



TESIS DOCTORAL

Caracterización fisiopatológica e identificación de biomarcadores de la cronificación del daño renal

Memoria presentada por Giampiero Andrea Massaro
para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Mención "Doctor Internacional"

Giampiero Andrea Massaro

Salamanca a 16 de Julio de 2021

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dedicar este espacio de mi tesis a las personas que han contribuido, con su incansable apoyo, a su realización.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores Francisco López Hernández, Carlos Martínez Salgado y a mi tutora Sandra Sancho Martínez por su inmensa paciencia, por sus consejos indispensables y por los conocimientos transmitidos a lo largo de estos años.

A todas las personas que formáis parte del grupo TRECARD. A las Dras. Ana Morales, Isabel Fuente Calvos, Laura Ramudo, Nélida Eleno y a los Drs. Alfredo Casanova y Moisés Pescador.

A todos los compañeros de trabajo de estos años: María, Yaremi, Cristina, Omar, Ana, Francesco, Claudia, Oisín (espero no olvidarme ninguno) que siempre han estado disponibles y con los que he compartido momentos importantes.

A los estudiantes de TFG y TFM que han participado en este proyecto contribuyendo a su desarrollo. Principalmente a Joana, que ha participado activamente mostrando gran interés y que esperemos siga investigando en nuestro grupo.

A Florence, con la que he compartido un año magnífico y que ha sido además de una compañera, una amiga fantástica. Gracias por tu ayuda y paciencia con el inglés.

A mis compañeros de piso de estos años, Jenni, Lucas, Cedric, Ismael y Juan.

A Dario, que me ha ayudado en la parte que me ha resultado más complicada, es decir, la parte gráfica y de formato. Tu ayuda ha sido para mí indispensable.

A mi novia Alba, que siempre me ha apoyado durante estos años y que ha contribuido fuertemente, gracias a sus consejos y a su ayuda con el español a la realización de este trabajo.

Por último, un agradecimiento especial va a mi familia a la que quiero dedicar esta tesis. Sin ellos no podría ser la persona que soy hoy y nada de esto habría sido posible.



ÍNDICES

ÍNDICES

Índice de figuras.....	VIII
Índice de tablas.....	XIII
ABREVIATURAS	XIX
INTRODUCCIÓN.....	1
1 EL DAÑO RENAL AGUDO	1
1.1 Definición	1
1.2 Epidemiología	2
1.3 Criterios diagnósticos	4
1.4 La tasa de filtración glomerular	5
1.5 Limitaciones de la creatinina plasmática como indicador de la función renal	6
1.6 Etiología y fisiopatología del DRA	8
1.6.1 Daño prerrenal.....	8
1.6.2 DRA intrínseco	9
1.6.3 DRA posrenal	12
1.7 Necrosis tubular aguda.....	12
1.7.1 Causas de disminución de la TFG en la NTA	13
1.7.2 Clasificación	13
2 RECUPERACIÓN DEL DRA.....	14
2.1 Definición	14
2.2 Regeneración del riñón tras un DRA	16
2.2.1 Teoría de las células madre de la médula ósea	17
2.2.2 Las células responsables del proceso de regeneración están en el interior del riñón	17

ÍNDICES

3	RECUPERACIÓN DEFICIENTE.....	21
3.1	Inflamación persistente.....	22
3.2	Parada del ciclo celular.....	23
3.3	Rarefacción capilar peritubular.....	24
3.4	Fibrosis.....	24
3.4.1	Daño tubular y fibrosis.....	25
3.4.2	Resolución de fibrosis.....	26
3.4.3	Fibrosis progresiva.....	26
4	LA ENFERMEDAD RENAL CRONICA.....	28
4.1	Definición.....	28
4.2	Epidemiología y factores de riesgo.....	30
5	CONEXIÓN ENTRE DRA Y ERC.....	31
5.1	Evidencia epidemiológica.....	31
5.2	Evolución de la función renal después del DRA.....	33
5.3	ERC <i>de novo</i> frente a disminución progresiva función renal.....	35
5.4	Factores que influyen en el deterioro progresivo función renal.....	36
6	BIOMARCADORES DE DAÑO RENAL.....	39
6.1	¿Por qué son necesarios?.....	39
6.2	¿Qué son los biomarcadores?.....	39
6.3	La orina como fuente de biomarcadores.....	40
6.4	Normalización de biomarcadores urinarios.....	41
6.5	Biomarcadores de recuperación/progresión tras un DRA.....	41
	HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	49

MATERIALES Y MÉTODOS	50
1 MATERIALES	53
2 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	53
2.1 Mantenimiento y manejo de los animales.....	53
2.2 Descripción del modelo animal y de los experimentos realizados.....	53
2.2.1 Modelo de episodios múltiples de daño renal.....	54
2.2.2 Estudio comparativo entre los grupos de diferente incidencia de DRA	55
3 TÉCNICAS EXPERIMENTALES IN VIVO	59
3.1 Anestesia	59
3.2 Operaciones quirúrgicas	60
3.2.1 Preparación preoperatoria	60
3.2.2 Isquemia-reperfusión unilateral	61
3.2.3 Nefrectomía de 5/6	62
3.2.4 Nefrectomía unilateral.....	63
3.2.5 Cuidado post-operatorio	63
3.3 Recogida y procesamiento de orina de 24 horas	63
3.4 Recogida y procesamiento de las muestras de sangre.....	65
3.5 Perfusión y extracción de órganos.....	65
4 DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS	66
4.1 Determinación de la concentración de creatinina en el plasma y la orina.....	66
4.2 Medida de la concentración de proteínas en la orina.....	68
4.3 Medida de la concentración de urea en el plasma (BUN, de <i>blood urea nitrogen</i>).....	68
5 IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR <i>WESTERN BLOT</i>	69

ÍNDICES

5.1	Preparación de las muestras, electroforesis y transferencia	69
5.2	Bloqueo e incubación con los anticuerpos.....	71
5.3	Revelado.....	72
5.4	Normalización de datos	73
6	ELISA	73
7	ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.....	76
7.1	Extracción del ARN del tejido renal.....	77
7.2	Obtención de ADNc	78
7.3	Diseño de los cebadores.....	78
7.4	PCR a tiempo real.....	80
8	ANÁLISIS HISTOLÓGICO	80
8.1	Tinción de hematoxilina-eosina.....	81
8.2	Tinción de ácido peryódico y reactivo de Schiff (PAS).....	81
8.3	Tinciones para el estudio de la fibrosis	82
8.3.1	Tinción de rojo sirio	83
8.3.2	Tinción de tricrómico de Masson.....	83
8.4	Cuantificación de colágeno mediante tinción con Rojo Sirio	84
9	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	85
10	REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS.....	86
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	92
1	CARACTERIZACIÓN DEL MODELO ANIMAL.....	95
1.1	EVOLUCIÓN DEL PESO CORPORAL.....	97
1.2	FUNCIÓN RENAL.....	98

1.2.1	Evolución de la creatinina plasmática	98
1.2.2	Evolución del aclaramiento de creatinina	101
1.2.3	Evolución de la urea plasmática	104
1.2.4	Evolución de la proteinuria	106
1.2.5	Flujo urinario	109
2	ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES ESTRUCTURALES RENALES EN EL DESARROLLO Y PROGRESIÓN DE LA ERC	111
2.1	Alteraciones estructurales subclínicas en el periodo posterior a un DRA (D20)	111
2.2	Alteraciones estructurales en M2	117
2.3	Cuantificación de la fibrosis en los modelos de diferente incidencia de daño	122
2.4	Evaluación de la progresión del daño renal	123
3	ESTUDIO DE BIOMARCADORES URINARIOS EN LA MONITORIZACIÓN DE LAS SECUELAS SUBCLÍNICAS DEL DRA Y DE LA PROGRESIÓN DE LA ERC	129
3.1	ALBÚMINA	130
3.2	TRANSFERRINA	133
3.3	CLUSTERINA	136
3.4	FETUINA-A	139
3.5	TCP-1-ETA	141
3.6	REG-IIIIB	143
3.7	NGAL	146
3.8	KIM-1	148
3.9	GM2AP	151
3.10	TIMP-2 e IGFBP-7	155
3.11	RBP4	158

DISCUSIÓN FINAL.....	164
CONCLUSIONES	175
CONCLUSIONS.....	177
SUMMARY.....	181
BIBLIOGRAFÍA.....	213

Índice de figuras

Figura 1: Incidencia de hospitalizaciones debidas al DRA por regiones geográficas (Adaptado de Susantitaphong et al., 2013).....	2
Figura 2: Etiología del DRA (Adaptado de Makris & Spanou, 2016).....	8
Figura 3: Fases de la NTA (Adaptado de Basile, Anderson y Sutton, 2012).....	14
Figura 4: Las dos posibles fuentes de células responsables de la regeneración del tejido renal (Adaptado de Andrianova et al., 2019)	18
Figura 5: Mecanismos de recuperación deficiente tras un DRA (adaptado de Zuk & Bonventre, 2016).	21
Figura 6: Circulo vicioso entre hipoxia y fibrosis (adaptado de Takaori & Yanagita, 2016).	28
Figura 7: Prognosis de la ERC mediante la TFG y la albuminuria (Adaptado de Levey y Coresh, 2012).....	30
Figura 8: Factores de conexión entre DRA y ERC (Adaptado de Chawla y cols., 2014).	33
Figura 9: Posibles trayectorias de la CrP tras un DRA (adaptado de Macedo & Mehta, 2019).	34
Figura 10: Ilustración conceptual de lo que puede ocurrir tras un DRA (adaptado de Basile et al., 2016). .	35
Figura 11: Dos posibles trayectorias para el desarrollo de una ERC progresiva tras un DRA: no recuperación vs deterioro progresivo de la función renal (adaptado de Sawhney et al., 2017).....	36
Figura 12: Representación esquemática del modelo de múltiples daños.....	54
Figura 13: Representación esquemática del experimento 2.....	57
Figura 14: Representación esquemática del experimento 3.....	59
Figura 15: Representación esquemática de una isquemia reperusión unilateral	62
Figura 16: Representación esquemática de una 5/6 nefrectomía.....	63

