Bcl-2.



**Figura 43. Efecto de cisplatino y cilastatina sobre el ratio Bax/Bcl-2 en tejido renal.** Se observa un aumento en el ratio Bax/Bcl-2 en los riñones de animales tratados con cisplatino. El tratamiento con cisplatino en combinación con cilastatina impide parcialmente el aumento del mismo. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM de n=6-8 animales por grupo. #  $p \leq 0.05$  vs resto de grupos.

### **1.3.5.- Cilastatina impide la activación de la ruta Fas/FasL**

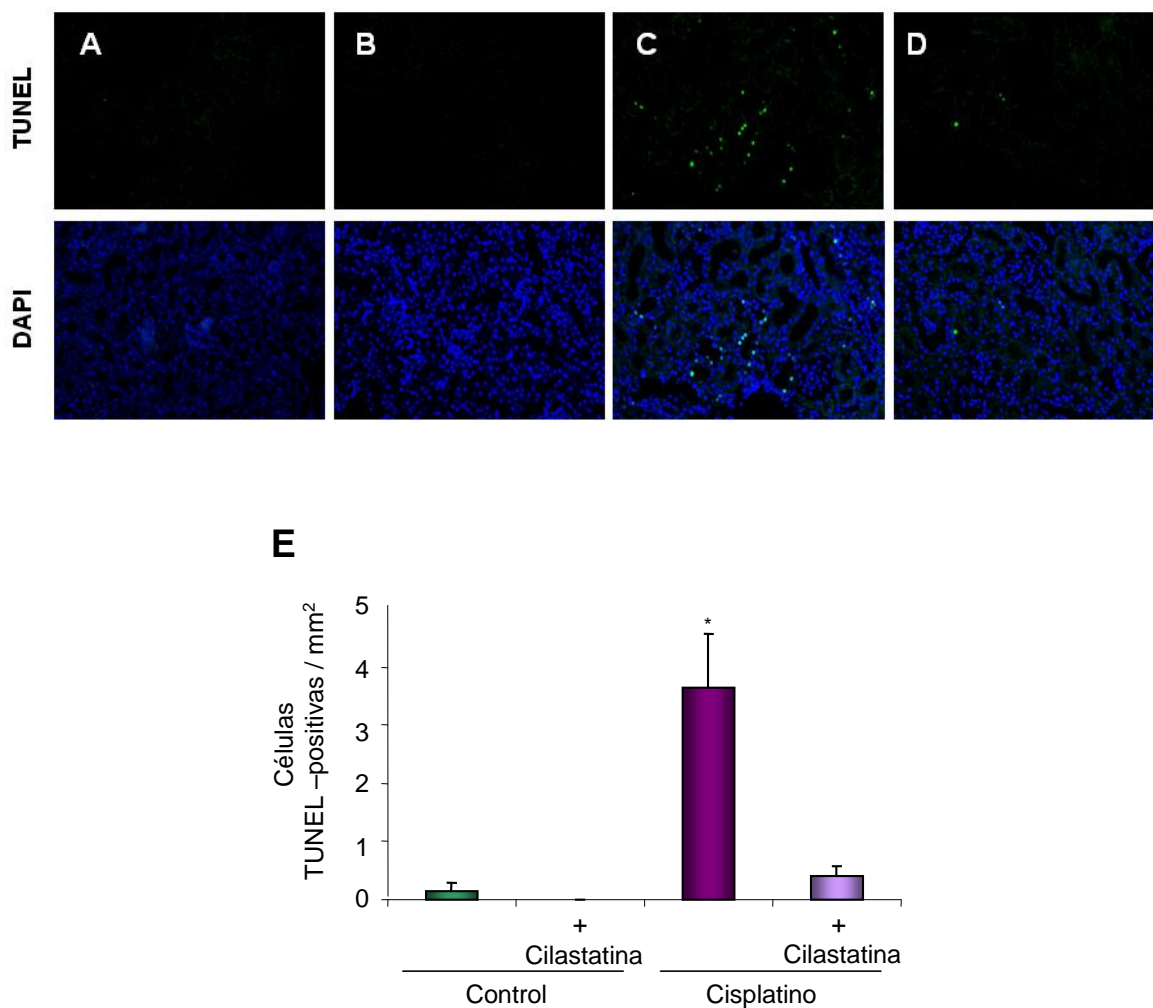
Tanto el receptor de muerte Fas como su ligando FasL son elementos fundamentales de la vía extrínseca de la apoptosis. Para estudiar la implicación de esta vía en el daño tóxico generado por cisplatino, y el efecto de cilastatina en relación con dicha agresión, se cuantificó la cantidad de ambas proteínas sintetizadas mediante western blot en extractos de corteza renal. En el caso de FasL se observa un claro aumento en su síntesis en los riñones de los animales tratados con cisplatino. La coadministración de cilastatina con cisplatino impidió el aumento en la síntesis de FasL (Figura 44A y B). En el caso del receptor Fas se observan comportamientos diferentes de sus distintas formas de expresión. Así, las formas Fas glicosilada y Fas nativa sufren un aumento significativo en su síntesis tras el tratamiento con cisplatino. Ambas formas quedan en valores similares al control si se coadministra cilastatina al cisplatino. Sin embargo el fragmento activo de Fas no experimenta modificación alguna en presencia de cisplatino y/o cilastatina (Figura 44C y D).



**Figura 44. Efecto de cisplatino y cilastatina sobre la síntesis de FasL y Fas en tejido renal.** A y C: Imágenes representativas de western blot de FasL y Fas (formas glicosilada, nativa y fragmento activo) respectivamente y  $\beta$ -actina (control de carga) en muestras de corteza renal. B y D: cuantificación de los densitometrados de los western blot de FasL y Fas corregidos por el control de carga. Se observa un aumento en la síntesis de FasL en los riñones de animales tratados con cisplatino. El tratamiento con cisplatino en combinación con cilastatina impidió el aumento en la síntesis de esta proteína. El tratamiento con cisplatino aumentó la síntesis de las formas glicosilada y nativa de Fas. De nuevo la coadministración de cisplatino y cilastatina impidió el incremento de ambas formas de expresión. Ningún tratamiento afectó a la síntesis del fragmento nativo. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM de n=6-8 animales por grupo.  $\dagger$  p < 0.001 vs resto de grupos, \* p < 0.05 vs resto de grupos.

### 1.3.6.- Cilastatina impide la fragmentación del ADN

Una vez activada caspasa 3, ésta viaja al núcleo donde se encarga de activar nucleasas que fragmentaran el ADN, progresando así el proceso de apoptosis. Se estudió el porcentaje de células que presentaban ADN fragmentado mediante la técnica de TUNEL en secciones de tejido renal incluidas en parafina. Como puede observarse en la figura 45, el tratamiento con cisplatino produce una gran fragmentación del ADN en las células renales. El tratamiento con cisplatino y cilastatina redujo drásticamente la aparición de fragmentación de ADN. En los riñones de los grupos control esta fragmentación está ausente.



**Figura 45. Efecto de cilastatina sobre la fragmentación del ADN inducida por cisplatino.** Imágenes representativas de tinción de TUNEL en secciones de tejido renal. A: grupo control, B: control + cilastatina, C: cisplatino, D: cisplatino + cilastatina. La fluorescencia verde indica los núcleos TUNEL-positivos. La tinción azul (DAPI) indica la presencia de núcleos celulares. E: cuantificación de células TUNEL-positivas por mm<sup>2</sup>. El tratamiento con cisplatino induce fragmentación del ADN en tejido renal. La coadministración de cilastatina con cisplatino impidió casi totalmente la fragmentación del ADN, permaneciendo en niveles similares a ambos grupos control. Los resultados se expresan como la media ± EEM de n=6-8 animales por grupo. \* p ≤ 0.001 vs resto de grupos. Magnificación 20X.

#### 1.4.- CILASTATINA REDUCE LA APARICIÓN DE ESTRÉS

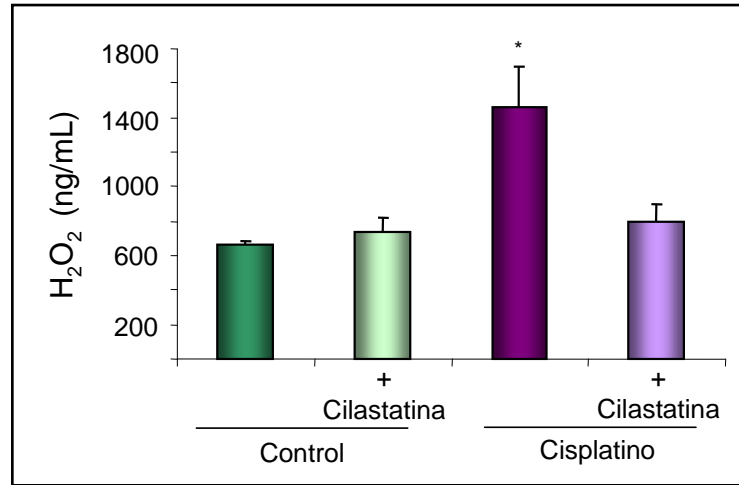
Durante el FRA inducido por cisplatino se produce un desequilibrio en el sistema redox celular, lo que desencadena alteraciones tanto en las concentraciones de ROS como en los sistemas antioxidantes.

##### 1.4.1.- Cilastatina reduce la aparición de peróxido de hidrógeno

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es un metabolito reactivo que sirve como regulador de los estados de EO, y que se genera como consecuencia de la dismutación del anión superóxido, o bien por reducción directa de la molécula de oxígeno en presencia de agentes oxidantes. Se determinó la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la orina de los animales, observando un aumento significativo de este metabolito en los animales tratados con cisplatino. Por el contrario, los animales que recibieron cisplatino en combinación con



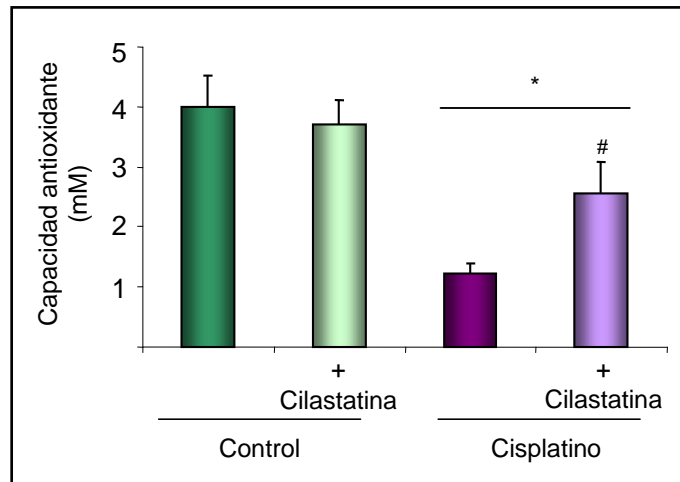
cilastatina presentaron valores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en orina semejantes a los grupos control (Figura 46).



**Figura 46. Efecto de cisplatino y cilastatina sobre la concentración de peróxido de hidrógeno en orina.** Los animales tratados con cisplatino presentan un aumento significativo en la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en orina. La coadministración de cilastatina con cisplatino impidió dicho aumento. La concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se expresa en ng/mL de orina. Los resultados se expresan como la media ± EEM de n=6-8 animales por grupo. \* p ≤ 0.05 vs resto de grupos.

#### **1.4.2.- Cilastatina restaura la capacidad antioxidante**

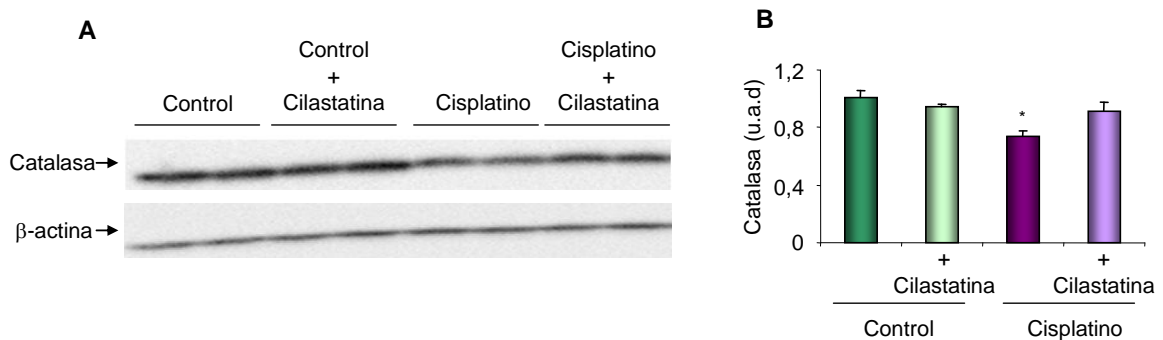
En presencia de un agente oxidante, además de un aumento en la concentración de radicales libres, el tejido renal experimenta una drástica caída en su capacidad antioxidante, lo que contribuye a un aumento en el desequilibrio redox celular<sup>18</sup>. Se analizó la capacidad antioxidante total en orina (lo que da una idea de la concentración de sistemas antioxidantes en el riñón) mediante el empleo de un kit comercial. En la figura 47 puede comprobarse cómo tras el tratamiento con cisplatino los animales experimentan un descenso significativo de su capacidad antioxidante renal, acorde con el aumento de EO observado anteriormente, y cómo en el caso del grupo de animales tratado con cisplatino y cilastatina esta reducción es menos marcada y significativamente diferente del grupo tratado con cisplatino.



**Figura 47. Efecto de cisplatino y cilastatina sobre la capacidad antioxidante renal.** Los animales del grupo cisplatino presentan un descenso significativo en la capacidad antioxidante en orina. La coadministración de cilastatina con cisplatino redujo parcialmente ese descenso. La capacidad antioxidante se expresa en unidades de concentración mM. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM de n=6-8 animales por grupo. \*  $p \leq 0.05$  vs grupos control, #  $p < 0.05$  vs grupo cisplatino.

### 1.4.3.- Cilastatina inhibe el descenso en la síntesis de catalasa

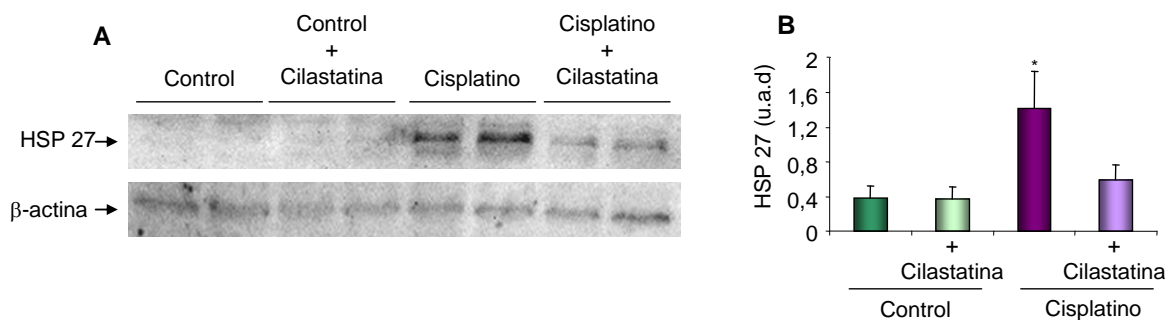
Una de las proteínas más importantes del sistema antioxidante es la catalasa, encargada de catalizar la descomposición de  $H_2O_2$  en oxígeno y agua. Como puede observarse en la figura 48, esta enzima sufre un descenso significativo en el tejido renal como consecuencia de la administración de cisplatino con respecto a los controles, de acuerdo con los resultados encontrados anteriormente (Figuras 46 y 47). El tratamiento combinado con cisplatino y cilastatina, sin embargo, mantuvo los niveles de síntesis de catalasa en valores cercanos a los de los grupos control.



**Figura 48. Efecto de cisplatino y cilastatina sobre la síntesis de catalasa en tejido renal.** A: Imágenes representativas de western blot de catalasa y  $\beta$ -actina (control de carga) en muestras de corteza renal. B: cuantificación del densitometrado del western blot de catalasa corregido por su control de carga. Se observa un descenso en la síntesis de catalasa en los riñones de animales tratados con cisplatino. El tratamiento con cisplatino en combinación con cilastatina impidió la reducción en la síntesis de esta proteína. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM de n=6-8 animales por grupo. \*  $p \leq 0.05$  vs resto de grupos.

