

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL DAÑO RENAL ASOCIADO A LA INMUNOTERAPIA ONCOLÓGICA

Characterization of Renal Damage Associated with Oncologic Immunotherapy

Alicia ABRIL; Javier TASCÓN; Laura VICENTE-VICENTE; Alfredo G. CASANOVA; Marta PRIETO; Ana I. MORALES*.

Unidad de Toxicología. Departamento de Fisiología y Farmacología. Edificio Departamental. Laboratorios 223-226. Universidad de Salamanca. Campus Miguel de Unamuno. 37007 Salamanca. España

*Correo-e: amorales@usal.es

RESUMEN: Los inhibidores del punto de control inmunitario (IPCI) son un grupo farmacológico destacable dentro de la inmunoterapia oncológica. Los IPCI se administran en monoterapia o en terapia combinada junto a quimioterápicos como el cisplatino, mostrando excelentes resultados clínicos. Sin embargo, no están exentos de reacciones adversas como la lesión renal inducida por IPCI, mínimamente estudiada y que empeora el pronóstico del paciente.

El objetivo del estudio fue la caracterización funcional del daño renal asociado a los IPCI (anti-CTLA-4 y anti-PD-1) y a la combinación de estos con cisplatino, mediante una batería de biomarcadores de lesión renal. En el estudio, se emplearon ratones macho C57BL/6 divididos en grupos experimentales. Cada grupo recibió, correspondientemente: anti-PD-1, anti-CTLA-4, cisplatino o la terapia combinada de cisplatino+anti-CTLA-4+anti-PD-1. El análisis de biomarcadores se realizó mediante técnicas colorimétricas y de inmunoensayo. Los datos fueron sometidos a análisis estadístico empleando el programa IBM SPSS® Statistics.

Los biomarcadores plasmáticos (creatinina y urea) no mostraron lesión renal en ningún grupo de tratamiento, mientras que los biomarcadores

urinarios (NGAL, KIM-1 y albúmina) aumentaron en los grupos de terapia combinada mostrando daño renal subclínico. Por ello, los biomarcadores urinarios podrían resultar ventajosos en el diagnóstico precoz del daño renal asociado a IPCI en pacientes oncológicos.

Palabras clave: inhibidores del punto de control inmunitario (IPCI); cisplatino; terapia combinada; daño renal; biomarcadores de daño renal subclínico.

ABSTRACT: Immune checkpoint inhibitors (IPCI) are a remarkable pharmacological group on cancer immunotherapy. IPCI are administered in monotherapy or in combination therapy with chemotherapeutics such as cisplatin, showing excellent clinical results. However, they are not exempt from adverse reactions such as IPCI-induced renal injury, which has been minimally studied and worsens the patient's prognosis.

The aim of the study was the functional characterization of renal damage associated with IPCI (anti-CTLA-4 and anti-PD-1), and their combination with cisplatin, by means of a battery of renal injury biomarkers. In the study, male C57BL/6 mice were divided into experimental groups. Each group received correspondingly; anti-PD-1, anti-CTLA-4, cisplatin, or the combined therapy of cisplatin+anti-CTLA-4+anti-PD-1. Biomarker analysis was performed using colorimetric and immunoassay techniques. The data were subjected to statistical analysis using IBM SPSS® Statistics software.

Plasma biomarkers (creatinine and urea) did not show renal injury in any treatment group, whereas urinary biomarkers (NGAL, KIM-1 and albumin) increased in the combined therapy groups showing subclinical renal damage. Therefore, urinary biomarkers could be advantageous in the early diagnosis of renal damage associated with IPCI in oncology patients.

Keywords: immune checkpoint inhibitors (IPCI); cisplatin; combined therapy; renal damage; biomarkers of subclinical renal damage.

1. INTRODUCCIÓN

El tratamiento del cáncer ha experimentado una revolución durante los últimos años, gracias al mayor conocimiento de la respuesta inmune frente a los tumores y de los mecanismos de evasión de estos, así como a la necesidad de obtener terapias más eficaces y mejor toleradas por el paciente. Una de las terapias más novedosas, y con mejores resultados clínicos, es la inmunoterapia, cuyo grupo

farmacológico de mayor relevancia lo constituyen los “inhibidores del punto de control inmunitario” (IPCI) (Izzedine *et al.*, 2016).