Figura 17: Jaula metabólica individual.....	64
Figura 18: Reacción de jaffe. La creatinina en ambiente básico forma un complejo coloreado con el picrato.	67
Figura 19: Representación esquemática del Western blot.....	73
Figura 20: Representación esquemática del ELISA tipo sándwich.	74
Figura 21: Esquema del proceso de extracción de ARN usando columnas de sílice (kit comercial).....	78
Figura 22: Imagen representativa de un riñón (200X) teñido con PAS.....	82
Figura 23: Representación del paso de conversión de pulgadas a micras.....	85
Figura 24: Transformación de la imagen a blanco y negro.	85
Figura 25: Evolución del peso corporal (g) a lo largo de los 9 meses	97
Figura 26: Valores de creatinina plasmática (mg/dl) en los diferentes modelos de daño renal durante los 2 meses de estudio	99
Figura 27: Evolución de la concentración plasmática de la creatinina a lo largo de los 9 meses.....	100
Figura 28: Valores del aclaramiento de creatinina (ml/min) en los diferentes modelos de daño renal durante los 2 meses de estudio.....	102
Figura 29: Evolución del aclaramiento de creatinina (ml/min) a lo largo de los 9 meses	103
Figura 30: Valores de urea plasmática (mg/dl) en los diferentes modelos de daño renal durante 2 meses	104
Figura 31: Evolución de la urea plasmática (mg/dl) a lo largo de los 9 meses.....	105
Figura 32: Valores de proteinuria (mg/día) en los diferentes modelos de daño renal durante dos meses	107
Figura 33: Evolución de la proteinuria (mg/día) a lo largo de los 9 meses	108
Figura 34: Evolución del flujo urinario (ml/día) a lo largo de los 9 meses	110
Figura 35: Evaluación de las alteraciones estructurales renales mediante tinción de Hematoxilina-eosina.	113
Figura 36: Evaluación del borde en cepillo mediante tinción de PAS.....	114
Figura 37: Evaluación de la fibrosis renal mediante tinción de Tricrómico de Masson.	115
Figura 38: Evaluación de la fibrosis renal mediante tinción de Rojo Sirio.....	116

Figura 39: Evaluación de las alteraciones estructurales renales mediante tinción de Hematoxilina-eosina.	118
Figura 40: Evaluación del borde en cepillo mediante tinción de PAS.	119
Figura 41: Evaluación de la fibrosis renal mediante tinción de Tricrómico de Masson.	120
Figura 42: Evaluación de la fibrosis renal mediante tinción de Rojo Sirio.	121
Figura 43: Cuantificación del área de fibrosis renal (μm^2).	123
Figura 44: Cuantificación de la fibrosis renal (μm^2).	125
Figura 45: Estudio de la progresión de las alteraciones renales mediante tinción de Hematoxilina-eosina.	126
Figura 46: Estudio de la progresión de la fibrosis renal mediante tinción de Tricromico de Masson.	127
Figura 47: Estudio de la progresión de la fibrosis renal mediante tinción de Rojo Sirio.	128
Figura 48: Análisis por ELISA de los niveles de albuminuria (mg/día) durante el periodo de estudio	131
Figura 49: Análisis por Western blot de la albuminuria en los diferentes grupos experimentales en D20 (día 20) y M2 (mes dos).	132
Figura 50: Análisis por Western blot de la evolución de la albuminuria a lo largo del estudio	132
Figura 51: Análisis por ELISA de los niveles urinarios de transferrina ($\mu\text{g/día}$) durante el periodo de estudio	134
Figura 52: Análisis por Western blot de la presencia de transferrina en la orina de los diferentes grupos experimentales en D20 (día 20) y M2 (mes dos).	135
Figura 53: Análisis por Western blot de la evolución de transferrina urinaria a lo largo del estudio	135
Figura 54: Análisis por Western blot de clusterina en la orina de los diferentes grupos experimentales en D20 (día 20) y M2 (mes dos).	137
Figura 55: Análisis por Western blot de la evolución de clusterina urinaria a lo largo del estudio	138
Figura 56: Análisis de la expresión génica de clusterina a nivel renal en el día 20 de estudio (D20).	138
Figura 57: Análisis por Western blot de fetuina-A en la orina de los diferentes grupos experimentales en D20 (día 20) y M2 (mes dos).	140
Figura 58: Análisis por Western blot de la evolución de fetuina-A urinaria a lo largo del estudio.	140

Figura 59: Análisis por Western blot de TCP-1-eta en la orina de los diferentes grupos experimentales en D20 (día 20) y M2 (mes dos).....	142
Figura 60: Análisis por Western blot de la evolución de TCP-1-eta urinario a lo largo del estudio	142
Figura 61: Análisis de la expresión génica de TCP-1 en tejido renal en el día 20 de estudio (D20).	143
Figura 62: Análisis por Western blot de RegIII-B en la orina de los diferentes grupos experimentales en D20 (día 20) y M2 (mes dos).	144
Figura 63: Análisis por Western blot de la evolución de RegIII-B urinario a lo largo del estudio	145
Figura 64: Análisis de la expresión génica de RegIII-B a nivel renal en el día 20 de estudio (D20).	145
Figura 65: Análisis por ELISA de los niveles urinarios de NGAL ($\mu\text{g}/\text{día}$) durante el periodo de estudio ...	147
Figura 66: Análisis de la expresión génica de NGAL en tejido renal en el día 20 de estudio (D20).	148
Figura 67: Análisis por ELISA de los niveles urinarios de KIM-1 ($\text{ng}/\text{día}$) durante el periodo de estudio ..	150
Figura 68: Análisis de la expresión génica de KIM-1 a nivel renal en el día 20 de estudio (D20).	151
Figura 69: Análisis por Western blot de GM2AP en la orina de los diferentes grupos experimentales en D20 (día 20).	153
Figura 70: Análisis por Western blot de GM2AP en la orina de los diferentes grupos experimentales en M2 (mes 2).	153
Figura 71: Análisis por Western blot de la evolución de GM2AP urinario a lo largo del estudio	154
Figura 72: Análisis de la expresión génica de GM2AP en tejido renal en el día 20 de estudio (D20).	154
Figura 73: Análisis por ELISA de los niveles urinarios de IGFBP-7 ($\text{ng}/\text{día}$) durante el periodo de estudio	155
Figura 74: Análisis por ELISA de los niveles urinarios de TIMP-2 ($\text{ng}/\text{día}$) durante el periodo de estudio	156
Figura 75: Análisis de la expresión génica de IGFBP-7 y TIMP-2 en tejido renal en el día 20 de estudio (D20).	158
Figura 76: Análisis por ELISA de los niveles urinarios de RBP4 ($\mu\text{g}/\text{día}$) durante el periodo de estudio ...	159
Figura 77: Biomarcadores urinarios de secuelas subclínicas posteriores al DRA.....	166
Figura 78: Evolución en el tiempo de los diferentes biomarcadores.....	169

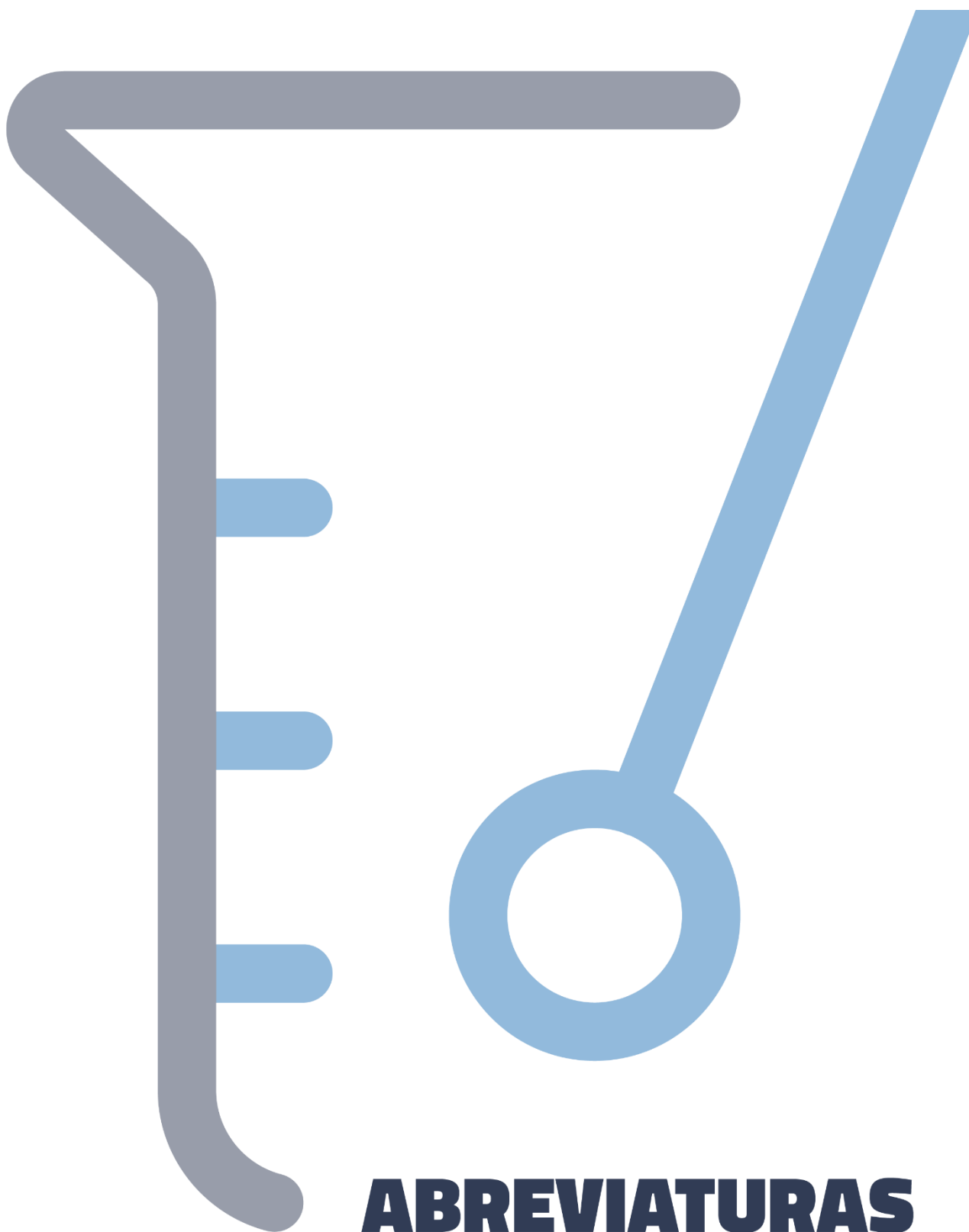
Figure 1: Assessment of renal function.	187
Figure 2: Evaluation of renal structural alterations by Haematoxylin-eosin staining.....	189
Figure 3: Brush border evaluation by PAS staining.....	190
Figure 4: Evaluation of renal fibrosis by Masson's Trichrome staining. Representative images (100X) of histological sections of the cortical region. Scale: 50 μ m.	190
Figure 5: Evaluation of renal structural alterations by Haematoxylin-eosin staining.....	192
Figure 6: Brush border evaluation by PAS staining.....	193
Figure 7: Evaluation of renal fibrosis by Masson's Trichrome stain.	194
Figure 8: Evaluation of the progression of kidney alterations using Haematoxylin-eosin staining.	196
Figure 9 Evaluation of the progression of renal fibrosis using Masson's Trichromic staining.....	197
Figure 10: Quantification of renal fibrosis (μ m ²). The results of the collagen quantification are shown at the different time points	199
Figure 11: ELISA analysis of albuminuria levels (mg/day) and urinary transferrin excretion (ug/day) during the study period.....	200
Figure 12: ELISA analysis of urinary levels of RBP4 (ng/day) during the study period.....	201
Figure 13: ELISA analysis of urinary levels of IGFBP7 (ng/day) and TIMP-2 (ng/day) during the study period	203
Figure 14 ELISA analysis of urinary levels of NGAL (ug/day) and KIM-1 (ng/day) during the study period	204
Figure 15 Western blot analysis of TCP-1 during the study period	205
Figure 16: Western blot analysis of fetuin-a during the study.....	206
Figure 17: Western blot analysis of clusterin during the study.....	207
Figure 18: Western blot analysis of RegIII-B during the study.....	208
Figure 19: Western blot analysis of GM2AP during the study.....	209