#### 1.4.4.- Cilastatina inhibe el aumento en la síntesis de proteínas de shock térmico

Las proteínas de shock térmico o HSPs son inducidas bajo situaciones de estrés y protegen las estructuras celulares de cambios irreversibles que afectan a su funcionamiento. Se ha observado que un aumento en la expresión de estas proteínas (entre las que se encuentra la HSP 27) está relacionado con la protección de la célula ante agentes inductores de EO y apoptosis <sup>90</sup>. Para comprobar el efecto ejercido por cisplatino y cilastatina sobre la expresión de HSP 27, se estudió la síntesis de esta proteína mediante western blot en corteza renal. Los resultados muestran un aumento significativo en la síntesis HSP 27 en presencia de cisplatino. Por el contrario la coadministración de cilastatina al cisplatino inhibió dicho aumento, siendo su valor semejante a los de los grupos control y control con cilastatina (Figura 49).



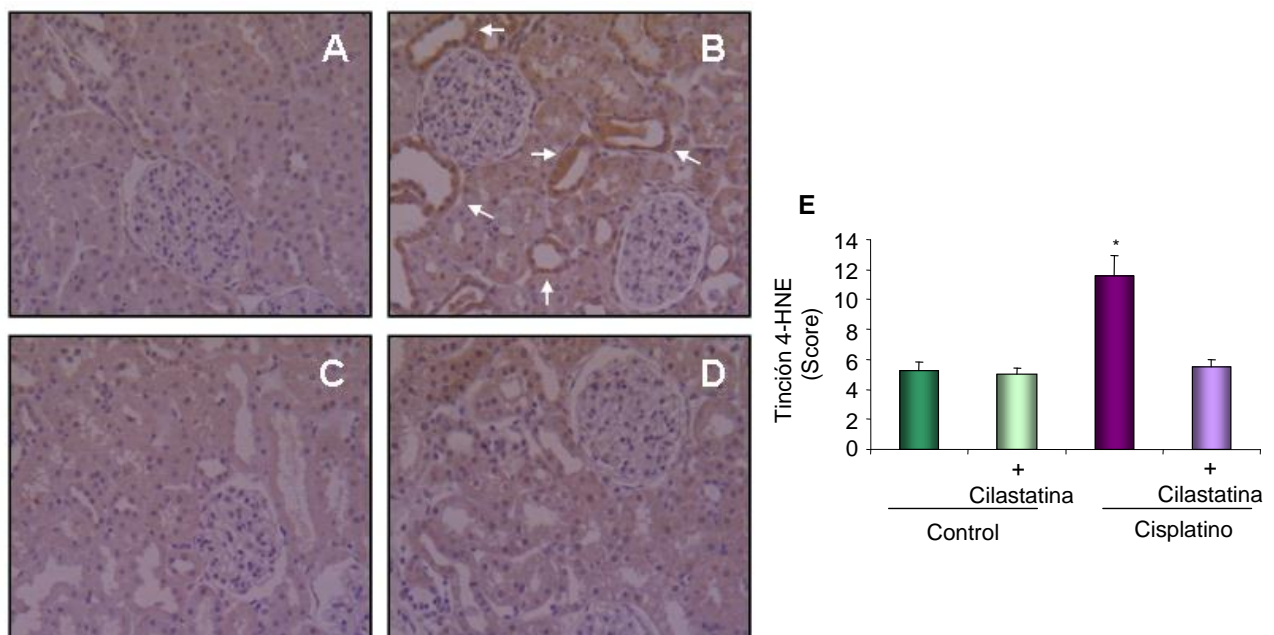
**Figura 49. Efecto de cisplatino y cilastatina sobre la síntesis de HSP 27 en tejido renal.** A: Imágenes representativas de western blot de HSP 27 y β-actina (control de carga) en muestras de corteza renal. B: Cuantificación del densitometrado del western blot de HSP 27 corregido por su control de carga. Se observa un aumento en la síntesis de HSP 27 en los riñones de animales tratados con cisplatino. El tratamiento con cisplatino en combinación con cilastatina impidió el incremento en la síntesis de esta proteína. Los resultados se expresan como la media ± EEM de n=6-8 animales por grupo. \*  $p \leq 0.05$  vs resto de grupos.

#### 1.5.- CILASTATINA REDUCE LA APARICIÓN DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

La peroxidación lipídica o degradación oxidativa de los lípidos es el proceso por el cual un radical libre captura electrones de los lípidos de la membrana celular, quedando como ácido graso radical, que reacciona a su vez con otro lípido de la membrana generando una reacción en cadena. Este proceso se produce como consecuencia del EO existente en la célula, y sus productos finales generan daño en la membrana celular, pudiendo ser potencialmente mutagénicos y carcinogénicos.

### 1.5.1.- Cilastatina reduce la aparición de 4-hidroxi-2-nonenal

El 4-HNE es un metabolito producto de la descomposición de peróxidos derivados de ácidos grasos poliinsaturados y ésteres, y por lo tanto un indicador de la presencia de peroxidación lipídica en el tejido. Se determinó la presencia de este metabolito en tejido renal mediante inmunolocalización en cortes incluidos en parafina. Como puede observarse, los riñones de los animales tratados con cisplatino (Figura 50B) presentan una mayor cantidad de 4-HNE que los riñones de los grupos control y control con cilastatina (Figura 50A y C). La coadministración de cilastatina con cisplatino impidió de forma parcial la aparición de este metabolito (Figura 50D). Todos estos datos se corroboran al observar la cuantificación de la inmunotinción, realizada mediante una escala semicuantitativa (Figura 50E).

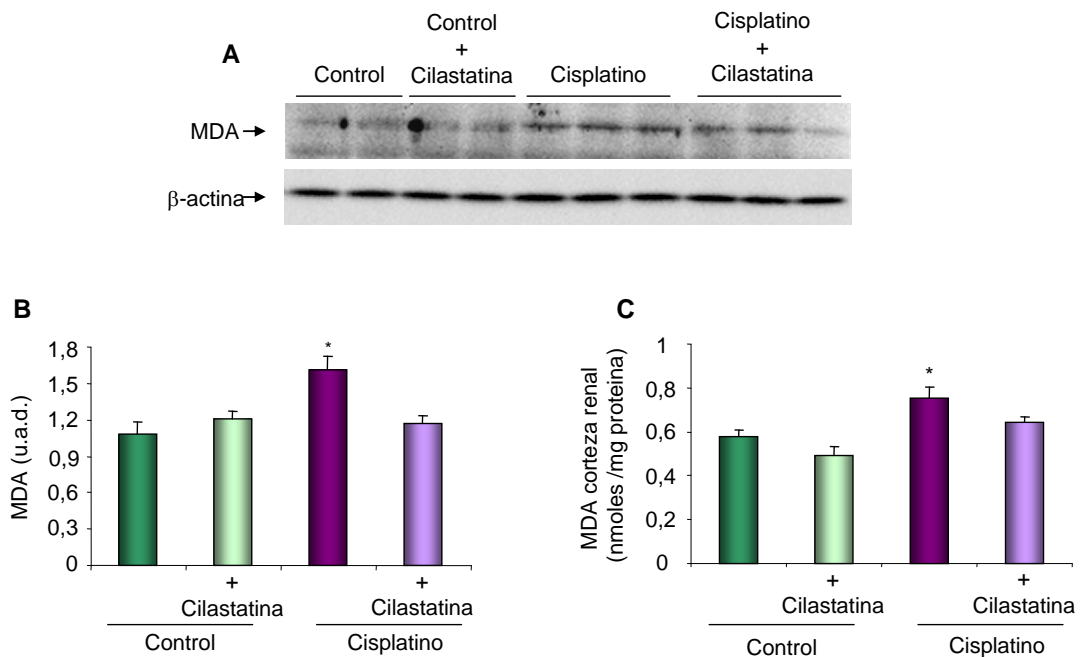


**Figura 50. Efecto de cisplatino y cilastatina sobre la síntesis de 4-HNE en tejido renal.** Imágenes representativas de inmunolocalizaciones de 4-HNE en secciones de corteza renal. A: grupo control, B: cisplatino, C: control + cilastatina, D: cisplatino + cilastatina. Se observa un aumento en la síntesis de 4-HNE en los riñones de animales tratados con cisplatino. El tratamiento con cisplatino en combinación con cilastatina redujo la aparición de 4-HNE en corteza renal. Las flechas indican la inmunotinción de 4-HNE. Magnificación 20X. E: Estimación semicuantitativa de la inmunotinción de 4-HNE en tejido renal. Los resultados expresan la media  $\pm$  EEM de n= 6-8 animales por grupo. \* p < 0.0001 vs resto de grupos.

### 1.5.2.- Cilastatina reduce la síntesis renal de malondialdehído

Al igual que el 4-HNE, el MDA es un metabolito secundario del proceso de peroxidación lipídica, y por lo tanto su presencia en concentraciones elevadas indicará un estado de EO en el tejido. Se determinó la presencia de MDA en corteza renal mediante western blot y la aplicación de la técnica de Recknagel y colaboradores <sup>160</sup>. Los resultados muestran un aumento significativo de la síntesis de MDA en el tejido como consecuencia de la administración de cisplatino por ambas técnicas (Figura 51).

Sin embargo la combinación de cilastatina y cisplatino impidió la aparición de MDA en el tejido renal, presentando estos animales niveles basales del metabolito, semejantes a los encontrados en los grupos control (Figura 51).

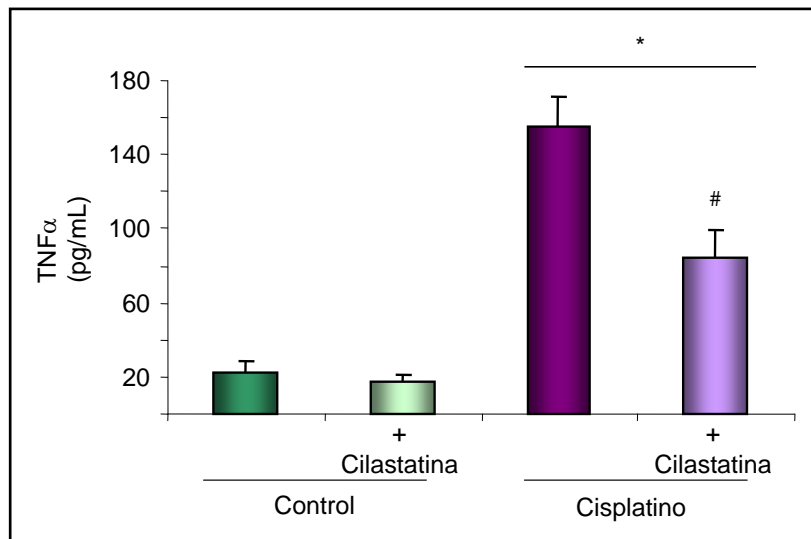


**Figura 51. Efecto de cisplatino y cilastatina sobre la síntesis de MDA en tejido renal.** A: Imágenes representativas de western blot de MDA y β-actina (control de carga) en muestras de corteza renal. B: Cuantificación del densitometrado del western blot de MDA corregido por su control de carga. C: Determinación de la concentración de MDA en corteza renal mediante la técnica de Recknagel y cols <sup>160</sup>. La concentración se expresa en nmoles de MDA/mg proteína. Se observa un aumento en la síntesis de MDA en los riñones de animales tratados con cisplatino. El tratamiento con cilastatina en combinación con cisplatino impidió el incremento en la síntesis del metabolito. Los resultados se expresan como la media ± EEM de n=6-8 animales por grupo. \* p < 0.05 vs resto de grupos.

## 1.6.- CILASTATINA REDUCE LA INFLAMACIÓN

### 1.6.1.- Cilastatina reduce la síntesis de TNFα

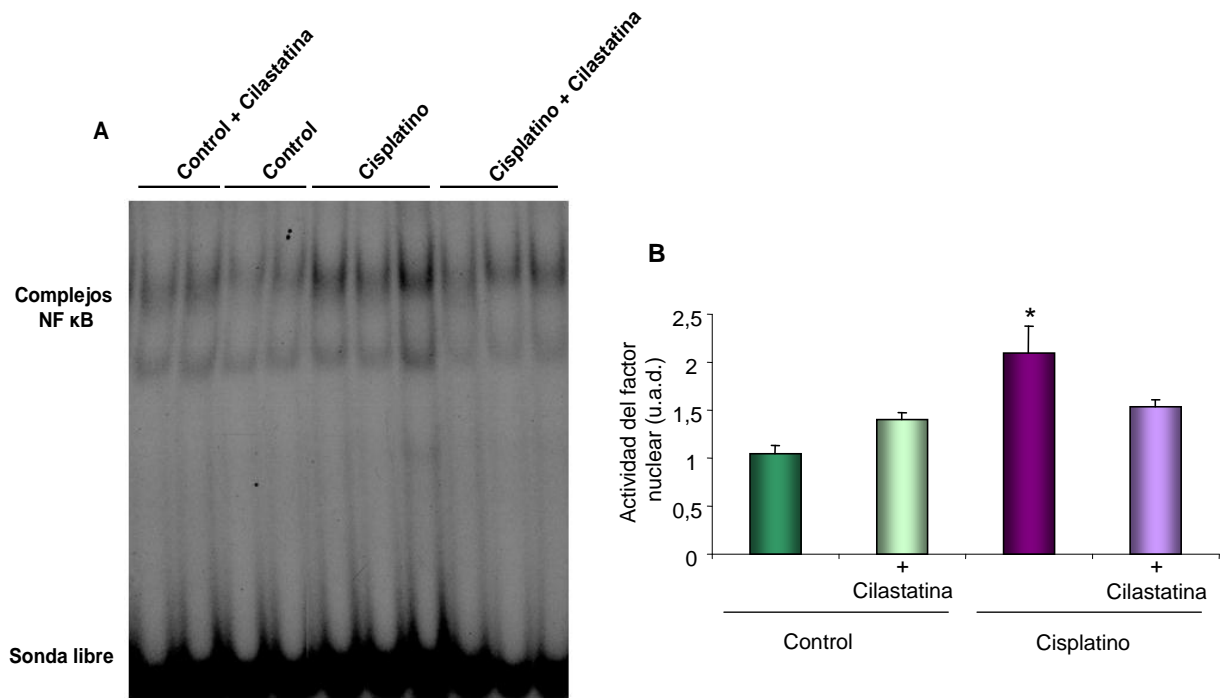
El TNFα es una citoquina liberada al torrente sanguíneo por las células del sistema inmune durante un proceso inflamatorio. Para comprobar si durante el tratamiento con cisplatino se producía inflamación, y si cilastatina ejercía algún efecto sobre la misma, se determinó la concentración de TNFα en los sueros de los animales mediante el empleo de un kit comercial. Como se muestra en la figura 52, los animales tratados con cisplatino presentan un aumento significativo en la concentración de TNFα en suero. Los animales tratados con cisplatino y el nefroprotector mostraron una menor concentración de TNFα en suero, aunque sin llegar a los valores encontrados en los grupos control y control con cilastatina.



**Figura 52. Efecto de cilastatina y cisplatino sobre la concentración de TNF $\alpha$  en suero.** Se determinó la concentración de TNF $\alpha$  mediante un kit comercial. Dicha concentración se expresa en pg de TNF $\alpha$ /mL suero. Los animales tratados con cisplatino presentan una elevada concentración de TNF $\alpha$  en suero. La coadministración de cilastatina al cisplatino impidió parcialmente dicho aumento. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM de n=6-8 animales por grupo. \*  $p \leq 0.05$  vs grupos control, #  $p < 0.01$  vs grupo cisplatino.