Los IPCI son anticuerpos monoclonales, entre los que destacan anti-CTLA-4 y anti-PD-1 (Izzedine *et al.*, 2016). Fármacos dirigidos, respectivamente, frente a dos dianas moleculares presentes en la membrana de linfocitos T que constituyen un grupo de moléculas necesarias para asegurar la autotolerancia inmunitaria: el antígeno cuatro del linfocito T citotóxico (CTLA-4) y el receptor uno de muerte celular programada (PD-1). La administración de anti-CTLA-4 impide la transducción de una señal inhibitoria al linfocito T, estimulando su activación. Por otro lado, la administración de anti-PD-1 mantiene la activación de las células T y restablece su respuesta contra las células tumorales (Centanni *et al.*, 2019).

Algunos tumores son resistentes al tratamiento con anti-CTLA-4 y anti-PD-1, lo que ha motivado la administración de combinaciones de inmunoterápicos y quimioterápicos para aumentar la eficacia del tratamiento (Abdel-Rahman y Fouad, 2016). Dicha terapia combinada ha sido aprobada recientemente y uno de los quimioterápicos empleados es el cisplatino, fármaco citotóxico capaz de inhibir la síntesis del ADN (Sharp y Siskind, 2017).

Los IPCI motivan la pérdida de autotolerancia inmunitaria periférica, causando por ello la aparición de reacciones adversas (Hryniewicki *et al.*, 2018). La lesión renal inducida por IPCI es una reacción adversa mínimamente estudiada hasta ahora, cuya principal manifestación clínica es la nefritis tubulointersticial aguda (Izzedine *et al.*, 2016), lesión inflamatoria caracterizada por la aparición de insuficiencia renal aguda (IRA) con lesiones tubulares y glomerulares (Perazella y Shirali, 2020). La terapia combinada de inmunoterapia y quimioterapia aumenta el riesgo de sufrir efectos adversos (Flynn y Larkin, 2017).

El algoritmo diagnóstico seguido en clínica para detectar la IRA se basa en la utilización de dos biomarcadores clásicos no sensibles ni específicos, la creatinina plasmática (CrP) y la urea plasmática (UP) (Wu y Huang, 2017). Esto hace necesario emplear técnicas invasivas como la biopsia renal en el diagnóstico diferencial de la lesión renal inducida por IPCI (Hryniewicki *et al.*, 2018).

La detección precoz de la lesión renal inducida por IPCI permite revertir el daño tras la suspensión del tratamiento con estos o disminución de su dosis, junto a la administración de corticosteroides (Hryniewicki *et al.*, 2018). Los biomarcadores clásicamente empleados no permiten detectar la lesión renal precozmente. De ahí la necesidad de caracterizar el daño renal asociado a IPCI en los primeros estadios, mediante sistemas diagnósticos innovadores. Moléculas como la lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL), la molécula de daño renal 1 (KIM-1) y albúmina aparecen en orina en las primeras fases del daño permitiendo la detección del daño renal subclínico (Vaidya *et al.*, 2008).

Actuar de forma temprana tras la aparición de una lesión renal podría impedir la suspensión del tratamiento antitumoral, lo que supondría un punto de inflexión en la supervivencia del paciente (Izzedine *et al.*, 2016). La posibilidad de emplear biomarcadores de IRA más sensibles y específicos permitiría prevenir el desarrollo de la lesión renal y una evaluación de la situación clínica del paciente más precisa.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis planteada es que el daño renal causado por IPCI pudiera ser subclínico y no evidenciado por los parámetros empleados en clínica. Además, la asociación de quimioterapia e inmunoterapia podría conducir a un aumento de los efectos nefrotóxicos. Con base en esto, los objetivos del trabajo son:

- Desarrollo de un modelo experimental para caracterizar el daño renal asociado a los IPCI administrados en monoterapia y combinados con quimioterapia.
- Estudio funcional del daño renal asociado a los IPCI y a la combinación con quimioterapia mediante una batería de biomarcadores de lesión renal.

3. METODOLOGÍA

3.1. *Diseño experimental*

Se emplearon ratones macho C57BL/6 de 8 semanas de vida que se distribuyeron en grupos experimentales de forma homogénea en cuanto a peso se refiere y se mantuvieron bajo condiciones controladas en el Animalario de la Universidad de Salamanca, con acceso libre a comida y agua. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca. Los experimentos de cisplatino y de terapia combinada se llevaron a cabo durante 6 días. Los IPCI en monoterapia se administraron durante 9 días. Se realizaron muestreos de orina y sangre en los días indicados en el cronograma (Figura 1).