Índice de tablas

Tabla 1: Criterios RIFLE, AKIN, y KDIGO para el diagnóstico del DRA (Adaptado de Negi et al., 2018 y Makris & Spanou, 2016).	5
Tabla 2: Lista de biomarcadores utilizados para seguir la recuperación renal tras un DRA (Adaptado de Forni et al., 2017).	45
Tabla 3: Puntos de estudio del experimento 1.	56
Tabla 4: Puntos de estudio para el experimento 2.	58
Tabla 5: Relación de anticuerpos primarios utilizados para la técnica de Western Blot.	71
Tabla 6: Relación de anticuerpos secundarios utilizados para la técnica de Western Blot.	72
Tabla 7: Resumen de los kits de ELISA empleados en este trabajo.	76
Tabla 8: Cebadores de diseño propio y condiciones empleadas en la técnica qPCR.	79
Tabla 9: Reactivos y productos utilizados.	89
Tabla 10: Equipos y aparatos utilizados.	89
Tabla 11: Programas informáticos utilizados.	90
Tabla 12: Valores de peso corporal (g) en los diferentes grupos experimentales.	97
Tabla 13: Valores de creatinina plasmática (mg/dl) en los diferentes grupos experimentales.	99
Tabla 14: Valores de creatinina plasmática (mg/dl) en los diferentes grupos experimentales.	101
Tabla 15: Valores de aclaramiento de creatinina (ml/min) en los diferentes grupos experimentales.	102
Tabla 16: Valores de aclaramiento de creatinina (ml/min) en los diferentes grupos experimentales.	103
Tabla 17: Valores de urea plasmática (mg/dl) en los diferentes grupos experimentales.	105
Tabla 18: Valores de urea plasmática (mg/dl) en los diferentes grupos experimentales.	106
Tabla 19: Valores de proteinuria (mg/día) en los diferentes grupos experimentales.	107
Tabla 20: Valores de proteinuria (mg/día) en los diferentes grupos experimentales.	109
Tabla 21: Valores de flujo urinario (ml/día) en los diferentes grupos experimentales.	110
Tabla 22: Valores en mg/día de albuminuria en los diferentes grupos experimentales.	131
Tabla 23: Valores en µg/día de transferrina urinaria en los diferentes grupos experimentales.	134
Tabla 24: Valores en µg/día de NGAL en los diferentes grupos experimentales.	148

ÍNDICES

Tabla 25: Valores en ng/día de KIM-1 urinario en los diferentes grupos experimentales.	151
Tabla 26: Valores en ng/día de IGFBP-7 urinario en los diferentes grupos experimentales.....	156
Tabla 27: Valores en ng/día de TIMP-2 urinario en los diferentes grupos experimentales.....	157
Tabla 28: Valores en ug/día de RBP4 urinario en los diferentes grupos experimentales.....	160



ABREVIATURAS

5/6 NEF	Grupo de animales en los que se aplicó una remoción de 5/6 de masa renal
A1, A2, A3	Categorías en función del nivel de albuminuria usadas en el pronóstico de la ERC
Abs	Absorbancia
ADQI	Iniciativa para la Calidad de la Diálisis Aguda (del inglés, <i>Acute dialysis quality initiative</i>)
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AKIN	Red de lesión renal aguda (del inglés, <i>Acute Kidney Injury Network</i>)
AINE	Antinflamatorio no esteroideo
AP-1	Factor de transcripción
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín trifosfato (del inglés, <i>adenosine triphosphate</i>)
B	Basal
BMSCs	Células madre derivadas de la médula ósea (del inglés, <i>bone marrow-derived stem cells</i>)
BSA	Albúmina de suero bovino (del inglés, <i>bovine serum albumin</i>)
BUN	Nitrógeno ureico plasmático (del inglés, <i>blood urea nitrogen</i>)
CD	Células dendríticas
CD133 y CD24	Marcadores de células madre

ABREVIATURAS

CDDP5	Grupo de animales en el que se administra solo cisplatino i.p. (5mg/kg)
CDDP5-I/R60	Grupo de doble daño (adm. de cisplatino e I/R60 unilateral en el riñón izquierdo)
CDDP5-I/R60-I/R60	Grupo triple daño
c-jun NH2 terminal	Enzima con actividad de quinasa
ClCr	Aclaramiento de creatinina
ConcP	Concentración de proteínas en la orina
Cr	Creatinina
CrP	Creatinina plasmática
CrPB	Creatinina plasmática basal
CrU	Creatinina urinaria
CTGF	Factor de crecimiento del tejido conectivo (del inglés, <i>connective tissue growth factor</i>)
c.s.p	Cantidad suficiente para
Ct	Ciclo umbral
CTR1	Transportador de cobre 1
D	Día
DAMPS	Patrones moleculares asociados a daño (del inglés, <i>damage associated molecular patterns</i>)
DRA	Daño renal agudo
eTFG	Tasa de filtración glomerular estimada (del inglés, <i>estimated glomerular filtration rate</i> eGFR)
EEUU	Estados Unidos
EEM	Error estándar de la media

ELISA	Ensayo de inmunoadsorción enzimática (del inglés, <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)
EMT	Transición epitelio-mesénquimal (del inglés, <i>epithelial mesenchymal transition</i>)
ERO	Especie reactiva de oxígeno (en inglés, <i>reactive oxygen species</i> (ROS))
ERA	Enfermedad renal aguda (en inglés, <i>acute kidney disease</i> , AKD)
ERC	Enfermedad renal crónica
ESRD	Enfermedad renal en etapa terminal (del inglés, <i>end-stage renal disease</i>)
FENa	Excreción fraccional de sodio
FRA	Fallo renal agudo
FU	Flujo urinario
G1-G2, G3a-b, G4-G5	Categorías usadas para el pronóstico de la ERC en base a la TFG
G2/M	Fases del ciclo celular
GM2AP	Proteína activadora del gangliósido M2 (del inglés, <i>ganglioside M2 activator protein</i>)
HRP	Peroxidasa de rábano picante (del inglés, <i>horseradish peroxidase</i>)
kDa	Kilodalton
IECA	Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina
Ig	Inmunoglobulina (del inglés, <i>immunoglobulin</i>)
IgA	Tipo de nefropatía diabética (la forma más común de glomerulonefritis)
IGFBP-7	Factor de crecimiento insulínico tipo 7 (del inglés, <i>Insulin-like growth factor-binding protein 7</i>)
IL	Interleukina
IMC	Índice de masa corporal

ABREVIATURAS

i.p.	Intraperitoneal
I/R	Isquemia-reperfusión
I/R60	Isquemia-reperfusión de 60 minutos unilateral
ISE	Electrodo selectivo de iones
LOX	Lisil oxidasa
L-FABP1	Proteína hepática fijadora de ácidos grasos (del inglés, <i>fatty acid-binding protein 1</i>)
KDIGO	Organización que desarrolla guías en nefrología (del inglés, <i>Kidney disease: improving global outcomes</i>)
KIM-1	Molécula de daño renal 1 (del inglés, <i>kidney molecule injury 1</i>)
LY6C	Proteína expresada en la superficie de macrófagos (del inglés, <i>lymphocyte antigen 6 complex</i>)
MDRD	Ecuación para estimar TFG (del inglés, <i>modification of diet in renal disease</i>)
M	Mes
M1	Macrófagos de tipo M1
M2	Macrófagos de tipo M2
MEC	Matriz extracelular
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
MMP	Metaloproteinasas de la Matriz (del inglés, <i>matrix metalloproteinases</i>)
MTAL	Rama ascendente gruesa Asa de Henle (del inglés, <i>Medullary Thick Ascending Limb</i>)
NaCl	Cloruro sódico
NAG	N-acetil-beta-D-glucosaminidasa
NaOH	Hidróxido sódico