### 1.6.2.- Cilastatina reduce la síntesis de factor nuclear $\kappa B$

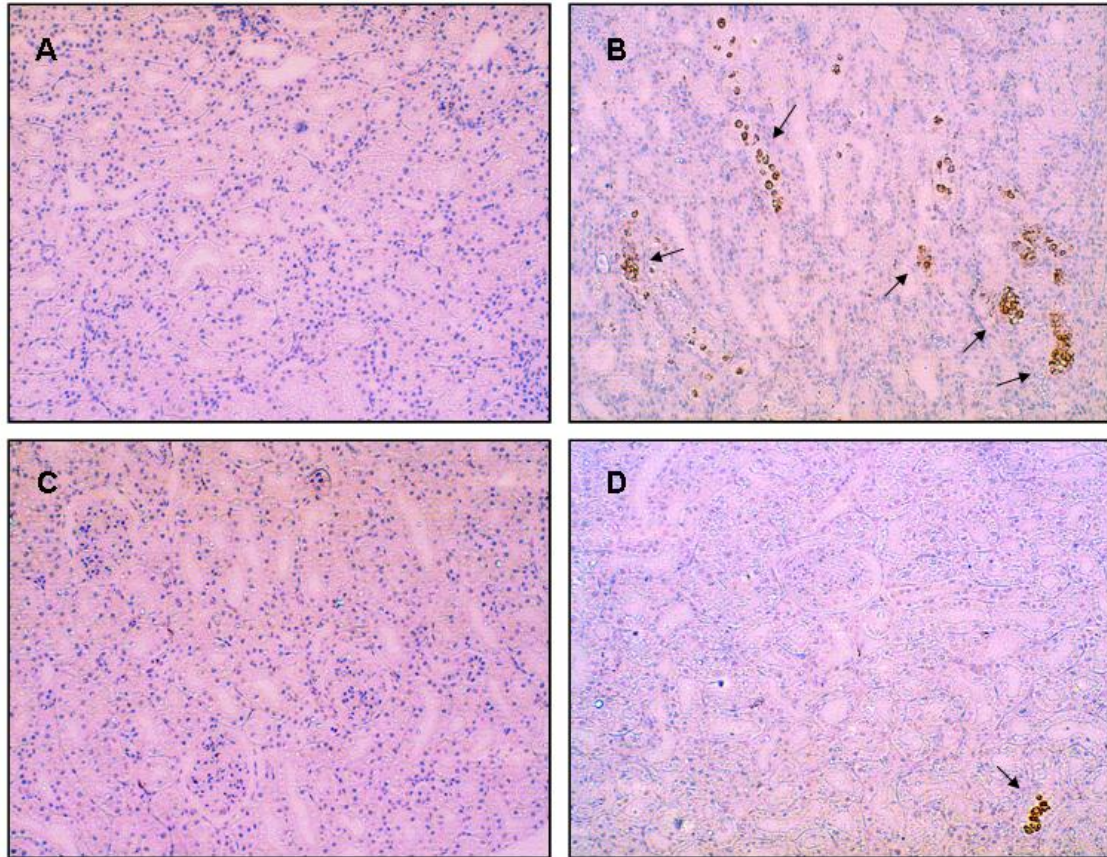
El factor de transcripción NF $\kappa B$  participa activamente en el desarrollo de numerosas patologías, fundamentalmente las que cursan con un componente inflamatorio <sup>146,163</sup>. Es conocido que el tratamiento con cisplatino produce una reacción inflamatoria a nivel renal, siendo un componente más en la patogenia de la toxicidad renal inducida por el fármaco. Por este motivo se estudió la activación del NF $\kappa B$  en tejido renal de los animales componentes del modelo. Se pudo observar cómo en el caso de los animales tratados únicamente con cisplatino se produjo una activación de los dos componentes del NF $\kappa B$  (p50 y p65). En los riñones de los animales tratados con la combinación de cisplatino y cilastatina esta activación está prácticamente ausente, siendo sus valores similares a los encontrados en los grupos control y control más cilastatina (Figura 53).



**Figura 53. Efecto de cisplatino y cilastatina sobre la expresión del factor nuclear κB en corteza renal.** A: Imágenes representativas de EMSA para determinación de NFκB B: cuantificación del densitometrado de las bandas de los complejos NFκB (p50 y p65). El tratamiento con cisplatino aumentó la expresión de NFκB en corteza renal. En los riñones de los animales tratados con cisplatino en combinación con cilastatina no se observó incremento en la expresión de NFκB, siendo sus valores similares a los de ambos grupos control. Los resultados se expresan como la media ± EEM de n=6-8 animales por grupo. \* p < 0.02 vs resto de grupos.

### 1.6.3.- Cilastatina reduce la presencia de monocitos/macrófagos

Durante cualquier proceso inflamatorio se produce en el tejido en cuestión un infiltrado inflamatorio de un tipo de leucocitos denominados monocitos, que se diferenciarán a macrófagos, encargados de la fagocitosis de proteínas, fosfolípidos, etc... durante la respuesta inflamatoria. Ambos tipos celulares presentan un marcador de superficie, el CD68, glicoproteína encargada de la captación de lipoproteínas de baja densidad. Para comprobar el efecto de cilastatina sobre la infiltración de monocitos/macrófagos en tejido renal inducida por cisplatino, se inmunolocalizó CD68 en tejido renal incluido en parafina, observando la presencia de numerosas células de infiltrado inflamatorio en los riñones de los animales tratados con cisplatino (Figura 54C), y una drástica disminución de las mismas en el tejido de los animales tratados con cisplatino en combinación con cilastatina (Figura 54D).

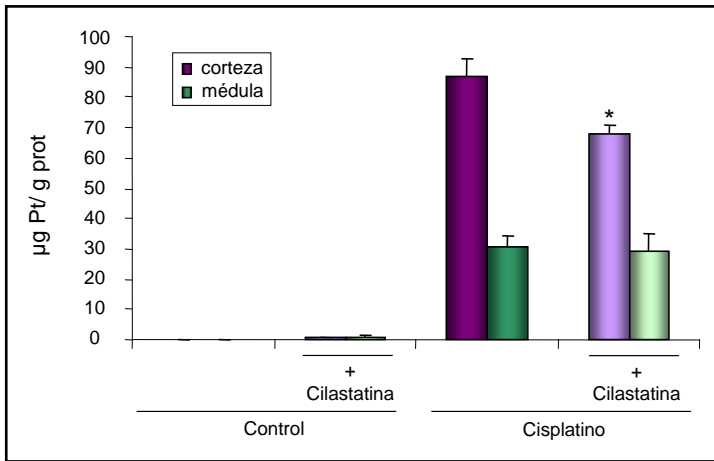


**Figura 54. Efecto de cisplatino y cilastatina sobre la aparición de infiltrado inflamatorio en tejido renal.** Imágenes representativas de inmunolocalizaciones de CD68 (marcador de monocitos y macrófagos) en secciones de corteza renal. A: grupo control, B: cisplatino, C: control + cilastatina, D: cisplatino + cilastatina. Se observa un aumento en la aparición de células inflamatorias en los riñones de animales tratados con cisplatino. El tratamiento con cisplatino en combinación con cilastatina redujo la aparición de monocitos y macrófagos en corteza renal. Las flechas indican la inmunotinción de CD68. Magnificación 10X.

### **1.7.- CILASTATINA REDUCE LA CONCENTRACIÓN DE PLATINO ACUMULADO EN CORTEZA RENAL**

Al igual que en los experimentos *in vitro*, se calculó la concentración de platino presente en corteza y médula renal cinco días después de su administración mediante ICP-MS. Como se puede observar en la figura 55, en presencia de cilastatina se reduce significativamente la acumulación de platino a nivel de corteza pero no de médula renal, lo que puede explicar en parte su potencial papel como nefroprotector frente a la toxicidad inducida por cisplatino a nivel del túbulo proximal.

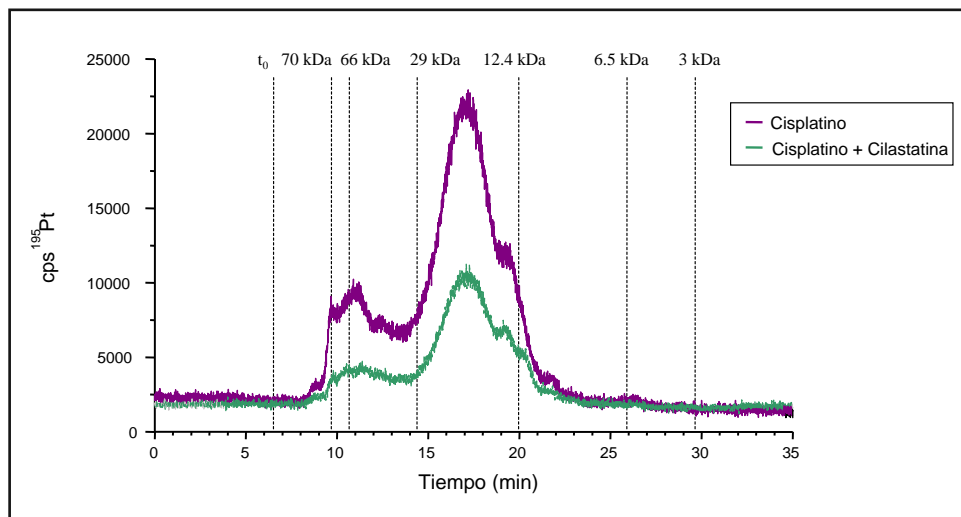




**Figura 55. Efecto de cilastatina sobre la concentración de platino en corteza y médula renal.** La administración de cilastatina en combinación con cisplatino reduce significativamente la concentración de platino en corteza renal, y sin embargo no ejerce ningún efecto a nivel medular. La concentración se expresa como µg de Pt/g de proteína. Los resultados se expresan como la media ± EEM de n=6-8 animales por grupo. ANOVA: \* p < 0.005 vs grupo cisplatino.

### 1.8.- CILASTATINA NO AFECTA A LA ESPECIACIÓN DE CISPLATINO EN TEJIDO RENAL

En la figura 56 se muestra la especiación de la molécula de Pt en la corteza renal de los animales de los distintos grupos. Como puede observarse, la presencia de cilastatina no induce ningún cambio en el perfil de proteínas unidas a Pt. Se observó Pt unido a proteínas en un rango de separación de 12.4 a 70 kDa, y el pico más intenso se correspondió con especies de 20 kDa aproximadamente. La menor intensidad de señal encontrada en el grupo cisplatino más cilastatina está relacionada con la menor acumulación de cisplatino intracelular observada en experimentos previos (Figura 55). Además, no se hallaron picos significativos correspondientes al cisplatino intacto o al complejo intracelular monoacuo, indicando que todo el Pt se encuentra unido a biomoléculas.

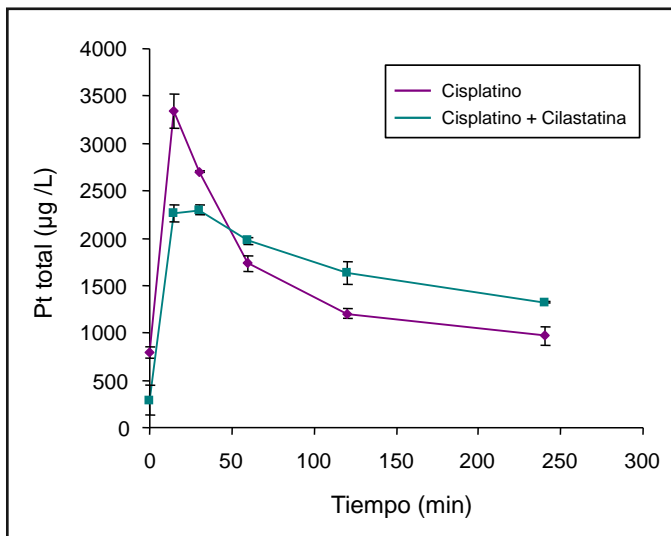


**Figura 56. Cromatograma de la especiación de cisplatino en extractos de corteza renal.** La señal de <sup>195</sup>Pt fue monitorizada por SEC/ICP-MS en extractos de corteza renal. Los picos de ambos cromatogramas presentan los mismos tiempos de retención e intensidades relativas similares. Los resultados son representativos de la especiación de 4 animales por grupo.

### 1.9.- EFECTOS DE CILASTATINA SOBRE LA FARMACOCINÉTICA DE CISPLATINO

El área bajo la curva (AUC) constituye la medida más importante de la biodisponibilidad de un fármaco y relaciona las variaciones de la concentración plasmática del mismo en función del tiempo.

Se realizaron medidas de la concentración de platino en suero a tiempos 0, 15, 30 minutos, 1, 2 y 4 horas tras la inyección de cisplatino en combinación o no con cilastatina. La concentración máxima de cisplatino en plasma fue detectada a tiempos similares en ambos casos, aunque fue ligeramente menor en el grupo al cual se administró cilastatina. Sin embargo, cilastatina disminuyó el ratio de eliminación de cisplatino, incrementando el tiempo de vida media en animales tratados con la combinación de cisplatino y cilastatina. Esto hace que el AUC resulte ser similar en ambos grupos o incluso algo mayor en los animales tratados con cilastatina, no encontrando en última instancia variaciones significativas del mismo tras la coadministración de cilastatina (Tabla 13, Figura 57).



**Figura 57. Efecto de cilastatina sobre la farmacocinética de cisplatino en ratas. Área bajo la curva.** Cilastatina no modifica el área bajo la curva de cisplatino, pero sí reduce su pico concentración máxima en suero, compensándolo con un retardo en el ratio de eliminación del fármaco. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM de n=4 animales por grupo.

PARÁMETRO	CISPLATINO	CISPLATINO + CILASTATINA
$C_{max}$ (µg/L)	3335 $\pm$ 181	2300 $\pm$ 56*
$t_{max}$ (min)	15 $\pm$ 0	15 $\pm$ 0
$t_{1/2}$ (min)	135 $\pm$ 15	279 $\pm$ 27*
Ratio de eliminación (µg/mL * min)	5.23 $\pm$ 0.57	2.50 $\pm$ 0.24*
AUC ((µg * min)/mL)	361.0 $\pm$ 11.1	402.7 $\pm$ 6.2

**Tabla 13. Parámetros farmacocinéticos estimados para cisplatino y cisplatino más cilastatina en ratas.**  $C_{max}$ : concentración máxima de platino,  $t_{max}$ : tiempo de obtención de la  $C_{max}$ ,  $t_{1/2}$ : tiempo de vida media del platino, AUC: área bajo la curva. Los parámetros farmacocinéticos fueron calculados empleando el programa Microsoft Excel, equipado con las funciones PK. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM de n=4 animales por grupo. ANOVA: \* p < 0.05 vs grupo cisplatino.

## **VII.- *DISCUSIÓN***

---

## 1.- TOXICIDAD RENAL INDUCIDA POR CISPLATINO

### 1.1.- APOPTOSIS Y NECROSIS

Desde su descubrimiento a finales de los años 60 y hasta la actualidad, el cisplatino ha sido ampliamente empleado como tratamiento quimioterápico de referencia en la lucha contra diversos tumores sólidos, como son los de ovario, cabeza y cuello, carcinoma pulmonar de células no pequeñas y otros tipos de cáncer. Pero la administración de cisplatino presenta dos inconvenientes fundamentales: 1) la aparición de resistencias y 2) sus numerosos efectos secundarios. Entre éstos se pueden destacar la neurotoxicidad, ototoxicidad y nefrotoxicidad, que aparece aproximadamente en un tercio de los pacientes sometidos a tratamiento con cisplatino, limitando su administración e incluso obligando a interrumpir dicho tratamiento <sup>117</sup>.

Entre el 25 y el 40% de los pacientes sometidos a tratamiento con cisplatino presentan una disminución leve y parcialmente reversible de la función renal tras el primer ciclo de tratamiento. La incidencia e intensidad del daño se incrementan en los ciclos siguientes, pudiendo llegar a ser irreversible. Por lo tanto esta toxicidad es acumulativa y dosis-dependiente y está directamente relacionada con la acumulación del fármaco a nivel renal <sup>9</sup>. La toxicidad renal aguda inducida por cisplatino se produce principalmente a nivel del túbulo proximal debido a que aproximadamente el 5% del mismo se filtra y el 25-40% se secreta y se vuelve a reabsorber, aumentando el tiempo de exposición de la célula del túbulo proximal al cisplatino, y por lo tanto produciendo un daño directo en el epitelio tubular.

El cisplatino entra a la célula a través de dos vías: desde el torrente sanguíneo por el lado basolateral a través de transportadores como OCT2 o Ctr1, y desde la luz tubular por difusión pasiva atravesando la membrana del borde en cepillo celular. Una vez dentro de la célula, interacciona tanto con ácidos nucleicos como con proteínas, desencadenando una serie de eventos que desembocan en el desarrollo de apoptosis a través tanto de la vía intrínseca como de la extrínseca.

El cisplatino sufre un proceso de biotransformación que comienza con la formación de conjugados de glutatión en la circulación, reacción mediada por la enzima glutatión-S-transferasa <sup>136,153</sup>. Cuando estos conjugados son captados por la célula proximal son transformados a conjugados cisteinil-glicina por la gamma-glutamil-transpeptidasa (GGT), expresada en la superficie de las células tubulares proximales <sup>151,152</sup>. Los conjugados cisteinil-glicina son procesados a conjugados de cisteína por aminodipeptidasas, expresadas también en la superficie celular <sup>151</sup>. Los conjugados de cisteína son transportados al interior de las células tubulares proximales, donde son metabolizados por la cisteína-S-conjugado  $\beta$ -liasa a tioles altamente reactivos, responsables de su nefrotoxicidad <sup>102</sup>. El efecto nefrotóxico del

cisplatino es independiente de su efecto citostático sobre las células tumorales. Este último se produce debido a la unión del cisplatino al ADN y la formación de aductos en la molécula, y por lo tanto solo será efectivo en tipos celulares con una alta tasa de división. En el riñón, más del 70% de las células se encuentran estacionadas en fase G1, según evidencias recientes <sup>71</sup>, por lo que su sensibilidad al daño nuclear por cisplatino es menor.