3.2. *Análisis de biomarcadores*

La función renal de cada ratón se evaluó mediante la medida de las concentraciones plasmáticas de CrP y UP y las concentraciones urinarias de KIM-1, NGAL y albúmina (muestras de días 0, 3 y 6). Los resultados correspondientes al día 9 se excluyeron por no ser relevantes en los objetivos propuestos.

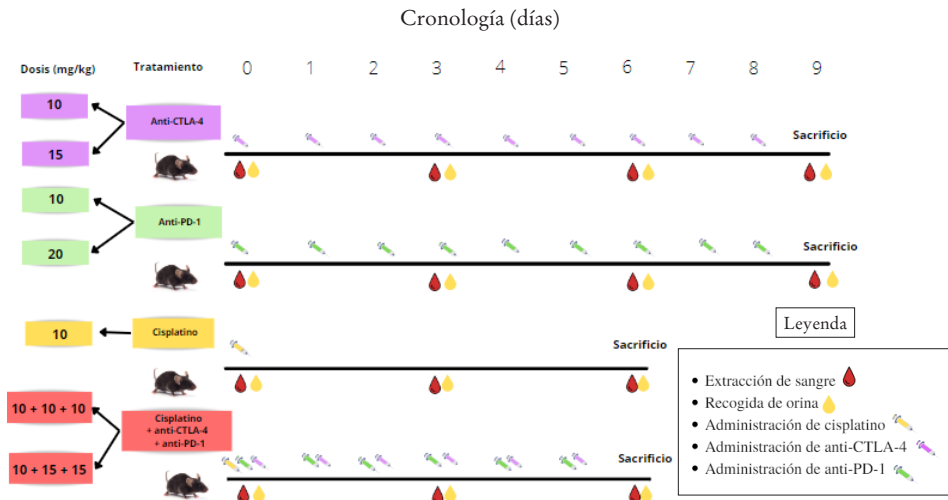


Figura 1. Cronograma de los experimentos. El cisplatino se administró en dosis única a día 0 del experimento. Los fármacos anti-CTLA-4 y anti-PD-1 se administraron con pauta diaria. Las administraciones se realizaron por vía intraperitoneal. La orina correspondiente a 24 horas se recogió en los colectores de jaulas metabólicas (en las que se introdujo a los animales 48 horas antes de la recogida para su acostumbramiento) y se almacenó a 4 °C para su posterior procesamiento. La extracción de sangre a día 0 y día 3 (y día 6 en el caso de IPCI administrados en monoterapia) se realizó a través de la vena submandibular previa anestesia de los ratones con isoflurano (extracción de alrededor de 0,15 mL). Previo al sacrificio, se administró como anestésico pentobarbital (100 mg/kg) y se realizó un corte en V en el abdomen para extraer sangre a punto final por incisión en el corazón (entre 0,5-1 mL). Cada muestra de sangre obtenida se almacenó a 4 °C en un Eppendorf con AEDT 0,5M como anticoagulante para su posterior procesamiento. Cada muestra de sangre se centrifugó (7000 giros durante 4 minutos) para obtener el plasma. El plasma se transfirió a otro Eppendorf mediante una micropipeta.

3.2.1. Técnicas colorimétricas

Empleadas en la determinación de CrP y UP. En la determinación de creatinina se empleó el kit QuantiChrom®DICT-500 y en el de urea el kit de Biochain®Z5030016. El fundamento teórico de estas determinaciones se basa en la capacidad de CrP o UP para reaccionar específicamente con picrato o un agente cromogénico (respectivamente), formando un complejo coloreado. Se midió la absorbancia del complejo formado en las muestras mediante un espectrofotómetro, a 510 nm en el caso de creatinina y 520 nm en urea. A partir de la absorbancia obtenida se calcularon las concentraciones de biomarcador, interpolando en una recta patrón diseñada con estándares de concentraciones conocidas del biomarcador a determinar.

3.2.2. Técnicas de inmunoensayo

En la determinación de biomarcadores urinarios (NGAL, KIM-1 y albúmina) se empleó la técnica inmunoenzimática ELISA tipo sándwich, cuyo fundamento teórico se basa en la capacidad de un anticuerpo fijado en una placa para reaccionar de forma específica con NGAL, KIM-1 o albúmina. Tras pasos sucesivos, se adiciona un anticuerpo monoclonal biotinilado que contiene la enzima peroxidasa de rábano capaz de catalizar la conversión de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) en un agente cromogénico azul. Posteriormente, se adiciona ácido sulfúrico para parar la reacción. La intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de biomarcador en la muestra biológica. Por lo que las concentraciones se calcularon midiendo la absorbancia a 450 nm en espectrofotómetro e interpolando en una recta patrón. En la determinación de NGAL se empleó el kit ELISA BioPorto-Diagnostics®042, en la de KIM-1 el kit ELISA ReddotBiotechInc.®RD-Kim1-Mu y en la de albúmina el kit ELISA BethylLaboratories® E99-134.