NaP	Sodio plasmático
NaU	Sodio urinario
NCBI	Del inglés, <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGAL	Lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (del inglés, <i>neutrophil gelatinase-associated liocalin</i>)
NF-kB	Factor de transcripción
NK	Célula asesina natura (del inglés, <i>natural killer</i>)
NIC	Nefropatía inducida por contraste
NTA	Necrosis tubular aguda
NO	Óxido nítrico (del inglés, <i>Nitric Oxide</i>)
OCT2	Transportador de cationes orgánicos 2
P53-21	Factores de transcripción que regulan el ciclo celular
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (del inglés, <i>polyacrilamide gel electrophoresis</i>)
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés, <i>Pathogen-associated molecular pattern molecules</i>)
PAS	Ácido peryódico de Schiff (del inglés, <i>periodic acid–Schiff</i>)
pb	Pares de bases
PBS	Salino con tampón fosfato (del inglés, <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, <i>polymerase chain reaction</i>)
PDGF-B	Factor de crecimiento derivado de plaquetas B (del inglés, <i>platelet-derived growth factor B</i>)
PECs	Células epiteliales parietales (del inglés, <i>parietal epithelial cells</i>)

ABREVIATURAS

PPRs	Receptores de reconocimiento de patrones (del inglés, <i>Pattern Recognition Receptor</i>)
PTH	Hormona paratiroidea (del inglés, <i>parathyroid hormone</i>)
PVDF	Polivinildenfluoruro (del inglés, <i>polyvinylidene fluoridide</i>)
q-PCR	PCR cuantitativa (del inglés, <i>quantitative real-time PCR</i>)
R	Día en que los animales recuperan la función renal
Reg-IIIb	Proteína 3- β derivada de islote regenerador (del inglés, <i>regenerating-islet derived protein 3-β</i>)
RIFLE	Sistema de clasificación de DRA (Del inglés <i>Risk, Injure, Failure, Loss, End-Stage Renal Disease</i> , ESRD)
RFR	Reserva funcional renal
RMR	Reducción masa renal
RBP4	Proteína de unión al retinolo (del inglés, <i>retinol binding protein 4</i>)
RPL7	Proteína ribosómica L7 (del inglés, <i>ribosomal protein L7</i>)
RT-qPCR	PCR en tiempo real precedida por la retrotranscripción de ARN (del inglés, <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
s.c	Administración subcutánea
S1, S2	Primeros dos segmentos del túbulo proximal (pars convoluta)
S3	Último segmento del túbulo proximal (pars recta)
SCID	Ratones con inmunodeficiencia combinada severa (del inglés, <i>severe combined immunodeficiency</i>)
SDS	Dodecil sulfato sódico (del inglés, <i>sodium dodecyl sulphate</i>)
SDS-PAGE	Del inglés, <i>Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis</i>

SEA	Servicio de experimentación animal
SHAM	Grupo de animales en los que se aplicó una cirugía simulada
STCs	Células tubulares diseminadas (del inglés, <i>scattered tubular cells</i>)
Sox9	Factor de transcripción involucrado en la respuesta regenerativa
TCP-1	Del inglés, <i>Tailless Complex Polypeptide</i>
TEF	Prueba de estrés a la furosemida
TFG	Tasa de filtración glomerular
TMB	Sustrato coloreado de la enzima HRP
TNF	Factor de necrosis tumoral (del inglés, <i>tumor necrosis factor</i>)
TGF- β 1	Factor de crecimiento transformante β 1 (del inglés, <i>transforming growth factor beta</i>)
TIMP-2	Inhibidor tisular de metaloproteinasas (del inglés, <i>tissue inhibitor of metalloproteinases 2</i>)
TLR	Receptor tipo Toll (del inglés, <i>toll-like receptor</i>)
TP	Túbulo proximal
TRS	Terapia renal sustitutiva
UCI	Unidad de cuidados intensivos
UNX	Grupo de animales nefrectomizados
UU.AA	Unidades arbitrarias
VEGF	Factor de crecimiento endotelial (del inglés, <i>vascular Endothelial Growth Factor</i>)
Wnt-7b	Vía de señalización (traducción de la señal)



INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1 EL DAÑO RENAL AGUDO

1.1 Definición

Los riñones tienen un papel central en el mantenimiento de la homeostasis del medio interno y, por lo tanto, en el funcionamiento del resto de los órganos y sistemas, y del organismo en conjunto (Dirkes, 2016). El daño renal agudo (DRA), previamente conocido como fallo renal agudo (FRA), es un síndrome caracterizado por el deterioro repentino de la función renal (Bellomo et al., 2012). El DRA es una termino genérico que engloba un grupo heterogéneo de condiciones que comparten características diagnósticas comunes; específicamente, un incremento en la concentración de creatinina plasmática (CrP) a menudo asociada a una reducción en el volumen de orina (Longo et al., 2011). Otras manifestaciones incluyen un incremento en la concentración del nitrógeno ureico en sangre (BUN; del inglés *blood urea nitrogen*), acumulación de ácidos metabólicos, el desequilibrio hídrico y niveles plasmáticos incrementados de potasio y fósforo (Bellomo et al., 2012).

El DRA es un síndrome complejo que a menudo surge como parte o consecuencia de otros síndromes (ej. insuficiencia cardíaca, insuficiencia hepática y la sepsis) (Ronco et al., 2019). En cuanto al rango de gravedad, varía desde asintomático y con cambios transitorios en los parámetros de laboratorio, a alteraciones ingentes y rápidamente fatales en la regulación efectiva del volumen circulante y la composición electrolítica y ácido-base del plasma y, en general, de los compartimientos intra y extracelular (Longo et al., 2011).

Cambiar el nombre de un síndrome tan conocido como el “fallo renal agudo” no ocurre con frecuencia. No obstante, el término DRA ha reemplazado al FRA para enfatizar que existe una cantidad continua de daño renal que comienza mucho antes de que se pueda detectar la pérdida de la función renal con pruebas estándar de laboratorio (Bellomo et al., 2012; Dirkes, 2016), ya que el término fallo refleja solo la parte del espectro del daño renal que ocurre clínicamente. En la mayoría de los casos, la reducción de la función renal

INTRODUCCIÓN

es modesta. Sin embargo, se ha documentado que también muy pequeños cambios están asociados con efectos negativos para la salud, tanto de forma inmediata como en un plazo más largo (Longo et al., 2011).

1.2 Epidemiología

El uso de criterios estándar en la definición del DRA, ha hecho posible estimar su incidencia y prevalencia, así como comparar resultados entre distintos estudios (Ronco et al., 2019). En un reciente meta-análisis, Susantitaphong et al., estimaron la incidencia global de DRA y reportaron las variaciones geográficas según los países, regiones y sus economías (Susantitaphong et al., 2013)(Figura 1).

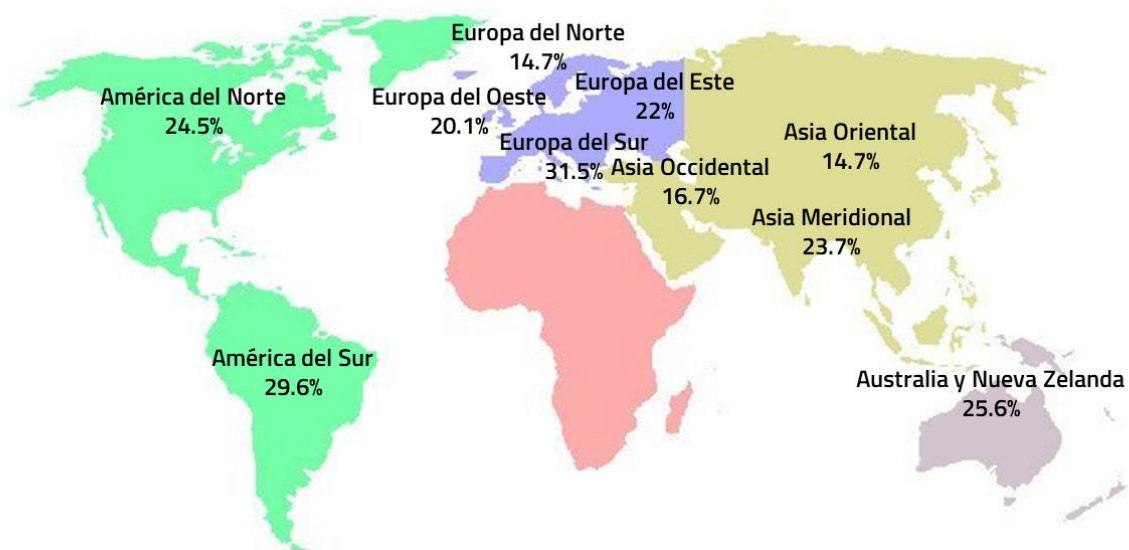


Figura 1: Incidencia de hospitalizaciones debidas al DRA por regiones geográficas (Adaptado de Susantitaphong et al., 2013).

Este estudio concluyó que, cuando se utilizaba la definición KDIGO (empleada en 154 de los 314 estudios utilizados en su trabajo), el porcentaje de hospitalizaciones debidas al DRA era del 21,6% entre los adultos, y del 33,7% entre los niños. La mortalidad general de los pacientes de DRA fue del 23% (23,9% de adultos y 13,8% de niños) (Negi et al., 2018; Susantitaphong et al., 2013). Además, diversos estudios muestran que la incidencia de DRA en pacientes hospitalizados está aumentando (Malhotra et al., 2019). Por ejemplo, Xue et al. mostraron que entre 1992 y 2001 la incidencia de DRA en Estados Unidos (EEUU) fue de 23,8 casos por 1000 altas hospitalarias, con un incremento del 11% por año (Chawla et al., 2014; Xue et al., 2006)(Chawla et al., 2014; Xue et al., 2006). Este incremento en la incidencia no se debe a mejores herramientas de diagnóstico, sino que corresponde a un incremento real (Siew & Davenport, 2015) que,

probablemente, se deba al aumento de múltiples factores de riesgo para el DRA como la hipertensión, edad avanzada, y la diabetes mellitus (Chawla et al., 2014).