La muerte de la célula tubular tras la exposición a cisplatino en experimentos *in vitro* es un fenómeno bien documentado <sup>35,92,116,120</sup>. Nuestras observaciones en cultivos primarios de PTEC tras el tratamiento con concentraciones crecientes de cisplatino mostraron cambios morfológicos y funcionales de muerte celular, lo que se corresponde con lo observado previamente por otros autores <sup>73,109,116,120,126</sup>. En nuestros cultivos primarios, el tratamiento con cisplatino produjo una pérdida celular tiempo y dosis-dependiente. Al estudiar por qué vías se produce esta muerte celular, pudimos comprobar que aunque existe necrosis en un bajo porcentaje (5-10%), la muerte celular sufrida por las células renales se debía mayoritariamente a apoptosis. Otros estudios confirman nuestros hallazgos <sup>72,129</sup>. Por lo tanto centramos nuestros esfuerzos en el estudio en profundidad del efecto de cisplatino sobre la apoptosis inducida durante el tratamiento con cisplatino. Tras dicho tratamiento la célula presenta una morfología nuclear picnótica debido a la condensación de la cromatina, además de un incremento en la liberación de nucleosomas y externalización del fosfolípido fosfatidilserina, lo que se corresponde con lo observado por otros autores en trabajos previos <sup>120,129</sup>.

Estos eventos propios de la apoptosis parecían incluir mediadores tanto de la vía intrínseca como de la extrínseca. Aunque estas vías confluyen en un resultado común, cuentan con mediadores diferentes y pueden darse a la vez o de manera independiente. Mientras que la vía intrínseca es dependiente de fenómenos que tienen lugar en la mitocondria y que activaran en última instancia caspasa 9 y a continuación caspasa 3, la vía extrínseca depende de la activación de receptores de muerte presentes en la membrana plasmática que desencadenarán la activación de caspasa 8 y finalmente caspasa 3. Diversos estudios publicados muestran una muerte celular por apoptosis que incluye ambas rutas de inducción por cisplatino <sup>77,117,156,163</sup>.

Para estudiar el efecto de cisplatino sobre la ruta extrínseca de la apoptosis en el modelo de nefrotoxicidad *in vitro* se estudió en primer lugar la expresión génica de tres elementos fundamentales en esta ruta, como son TNF $\alpha$ , Fas y FasL <sup>156</sup>, comprobando que cisplatino era capaz de inducir un incremento en la expresión de los mismos. A tiempos cortos de tratamiento se puede encontrar FasL a nivel de membrana, pero tras 2 horas y media la molécula desaparece de la superficie celular, internalizándose e iniciando la vía extrínseca <sup>84</sup>. Tsuruya y otros autores demostraron la implicación directa de la ruta de apoptosis mediada por receptores de muerte en la toxicidad renal inducida por cisplatino <sup>156</sup>. En concordancia con estos resultados,

hemos observado en los animales tratados con cisplatino un incremento en la expresión renal de las formas nativa y glicosilada del receptor Fas, así como de FasL y caspasa 8, ampliando nuestras observaciones las referidas por otros autores <sup>31,88,157</sup>.

Nuestros ensayos mostraron un incremento en la actividad de las caspasas 8 y 3 en presencia de cisplatino, confirmando estudios previos <sup>31,77,147</sup>. Sin embargo a 24 horas la actividad de caspasa 9 muestra un discreto aumento debido probablemente a la activación previa o posterior de la vía intrínseca. Junto a estos resultados observamos una actividad sostenida de caspasa 3 a lo largo del tiempo incluso 48 horas después del tratamiento.

En presencia de cisplatino se produce un incremento en la concentración de TNF $\alpha$ , producido tanto por la propia célula como por células de infiltrado inflamatorio circundantes al foco de lesión. TNF $\alpha$  se ancla a su receptor (TNFR), que activa caspasa 8, la cual desencadena las dos rutas principales de apoptosis. Además la unión TNF $\alpha$ -TNFR produce la degradación de I $\kappa$ B, activando NF $\kappa$ B que viaja al núcleo donde induce la transcripción de gran número de genes. La activación de NF $\kappa$ B que hemos observado tiene una triple acción, ya que contribuye a la muerte celular mediante la producción de TNF $\alpha$ , pero a la vez induce la generación de diversos elementos antiapoptóticos, como las proteínas antiapoptóticas de la familia de Bcl-2, y por último contribuye a la lesión inflamatoria asociada.

Estos datos fueron corroborados con los experimentos realizados *in vivo*, en los que observamos un significativo aumento en la fragmentación del ADN, así como en la síntesis de Bax, caspasa 3 y caspasa 9 tras el tratamiento con cisplatino. Sin embargo dicho tratamiento no afectó a los niveles de la proteína antiapoptótica Bcl-2. Los hallazgos bioquímicos de toxicidad directa producida por cisplatino sobre la célula tubular proximal tienen una repercusión funcional directa en el modelo animal. Una sola inyección de cisplatino a una concentración de 5 mg/Kg peso induce en ratas una marcada disfunción renal, evidenciada por alteraciones a nivel histológico, así como una reducción del aclaramiento de creatinina e incremento en los niveles de creatinina sérica, NUS y excreción fraccional de sodio <sup>38,50,82,88,137</sup>. Los animales tratados con cisplatino en nuestro modelo experimental mostraron una reducción en el peso corporal y en el aclaramiento de creatinina, acompañado de un incremento en los niveles de creatinina sérica, NUS, volumen de orina y proteinuria. La disminución en el peso corporal se corresponde con la incapacidad de la nefrona distal de reabsorber agua, lo que provoca poliuria, deshidratación y por lo tanto pérdida de peso. El estudio histológico de los riñones de los animales tratados con cisplatino mostró un claro incremento en el daño tubular, presentando signos de muerte celular a nivel cortical y depósitos proteicos en la luz de los túbulos a nivel medular.

## 1.2.- ESTRÉS OXIDATIVO E INFLAMACIÓN

En cuanto al EO, estudios previos han afirmado que durante la toxicidad renal producida por cisplatino se genera un desbalance en el equilibrio redox celular, caracterizado por un incremento en la concentración de ROS producidos por la mitocondria y una pérdida de funcionalidad de los sistemas antioxidantes, encargados de la detoxificación celular. De hecho, trabajos previos han demostrado que en presencia de cisplatino se produce un aumento en la concentración de ROS <sup>119</sup>, además de una depleción en los sistemas antioxidantes celulares, compuestos por enzimas como la catalasa <sup>14,82</sup>. Las altas concentraciones de ROS están relacionadas con los procesos de inflamación y muerte celular, ya que inducen la activación de NFκB en la célula. El tratamiento con cisplatino produce EO en células renales en cultivo <sup>79</sup>. Nuestros estudios *in vitro* confirmaron un aumento en las concentraciones intracelulares de radical superóxido. Asimismo, durante la realización de modelo animal de nefrotoxicidad inducida por cisplatino, hemos podido comprobar cómo en las ratas tratadas con cisplatino se produce un incremento en los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en orina y una drástica pérdida de la capacidad antioxidante renal, evidenciada por un descenso en los niveles de catalasa en el tejido.

Es más que probable que la actividad de la glutatión-S-transferasa esté implicada en un consumo intenso de glutatión, que podría poner en riesgo a los sistemas antioxidantes celulares cuando hay un exceso de cisplatino. Sin embargo, no hay apenas estudios diseñados para analizar este extremo. Se trataría de una situación similar a la descrita a nivel hepático en el Síndrome Alcohol-Paracetamol. La localización renal del daño por cisplatino sería un indicativo más del intenso manejo intracelular renal de cisplatino.

De ser cierto el papel de DHP-I en el recambio de los residuos peptídicos de glutatión unidos a cisplatino a su entrada a la célula, la inhibición de DHP-I por cilastatina podría tener un efecto directo en la reducción del turnover de glutatión, mejorando las reservas antioxidantes y reduciendo el estrés oxidativo colateral.

Varios estudios sostienen la importancia de las HSPs en la protección celular frente a diversas agresiones, correlacionando sus expresiones con un descenso en el daño a nivel oxidativo en el túbulo proximal <sup>52</sup>. De hecho, un aumento en las concentraciones de HSP 70 y HSP 72 protegen frente a la toxicidad producida por cisplatino en células renales <sup>52,157</sup>. En nuestros estudios hemos observado un incremento en la síntesis de HSP 27 producido por la inyección de cisplatino. HSP 27 tiene importantes propiedades antiapoptóticas (inhibe tanto al receptor Fas como la ruta intrínseca) y modula los niveles de ROS y glutatión.

Como consecuencia de este proceso de EO sufrido por la célula se produce peroxidación lipídica a nivel de la membrana plasmática. Derivados de esta peroxidación de los lípidos se sintetizan numerosos metabolitos secundarios que se

desprenden al citoplasma, como el 4-HNE o el MDA, ambos aumentados durante el tratamiento con cisplatino. Otros autores han encontrado resultados similares <sup>14-16,38,82,137</sup>.

Diversos trabajos publicados en los últimos años afirman que existe una implicación directa de la inflamación en la patogenia de la nefrotoxicidad inducida por cisplatino <sup>50,78,119</sup>. En nuestro modelo experimental hemos podido observar que en presencia de cisplatino se produce un incremento en los niveles de citoquinas proinflamatorias como TNF $\alpha$ , así como un aumento de infiltrado inflamatorio caracterizado por la presencia en tejido de monocitos y macrófagos en el tejido renal. Estas células, además del aumento de NF $\kappa$ B, contribuyen al incremento en la concentración de la citoquina TNF $\alpha$ , que puede participar en las rutas de inducción de muerte celular actuando como ligando de los receptores de muerte y por lo tanto activando la ruta extrínseca de la apoptosis <sup>38,50,62,79,82,89,95,119,143</sup>.

## **2.- EFECTO DE CILASTATINA SOBRE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR CISPLATINO**

Para prevenir la nefrotoxicidad inducida por cisplatino se han descrito en la literatura diversas estrategias a nivel clínico, como son: a) evitar la administración simultánea de otros nefrotóxicos, b) reducir las dosis de cisplatino, c) sustituirlo por otros derivados menos tóxicos pero también menos efectivos, d) incrementar el aporte de líquidos para disminuir la concentración de cisplatino en la luz tubular, e) administrar antioxidantes como tiosulfato o amifostina.

A raíz de identificar los mecanismos de inducción de muerte, en los últimos años diversos grupos de investigación han invertido sus esfuerzos en la búsqueda de sustancias nefroprotectoras de muy distinta naturaleza, entre las que destacan antioxidantes como genisteína ó espirulina <sup>104,143</sup>, productos de origen vegetal <sup>15,38,104</sup> o inhibidores de la apoptosis <sup>38,57,140,165</sup> entre otros.

Sin embargo, prácticamente ninguno ha llegado a ser empleado en clínica, ya que, o bien no presentan los resultados esperados tras los estudios preclínicos, o bien surgen dudas de si existirá algún tipo de interferencia con la función terapéutica de cisplatino como citotóxico, a la hora de combatir el tumor <sup>117</sup>. Los inhibidores del transporte de cisplatino basolateral tampoco han llegado a ser utilizados <sup>117,118</sup>.

Por otro lado, con la finalidad no solo de combatir los efectos secundarios a la administración de cisplatino, sino también la aparición de posibles resistencias, se diseñaron otros compuestos de segunda generación derivados del platino, principalmente carboplatino y oxaliplatino, activos frente al mismo espectro de tumores y que permiten dosis de administración algo superiores. Sin embargo, estos



compuestos presentan otros efectos secundarios, y hay acuerdo general en que su eficacia como citostáticos es inferior a la del cisplatino <sup>11,39</sup>.

En esta tesis se han estudiado tanto los mecanismos fisiopatológicos de la nefrotoxicidad inducida por cisplatino como el efecto nefroprotector de cilastatina. La cilastatina es un compuesto originalmente sintetizado para inhibir la DHP-I presente en el borde el cepillo de la PTEC renal, con el fin de impedir la apertura del anillo  $\beta$ -lactámico del imipenem, aumentando la eficacia terapéutica del mismo frente a infecciones urinarias e inhibiendo su toxicidad al reducir la captación renal de imipenem <sup>23,34,76</sup>.

Las primeras evidencias de un posible papel nefroprotector de cilastatina se obtuvieron en los años 80, en los que se produjo una activa investigación de CsA a nivel farmacológico, estudiando su interacción con otros fármacos de uso común en clínica, como Imipenem/Cilastatina. Estos estudios, realizados tanto a nivel preclínico <sup>64,142</sup> como clínico <sup>24,27,61,99</sup> mostraron cómo dicha combinación podía ser útil a la hora de reducir la nefrotoxicidad asociada al inmunosupresor tras un trasplante tanto renal como de otros órganos. En nuestro laboratorio demostramos por vez primera que cilastatina actuaba directamente sobre la célula del túbulo proximal para impedir la toxicidad de CsA y tacrolimus <sup>121</sup>. Un metaanálisis <sup>149</sup> realizado por nuestro grupo recogió los datos observados por Sido <sup>142</sup>, Hammer <sup>64</sup>, Gruss <sup>61</sup>, Markewitz <sup>99</sup>, Carmellini <sup>27</sup> y Baghaie <sup>17</sup>, pudiendo concluir que cilastatina reduce la nefrotoxicidad asociada al tratamiento con CsA en un 44%, y fijando en un 76% la reducción del riesgo de aparición de FRA. En estudios posteriores demostramos también el papel nefroprotector de cilastatina frente a otros reconocidos nefrotóxicos de diferente naturaleza como antibióticos, citotóxicos, antiinflamatorios, antirretrovirales, anestésicos e inmunosupresores <sup>87</sup>.

La característica principal de un buen nefroprotector debe ser su inocuidad a nivel renal. Estudios previos de nuestro grupo demostraron que cilastatina no ejercía efecto alguno sobre la dinámica de crecimiento de PTEC en cultivo <sup>121</sup>. Además, en los experimentos realizados *in vitro* no se ha observado ningún efecto significativo de cilastatina sobre la generación de apoptosis o EO en las células. En los ensayos *in vivo* realizados con animales, tampoco hemos podido constatar diferencias en los valores obtenidos para el grupo control y el grupo tratado únicamente con cilastatina.

Nuestros datos vienen apoyados por los estudios preclínicos realizados previamente a la comercialización de I/C, en los que no se observó efecto deletéreo de cilastatina a nivel renal para las concentraciones de administración previstas <sup>135</sup>.

En cuanto a las concentraciones de cilastatina empleadas en los experimentos presentados en esta tesis, la elegida para los experimentos *in vitro* (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) se seleccionó por ser cercana a los niveles plasmáticos presentados por pacientes tratados con I/C, a pesar de que no es la concentración más alta ensayada, ni con la que hemos obtenido máxima protección <sup>121</sup>. Con respecto a la dosis de cilastatina

empleada para el modelo experimental en rata (75 mg/kg/12 horas), se determinó a partir de los datos para animales y humanos obtenidos en la literatura <sup>41,64,93,121,142</sup>.

<b>DOSIS (mg/Kg)</b>	5	10	20	50	100	200
<b>[CILASTATINA] PLASMA (µg/mL)</b>	22	65	100	250	600	1000

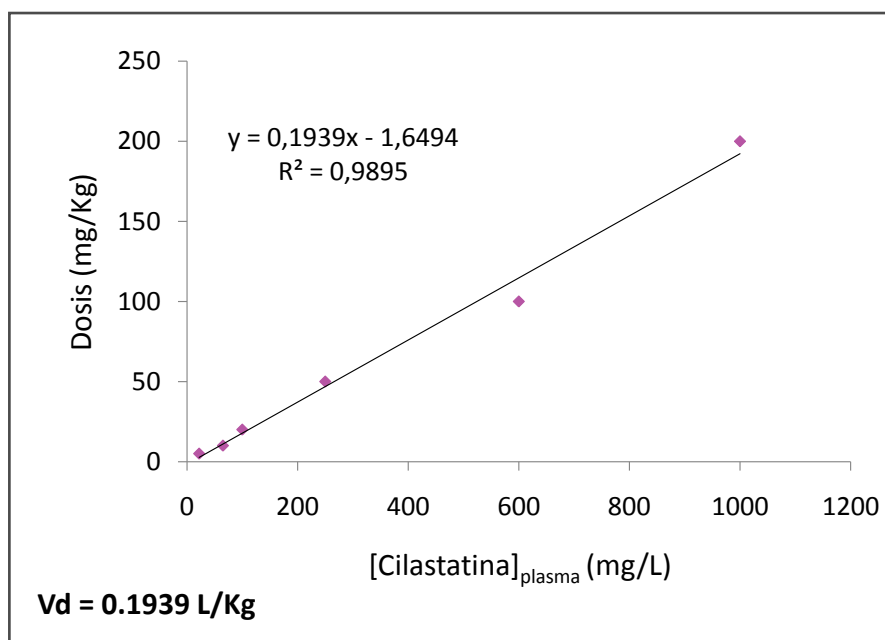
**Tabla 14. Concentraciones de cilastatina alcanzadas en plasma en función de la dosis administrada.** Se encuadra el rango de dosis empleado en clínica humana.