3.3. Análisis estadístico

Se empleó el programa IBM SPSS® Statistics versión 20, IBM, Armonk, NY, EE. UU. Se realizó una prueba de normalidad (test de Shapiro-Wilk). A los valores que seguían una distribución normal se les aplicó el test ANOVA de una vía y como prueba Post-hoc, el test de Scheffe. Los valores con distribución no normal se sometieron a un análisis de pruebas no paramétricas (Kruskal-Wallis). Se consideró que había diferencias estadísticamente significativas si p-valor < 0,05.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

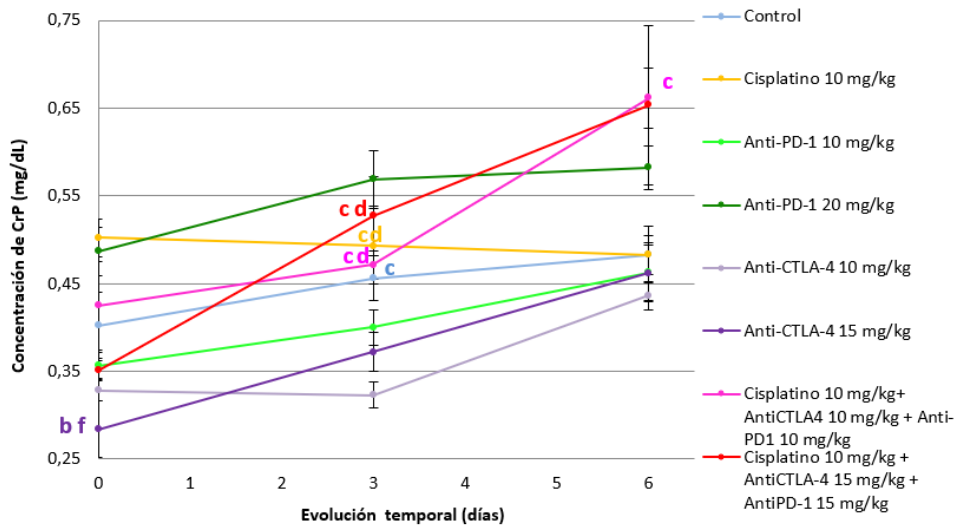
4.1. Biomarcadores plasmáticos: Creatinina (CrP) y Urea (UP)

Las concentraciones de CrP (Figura 2A) y UP (Figura 2B) a día 0 y día 3 se situaron dentro del rango de normalidad en ratón (0,42-0,58 mg/dL y 62,48-77,46 mg/dL respectivamente) (Quimby y Luong, 2007). Las diferencias observadas entre grupos pudieron estar causadas por la idiosincrasia de cada ratón y que los experimentos no se realizaron de forma sincrónica (no se dispone de jaulas metabólicas suficientes para incluir todos los ratones en un experimento).

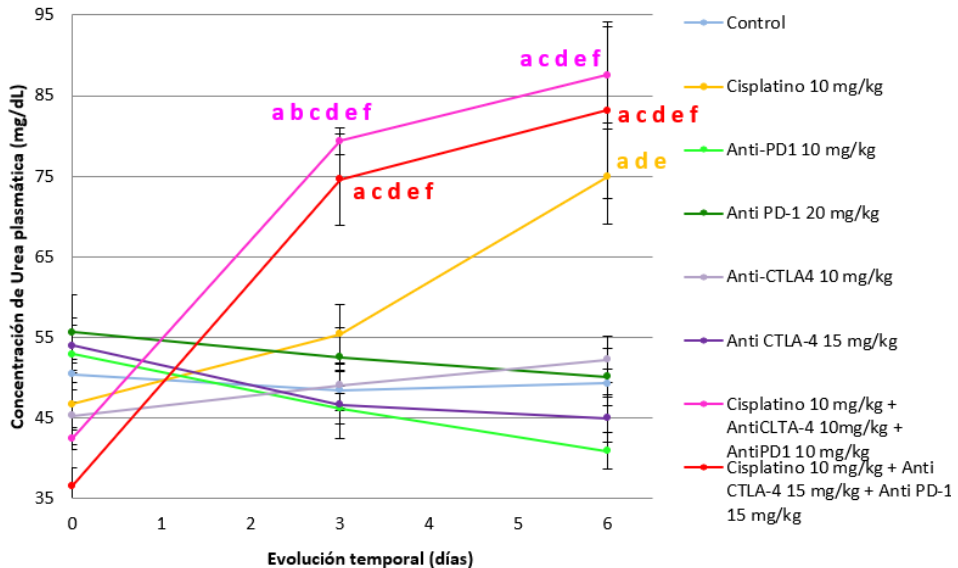
A día 6 ambos biomarcadores aumentaron ligeramente por encima del rango de normalidad (Quimby y Luong, 2007) en los grupos de terapia combinada. Este incremento pudo evidenciar un deterioro de la filtración glomerular (Wu y Huang, 2018). Sin embargo, debido a que estos parámetros dependen de numerosos factores extrarrenales y varían de forma fisiológica (Bagshaw y Bellomo, 2007), este ligero aumento no fue suficiente para dilucidar la existencia de daño renal.