El DRA complica más del 20% de los ingresos hospitalarios de cuidados agudos y hasta el 50% de los ingresos en la unidad de cuidados intensivos (UCI) (Hoste et al., 2015). La prevalencia del DRA que requiere terapia renal sustitutiva (TRS) reportada por numerosos estudios es aproximadamente del 4-6% y la mortalidad hospitalaria en estos pacientes del 60-70% (Brochard et al., 2010; Uchino, 2006; Uchino et al., 2005). De estos pacientes con DRA que requieren TRS y sobreviven, entre el 5% y el 30% requieren diálisis a largo plazo (Susantitaphong et al., 2005).

Resulta importante añadir que la epidemiología del DRA difiere enormemente entre países desarrollados y aquellos en vías de desarrollo, debido a las diferencias en la demografía, economía, geografía y la carga y el tipo de comorbilidades (Longo et al., 2011). En países con ingresos bajos y medios-bajos, la epidemiología del DRA no está suficientemente bien descrita. En dichos países, la baja disponibilidad de recursos y la inadecuada infraestructura de salud están asociadas a un peor reconocimiento y tratamiento del DRA (Mehta et al., 2016). Como consecuencia, muchas personas continúan falleciendo debido a este trastorno, que a menudo se puede prevenir con medidas simples como la hidratación o el tratamiento de las infecciones agudas. Sin embargo, el acceso a la TRS está limitado a menos del 5% de los pacientes que lo necesitan, especialmente en África subsahariana (Remuzzi & Horton, 2013).

Por este motivo, la Sociedad Internacional de Nefrología creó la iniciativa DRA Oby25, que tiene como objetivo lograr prevenir todas las muertes evitables por este síndrome en todo el mundo en 2025. Como paso inicial, hicieron un mapa mundial de incidencia durante un periodo de 10 semanas en 2014 recolectando informaciones provenientes de diferentes partes del mundo (Mehta et al., 2016). Los resultados mostraron que la incidencia de DRA adquirido en el hospital fue del 39% (1429/3661) en los adultos y del 53% (187/354) en los niños. La incidencia de DRA adquirido en el hospital fue mayor en países desarrollados (64% en Norte América, 39% en Europa Occidental) comparado con países en desarrollo con bajos ingresos (15% en África, 18% en Asia Meridional y 19% en Europa del Este y Europa Central) (Malhotra et al., 2019).

INTRODUCCIÓN

En lo que se refiere a los costes, se estima que los aquellos directamente asociados al DRA suponen el 5% del total de los costes hospitalarios (Chertow et al., 2005). En un análisis de Estados Unidos en el que se compararon los costes de los ingresos hospitalarios en pacientes con y sin DRA, que fueron ajustados para tener en cuenta los costes atribuibles al exceso de comorbilidad, el DRA fue asociado a un incremento en los costes de 1795 dólares por admisión. Sin embargo, en los pacientes que requirieron diálisis (<5%), el DRA produjo un incremento del coste de 42077 dólares (Hoste et al., 2018).

1.3 Criterios diagnósticos

El término “función renal” es vago e impreciso. Los riñones tienen múltiples funciones, que no necesariamente se deterioran de forma sincrónica. Puesto que es complicado evaluar individualmente todas ellas, desde mediados del siglo XX se ha considerado que la tasa de filtración glomerular (TFG) es el parámetro que mejor representa el estado funcional de los riñones (A S Levey, 1990; Stevens et al., 2006; Toth, 1951). Por lo tanto, como aproximación, el diagnóstico de la disfunción renal también se ha realizado tradicionalmente mediante la evaluación directa o indirecta de la TFG.

Hasta hace unos años no había consenso en la definición exacta de DRA, con más de 30 definiciones diferentes utilizadas (J. A. Kellum et al., 2002). Esta falta de claridad ha hecho difícil comparar la epidemiología y los resultados de DRA entre distintos estudios (Negi et al., 2018). Por este motivo, 2004 marcó la introducción del sistema de clasificación RIFLE propuesto por el Grupo de Iniciativa de Calidad de Diálisis Aguda (ADQI, del inglés, *acute dialysis quality initiative*), que condujo a un consenso en la definición y la calificación (Bellomo et al., 2004). El acrónimo RIFLE indica: Riesgo (*Risk*), Daño (*Injury*) y Fallo (*Failure*), Pérdida (*Loss*) y Enfermedad Renal en Estado Terminal ESRD (del inglés, *end-stage renal disease*) (Urbschat et al., 2011).

Tras la introducción de la definición de DRA, RIFLE fue redefinido por el grupo de la Red de lesión Renal Aguda (AKIN; del inglés, *acute kidney injury network*) en 2007. Su clasificación no necesita el valor basal de CrP para definir el DRA, aunque requiere al menos dos medidas de CrP en 48h (Mehta et al., 2007). El grupo de trabajo de KDIGO modificó aún más el sistema en 2012 (J. A. Kellum et al., 2012) como se resume en la Tabla 1.

CRITERIOS	RIFLE	AKIN	KDIGO
Año	2004	2007	2012
Parámetros	CrP, TFG, FU	CrP, FU	CrP, FU
Definición	Aumento en la CrP $\geq 1,5$ veces. FU $\leq 0,5$ ml/kg/h durante 6h.	Aumento en la CrP $\geq 0,3$ mg/dl (en las 48h). Aumento en la CrP $\geq 1,5$ veces (en las 48h). FU $\leq 0,5$ ml/kg/h durante 6h.	Aumento en la CrP $\geq 0,3$ mg/dl (en las 48h). Aumento en la CrP $\geq 1,5$ veces (en 7 días) FU $\leq 0,5$ ml/kg/h durante 6h. Estadio 1: CrP $\geq 1,5-1,9$ veces o $\geq 0,3$ mg/dL. FU $\leq 0,5$ ml/kg/h durante 6h. Estadio 2: CrP $\geq 2-2,9$ veces. FU $\leq 0,5$ ml/kg/h durante 6h. Estadio 3: CrP ≥ 3 veces o ≥ 4 mg/dL o necesidad diálisis. FU $\leq 0,3$ ml/kg/h durante 24h o anuria ≥ 24 h.
CrP basal	CrPB estimada de la ecuación MDRD.	No necesaria. Al menos 2 valores de CrP en las 48h.	CrPB estimada de la ecuación MDRD.

Tabla 1: Criterios RIFLE, AKIN, y KDIGO para el diagnóstico del DRA (Adaptado de Negi et al., 2018 y Makris & Spanou, 2016).

1.4 La tasa de filtración glomerular

La TFG, que mide el volumen de plasma filtrado por los glomérulos en un periodo de tiempo dado y, como tal, un indicador directo de la función renal (Molitoris & Reilly, 2017). No se puede medir directamente, en cambio sí se puede determinar indirectamente mediante el aclaramiento de sustancias que se filtran libremente a través de los glomérulos (A. S. Levey & Inker, 2017). Teóricamente, un marcador perfecto para estimaciones de TFG debería tener las siguientes características: producción constante y concentración de plasma estable en ausencia de variación de TFG; filtración libre por los glomérulos; falta de secreción, reabsorción o metabolismo tubular; y ausencia de eliminación extrarrenal (Bargnoux et al., 2018). Desafortunadamente un marcador endógeno con estas características no existe.

La manera más precisa para estimar la TFG implica la inyección endovenosa de inulina y la medición de su aclaramiento. La inulina es un polisacárido exógeno que es completamente filtrado, no reabsorbido ni

INTRODUCCIÓN

secretado por los riñones. Sin embargo, el uso de inulina es invasivo y lento y por esto raramente utilizado. Alternativamente, el aclaramiento de creatinina (ClCr) puede ser utilizado para estimar la TFG. Se trata del volumen de plasma depurado de creatinina por unidad de tiempo y se calcula a partir de la excreción de creatinina en una recolección de orina de 24 horas y una única medición de creatinina plasmática en estado estacionario (A. S. Levey & Inker, 2017). El estado estacionario es imprescindible para el cálculo preciso del aclaramiento, pero raramente se encuentra en pacientes críticamente enfermos (Robert & Zarowitz, 1991).

El desarrollo de métodos para estimar la TFG únicamente a través de niveles plasmáticos de marcadores de filtración endógenos ha simplificado su evaluación sin requerir la administración de sustancias exógenas y sin realizar mediciones de aclaramiento (no es necesario recolectar orina) (A. S. Levey & Inker, 2017). La TFG puede estimarse con la aplicación de ecuaciones que utilizan la CrP y otros parámetros y entre las cuales encontramos:

- **Ecuación de Cockcroft-Gault:** estima el aclaramiento (en ml/min) a partir de la edad, género, peso corporal y CrP (Cockcroft & Gault, 1976).
- **Ecuación de estudio MDRD** (del inglés, *Modification of Diet in Renal Disease*): estima la TFG estandarizada por área de superficie corporal (en ml/min/1,73m²) a partir de la edad, género, raza (afroamericanos vs. caucásicos y otros) y CrP (Andrew S. Levey et al., 1999).

Ambos métodos tienen limitaciones ya que pueden resultar en sobreestimación o subestimación de la TFG.

1.5 Limitaciones de la creatinina plasmática como indicador de la función renal

La creatinina plasmática es el indicador de la función de filtración renal más comúnmente utilizado. Se trata de un metabolito del fosfato de creatina, un depósito de energía que se encuentra en el músculo esquelético y en condiciones normales se produce a un ritmo constante (De Rosa et al., 2016). La creatinina se filtra completamente por el riñón, no se reabsorbe en el túbulo y únicamente una pequeña cantidad es activamente secretada. Por tanto, su tasa de excreción es aproximadamente igual a la tasa a la que se filtra y cualquier cambio en los niveles de creatinina en sangre está relacionado con la filtración reflejando la función renal (Hersey-Benner & Mayer, 2012). Si la TFG decrece, la tasa de excreción de creatinina también

decrece transitoriamente, causando una acumulación de creatinina en los fluidos del cuerpo y aumentando la concentración en plasma hasta que su tasa de excreción vuelve a la normalidad.