Cuando se representan las dosis de cilastatina usadas por distintos autores frente a las concentraciones plasmáticas alcanzadas, es posible estimar el volumen de distribución de cilastatina:

$$\text{Dosis (mg)} = \text{Vol. de distribución (L/Kg)} \times \text{Peso (Kg)} \times [\text{Cilastatina}]_{\text{plasma}} \text{ (mg/L)}$$

$$\text{Dosis/peso (mg/Kg)} = \text{Vol. de distribución (L/Kg)} \times [\text{Cilastatina}]_{\text{plasma}} \text{ (mg/L)}$$

Dicha representación permite estimar el volumen de distribución en 0.19 L/Kg, lo que implica que la cilastatina se distribuye mayoritariamente en el volumen plasmático, y es probable que tenga una elevada unión a proteínas (Figura 58).



**Figura 58. Volumen de distribución de cilastatina.** Mediante representación de la concentración de cilastatina alcanzada en plasma en mg/L frente a la dosis administrada en mg/Kg se obtiene el valor del volumen de distribución del fármaco, que corresponde a 0.19 L/Kg.

Durante los estudios realizados *in vitro* en PTEC pudimos observar en primer lugar, que la presencia de cilastatina inhibía de forma parcial tanto la muerte celular como la pérdida de viabilidad producidas por el tratamiento con cisplatino. Si profundizamos en el estudio de las vías implicadas observamos que cilastatina no es capaz de proteger a la célula de la muerte por necrosis pero sí de la muerte por apoptosis, por lo que centramos en ella los estudios de protección por cilastatina.

En cuanto al estudio de las caspasas, cilastatina impidió parcialmente el incremento en la actividad de caspasa 3 y caspasa 8. En el caso particular de caspasa 3, el estudio de su actividad a tiempos largos mostró que cilastatina mantiene reducida su actividad incluso 48 horas después del tratamiento con cisplatino, lo que indica que la protección de cilastatina frente al tratamiento con cisplatino no retrasa la muerte celular, sino que es una protección mantenida en el tiempo y por lo tanto una protección real. Todas las vías de apoptosis subsecuentes a la trimerización e internalización del complejo Fas/FasL resultan inhibidas por cilastatina.

Tras comprobar que efectivamente cilastatina era capaz de inhibir en parte la apoptosis inducida *in vitro* por cisplatino, decidimos estudiar si tenía algún efecto frente a otros tipos de daño en la célula, concretamente el EO, o si este EO se producía de forma primaria por el tratamiento con cisplatino, o era secundario a la inducción de apoptosis. La administración de cilastatina en combinación con cisplatino impidió parcialmente el aumento en la síntesis mitocondrial del radical superóxido en las células de epitelio renal en cultivo. Todos estos datos desprendidos de los estudios *in vitro* de toxicidad y protección apuntan a un posible potencial tanto antiapoptótico como antioxidante de cilastatina frente al efecto tóxico ejercido por cisplatino en la célula renal, y que el efecto oxidativo es secundario y no primario a la aparición de apoptosis.

En el estudio *in vivo* de toxicidad renal aguda inducida por cisplatino en ratas, el tratamiento con cilastatina mejoró significativamente, y parcial o totalmente cada uno de los parámetros de función renal modificados por cisplatino.

El estudio histológico de los riñones de los animales tratados con cisplatino en combinación con cilastatina mostró un claro descenso en el daño tubular, desapareciendo completamente los depósitos proteicos de las luces tubulares tanto a nivel cortical como medular. La ausencia de daño significativo a nivel glomerular, así como el daño masivo preferente a nivel del túbulo proximal nos llevan a pensar que la proteinuria observada, constituida por albúmina y globulinas, aun siendo de origen glomerular, obedece a una lesión en la capacidad de reabsorción proteica del túbulo proximal. Cilastatina parece capaz de restaurar dicha capacidad.

La característica más peculiar del FRA inducido por cisplatino es la aparición de una poliuria sugestiva de lesión del mecanismo de contracorriente. La evolución paralela de la poliuria y los depósitos proteicos medulares al añadir cilastatina sugiere

que los cilindros proteicos pueden estar implicados en la pérdida masiva de agua y sal.

En el caso de los ensayos relacionados con la apoptosis en el tejido renal de los animales, hemos podido comprobar que en presencia de cilastatina se reduce la síntesis de proteínas características de la ruta de apoptosis mediada por los receptores de muerte, como Fas (en sus formas nativa y glicosilada), FasL y caspasa 8. Además, cilastatina inhibe la síntesis de proteínas como Bax, caspasa 3 y caspasa 9 en presencia de cisplatino, lo que impide por lo tanto que se desencadene la ruta intrínseca de la apoptosis.

### **3.- EFECTO DE CILASTATINA SOBRE LA OXIDACIÓN Y LA INFLAMACIÓN INDUCIDAS POR CISPLATINO**

Con respecto a los fenómenos de EO que se producen *in vivo* en el riñón durante el tratamiento con cisplatino, hemos podido observar cómo estos se dan en menor medida con la coadministración de cisplatino y cilastatina. Cilastatina impide el incremento en los niveles de ROS como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en orina, y es capaz de restaurar los niveles de catalasa y por lo tanto la capacidad antioxidante en el tejido renal. Además, cilastatina restauró hasta niveles normales la proteína HSP 27, demostrando así su potencial antioxidante y antiapoptótico <sup>14,82,90,137</sup>.

El paso del conjugado platino-cisteinil-glicina a platino-cisteína, mediado por aminodipeptidasas y necesario para que los conjugados de cisteína sean transportados al interior de la célula, podría verse interferido por cilastatina si DHP-I fuese una de las aminodipeptidasas implicadas en este proceso <sup>151</sup>. Esto no se ha aclarado en esta tesis ni en la literatura, pero es razonable pensar que es así, ya que a diferencia de DHP-IV, el enlace peptídico diana de DHP-I es una glicina con un aminoácido diferente de prolina.

Por último, con la finalidad de comprobar si cilastatina era capaz de inhibir la aparición de inflamación como resultado del tratamiento con cisplatino, se estudiaron diversos parámetros indicadores de procesos inflamatorios, comprobando que el tratamiento con cilastatina impide el aumento de citoquinas como TNF $\alpha$  así como del infiltrado inflamatorio de monocitos/macrófagos. Además, cilastatina fue capaz de restaurar hasta valores normales los niveles del factor nuclear  $\kappa$ B. Todo esto indica que cilastatina podría actuar también como agente antiinflamatorio en procesos de toxicidad renal.

Por lo tanto, el tratamiento con cilastatina interfirió con los tres sistemas de mediación estudiados: la muerte celular por apoptosis, la oxidación y la inflamación,

sugiriendo que los tres tienen una señalización inicial común. Cilastatina parece capaz de interferir con dicha señalización inicial.

La finalidad última del tratamiento con cisplatino es la eliminación, parcial o total, de un tumor sólido. Esta eliminación celular se produce siempre a expensas de la eliminación de células o tejidos no tumorales, ya que este tratamiento quimioterápico presenta el inconveniente de no ir dirigido de forma exclusiva al tejido tumoral. Este daño infringido sobre tejido sano, puede ocasionar, en el caso del tejido renal, incluso la suspensión del tratamiento, debido a que los daños colaterales al mismo superan en magnitud a su posible efecto beneficioso. Durante los últimos años se han invertido grandes esfuerzos en la búsqueda de agentes nefroprotectores útiles durante el tratamiento con cisplatino <sup>38,47,82,88,137</sup>. Sin embargo, estos esfuerzos en la mayoría de los casos han dado pocos o ningún resultado debido a que, o bien los efectos del protector no se producen exclusivamente en tejido renal, o bien interfiere de alguna manera con el efecto de cisplatino a nivel del tumor.

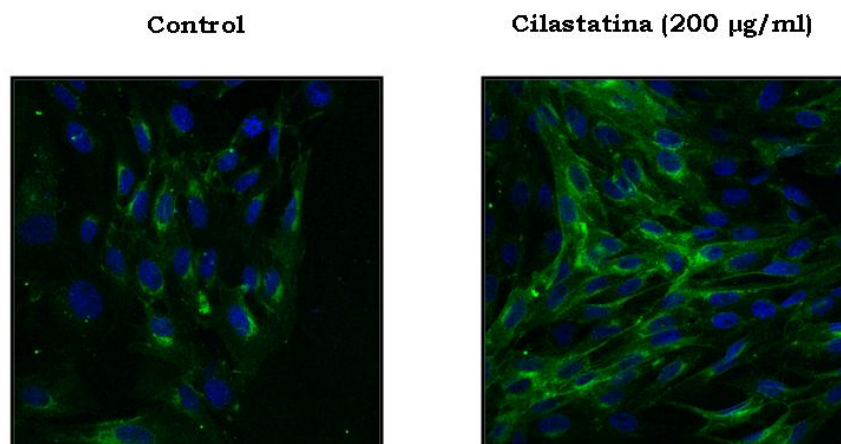
Al ser cilastatina un ligando de DHP-I, enzima cuya distribución se encuentra prácticamente restringida al borde en cepillo de la PTEC, es de esperar que su efecto se dé exclusivamente a nivel renal, y más concretamente a nivel de esta enzima. De hecho, hemos podido comprobar cómo a nivel de PTEC cilastatina actúa únicamente como inhibidor de DHP-I, no presentando ningún efecto sobre otras dehidropeptidasas que se pueden encontrar en el organismo. Nuestros estudios de actividad de DHP-I en células tumorales HeLa han demostrado la ausencia de la enzima en estas células, no siendo por lo tanto dianas de cilastatina. Cabe dentro de lo posible que de existir alguna especie tumoral que exprese DHP-I en su membrana, pudiese resultar protegida del efecto de cisplatino por cilastatina, siempre y cuando la unión a DHP-I en dicha célula interfiriese como en la célula proximal con la cascada de señalización de la apoptosis <sup>58</sup>.

En vista de estos resultados decidimos estudiar si cilastatina tenía algún efecto sobre la muerte celular producida por cisplatino en cultivos de células HeLa, línea celular establecida de cáncer de útero, y otras líneas celulares de extendido uso, y dianas todas ellas del quimioterápico cisplatino. Cilastatina no tuvo ningún efecto, perjudicial ni beneficioso, sobre la viabilidad celular reducida tras la administración de cisplatino en ninguna de las líneas tumorales. Además, tampoco influyó en el aumento de núcleos picnóticos y la actividad de caspasa 3 en células HeLa, ni presentó ningún efecto sobre la unión de platino al ADN, fundamental para que cisplatino lleve a cabo su papel como citotóxico.

Todos estos resultados indican que cilastatina presenta un efecto órgano-específico a nivel renal, no influyendo en la función terapéutica de cisplatino como agente antitumoral.

#### 4.- EFECTOS DE CILASTATINA SOBRE EL TRANSPORTE CELULAR DE CISPLATINO

Durante nuestros estudios de inducción de lesión renal en el túbulo proximal con fármacos nefrotóxicos y protección con cilastatina, hemos observado en repetidas ocasiones que la concentración intracelular de los fármacos en estudio está reducida en un 20-30% en presencia de cilastatina. Además, hemos podido comprobar que esta reducción es específica para el túbulo proximal. Debido a estos indicios, nuestra hipótesis implicaba que la protección ejercida por cilastatina se debía a un efecto sobre el borde en cepillo de las células epiteliales del túbulo proximal renal, en concreto sobre las balsas de colesterol. Observaciones previas de nuestro laboratorio habían demostrado que el tratamiento con cilastatina impide la internalización de la toxina B colérica, cuyo receptor específico, el monosialosil-gangliósido, se encuentra anclado a las balsas de colesterol (Figura 59) <sup>87</sup>. Además, la administración de cilastatina en cultivos celulares tratados con CsA produjo alteraciones en la fluidez de membrana <sup>121</sup>.



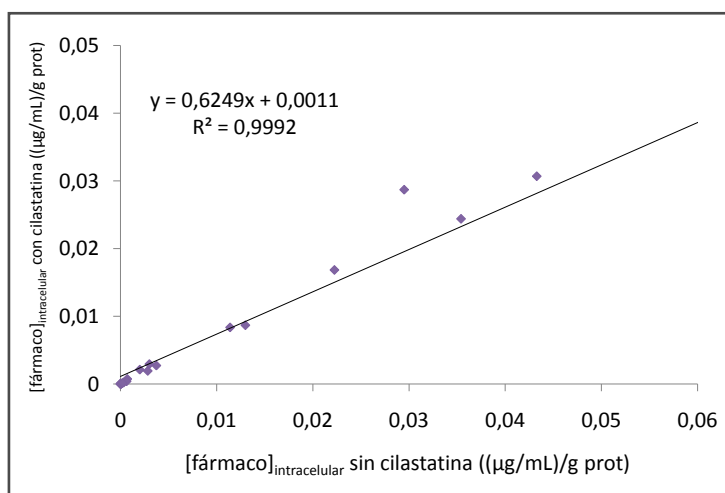
**Figura 59. Efecto de cilastatina sobre la internalización de toxina B colérica a través de las balsas de colesterol.** Imágenes representativas de inmunolocalizaciones por microscopía confocal de toxina B colérica-FITC en PTEC en presencia/ausencia de cilastatina 200 µg/mL durante 2.5 horas. Se observa un cambio en la distribución de toxina B, siendo perinuclear en el control debido a su internalización a través de las BDC. El tratamiento con cilastatina impide dicha internalización, permaneciendo la toxina B en la membrana celular (Modificada de Pérez *et al.* <sup>121</sup>).

Pero estos hallazgos no nos permitían establecer si con cilastatina se producía una inhibición del transporte difusivo debida a los cambios en la fluidez de membrana, o si lo ocurrido se debía a una disminución en el flujo de pinocitosis.

La entrada de cisplatino al interior de la célula renal, así como su eliminación hacia la luz tubular son procesos dependientes de diversos factores. Así, la captación del fármaco se puede realizar o bien por la cara basolateral o bien por la región apical, estando implicados tanto transportadores como OCT2 y Ctr1 como la difusión pasiva <sup>32,49,69,94,117,118,164</sup>. En cuanto a la expulsión del fármaco se produce hacia la luz

tubular, estando mediada por transportadores situados en la membrana apical, como los de la familia ABC o MATE1 <sup>12,164</sup>.

Hemos publicado recientemente que cilastatina interfiere con la acumulación intracelular de CsA, tacrolimus y paracetamol <sup>87</sup>. En este trabajo demostramos además reducción en el acúmulo intracelular de cisplatino en las células renales del túbulo proximal. Cuando representamos gráficamente las concentraciones que alcanza dentro de las células renales cada uno de los fármacos mencionados a cada una de las dosis estudiadas en ausencia (abscisas) o presencia de cilastatina (ordenadas), la pendiente de la recta de regresión obtenida marca la reducción observada en la acumulación intracelular para cualquiera de los fármacos estudiados. Es notable observar que todos los fármacos se alinean sobre una recta ( $R^2 > 0,999$ ), a pesar de que dichos fármacos tienen muy diversas características físicas y químicas (Figura 60).



**Figura 60. Porcentaje de reducción en la acumulación de fármacos por cilastatina.** Se representan las concentraciones de fármaco intracelular con cilastatina frente a sin cilastatina. Los datos proceden de experimentos realizados con dosis crecientes de cisplatino, tacrolimus, ciclosporina, gentamicina, vancomicina y paracetamol. El porcentaje de reducción de la acumulación de fármacos se comporta como una constante, y se ha determinado por el cálculo de la inversa de la pendiente, obteniendo como resultado una reducción constante en la acumulación intrarrenal de fármacos del 37%.

Existe alguna publicación previa que muestra cómo cilastatina a altas concentraciones puede inhibir uno de los transportadores aniónicos basolaterales OAT3 <sup>145</sup>. Por nuestra parte, acabamos de publicar evidencias de que también es capaz de inhibir transportadores basolaterales de características catiónicas, específicos para metales <sup>106</sup>.

En el caso de las células tumorales (HeLa), a pesar de que carecen de DHP-I, su concentración intracelular de cisplatino también se ve reducida en presencia de cilastatina, confirmando que cilastatina es capaz de inhibir otros transportes de cisplatino.

No parece que una inhibición del transporte de cisplatino, una interferencia con su metabolismo intracelular o una reducción de la concentración intracelular de cisplatino sea el mecanismo implicado en la nefroprotección, ya que de ser así la necrosis también se habría visto reducida, y veríamos protección en células tumorales.