El hecho de que las concentraciones de UP aumentasen a día 6 en el grupo de cisplatino podría sugerir que UP es ligeramente más sensible que CrP (Figura 2A), mostrando indicios de lesión renal no detectables mediante CrP. A pesar del incremento, las concentraciones de UP se mantuvieron prácticamente dentro del rango de normalidad (Quimby y Luong, 2007).

Es posible que los ratones desarrollasen una lesión renal no evidenciada por estos parámetros, puesto que la filtración glomerular debe reducirse de forma importante para que CrP y UP aumenten por encima del rango normal (Bagshaw y Bellomo, 2007). A la vista de los resultados, el modelo experimental desarrollado podría corroborar lo descrito en clínica; algunos pacientes desarrollan nefritis tubulointersticial aguda debido al tratamiento con IPCI y no presentan alterados estos biomarcadores (Cortazar *et al.*, 2016).



2A



2B

Figura 2. Evolución temporal de las concentraciones de biomarcadores plasmáticos. Diferencias significativas vs. grupo control: a $p < 0,05$; grupo cisplatino: b $p < 0,05$; grupo anti-CTLA-4 10 mg/kg: c $p < 0,05$; grupo anti-CTLA-4 15 mg/kg: d $p < 0,05$; grupo anti-PD-1 10 mg/kg: e $p < 0,05$; grupo anti-PD-1 20 mg/kg f $p < 0,05$.

4.2. Biomarcadores urinarios

4.2.1. Lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL)

Las concentraciones basales de NGAL en orina son variables interindividualmente. Por ello, se requiere comparar su evolución respecto a dichas concentraciones (Smertka y Chudek, 2012).

El aumento de NGAL a nivel urinario indica un deterioro temprano de la función renal evidenciable incluso tres días antes del aumento de CrP (Wu y Huang, 2018; Smertka y Chudek, 2012). Las concentraciones de NGAL aumentaron de forma significativa en el grupo de cisplatino a día 6 (Figura 3A) respecto al grupo control, anti-CTLA-4 (10 mg/kg y 15 mg/kg) y anti-PD-1 10 mg/kg, mostrando una leve afectación renal.

Es importante destacar que los IPCI en monoterapia no modificaron significativamente las concentraciones de NGAL respecto a su valor basal (a las dosis y tiempo estudiados), no mostrándose daño renal.

La alteración del parámetro en los grupos de terapia combinada se produjo tanto a día 3 como a día 6 (Figura 3A), mostrando la aparición de una lesión renal. El incremento fue mucho más marcado que en el resto de los grupos, lo que podría mostrar que los IPCI potenciaron el efecto nefrotóxico inducido por cisplatino (Sharp y Siskind, 2017). NGAL aumentó hasta día 6, mostrando un deterioro progresivo de la función renal tras las sucesivas administraciones de inmunoterapia. El aumento de NGAL en orina se relaciona con la aparición de lesiones inflamatorias a nivel de las células del túbulo proximal (Vaidya *et al.*, 2008; Smertka y Chudek, 2012). Por ello, en este caso, su incremento podría reflejar la aparición de nefritis tubulointersticial.

4.2.2. Molécula de daño renal 1 (KIM-1)

Las concentraciones basales de KIM-1 excretadas en orina en condiciones fisiológicas son mínimas y en algunos casos indetectables (Han *et al.*, 2002) como ocurre con los resultados obtenidos a día 0 del experimento (Figura 3B).

Las concentraciones de KIM-1 se mantuvieron en niveles basales a lo largo del experimento en los grupos experimentales de administración de monoterapia, por tanto, no se evidenció daño renal.