La medición de la creatinina plasmática es una simple prueba, pero, a pesar de ser el método comúnmente utilizado para la determinación de la función renal, tiene varias limitaciones, que se detallan a continuación (Dixon Thomas, Seeba Zachariah, Abdelgadir Elamin Eltom, 2017; Lopes & Jorge, 2013):

- La creatinina plasmática puede incrementarse con la ingesta de grandes cantidades de carne (Mayersohn et al., 1983).
- La producción endógena y la liberación de Cr al plasma son variables y están influenciadas por múltiples factores, principalmente por la edad, género, dieta y masa muscular. Por ejemplo, un adulto varón de origen africano debería tener una mayor producción de creatinina debido a una mayor masa muscular.
- Por otro lado, la malnutrición y la inactividad decrecen la masa muscular y, por ello, decrece la creatinina plasmática.
- Alrededor del 2% de la creatina del cuerpo se convierte en creatinina cada día. Condiciones patológicas con un aumento de rotura muscular (Rabdomiólisis) podrían aumentar la producción de creatinina y su concentración plasmática.
- Pacientes con sobrecarga de líquido tienen una menor concentración de creatinina plasmática debido a la dilución de la sangre (De Rosa et al., 2016).
- El mecanismo de secreción tubular de creatinina aumenta a medida que la tasa de filtración glomerular (TFG) disminuye, por lo cual, se puede sobreestimar la función renal en pacientes con DRA (Bellomo et al., 2004).
- La eliminación extra-renal (principalmente intestinal) de la creatinina puede ocurrir, especialmente en enfermedad renal avanzada (Stevens & Levey, 2009).
- Muchos medicamentos inhiben la secreción tubular de Cr (por ejemplo, trimetoprim y cimetidina), causando un incremento temporal de CrP (Williamson & New, 2014).

INTRODUCCIÓN

- Varios factores pueden interferir en la determinación analítica de Cr (ej. acetoacetato acumulado en cetoacidosis diabética puede interferir con el método de medición con picrato), provocando una falsa elevación en los valores de CrP (Molitch et al., 1980).
- La CrP es un marcador de la función renal, no del daño renal. La CrP aumenta solo cuando hay un declive significativo en la filtración glomerular. Cambios en la CrP carecen de sensibilidad para la detección temprana del DRA, ya que en una persona sana se debe perder casi el 50% de TFG antes de que se detecte un cambio en la creatinina plasmática (Ronco et al., 2019).

1.6 Etiología y fisiopatología del DRA

Tradicionalmente, las causas del DRA se han dividido en tres amplias categorías: daño prerrenal (azotemia prerrenal), daño renal intrínseco y daño postrenal (Figura 2).

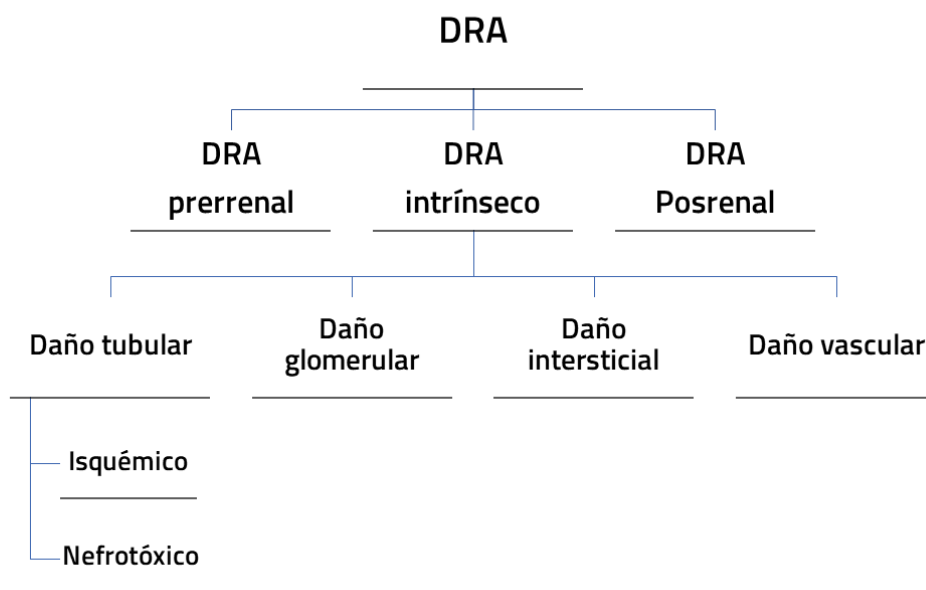


Figura 2: Etiología del DRA (Adaptado de Makris & Spanou, 2016).

1.6.1 Daño prerrenal

La azotemia prerrenal es la forma más común de DRA en personas hospitalizadas (Nash et al., 2002). Es la designación para un aumento en la concentración de CrP debido a una disminución del flujo de sangre a los riñones y de la presión hidrostática intraglomerular, sin daño parenquimatoso en los riñones. Es

rápidamente reversible una vez que la hemodinámica renal se normaliza. No obstante, periodos prolongados de azotemia prerrenal pueden llevar a una lesión isquémica (Bellomo et al., 2012; Longo et al., 2011).

Las condiciones clínicas asociadas más comunes son la hipovolemia, la disminución del gasto cardíaco y los medicamentos que interfieren con las respuestas autorreguladoras renales, como los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y los antagonistas de los receptores de angiotensina II (Longo et al., 2011). Grados leves de hipovolemia y reducciones en el gasto cardíaco provocan cambios fisiológicos renales compensatorios. Cuando la presión sanguínea cae, una vasodilatación gradual de las arteriolas preglomerulares está mediada por la biosíntesis intrarrenal de las prostaglandinas vasodilatadoras (prostaciclina, prostaglandina E₂), calicreína y, posiblemente, óxido nítrico (NO). Además, la vasoconstricción concomitante en la arteriola eferente, principalmente bajo la influencia de la angiotensina II, mantiene una presión hidrostática capilar glomerular constante (Lameire, 2005).

Los medicamentos pueden afectar estos cambios compensatorios. Por un lado, los AINEs inhiben la producción de prostaglandinas renales, limitando la vasodilatación aferente renal. Mientras que los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) y los antagonistas de los receptores de angiotensina II limitan la vasoconstricción eferente renal (Longo et al., 2011).

1.6.2 DRA intrínseco

El DRA intrínseco o intrarrenal tiene lugar cuando hay un daño directo a los riñones. Su etiología puede ser difícil de evaluar dada la amplia variedad de daños que puede tener el riñón. Generalmente, hay cuatro estructuras del riñón que pueden estar implicadas: los túbulos, glomérulos, el intersticio y los vasos sanguíneos intrarrenales (Makris & Spanou, 2016). Las causas más comunes del DRA intrínseco son sepsis, isquemia y nefrotóxicos. En muchos casos, la azotemia prerrenal avanza hasta un daño tubular.

1.6.2.1 DRA asociado a la sepsis

El daño renal agudo asociado a sepsis es una complicación común en pacientes hospitalizados y críticamente enfermos, lo que aumenta el riesgo de desarrollar comorbilidades crónicas y se asocia a una mortalidad extremadamente alta (Mehta et al., 2011; S. Peerapornratana, Carlos L. Manrique-Caballero, H. Gómez, 2019).

INTRODUCCIÓN

La sepsis también constituye una causa muy importante de DRA en los países en vías de desarrollo (Hoste et al., 2018; Mehta et al., 2016). El mecanismo exacto de la sepsis está todavía en investigación (Ronco et al., 2019). La hipoperfusión mediada por sepsis que surge de la vasodilatación arterial generalizada que conduce a una reducción de la TFG se ha citado como posible causa. Sin embargo, recientes evidencias han desafiado este paradigma (Alobaidi et al., 2015).

1.6.2.2 DRA asociado a la isquemia

Los riñones sanos reciben un 20% del gasto cardíaco y representan el 10% del consumo de oxígeno en reposo, a pesar de constituir solo el 0,5% de la masa del cuerpo humano (Longo et al., 2011). Por lo tanto, el suministro de oxígeno al riñón puede cambiar drásticamente dependiendo del estado de la perfusión renal que predispone al riñón al daño hipóxico (Tanaka et al., 2014). Los riñones también incluyen una de las regiones más hipóxicas del cuerpo, la médula renal. La médula externa es particularmente vulnerable al daño isquémico debido a la arquitectura de los vasos sanguíneos que suministran oxígeno y nutrientes a los túbulos. Esta región del riñón se oxigena marginalmente en circunstancias normales y sufre la hipoxia más grave y persistente después de un episodio isquémico, porque el retorno del flujo sanguíneo a esta región se retrasa (Longo et al., 2011).

El último segmento del túbulo proximal (el segmento S3) y la rama ascendente gruesa del asa de Henle (MTAL) están localizados en la médula externa del riñón. Aunque estos segmentos de la nefrona son metabólicamente bastante activos con una alta actividad de transporte, las características metabólicas de ambos difieren sustancialmente. El MTAL tiene una mayor capacidad que el segmento S3 para generar ATP por glucólisis cuando el metabolismo oxidativo se ve afectado por una disminución en el flujo sanguíneo medular después de una lesión por isquemia-reperfusión (Lieberthal & Nigam, 1998). Por otro lado, el segmento S3 es más susceptible a una lesión isquémica *in vivo* que los segmentos S1 y S2, representando el segmento más afectado en la lesión de DRA isquémico (M A Venkatachalam, 1978).

El DRA asociado a isquemia es una complicación grave en el periodo postoperatorio, especialmente después de operaciones importantes que implican una pérdida de sangre significativa e hipotensión intraoperatoria. Los procedimientos más comúnmente asociados a DRA isquémico son la cirugía cardíaca

con baipás cardiopulmonar y procedimientos vasculares con pinzamiento aórtico y procedimientos intraperitoneales (Longo et al., 2011).

1.6.2.3 DRA asociado a los nefrotóxicos

Los riñones tienen una gran susceptibilidad a la nefrotoxicidad debido a la perfusión sanguínea extremadamente alta y a la concentración de sustancias circulantes a lo largo de la nefrona donde el agua se reabsorbe y, en el intersticio medular. Esto da como resultado una exposición a una alta concentración de toxinas en las células tubulares, intersticiales y endoteliales (Choudhury & Ahmed, 2006; Pazhayattil & Shirali, 2014).