La estructura y la función de cilastatina, diseñada para su unión a una proteína del glucocálix del borde en cepillo, sugieren que el mecanismo de su acción protectora incluye la unión al borde en cepillo. Por otro lado, cilastatina no modifica la expresión de FasL en respuesta al daño directo de cisplatino sobre el ADN celular, pero sí interfiere con el destino de FasL una vez que se une a su receptor Fas a nivel del borde en cepillo. Todos los efectos de cilastatina descritos sobre diferentes sistemas celulares parecen ser posteriores a este primer hecho básico.

## **5.- EFECTO DE CILASTATINA SOBRE LA ESPECIACIÓN INTRACELULAR DE CISPLATINO**

Hemos podido comprobar que cilastatina no modifica la especiación del cisplatino a nivel celular ni tisular. Esto significa que la molécula de cisplatino, una vez en el interior de la célula, se comporta de la misma manera en presencia y ausencia de cilastatina, presentando el mismo perfil de unión a biomoléculas, lo que indica que el fármaco no está sufriendo modificaciones metabólicas ocasionadas por cilastatina.

Por último, en nuestros experimentos hemos observado que, a pesar de que cilastatina reduce algo las concentraciones intracelulares de cisplatino en células HeLa, las concentraciones alcanzadas (con o sin cilastatina) son muy superiores a las alcanzadas en PTEC, no varía la unión a ADN y no se reduce en ellas la apoptosis. En células HeLa, cilastatina parece capaz de inhibir parcialmente alguno de los sistemas de transporte de cisplatino, pero no de interaccionar con DHP-I, ya que dicha enzima es inexistente. La inhibición del transporte no modifica la citotoxicidad del cisplatino.

Por lo tanto, parece que la protección necesita tanto la unión de cilastatina a DHP-I, como también la interacción local de DHP-I con receptores de membrana.

## **6.- SUCESIÓN DE EVENTOS EN LA PROTECCIÓN RENAL POR CILASTATINA: PAPEL DE LA DEHIDROPEPTIDASA I**

Evidencias previas de nuestro grupo confirman que cilastatina es capaz de proteger al riñón frente a agresiones de tóxicos que no son sustrato de DHP-I, como son CsA, tacrolimus, vancomicina, gentamicina y paracetamol, etc...<sup>87,121</sup>. Esto nos hace pensar que la acción nefroprotectora de cilastatina no es debida a su papel inhibidor de la enzima, sino más bien a su interacción con la misma y concretamente con la región de la membrana a la que se encuentra anclada: las balsas de colesterol. DHP-I se une de forma covalente a un residuo GPI localizado en las balsas de

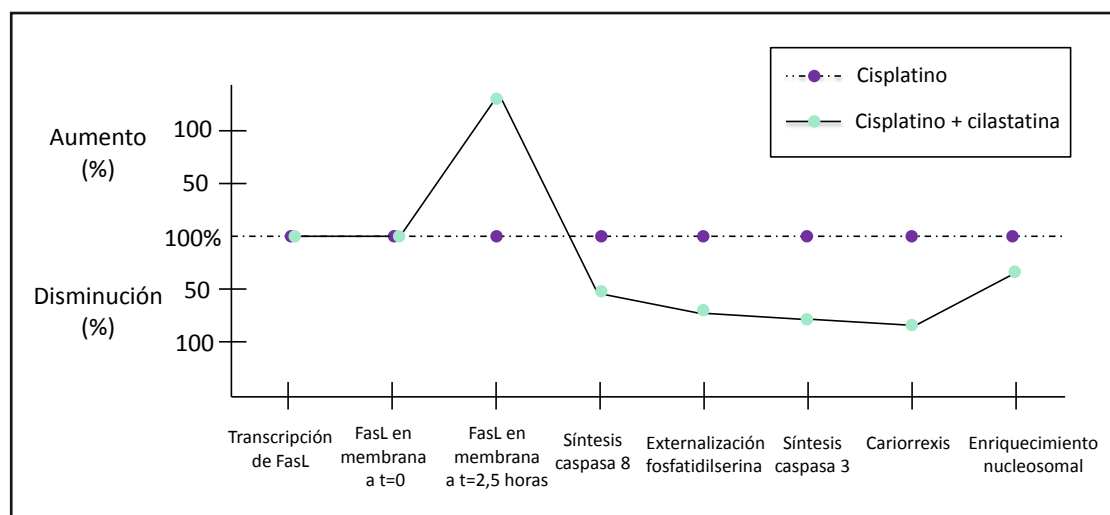


colesterol, que son dominios ricos en colesterol e implicados en numerosos procesos de endocitosis, transducción de señales y transporte transmembrana <sup>37,166</sup>.

Estudios recientes han demostrado que la apoptosis inducida por cisplatino y mediada por el receptor de muerte Fas requiere la trimerización del mismo en las BDC. Dimanche-Boithrel ha demostrado que la exposición de células de carcinoma humano de colon a cisplatino induce la formación de trímeros de Fas y su redistribución a lo largo de las balsas de colesterol, acompañado de FADD y caspasa 8 (anclados también a las balsas de colesterol) <sup>84</sup>. Por otro lado, la desorganización de las balsas de colesterol impide el desarrollo de la cascada de muerte celular iniciada por la unión Fas-FasL en timocitos y células Jurkat <sup>100</sup>. En presencia de cilastatina, el aumento en la síntesis de FasL y Fas inducidos por cisplatino, permanecen anclados a la membrana plasmática y no son capaces de internalizarse. Aunque no se han realizado experimentos de colocalización con cilastatina y Fas, nuestros hallazgos sugieren que la interferencia de cilastatina con la toxicidad inducida por cisplatino en el túbulo proximal ocurre al inicio de la ruta extrínseca de la apoptosis, a nivel de la membrana plasmática.

Clásicamente, cuando se estudia el efecto de un inhibidor sobre una cascada de eventos biológicos, el sitio de la inhibición viene marcado por un aumento de los sustratos o mediadores del paso anterior a la inhibición, así como un descenso en la actividad o concentración de todos los pasos posteriores.

En la siguiente gráfica se han utilizado los porcentajes de cambio inducidos por cilastatina en los eventos que siguen, tanto *in vivo* como *in vitro*, a la intoxicación aguda por cisplatino. El punto de acción se puede localizar entre la internalización de FasL unido a membrana y la activación de caspasa 8.



**Figura 61. Sucesión de eventos en la toxicidad aguda inducida por cisplatino. Efecto de cilastatina.** Se puede identificar el punto de acción de cilastatina entre la internalización de FasL unido a membrana y la activación de caspasa 8.

## **7.- CILASTATINA: UNA ESTRATEGIA PROMETEDORA PARA EL TRATAMIENTO DE LA TOXICIDAD RENAL**

A pesar del alto potencial que podría tener cilastatina como nefroprotector, presenta ciertas limitaciones que se han de solventar para hacerla óptima para su comercialización. Así, cilastatina inhibe su propia absorción intestinal, debido a que se ancla al borde en cepillo de las células del epitelio intestinal. Debido a esto, cilastatina presenta una baja biodisponibilidad oral (en torno al 8%), que en el momento actual limita su administración a la vía parenteral. Dado que el volumen de distribución de cilastatina (0.2 L/Kg aproximadamente) y cisplatino (0.5 L/Kg) son próximos, probablemente se podría plantear su administración parenteral conjunta.

Por otro lado, cilastatina modifica la farmacocinética de cisplatino, disminuyendo la concentración máxima de fármaco alcanzada en sangre y ralentizando su secreción renal, lo que implica que cisplatino se mantiene en el torrente sanguíneo a concentraciones más altas y sostenidas en el tiempo, lo que representaría un beneficio neto para la administración conjunta de ambos fármacos.

En resumen, podemos decir que los resultados encontrados en esta tesis proporcionan evidencias consistentes de que cilastatina puede reducir tanto *in vitro* como *in vivo* la nefrotoxicidad producida a consecuencia del tratamiento con cisplatino mediante su interferencia con mediadores de la vía extrínseca de la apoptosis a nivel de membrana. El hecho de que cilastatina ejerza esta protección sin interferir con el efecto citotóxico del cisplatino sobre sus dianas terapéuticas, que en principio no expresan DHP-I y que además el perfil farmacocinético favorezca a la combinación cisplatino-cilastatina (cilastatina no modifica el AUC de cisplatino pero sí aumenta su tiempo de vida media en sangre), sugieren que cilastatina podría tener un gran potencial como estrategia terapéutica real para la preservación de la función renal en pacientes oncológicos sometidos a tratamiento quimioterápico con cisplatino.

## **VIII.- CONCLUSIONES**

---

1.- Cisplatino produce daño renal en células proximales tubulares renales en cultivo (caracterizado por redondeamiento celular y desprendimiento al sobrenadante) y en el modelo animal de toxicidad aguda (caracterizado por la elevación de la creatinina, NUS, proteinuria y aparición de lesiones a nivel túbulointersticial). La aparición del daño está relacionada con la activación de vías apoptóticas, inflamatorias y la presencia de mayor estrés oxidativo.

2.- Cilastatina por sí sola no induce ningún cambio sobre la dinámica de crecimiento de las células proximales tubulares renales en cultivo, morfología, porcentaje de supervivencia, potencial de membrana, síntesis de radicales libres, enriquecimiento nucleosomal, localización de fosfatidilserina, actividad de caspasas, liberación de citocromo c y transcripción de genes proapoptóticos. Asimismo no presenta efectos en el peso de los animales, su función y morfología renal y la expresión de distintos signos indicadores de apoptosis, inflamación o estrés oxidativo.

3.- La administración de cilastatina en combinación con cisplatino impide de forma total o parcial la aparición de apoptosis y el daño oxidativo e inflamatorio producidos por este, tanto *in vitro* como en un modelo *in vivo* de fracaso renal agudo por cisplatino.

4.- Cilastatina inhibe parcialmente la entrada y acumulación del cisplatino en las células proximales tubulares renales en cultivo, así como en la corteza renal de los animales, pero no modifica la especiación o unión a biomoléculas del mismo en el interior celular.

5.- El mecanismo de protección ejercido por cilastatina parece estar relacionado con la interferencia de la vía extrínseca de la apoptosis, al ser capaz de inhibir la internalización precoz del complejo Fas/FasL.

6.- Cilastatina no es capaz de inhibir la muerte celular producida por cisplatino en diferentes líneas tumorales (mama, vejiga, colon, cervix...), dianas terapéuticas del quimioterápico. Por lo tanto, cilastatina ejerce su acción protectora a nivel renal de manera órgano-específica no afectando al efecto farmacológico antineoplásico del cisplatino.

En conjunto, estos datos apoyan la idea de que cilastatina podría representar una prometedora alternativa terapéutica ante las complicaciones renales producidas en pacientes oncológicos tratados con cisplatino, sin comprometer su eficacia anticancerígena. Además, su uso permitiría el aumento de dosis y ciclos del fármaco impidiendo a su vez la interrupción del tratamiento, tan usual en estos pacientes debido al desarrollo de fracaso renal agudo tóxico.

## **IX. - BIBLIOGRAFÍA**

---

1. JAMA. National Institutes of Health Consensus Conference , 259-2961. (1983). Conference Proceeding.
2. Adachi, H. *et al.* Identification of membrane anchoring site of human renal dipeptidase and construction and expression of a cDNA for its secretory form. *J. Biol. Chem.* **265**, 15341-15345 (1990).
3. Adachi, H. *et al.* Primary structure of human microsomal dipeptidase deduced from molecular cloning. *J. Biol. Chem.* **265**, 3992-3995 (1990).
4. Adams, J. M. & Cory, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**, 1322-1326 (1998).
5. Adams, J. M. & Cory, S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 488-496 (2007).
6. Adler, S. & Huang, H. Oxidant stress in kidneys of spontaneously hypertensive rats involves both oxidase overexpression and loss of extracellular superoxide dismutase. *Am. J. Physiol Renal Physiol* **287**, F907-F913 (2004).
7. Adrain, C. & Martin, S. J. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 390-397 (2001).
8. Akcay, A., Nguyen, Q. & Edelstein, C. L. Mediators of inflammation in acute kidney injury. *Mediators. Inflamm.* **2009**, 137072 (2009).
9. Albalade Ramón, M. & Gruss Vergara, E. Patología Renal en Oncología, en *Nefrología Clínica*. Hernando Avendaño, L. pp. 720-730 (Panamericana, Madrid,2011).
10. Algeciras-Schimmich, A. *et al.* Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol. Cell Biol.* **22**, 207-220 (2002).
11. Alinari, L. *et al.* Value of oxaliplatin treatment in heavily pretreated patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk. Lymphoma* **46**, 1437-1440 (2005).
12. Anzai, N. & Endou H. Renal drug transporters and nephrotoxicity. Proc. 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences. AATEX 14(Special Issue), 447-452. 2011. 21-8-2007. Conference Proceeding.
13. Arany, I. & Safirstein, R. L. Cisplatin nephrotoxicity. *Semin. Nephrol.* **23**, 460-464 (2003).
14. Atessahin, A., Ceribasi, A. O., Yuce, A., Bulmus, O. & Cikim, G. Role of ellagic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **100**, 121-126 (2007).
15. Atessahin, A., Yilmaz, S., Karahan, I., Ceribasi, A. O. & Karaoglu, A. Effects of lycopene against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *Toxicology* **212**, 116-123 (2005).
16. Bae, E. H. *et al.* alpha-Lipoic acid prevents cisplatin-induced acute kidney injury in rats. *Nephrol. Dial. Transplant.* **24**, 2692-2700 (2009).
17. Baghaie A, B. M. A. C. The effect of imipenem/cilastatin on acute cyclosporine nephrotoxicity in heart/lung transplant patients. *Crit Care Med* 23(A241) (1995). Abstract.

18. Baliga, R., Ueda, N., Walker, P. D. & Shah, S. V. Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. *Drug Metab Rev.* **31**, 971-997 (1999).
19. Baliga, R., Zhang, Z., Baliga, M., Ueda, N. & Shah, S. V. In vitro and in vivo evidence suggesting a role for iron in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Kidney Int.* **53**, 394-401 (1998).
20. Baliga, R., Zhang, Z., Baliga, M., Ueda, N. & Shah, S. V. Role of cytochrome P-450 as a source of catalytic iron in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Kidney Int.* **54**, 1562-1569 (1998).
21. Bancroft, D. P., Lepre, C. A. & Lippard, S. J. Platinum-195 NMR kinetic and mechanistic studies of cis- and trans-diamminedichloroplatinum(II) binding to DNA. *Journal of the American Society of Chemistry* **112**, 6860-6871 (2011).
22. Berners-Price, S. J. & Appleton, T. G. The chemistry of cisplatin in aqueous solution, en *Platinum-based drugs in cancer therapy*. Kelland and Farrell. pp. 1-35 (2011).
23. Birnbaum, J., Kahan, F. M., Kropp, H. & MacDonald, J. S. Carbapenems, a new class of beta-lactam antibiotics. Discovery and development of imipenem/cilastatin. *Am. J. Med* **78**, 3-21 (1985).
24. Calne, R. Y. *et al.* Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet* **2**, 1323-1327 (1978).
25. Campbell, B. J., Di, S. Y., Forrester, L. J. & Zahler, W. L. Specificity and inhibition studies of human renal dipeptidase. *Biochim. Biophys. Acta* **956**, 110-118 (1988).
26. Campbell, B. J., Lin, Y. C., Davis, R. V. & Ballew, E. The purification and properties of a particulate renal dipeptidase. *Biochim. Biophys. Acta* **118**, 371-386 (1966).
27. Carmellini, M., Frosini, F., Filipponi, F., Boggi, U. & Mosca, F. Effect of cilastatin on cyclosporine-induced acute nephrotoxicity in kidney transplant recipients. *Transplantation* **64**, 164-166 (1997).
28. Carrero, J. J. & Stenvinkel, P. Persistent inflammation as a catalyst for other risk factors in chronic kidney disease: a hypothesis proposal. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **4 Suppl 1**, S49-S55 (2009).
29. Chandrasekar, P. H. & Cronin, S. M. Nephrotoxicity in bone marrow transplant recipients receiving aminoglycoside plus cyclosporine or aminoglycoside alone. *J. Antimicrob. Chemother.* **27**, 845-849 (1991).
30. Chen, J., Emara, N., Solomides, C., Parekh, H. & Simpkins, H. Resistance to platinum-based chemotherapy in lung cancer cell lines. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **66**, 1103-1111 (2010).
31. Choi, D. E. *et al.* Pretreatment with darbepoetin attenuates renal injury in a rat model of cisplatin-induced nephrotoxicity. *Korean J. Intern. Med* **24**, 238-246 (2009).
32. Ciarimboli, G. *et al.* Organic cation transporter 2 mediates cisplatin-induced oto- and nephrotoxicity and is a target for protective interventions. *Am. J. Pathol.* **176**, 1169-1180 (2010).