En los grupos de administración de terapia combinada las concentraciones de KIM-1 aumentaron progresivamente hasta día 6. El incremento fue significativo tanto a día 3 como a día 6 (Figura 3B). El aumento de KIM-1 podría relacionarse con aparición de fibrosis intersticial y lesión inflamatoria a nivel de los túbulos proximales (Vaidya *et al.*, 2008), así como con necrosis al mismo nivel (Han *et al.*, 2002). El aumento de KIM-1 observado, por tanto, podría reflejar la aparición de nefrotoxicidad a nivel de los túbulos proximales. Probablemente originado por cisplatino (Sharp y Siskind, 2017) y potenciado a este nivel tras sucesivas administraciones de inmunoterapia.

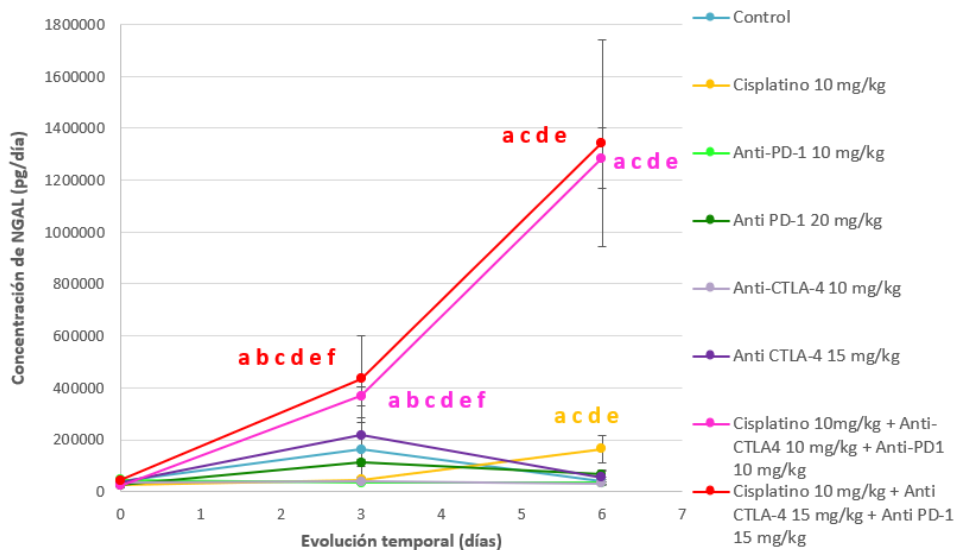
4.2.3. Albúmina

Las concentraciones fisiológicas de albúmina en orina son mínimas por la anatomofisiología del glomérulo renal, que impide el paso de proteínas. Las pocas moléculas que consiguen atravesarlo se reabsorben a nivel tubular (Agrawal y Smoyer, 2017).

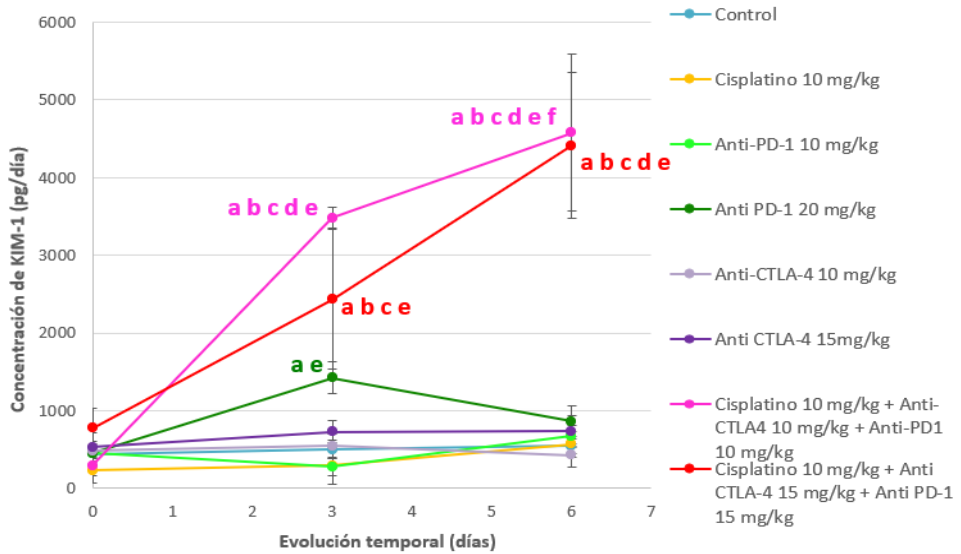
A día 3 (Figura 3C) se produjo un incremento en las concentraciones de albúmina urinaria en los grupos de terapia combinada y en el de cisplatino, mostrando una lesión renal. El aumento de sus concentraciones se relaciona con una disminución de su reabsorción en los túbulos proximales, evidenciable durante los primeros estadios de IRA o por una lesión a nivel glomerular (Vaidya *et al.*, 2008).