La lesión nefrotóxica ocurre como respuesta a varios compuestos farmacológicos, sustancias endógenas y exposiciones ambientales. Los pacientes hospitalizados, especialmente los pacientes críticamente enfermos, comúnmente reciben múltiples medicamentos, con una cuarta parte de estos medicamentos con cierto potencial nefrotóxico. La administración de nefrotóxicos se asocia con casi el 60% de todos los DRA adquiridos en el hospital (Rivosecchi et al., 2016). Entre los agentes tóxicos que causan DRA se encuentran los agentes quimioterapéuticos (como el cisplatino), antibióticos y agentes de radiocontraste.

1.6.2.3.1 DRA producido por el cisplatino

El cisplatino es un importante fármaco antineoplásico utilizado para el tratamiento de tumores sólidos. Su principal efecto secundario limitante de la dosis es la nefrotoxicidad (Dasari & Tchounwou, 2014; Yao et al., 2007), ya que después de una dosis única de cisplatino (50–100 mg/m²), aproximadamente un tercio de los pacientes desarrollan nefrotoxicidad (Ozkok & Edelstein, 2014).

El cisplatino se elimina por vía renal, por filtración glomerular y por secreción. Se acumula en las células renales, principalmente del segmento S3 del túbulo proximal, a las que entra por difusión facilitada o por transporte activo a través de los transportadores: CTR1 (transportador de cobre 1) y OCT2 (transportador de cationes orgánicos 2) (Miller et al., 2010; Sánchez-González et al., 2011; Yao et al., 2007). Se ha estimado que su concentración en las células tubulares proximales es 5 veces mayor que su concentración plasmática y, por ende, dicha acumulación de cisplatino en el riñón contribuye a su nefrotoxicidad (Ozkok y Edelstein, 2014).

INTRODUCCIÓN

1.6.2.3.2 *Otros agentes nefrotóxicos*

Varios agentes antimicrobianos se asocian comúnmente con el DRA. Los aminoglucósidos se filtran libremente a través del glomérulo y después se acumulan dentro de la corteza renal, donde las concentraciones pueden exceder en gran medida las del plasma. El DRA generalmente se manifiesta después de 5 a 7 días de terapia y puede presentarse incluso después de que se haya discontinuado el tratamiento (Longo et al., 2011).

La nefropatía inducida por contraste (NIC), una complicación muy conocida asociada con los medios de radiocontraste yodados, es una de las causas más comunes de DRA en el hospital. Los agentes de radiocontraste yodado intravenoso son necesarios para varios procedimientos de diagnóstico y radiología intervencionista (Pazhayattil & Shirali, 2014).

1.6.3 DRA posrenal

El DRA posrenal tiene lugar cuando el flujo de orina normalmente unidireccional se bloquea de forma aguda, parcial o totalmente, lo que aumenta la presión hidrostática retrógrada que interfiere con la filtración glomerular. La obstrucción del flujo urinario puede ser causada por trastornos funcionales o estructurales en cualquier lugar desde la pelvis renal hasta el final de la uretra. Una tasa de flujo urinario normal no descarta la presencia de obstrucción parcial, ya que la TFG es dos órdenes de magnitud más alta que la tasa de producción de la orina y para que ocurra el DRA en individuos sanos, la obstrucción debe afectar a ambos riñones, a menos que solo un riñón sea funcional (Longo et al., 2011).

1.7 Necrosis tubular aguda

La necrosis tubular aguda (NTA) es el término utilizado para designar el DRA intrínseco resultante del daño de los túbulos renales. Sus principales causas son la isquemia y la nefrotoxicidad (David P. Basile et al., 2012). Los principales aspectos moleculares y celulares de la NTA se han establecido en modelos animales (Lameire, 2005).

En humanos, los hallazgos destacados en las biopsias incluyen el desprendimiento de células epiteliales tubulares de la membrana basal, desprendimiento de células en el lumen tubular, pérdida del borde en cepillo en segmentos tubulares proximales, y la formación de cilindros urinarios (*urinary casts* en inglés) derivados de células desprendidas, desechos tubulares y proteínas (David P. Basile et al., 2012). A pesar

del término “necrosis tubular aguda”, las células necróticas no son un hallazgo común y, a menudo, solo existe una limitada evidencia histológica de lesión a pesar del marcado deterioro funcional (Lameire, 2005).

1.7.1 Causas de disminución de la TFG en la NTA

Existen dos componentes que son importantes en la disminución aguda de la TFG en la NTA: un componente vascular, que incluye la vasoconstricción intrarrenal con una caída de la presión de la filtración glomerular, congestión vascular en la médula externa y activación de la retroalimentación tubuloglomerular; y un componente tubular, que incluye obstrucción tubular, disminución de la reabsorción tubular e inflamación intersticial (Lameire, 2005). En cuanto a la componente vascular, los factores implicados en la misma incluyen la activación de la retroalimentación tubuloglomerular por aumento de la llegada de solutos a la mácula densa como consecuencia de la lesión del túbulo proximal, aumento del tono vascular basal y reactividad a los agentes vasoconstrictores y disminución de la capacidad de respuesta vasodilatadora (Longo et al., 2011).

Thureau y Boylan teorizaron la conexión entre la lesión tubular con una reducción en la capacidad de reabsorción tubular y una consecuente caída en la TFG. Postularon que la oliguria en el DRA debida a la reducción en la TFG mediada por la retroalimentación tubuloglomerular se produce como una adaptación funcional del riñón para defenderse de las pérdidas en el volumen extracelular cuando la reabsorción proximal se ve comprometida debido a una lesión tubular. Como más del 90% de la sal y el agua filtradas se reabsorbe, plantearon la hipótesis de que sin la presencia de retroalimentación tubuloglomerular, incluso una disminución moderada en la reabsorción proximal conduciría a pérdidas excesivas de electrolitos y agua (Rosen & Stillman, 2008; Singh & Okusa, 2011).

1.7.2 Clasificación

La NTA se divide en las siguientes fases (Figura 3) (Cuesta Apausa, 2019; David P. Basile et al., 2012; Hanif & Ramphul, 2018):

- *Fase de iniciación*: se caracteriza por una brusca disminución de la TFG y un incremento de los niveles plasmáticos de creatinina y urea que se debe a un daño en los túbulos.
- *Fase de extensión*: hay una amplificación del daño debido a una respuesta inflamatoria, con liberación de citosinas y quimiocinas, y a una hipoxia continuada como consecuencia de la reducción

del flujo renal. A lo largo de esta fase la TFG continúa disminuyendo y las células tubulares de la corteza externa empiezan a regenerarse.

- *Fase de mantenimiento:* en esta fase, se establece la reparación celular, hay apoptosis, migración y proliferación celular para recuperar la integridad tisular y funcional. La función celular mejora lentamente a medida que las células se reparan y reorganizan. Además, la TFG se estabiliza en un nivel determinado en función de la intensidad del daño inicial.
- *Fase de reparación:* es la continuación de la fase de mantenimiento, con diferenciación celular y restablecimiento de la polaridad celular, con una recuperación de la función renal.

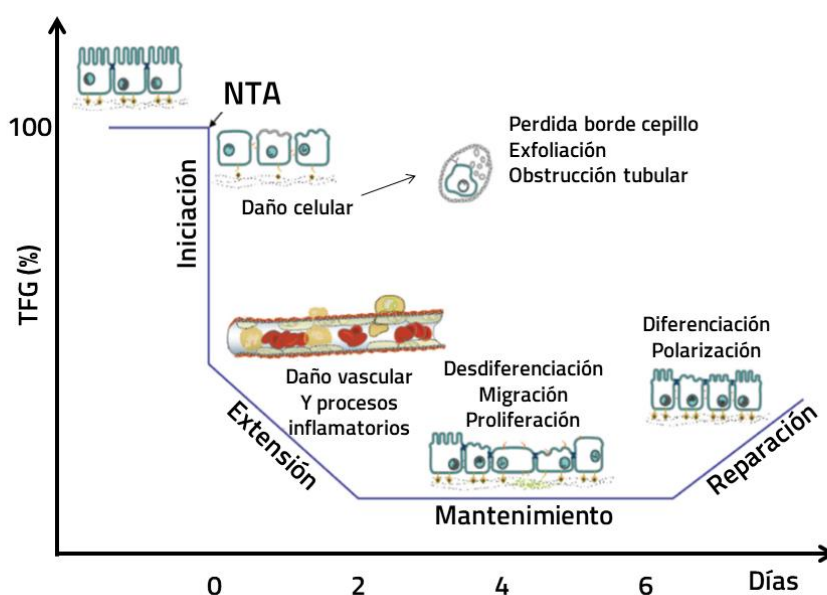


Figura 3: Fases de la NTA (Adaptado de Basile, Anderson y Sutton, 2012)

2 RECUPERACIÓN DEL DRA

2.1 Definición

En el pasado, la recuperación renal se definía a menudo como la independencia de la TRS tras un DRA que requiere diálisis (Macedo et al., 2008). Actualmente, a pesar de varias limitaciones, la definición más utilizada es la ausencia de criterios de DRA, es decir, ausencia de alteraciones en la CrP o el flujo urinario. Siendo así, la recuperación parcial podría definirse como un descenso a un estadio de DRA de menor gravedad (Forni et al., 2017; Göcze et al., 2017).

Existen tres problemas importantes para definir la recuperación del DRA: 1) el desconocimiento frecuente de la creatinina plasmática basal (CrPB), previa al episodio de DRA, 2) las limitaciones en la definición basada en la CrP y 3) el tiempo para evaluar la recuperación renal. A continuación, se explicará cada problema con mayor profundidad. Como acabamos de comentar, el problema principal es el desconocimiento de la CrPB (Göcze et al., 2017; MacEdo & Mehta, 2016). Idealmente, una CrPB debería reflejar el nivel de función renal en estado estacionario antes de la hospitalización (Macedo et al., 2008). Sin embargo, una proporción significativa de los pacientes no tiene una evaluación de CrP en los 3 a 12 meses previos (MacEdo & Mehta, 2016).