33. Cleare, M. J. & Hoeschele, J. D. Studies on the antitumor activity of group VIII transition metal complexes. Part I. Platinum (II) complexes. *Bioinorganic Chemistry* **2**, 187-210 (2011).
34. Clissold, S. P., Todd, P. A. & Campoli-Richards, D. M. Imipenem/cilastatin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs* **33**, 183-241 (1987).
35. Cummings, B. S. & Schnellmann, R. G. Cisplatin-induced renal cell apoptosis: caspase 3-dependent and -independent pathways. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **302**, 8-17 (2002).
36. Daugas, E. *et al.* Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J.* **14**, 729-739 (2000).
37. de, L. A., Donovan, L. & Arcaro, A. Lipid rafts and caveolae in signaling by growth factor receptors. *Open. Biochem. J.* **1**, 12-32 (2007).
38. Do Amaral, C. L. *et al.* Resveratrol attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Arch. Toxicol.* **82**, 363-370 (2008).
39. Doolittle, N. D. *et al.* Delayed sodium thiosulfate as an otoprotectant against carboplatin-induced hearing loss in patients with malignant brain tumors. *Clin. Cancer Res.* **7**, 493-500 (2001).
40. Drusano, G. L. *et al.* The plasma pharmacokinetics of high dose (1 g) imipenem coadministered with 1 g cilastatin in six normal volunteers. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **3**, 468-470 (1984).
41. Drusano, G. L. *et al.* Safety and tolerability of multiple doses of imipenem/cilastatin. *Clin. Pharmacol. Ther.* **37**, 539-543 (1985).
42. Eastman, A. Cross-linking of glutathione to DNA by cancer chemotherapeutic platinum coordination complexes. *Chem. Biol. Interact.* **61**, 241-248 (1987).
43. Eiger, I. Z. & Greenstein, J. P. Addition products of dehydropeptides. *Arch. Biochem.* **19**, 467-473 (1948).
44. Enomoto, A. *et al.* Role of organic anion transporters in the tubular transport of indoxyl sulfate and the induction of its nephrotoxicity. *J. Am. Soc. Nephrol.* **13**, 1711-1720 (2002).
45. Esteban-Fernandez, D., Verdaguer, J. M., Ramirez-Camacho, R., Palacios, M. A. & Gomez-Gomez, M. M. Accumulation, fractionation, and analysis of platinum in toxicologically affected tissues after cisplatin, oxaliplatin, and carboplatin administration. *J. Anal. Toxicol.* **32**, 140-146 (2008).
46. Fadok, V. A. *et al.* Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* **148**, 2207-2216 (1992).
47. Fatima, S., Arivarasu, N. A. & Mahmood, R. Vitamin C attenuates cisplatin-induced alterations in renal brush border membrane enzymes and phosphate transport. *Hum. Exp. Toxicol.* **26**, 419-426 (2007).
48. Ferguson, M. A., Masterson, W. J., Homans, S. W. & McConville, M. J. Evolutionary aspects of GPI metabolism in kinetoplastid parasites. *Cell Biol. Int. Rep.* **15**, 991-1005 (1991).

49. Filipski, K. K., Mathijssen, R. H., Mikkelsen, T. S., Schinkel, A. H. & Sparreboom, A. Contribution of organic cation transporter 2 (OCT2) to cisplatin-induced nephrotoxicity. *Clin. Pharmacol. Ther.* **86**, 396-402 (2009).
50. Francescato, H. D., Costa, R. S., Scavone, C. & Coimbra, T. M. Parthenolide reduces cisplatin-induced renal damage. *Toxicology* **230**, 64-75 (2007).
51. Frey, N. & Olson, E. N. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu. Rev. Physiol* **65**, 45-79 (2003).
52. Garrido, C. Size matters: of the small HSP27 and its large oligomers. *Cell Death. Differ.* **9**, 483-485 (2002).
53. Gately, D. P. & Howell, S. B. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *Br. J. Cancer* **67**, 1171-1176 (1993).
54. Giordano, F. J. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J. Clin. Invest* **115**, 500-508 (2005).
55. Go, R. S. & Adjei, A. A. Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. *J. Clin. Oncol.* **17**, 409-422 (1999).
56. Goetz, M. B. & Sayers, J. Nephrotoxicity of vancomycin and aminoglycoside therapy separately and in combination. *J. Antimicrob. Chemother.* **32**, 325-334 (1993).
57. Gonzalez, R. *et al.* Reversion by ozone treatment of acute nephrotoxicity induced by cisplatin in rats. *Mediators. Inflamm.* **13**, 307-312 (2004).
58. Greenstein, J. P. & Leuthardt, F. M. Dehydropeptidase activity in tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **9**, 389 (1949).
59. Griendling, K. K., Sorescu, D. & Ushio-Fukai, M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ. Res.* **86**, 494-501 (2000).
60. Gross, A. *et al.* Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J. Biol. Chem.* **274**, 1156-1163 (1999).
61. Gruss, E. *et al.* Nephroprotective effect of cilastatin in allogeneic bone marrow transplantation. Results from a retrospective analysis. *Bone Marrow Transplant.* **18**, 761-765 (1996).
62. Gupta, S. Molecular steps of tumor necrosis factor receptor-mediated apoptosis. *Curr. Mol. Med.* **1**, 317-324 (2001).
63. Gyure, W. L. Comparison of several methods for semiquantitative determination of urinary protein. *Clin. Chem.* **23**, 876-879 (1977).
64. Hammer, C., Thies, J. C., Mraz, W. & Mihatsch, M. Reduction of cyclosporin (CSA) nephrotoxicity by imipenem/cilastatin after kidney transplantation in rats. *Transplant. Proc.* **21**, 931 (1989).
65. Hanigan, M. H. & Devarajan, P. Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. *Cancer Ther.* **1**, 47-61 (2003).
66. Hare, J. M. & Stamler, J. S. NO/redox disequilibrium in the failing heart and cardiovascular system. *J. Clin. Invest* **115**, 509-517 (2005).

67. Hensley, K., Robinson, K. A., Gabbita, S. P., Salsman, S. & Floyd, R. A. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic. Biol. Med* **28**, 1456-1462 (2000).
68. Hernando, L. Insuficiencia Renal, en *Nefrología clínica*. Hernando, L. pp. 693-771 (Panamericana, Madrid,2011).
69. Holzer, A. K. *et al.* The copper influx transporter human copper transport protein 1 regulates the uptake of cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Mol. Pharmacol.* **66**, 817-823 (2004).
70. Hooper, N. M. Glycosyl-phosphatidylinositol anchored membrane enzymes. *Clin. Chim. Acta* **266**, 3-12 (1997).
71. Humphreys, B. D. *et al.* Repair of injured proximal tubule does not involve specialized progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 9226-9231 (2011).
72. Jiang, M. & Dong, Z. Regulation and pathological role of p53 in cisplatin nephrotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **327**, 300-307 (2008).
73. Jiang, M. *et al.* Nutlin-3 protects kidney cells during cisplatin therapy by suppressing Bax/Bak activation. *J. Biol. Chem.* **282**, 2636-2645 (2007).
74. Johnson, N. P., Hoeschele, J. D. & Rahn, R. O. Kinetic analysis of the in vitro binding of radioactive cis- and trans-dichlorodiammineplatinum(II) to DNA. *Chem. Biol. Interact.* **30**, 151-169 (1980).
75. Joza, N. *et al.* Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* **410**, 549-554 (2001).
76. Kahan, F. M. & Rogers, J. D. Imipenem/cilastatin: evolution of the sustained-release intramuscular formulation. *Chemotherapy* **37 Suppl 2**, 21-25 (1991).
77. Kaushal, G. P., Kaushal, V., Hong, X. & Shah, S. V. Role and regulation of activation of caspases in cisplatin-induced injury to renal tubular epithelial cells. *Kidney Int.* **60**, 1726-1736 (2001).
78. Kim, M. G. *et al.* IL-10 mediates rosiglitazone-induced kidney protection in cisplatin nephrotoxicity. *J. Korean Med Sci.* **25**, 557-563 (2010).
79. Kim, Y. H. *et al.* Protective effect of the ethanol extract of the roots of Brassica rapa on cisplatin-induced nephrotoxicity in LLC-PK1 cells and rats. *Biol. Pharm. Bull.* **29**, 2436-2441 (2006).
80. Koller, M., Brom, J., Raulf, M. & Konig, W. Cilastatin (MK 0791) is a potent and specific inhibitor of the renal leukotriene D4-dipeptidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **131**, 974-979 (1985).
81. Kropp, H., Sundelof, J. G., Hajdu, R. & Kahan, F. M. Metabolism of thienamycin and related carbapenem antibiotics by the renal dipeptidase, dehydropeptidase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **22**, 62-70 (1982).
82. Kuhad, A., Pilkhwai, S., Sharma, S., Tirkey, N. & Chopra, K. Effect of curcumin on inflammation and oxidative stress in cisplatin-induced experimental nephrotoxicity. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 10150-10155 (2007).
83. Kusama, M. *et al.* Effect of cilastatin on renal handling of vancomycin in rats. *J. Pharm. Sci.* **87**, 1173-1176 (1998).

84. Lacour, S. *et al.* Cisplatin-induced CD95 redistribution into membrane lipid rafts of HT29 human colon cancer cells. *Cancer Res.* **64**, 3593-3598 (2004).
85. Larsen, G. L. & Henson, P. M. Mediators of inflammation. *Annu. Rev. Immunol.* **1**, 335-359 (1983).
86. Launay-Vacher, V. *et al.* Renal tubular drug transporters. *Nephron Physiol* **103**, 97-106 (2006).
87. Lazaro, A., Camaño, S., Humanes, B. & Tejedor, A. *Pharmacology*. Gallelli. (Intech, 2012).
88. Lee, K. W. *et al.* Sildenafil attenuates renal injury in an experimental model of rat cisplatin-induced nephrotoxicity. *Toxicology* **257**, 137-143 (2009).
89. Lee, S. *et al.* Protective role of L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid in cisplatin-induced renal injury. *Nephrol. Dial. Transplant.* **21**, 2085-2095 (2006).
90. Leroux, M. R., Melki, R., Gordon, B., Batelier, G. & Candido, E. P. Structure-function studies on small heat shock protein oligomeric assembly and interaction with unfolded polypeptides. *J. Biol. Chem.* **272**, 24646-24656 (1997).
91. Li, H., Zhu, H., Xu, C. J. & Yuan, J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491-501 (1998).
92. Lieberthal, W., Triaca, V. & Levine, J. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. *Am. J. Physiol* **270**, F700-F708 (1996).
93. Lin, J. H., Chen, I. W. & Ulm, E. H. Dose-dependent kinetics of cilastatin in laboratory animals. *Drug Metab Dispos.* **17**, 426-432 (1989).
94. Ludwig, T., Riethmuller, C., Gekle, M., Schwerdt, G. & Oberleithner, H. Nephrotoxicity of platinum complexes is related to basolateral organic cation transport. *Kidney Int.* **66**, 196-202 (2004).
95. Luo, J. *et al.* The molecular mechanisms of the attenuation of cisplatin-induced acute renal failure by N-acetylcysteine in rats. *Nephrol. Dial. Transplant.* **23**, 2198-2205 (2008).
96. Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. & Wang, X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**, 481-490 (1998).
97. Maeno, E., Ishizaki, Y., Kanaseki, T., Hazama, A. & Okada, Y. Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 9487-9492 (2000).
98. Majno, G. & Joris, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* **146**, 3-15 (1995).
99. Markewitz, A. *et al.* Reduction of cyclosporine-induced nephrotoxicity by cilastatin following clinical heart transplantation. *Transplantation* **57**, 865-870 (1994).

100. Micheau, O., Solary, E., Hammann, A. & manche-Boitrel, M. T. Fas ligand-independent, FADD-mediated activation of the Fas death pathway by anticancer drugs. *J. Biol. Chem.* **19;274**, 7987-7992 (1999).
101. Millan, J. *et al.* Isolation of lipid raft-associated proteolipids. *Methods Mol. Biol.* **228**, 223-230 (2003).
102. Miller, R. P., Tadagavadi, R. K., Ramesh, G. & Reeves, W. B. Mechanisms of Cisplatin nephrotoxicity. *Toxins. (Basel)* **2**, 2490-2518 (2010).
103. Miller, S. E. & House, D. A. The hydrolysis products of *cis*-diamminedichloroplatinum(II) 5. The anation kinetics of *cis*-Pt(X)(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub><sup>+</sup> (X=Cl, OH) with glycine, monohydrogen malonate and chloride. *Inorganica Chimica Acta* 187(2), 125-132. 2011. Abstract.
104. Mohan, I. K. *et al.* Protection against cisplatin-induced nephrotoxicity by Spirulina in rats. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **58**, 802-808 (2006).
105. Morandat, S., Bortolato, M. & Roux, B. Cholesterol-dependent insertion of glycosylphosphatidylinositol-anchored enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* **1564**, 473-478 (2002).
106. Moreno-Gordaliza, E. *et al.* Elemental bioimaging in kidney by LA-ICP-MS as a tool to study nephrotoxicity and renal protective strategies in cisplatin therapies. *Anal. Chem.* **83**, 7933-7940 (2011).
107. Mraz, W., Modic, P. K. & Hammer, C. Impact of imipenem/cilastatin on cyclosporine metabolism and excretion. *Transplant. Proc.* **24**, 1704-1708 (1992).
108. Mraz, W., Sido, B., Knedel, M. & Hammer, C. Concomitant immunosuppressive and antibiotic therapy--reduction of cyclosporine A blood levels due to treatment with imipenem/cilastatin. *Transplant. Proc.* **19**, 4017-4020 (1987).
109. Nagothu, K. K., Bhatt, R., Kaushal, G. P. & Portilla, D. Fibrate prevents cisplatin-induced proximal tubule cell death. *Kidney Int.* **68**, 2680-2693 (2005).
110. Nakamura, T., Hashimoto, Y., Kokuryo, T. & Inui, K. I. Effects of fosfomycin and imipenem/cilastatin on nephrotoxicity and renal excretion of vancomycin in rats. *Pharm. Res.* **15**, 734-738 (1998).
111. Nakamura, T., Kokuryo, T., Hashimoto, Y. & Inui, K. I. Effects of fosfomycin and imipenem-cilastatin on the nephrotoxicity of vancomycin and cisplatin in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* **51**, 227-232 (1999).
112. Nitantai, Y., Satow, Y., Adachi, H. & Tsujimoto, M. Crystal structure of human renal dipeptidase involved in beta-lactam hydrolysis. *J. Mol. Biol.* **321**, 177-184 (2002).
113. Nordberg, J. & Arner, E. S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med* **31**, 1287-1312 (2001).
114. Norrby, S. R. *et al.* Urinary recovery of N-formimidoyl thienamycin (MK0787) as affected by coadministration of N-formimidoyl thienamycin dehydropeptidase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **23**, 300-307 (1983).

115. O'Dwyer, P. J., Stevenson, J. P. & Johnson, S. W. Clinical pharmacokinetics and administration of established platinum drugs. *Drugs* **59 Suppl 4**, 19-27 (2000).
116. Okuda, M., Masaki, K., Fukatsu, S., Hashimoto, Y. & Inui, K. Role of apoptosis in cisplatin-induced toxicity in the renal epithelial cell line LLC-PK1. Implication of the functions of apical membranes. *Biochem. Pharmacol.* **59**, 195-201 (2000).
117. Pabla, N. & Dong, Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int.* **73**, 994-1007 (2008).
118. Pabla, N., Murphy, R. F., Liu, K. & Dong, Z. The copper transporter Ctr1 contributes to cisplatin uptake by renal tubular cells during cisplatin nephrotoxicity. *Am. J. Physiol Renal Physiol* **296**, F505-F511 (2009).
119. Pan, H. *et al.* Cannabidiol attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity by decreasing oxidative/nitrosative stress, inflammation, and cell death. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **328**, 708-714 (2009).
120. Park, M. S., De, L. M. & Devarajan, P. Cisplatin induces apoptosis in LLC-PK1 cells via activation of mitochondrial pathways. *J. Am. Soc. Nephrol.* **13**, 858-865 (2002).
121. Perez, M. *et al.* Inhibition of brush border dipeptidase with cilastatin reduces toxic accumulation of cyclosporin A in kidney proximal tubule epithelial cells. *Nephrol. Dial. Transplant.* **19**, 2445-2455 (2004).
122. Pike, L. J. The challenge of lipid rafts. *J. Lipid Res.* **50 Suppl**, S323-S328 (2009).
123. Pike, M. C. & Snyderman, R. Leukocyte chemoattractant receptors. *Methods Enzymol.* **162**, 236-245 (1988).
124. Pil, P. & Lippard, S. J. Cisplatin and related drugs, en *Encyclopedia of Cancer*, pp. 393-409 (1997).
125. Prestayko, A. W., D'Aoust, J. C., Issell, B. F. & Crooke, S. T. Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II). *Cancer Treat. Rev.* **6**, 17-39 (1979).
126. Price, P. M., Safirstein, R. L. & Megyesi, J. Protection of renal cells from cisplatin toxicity by cell cycle inhibitors. *Am. J. Physiol Renal Physiol* **286**, F378-F384 (2004).
127. Raymond, E., Faivre, S., Chaney, S., Woynarowski, J. & Cvitkovic, E. Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin. *Mol. Cancer Ther.* **1**, 227-235 (2002).
128. Robertson, J. D., Orrenius, S. & Zhivotovsky, B. Review: nuclear events in apoptosis. *J. Struct. Biol.* **129**, 346-358 (2000).
129. Rodríguez Iturbe, B. & Fernández, L. Apoptosis en Enfermedades Renales. *Nefrología* **XVII**, 457-466 (2011).
130. Rosenberg, B., Vancamp, L. & Krigas, T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* **205**, 698-699 (1965).