El incremento es especialmente importante en los grupos de terapia combinada, mostrándose la aparición de daño renal probablemente inducido por cisplatino a nivel del túbulo proximal y potenciado por la administración de IPCI.

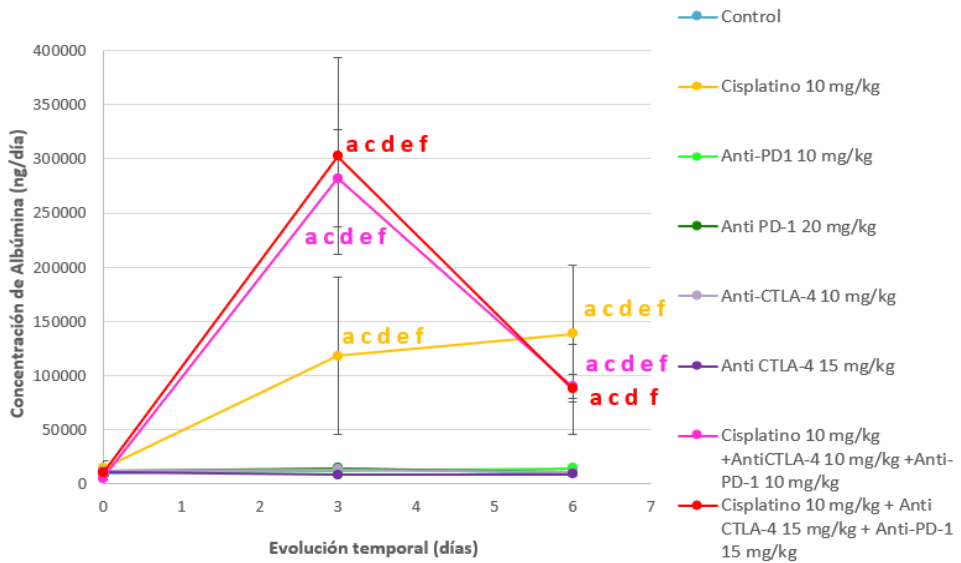
A día 6 (Figura 3C) las concentraciones de albúmina se redujeron en los grupos de terapia combinada. Esto podría deberse a la eliminación de cisplatino y a una posible reparación del daño producido a nivel tubular, recuperando este la capacidad de reabsorción de albúmina. Además, es posible que la albúmina siga un patrón de alteración más característico de cisplatino (pico de daño renal a día 3 en ratón [Sharp y Siskind, 2017]) que el inducido por IPCI (reacciones inflamatorias mantenidas en el tiempo [Perazella y Shirali, 2020]). A pesar de la disminución en las concentraciones, estas fueron superiores a los niveles basales, por lo que la lesión renal se mantuvo.



3A



3B



3C

Figura 3. Evolución temporal de la concentración de biomarcadores urinarios. Diferencias significativas vs. grupo control: a $p < 0,05$; grupo cisplatino: b $p < 0,05$; grupo anti-CTLA-4 10 mg/kg: c $p < 0,05$; grupo anti-CTLA-4 15 mg/kg: d $p < 0,05$; grupo anti-PD-1 10 mg/kg: e $p < 0,05$; grupo anti-PD-1 20 mg/kg: f $p < 0,05$.

Biomarcadores como NGAL, KIM-1 y albúmina, presentes también en orina humana tras una lesión renal (Wu y Huang, 2018; Agrawal y Smoyer, 2017), podrían resultar ventajosos en la detección del daño renal subclínico, facilitando la instauración precoz de medidas preventivas y de tratamiento personalizadas para disminuir la morbimortalidad asociada a la lesión renal. Su uso podría evitar la administración de corticosteroides y/o suspensión del tratamiento antineoplásico, optimizando la eficacia.