131. Rosenberg, S. A. *et al.* Prospective randomized trial of the treatment of patients with metastatic melanoma using chemotherapy with cisplatin, dacarbazine, and tamoxifen alone or in combination with interleukin-2 and interferon alfa-2b. *J. Clin. Oncol.* **17**, 968-975 (1999).
132. Rybak, L. P., Mukherjea, D., Jajoo, S. & Ramkumar, V. Cisplatin ototoxicity and protection: clinical and experimental studies. *Tohoku J. Exp. Med* **219**, 177-186 (2009).
133. Rybak, M. J., Albrecht, L. M., Berman, J. R., Warbasse, L. H. & Svensson, C. K. Vancomycin pharmacokinetics in burn patients and intravenous drug abusers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 792-795 (1990).
134. Sachs, D. H. *et al.* Transplantation in miniature swine. I. Fixation of the major histocompatibility complex. *Transplantation* **22**, 559-567 (1976).
135. Sack, K., Herhahn, J., Marre, R. & Schulz, E. Renal tolerance of imipenem/cilastatin and other beta-lactam antibiotics in rats. *Infection*. **13 Suppl 1**, S156-S160 (1985).
136. Sadzuka, Y., Shimizu, Y., Takino, Y. & Hirota, S. Protection against cisplatin-induced nephrotoxicity in the rat by inducers and an inhibitor of glutathione S-transferase. *Biochem. Pharmacol.* **48**, 453-459 (1994).
137. Satoh, M. *et al.* A novel free radical scavenger, edarabone, protects against cisplatin-induced acute renal damage in vitro and in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **305**, 1183-1190 (2003).
138. Schnackenberg, C. G. Oxygen radicals in cardiovascular-renal disease. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2**, 121-125 (2002).
139. Shi, Y. Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view. *Protein Sci.* **13**, 1979-1987 (2004).
140. Shimeda, Y. *et al.* Protective effects of capsaicin against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 1635-1638 (2005).
141. Siddik, Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* **22**, 7265-7279 (2003).
142. Sido, B., Hammer, C., Mraz, W. & Krombach, F. Nephroprotective effect of imipenem/cilastatin in reducing cyclosporine toxicity. *Transplant. Proc.* **19**, 1755-1758 (1987).
143. Sung, M. J. *et al.* Genistein protects the kidney from cisplatin-induced injury. *Kidney Int.* **74**, 1538-1547 (2008).
144. Takeda, J. & Kinoshita, T. GPI-anchor biosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 367-371 (1995).
145. Takeda, M. *et al.* Characterization of organic anion transport inhibitors using cells stably expressing human organic anion transporters. *Eur. J. Pharmacol.* **419**, 113-120 (2001).
146. Tamada, S. *et al.* Molecular mechanisms and therapeutic strategies of chronic renal injury: the role of nuclear factor kappaB activation in the development of renal fibrosis. *J. Pharmacol. Sci.* **100**, 17-21 (2006).

147. Tayem, Y., Johnson, T. R., Mann, B. E., Green, C. J. & Motterlini, R. Protection against cisplatin-induced nephrotoxicity by a carbon monoxide-releasing molecule. *Am. J. Physiol Renal Physiol* **290**, F789-F794 (2006).
148. Tejedor, A. Alteraciones celulares en el fracaso renal agudo, en *Fracaso Renal Agudo*. Liaño, F. pp. 17-44 (Masson, Madrid,2011).
149. Tejedor, A. *et al.* Cilastatin protection against cyclosporin A-induced nephrotoxicity: clinical evidence. *Curr. Med Res. Opin.* **23**, 505-513 (2007).
150. Touyz, R. M. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension* **44**, 248-252 (2004).
151. Townsend, D. M., Deng, M., Zhang, L., Lapus, M. G. & Hanigan, M. H. Metabolism of Cisplatin to a nephrotoxin in proximal tubule cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**, 1-10 (2003).
152. Townsend, D. M. & Hanigan, M. H. Inhibition of gamma-glutamyl transpeptidase or cysteine S-conjugate beta-lyase activity blocks the nephrotoxicity of cisplatin in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **300**, 142-148 (2002).
153. Townsend, D. M., Tew, K. D., He, L., King, J. B. & Hanigan, M. H. Role of glutathione S-transferase Pi in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biomed. Pharmacother.* **63**, 79-85 (2009).
154. Toyoguchi, T. & Nakagawa, Y. Nephrotoxicity and drug interaction of vancomycin. *Nippon Yakurigaku Zasshi* **107**, 225-235 (1996).
155. Toyoguchi, T., Takahashi, S., Hosoya, J., Nakagawa, Y. & Watanabe, H. Nephrotoxicity of vancomycin and drug interaction study with cilastatin in rabbits. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 1985-1990 (1997).
156. Tsuruya, K. *et al.* Direct involvement of the receptor-mediated apoptotic pathways in cisplatin-induced renal tubular cell death. *Kidney Int.* **63**, 72-82 (2003).
157. Tuzcu, M. *et al.* Protective role of zinc picolinate on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J. Ren Nutr.* **20**, 398-407 (2010).
158. Vaux, D. L. & Korsmeyer, S. J. Cell death in development. *Cell* **96**, 245-254 (1999).
159. Vaziri, N. D., Lin, C. Y., Farmand, F. & Sindhu, R. K. Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and NADPH oxidase in lead-induced hypertension. *Kidney Int.* **63**, 186-194 (2003).
160. Waller, R. L., Glende, E. A., Jr. & Recknagel, R. O. Carbon tetrachloride and bromotrichloromethane toxicity. Dual role of covalent binding of metabolic cleavage products and lipid peroxidation in depression of microsomal calcium sequestration. *Biochem. Pharmacol.* **32**, 1613-1617 (1983).
161. Wang, D. & Lippard, S. J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 307-320 (2005).
162. Welch, C. L. & Campbell, B. J. Uptake of glycine from L-alanylglycine into renal brush border vesicles. *J. Membr. Biol.* **54**, 39-50 (1980).



163. Yao, X., Panichpisal, K., Kurtzman, N. & Nugent, K. Cisplatin nephrotoxicity: a review. *Am. J. Med Sci.* **334**, 115-124 (2007).
164. Yokoo, S. *et al.* Differential contribution of organic cation transporters, OCT2 and MATE1, in platinum agent-induced nephrotoxicity. *Biochem. Pharmacol.* **74**, 477-487 (2007).
165. Zafirov, D. *et al.* Erythropoietin reduces cumulative nephrotoxicity from cisplatin and enhances renal tubular cell proliferation. *Prilozi.* **29**, 167-183 (2008).
166. Zajchowski, L. D. & Robbins, S. M. Lipid rafts and little caves. Compartmentalized signalling in membrane microdomains. *Eur. J. Biochem.* **269**, 737-752 (2002).
167. Zamble, D. B. & Lippard, S. J. Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 435-439 (1995).
168. Zou, H., Li, Y., Liu, X. & Wang, X. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.* **274**, 11549-11556 (1999).

## **X. - ANEXO**

---

**Los resultados presentados en esta Tesis han sido publicados parcialmente en:**

- **Humanes B**, Lázaro A, Camano S, Moreno-Gordaliza E, Lazaro JA, Blanco-Codesido M, Lara JM, Ortiz A, Gomez-Gomez MM, Martín-Vasallo P, Tejedor A. "Protective effect of cilastatin on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats". *Kidney Int*, 2012 (in press).
- Camano S, Lazaro A, Moreno-Gordaliza E, Torres AM, de Lucas C, **Humanes B**, Lazaro JA, Gomez-Gomez MM, Bosca L, Tejedor A. "Cilastatin attenuates cisplatin-induced proximal tubular cell damage" *J Pharmacol Exp Ther*. **334(2)**, 419-29 (2010).

**Otros artículos publicados durante el desarrollo de la Tesis:**

- Alberto Lazaro, Sonia Camaño, **Blanca Humanes**, Alberto Tejedor. "Novel strategies in drug-induced acute kidney injury", en "*Pharmacology*". Ed: Gallelli L Intech: Croacia, 2012 (in press).
- Moreno-Gordaliza M, Giesen C, Alberto Lazaro A, Esteban-Fernández D, **Humanes B**, Canas B, Panne U, Tejedor A, Jakubowski N, and Gómez-Gómez MM. "Elemental bioimaging in kidney by LA-ICP-MS as a tool to study nephrotoxicity and renal protective strategies in cisplatin therapies". *Anal Chem*, **83 (20)**, 7933-40 (2011).

**Los resultados de esta Tesis han sido presentados parcialmente en los siguientes congresos:**

- *103rd AACR Annual Meeting 2012*. Chicago (Illinois, Estados Unidos). Marzo-Abril de 2012. "Cilastatin attenuates cisplatin-induced proximal tubular cell damage without compromising antitumoral activity". **Blanca Humanes**, Montserrat Blanco-Codesido, Alberto Lázaro, Sonia Camaño, Alberto Tejedor.
- *The American Society of Nephrology 44th annual renal week meeting*. Philadelphia (Estados Unidos). Noviembre 2011. "Role of Cilastatin Against Cisplatin-Induced Nephrotoxicity and Inflammation in Rats" A. Lázaro, **B. Humanes**, S. Camaño, J.A, Lázaro, JM Lara, , Tejedor A. *J Am Soc Nephrol*, 2011.

- *XLI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nefrología*. Sevilla (España). 15 al 18 de Octubre 2011. "Cilastatina protege el riñón del daño tóxico generado por cisplatino". **B. Humanes**, A. Lazaro Fernández, S. Camaño, JA. Lázaro Manero, J. M. Lara, P. Rodríguez Benítez, J. Luño y A. Tejedor. (COMUNICACIÓN ORAL). Publicación: *Nefrología*, 2011.
- *23rd Annual Meeting of the European Renal Cell Study Group*. Desenzano del Garda (Italia). Marzo 2011. "Brush-border rafts blockade reduces cisplatin-induced renal damage". **Humanes B**, Lazaro A, Camaño S, López-Parra V, Lázaro J.A., Lara J.M., Tejedor A.
- *9th BANTAO Congress*. Antalya (Turquía). Noviembre 2009. "Cilastatin prevents cisplatin-induced nephrotoxicity by reducing apoptosis and oxidative stress". **Blanca Humanes**, Alberto Lázaro, Sonia Camaño, Jose Manuel Lara, José Antonio Lázaro, Marina Mojena, Ramiro Callejas, Alberto Tejedor.
- *The American Society of Nephrology 42th annual renal week meeting*. San Diego (Estados Unidos). Octubre 2009. "Cilastatin provides renal protection against toxic and oxidative injury in an animal model of cisplatin acute nephrotoxicity". **B. Humanes**, A. Lázaro, S. Camaño, JM Lara, J.A, Lázaro, P Rodriguez, R. Bosch, Tejedor A. *J Am Soc Nephrol*, 2009.
- *The American Society of Nephrology 42th annual renal week meeting*. San Diego (Estados Unidos). Octubre 2009. "Cilastatin protects against cisplatin-induced proximal tubular cells damage". Camano S, Lazaro A, Moreno-Gordaliza E, Torres AM, de Lucas C, Gomez-Gomez MM, **Humanes B**, Meseguer A, Tejedor A. *J Am Soc Nephrol*, 2009.
- *The American Society of Nephrology 42th annual renal week meeting*. San Diego (Estados Unidos). Octubre 2009. "Is lipid raft internalisation critical in toxic acute renal failure?". Tejedor A, Camaño S, de Lucas C, Torres AM, Lazaro JA, **Humanes B**, Ruano ML, Bosca L, Lázaro A. *J Am Soc Nephrol*, 2009.

**Otras presentaciones a congresos durante el desarrollo de la Tesis:**

- *ASTS 12th Annual State of the Art Winter Symposium 2012.* Miami (Florida, Estados Unidos). Enero de 2012. “Renal protective effect of PDE5 inhibitors against warm ischemia is dose dependent: Experimental study”. Enrique Lledo-Garcia, David Subira-Rios, Gabriel Ogaya-Pinies, Javier Mayor, **Blanca Humanes-Sanchez**, Alberto Lazaro, Juan Francisco del Cañizo-Lopez, Carlos Hernandez-Fernandez, Alberto Tejedor-Jorge.
  
- *ASTS 12th Annual State of the Art Winter Symposium 2012.* Miami (Florida, Estados Unidos). Enero de 2012. “Cell culture viability of warm ischemic kidneys according to the length of cold storage and the influence of reperfusion”. Enrique Lledo-Garcia, Gabriel Ogaya-Pinies, Javier Mayor, **Blanca Humanes-Sanchez**, Alberto Lazaro, Juan Francisco del Cañizo-Lopez, Carlos Hernandez-Fernandez, Alberto Tejedor-Jorge.
  
- *ASTS 12th Annual State of the Art Winter Symposium 2012.* Miami (Florida, Estados Unidos). Enero de 2012. “An experimental model of regulation of mitochondrial edema secondary to rewarming in warm ischemic kidneys after storage”. Enrique Lledo-Garcia, Gabriel Ogaya-Pinies, Javier Mayor, Gema del Pozo, **Blanca Humanes-Sanchez**, Alberto Lazaro, Juan Francisco del Cañizo-Lopez, Carlos Hernandez-Fernandez, Alberto Tejedor-Jorge.
  
- *XLI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nefrología.* Sevilla (España). 15 al 18 de Octubre 2011. “Efecto de cilastatina sobre la muerte celular por vancomicina en células proximales renales”. A. Lazaro, S. Camaño, V. López Parra, **B. Humanes**, A.M. Torres, C. de Lucas, E. Cercenado, J. Luño y A. Tejedor. (COMUNICACIÓN E-POSTER). Publicación: *Nefrología*, 2011.
  
- *3rd International Symposium on Metallomics.* Munich (Alemania). Junio 2011. “Bioimaging of Platinum and Other Metals by LA-(HR-)ICP-MS as a Tool to Study Kidney Damage and Nephroprotection Strategies During Cisplatin Treatments”. Moreno-Gordaliza, E., Giesen, C., Lázaro, A., ES; Esteban-Fernández, D., **Humanes, B.**, Cañas, B., Tejedor, A., Jakubowski, N., Gómez-Gómez, M.M.
  
- *23rd Annual Meeting of the European Renal Cell Study Group.* Desenzano del Garda (Italia). Marzo 2011. “Cilastatin mediated brush-border membrane rafts blockade protects against vancomycin-induced toxicity in proximal renal cells”. Lázaro A, López-Parra V, Camaño S, **Humanes B**, Torres A, de Lucas C, Cercenado E, Tejedor A.

- *LXXV Congreso Nacional de Urología. Bilbao (España). 11 al 14 de Junio 2010.* “Viabilidad celular de riñones con isquemia normotérmica en relación a la duración de la conservación hipotérmica”. Enrique Lledó García; Alberto Lazaro; **Blanca Humanes**; Marina Mojena; Sonia Camaño; Gabriel Ogaya; Carlos Hernandez Fernandez; Juan Francisco Del Cañizo; Alberto Tejedor-Jorge.
  
- *The American Society of Nephrology 42th annual renal week meeting. San Diego (Estados Unidos). Octubre 2009.* "Protection by cilastatin against gentamicin and vancomycin-induced renal injury". Camaño S, Lázaro A, Torres A, de Lucas C, **Humanes B**, Callejas R, Mojena M, Cercenado E, Ortiz A, Tejedor A. *J Am Soc Nephrol*, 2009.
  
- *XXXVIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nefrología. San Sebastián (España). 4 al 8 de Octubre 2008.* “La vasoconstricción renal observada con el uso de CsA no es causa sino consecuencia de la lesión tubular proximal. Evidencias de un modelo porcino de toxicidad aguda por CsA”. S. Camaño, JA. Lázaro A. Lazaro, P. Martín-Vasallo, **B. Humanes**, F. Liaño, J. Luño y A. Tejedor. (COMUNICACIÓN ORAL). Publicación: *Nefrología*, 2008.