5. CONCLUSIONES

- Este modelo experimental permitió caracterizar el daño renal inducido por la administración de IPCI en monoterapia y combinados con quimioterapia en el ratón. Concluyendo que:
 - No se evidenció efecto nefrotóxico en los grupos de IPCI en monoterapia, a ninguna de las dosis administradas y durante los tiempos estudiados.
 - La administración de terapia combinada provocó un daño renal inducido por cisplatino y potenciado por los IPCI, que se evidenció por la excreción de biomarcadores urinarios relacionados con el daño tubular.
- La batería de biomarcadores de daño renal subclínico resultó útil en el estudio funcional renal, mostrando lesiones renales no detectables con el uso de biomarcadores clásicos.
- No se evidenció un efecto dosis-dependiente en los grupos de terapia combinada.
- La puesta a punto de estos modelos de nefrotoxicidad en terapia combinada permitirá estudiar los mecanismos fisiopatológicos subyacentes a estos tratamientos, así como mejorar el significado diagnóstico de la excreción de biomarcadores urinarios y mejorar el manejo del paciente oncológico.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Rahman O, Fouad M. A network meta-analysis of the risk of immune-related renal toxicity in cancer patients treated with immune checkpoint inhibitors. *Immunotherapy*. 2016 May; 8(5):665-674. DOI: 10.2217/imt-2015-0020
- Agrawal S, Smoyer WE. Role of albumin and its modifications in glomerular injury. *Pflug Arch - Eur J Physiol*. 1 de agosto de 2017; 469(7):975-982. DOI: 10.1007/s00424-017-2029-4
- Bagshaw SM, Bellomo R. Early diagnosis of acute kidney injury. *Curr Opin Crit Care*. 2007 Dec; 13(6):638-644. DOI: 10.1097/MCC.0b013e3282f07570

- Centanni M, Moes DJAR, Trocóniz IF, Ciccolini J, van Hasselt JGC. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Immune Checkpoint Inhibitors. *Clin Pharmacokinet.* 2019 Jul; 58(7):835-857. DOI: 10.1007/s40262-019-00748-2
- Cortazar FB, Marrone KA, Troxell ML, Ralto KM, Hoenig MP, Brahmer JR *et al.* Clinicopathological features of acute kidney injury associated with immune checkpoint inhibitors. *Kidney Int.* septiembre de 2016; 90(3):638-647. DOI: 10.1016/j.kint.2016.04.008
- Flynn MJ, Larkin JMG. Novel combination strategies for enhancing efficacy of immune checkpoint inhibitors in the treatment of metastatic solid malignancies. *Expert Opin Pharmacother.* 2017 Oct; 18(14):1477-1490. DOI: 10.1080/14656566.2017.1369956
- Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thadhani R, Bonventre JV. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): A novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int.* julio de 2002 [citado 12 de marzo de 2022]; 62(1):237-244. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2002.00433.x
- Izzedine H, Mateus C, Boutros C, Robert C, Rouvier P, Amoura Z, Mathian A. Renal effects of immune checkpoint inhibitors. *Nephrol Dial Transplant.* 2017 Jun 1; 32(6):936-942. DOI: 10.1093/ndt/gfw382
- Hryniewicki AT, Wang C, Shatsky RA, Coyne CJ. Management of Immune Checkpoint Inhibitor Toxicities: A Review and Clinical Guideline for Emergency Physicians. *J Emerg Med.* octubre de 2018; 55(4):489-502. DOI: 10.1016/j.jemermed.2018.07.005
- Perazella MA, Shirali AC. Immune checkpoint inhibitor nephrotoxicity: what do we know and what should we do? *Kidney Int.* enero de 2020; 97(1):62-74. DOI: 10.1016/j.kint.2019.07.022
- Quimby FW, Luong RH. Clinical Chemistry of the Laboratory Mouse. *Mouse Biomed Res.* 2007; 171-216. DOI: 10.1016/B978-012369454-6/50060-1
- Sharp CN, Siskind LJ. Developing better mouse models to study cisplatin-induced kidney injury. *Am J Physiol-Ren Physiol.* 1 de octubre de 2017; 313(4):F835-841. DOI: 10.1152/ajprenal.00285.2017
- Smertka M, Chudek J. Using NGAL as an Early Diagnostic Test of Acute Kidney Injury. *Ren Fail.* febrero de 2012; 34(1):130-133. DOI: 10.3109/0886022X.2011.623500
- Vaidya VS, Ferguson MA, Bonventre JV. Biomarkers of acute kidney injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2008; 48:463-493. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094615
- Wu H, Huang J. Drug-Induced Nephrotoxicity: Pathogenic Mechanisms, Biomarkers and Prevention Strategies. *Curr Drug Metab.* 2018; 19(7):559-567. DOI: 10.2174/1389200218666171108154419