La función renal basal es relevante también para distinguir la no-recuperación de una ERC preexistente (Forni et al., 2017). Además, la recuperación puede subestimarse en pacientes con creatinina premórbida desconocida y sobreestimarse si se ignora la pérdida de masa muscular en pacientes críticos (Forni et al., 2017; Göcze et al., 2017). En ausencia de un valor de referencia, se pueden usar varios enfoques. El más común es el uso de la ecuación MDRD, recomendada por el grupo de trabajo ADQI. Esta estimación asume que los pacientes tienen un valor basal de TFG estimada de 75ml/min/1,73m^2 (Forni et al., 2017; Macedo et al., 2008). No obstante, estudios recientes han mostrado que los pacientes con valores de CrPB calculados tienen una menor recuperación completa comparado con aquellos con valores basales ya conocidos (Göcze et al., 2017).

El segundo problema que se mencionaba para definir la recuperación es la aplicación de los criterios de Cr. Factores como los extremos en la masa muscular o la ingesta de proteínas en la dieta pueden afectar la CrP independientemente de la función renal (Forni et al., 2017). Incluso pacientes que muestran una recuperación completa, según la evaluación basada en CrP, pueden tener pérdida de nefronas, ya que debe producirse la pérdida de más de la mitad de la función para que la CrP se altere, con una disminución en la reserva funcional renal (Goldstein et al., 2014; MacEdo & Mehta, 2016). La reserva funcional renal (RFR) describe la capacidad de los riñones para incrementar la TFG en respuesta a estímulos fisiológicos o patológicos. La cuantificación de la RFR puede resultar esencial para la detección temprana de la susceptibilidad del riñón a daño renal tanto agudo como crónico. Puede ser evaluada mediante diferentes tipos de pruebas de estrés renal. La reserva funcional glomerular se puede cuantificar mediante la carga

INTRODUCCIÓN

de proteínas orales o la infusión intravenosa de aminoácidos, y la respuesta tubular al estrés se puede evaluar con el test de estrés a la furosemida (TEF) (Göcze et al., 2017).

El último parámetro que dificulta la definición de recuperación renal es el tiempo en el que se evalúa, que debería estandarizarse. En la mayoría de los estudios los pacientes se dan por recuperados con el alta hospitalaria. Sin embargo, algunos estudios han mostrado como el tiempo de recuperación puede ser más largo y continuar después del alta hospitalaria (MacEdo & Mehta, 2016), por lo que podría ser demasiado precipitado dar por finalizado este proceso (Göcze et al., 2017). La recuperación renal puede ocurrir en pocas horas o días después del daño que conduce a DRA o mucho más tarde, en meses. Por este motivo, el grupo ADQI estableció el término Enfermedad Renal Aguda (ERA) para definir el curso de la enfermedad después del DRA y estandarizó el periodo mínimo de seguimiento a 3 meses después del DRA (periodo ERA) (MacEdo & Mehta, 2016). Este periodo se considera crítico para llevar a cabo intervenciones que modifiquen el curso natural de la enfermedad.

La ERA se define como el daño renal clínico o subclínico y/o la pérdida de la función renal que tiene una duración de entre 7 días y 3 meses desde la exposición a la causa que indujo a un DRA (Chawla et al., 2017). Esta definición reconoció las limitaciones potenciales de las definiciones puramente basadas en la CrP al introducir el concepto de daño subclínico. Tal fenotipo “subclínico” indica la presencia de daño del parénquima renal sin un aumento de la creatinina que puede existir antes o después de un episodio clínicamente manifiesto de DRA (Zoltán H. Endre, 2018). Por lo tanto, una definición ideal de recuperación debería tener en cuenta la masa y la función renal que se ha perdido, indicar cuándo la recuperación es completa y cuándo los mecanismos de daño se han detenido, y proveer una medida de la reserva renal y de biomarcadores para proporcionar una información pronóstica (Chawla et al., 2017).

2.2 Regeneración del riñón tras un DRA

Los riñones son órganos con capacidad regenerativa y en algunos casos pueden recuperarse por completo después de un DRA (Forni et al., 2017). El proceso de regeneración renal implica el reemplazo de epitelio perdido por la proliferación de células progenitoras. Sin embargo, el origen de estas células todavía es muy debatido (Coelho et al., 2018; Kramann et al., 2015). Se han estudiado cuatro posibilidades: a) las células madre derivadas de la médula ósea (BMSCs, del inglés *bone marrow stromal cells*) pueden llegar al epitelio

lesionado, replicarse y diferenciarse en nuevas células tubulares; b) existe una población de células madre fijas que puede reponer la población de células epiteliales después de la lesión; c) las células tubulares supervivientes pueden desdiferenciarse, proliferar y luego volver a diferenciarse en células tubulares maduras como respuesta de supervivencia al daño o d) más de una opción contribuye al proceso de regeneración.

2.2.1 Teoría de las células madre de la médula ósea

Una de las primeras hipótesis con respecto a las células responsables de la regeneración renal fue que estas células derivaban de la médula ósea. Algunos investigadores reportaron la incorporación de células de médula ósea previamente aisladas y marcadas en los túbulos proximales del riñón (Huls et al., 2008; Kale et al., 2003). No obstante, se reconoce que las técnicas utilizadas para la cuantificación de células madre derivadas de médula ósea marcadas generan falsos positivos. Los falsos positivos suelen ser causadas por leucocitos marcados (Huls et al., 2008).

Otros grupos demostraron la acción terapéutica de la administración de células madre para prevenir la progresión de la enfermedad y reparar el tejido renal dañado después del DRA (Duffield et al., 2005; P. Liu et al., 2014). Morigi et al. propusieron que la acción terapéutica de las BMSCs en ratones con DRA debería ser atribuible a los efectos paracrinós en las células renales dañadas a través de la producción de factores celulares que fueron capaces de estimular la proliferación de células tubulares e inhibir la apoptosis (P. Liu et al., 2014; Morigi et al., 2008).

2.2.2 Las células responsables del proceso de regeneración están en el interior del riñón

Actualmente, hay dos hipótesis principales con respecto a las células responsables de la regeneración renal (Figura 4). Ambas están de acuerdo en que la regeneración tubular ocurre dentro de los túbulos mismos; sin embargo, la célula de origen sigue siendo el centro del debate. Una hipótesis sugiere la existencia de una población de células progenitoras residentes en el riñón que, normalmente se encuentra en un estado de reposo y después de una lesión, volvería a ingresar al ciclo celular con el objetivo de reemplazar las células que se pierden debido al daño tubular.

La segunda afirma que cualquier célula del túbulo proximal puede adquirir propiedades similares a las células madre y se basa en el concepto de que la baja tasa de proliferación basal de las células tubulares

INTRODUCCIÓN

adultas no requiere una población de células madre. Este concepto está respaldado por la observación de que las células epiteliales completamente diferenciadas del túbulo proximal están en equilibrio en la fase G1 del ciclo celular, como si estuvieran listas para progresar en el ciclo en caso de lesión. En tal escenario, las células tubulares completamente diferenciadas sufrirían transitoriamente un ciclo de dediferenciación (Lombardi et al., 2016).

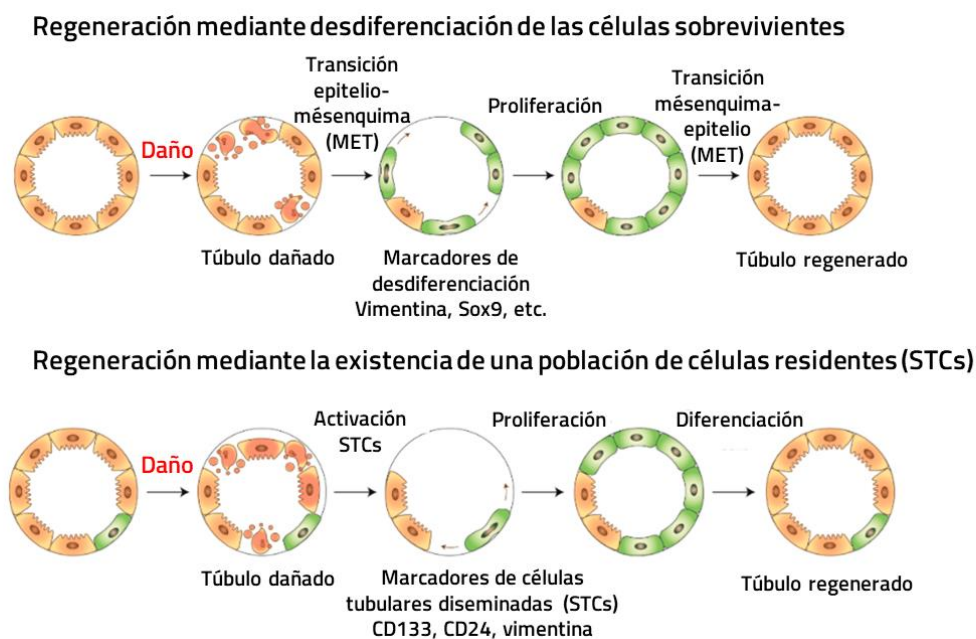


Figura 4: Las dos posibles fuentes de células responsables de la regeneración del tejido renal (Adaptado de Andrianova et al., 2019)

2.2.2.1 Células tubulares diseminadas en riñones de pacientes: ¿células progenitoras fijas o un fenotipo transitorio?

Existe una clara evidencia histológica de la presencia de una distinta población de células tubulares en riñones humanos sanos (Kramann et al., 2015; Lindgren et al., 2011; Ronconi et al., 2009; Sagrinati et al., 2006). En 2006, el grupo de Romagnani fue el primero en describir una población de células progenitoras localizadas entre las células epiteliales parietales (PECs) en la cápsula de Bowman y caracterizada por la expresión de marcadores reconocidos de células madre como CD133 y CD24 (Sagrinati et al., 2006). Después, Lindgren et al. aislaron células epiteliales CD24+ y CD133+ en base a su actividad aldehído deshidrogenasa de la corteza renal humana (Lindgren et al., 2011). Por sus características fueron

denominadas células tubulares diseminadas (STCs de sus siglas en inglés *scattered tubular cells*) (Hansson et al., 2014).

Estas células son más pequeñas, presentan menos mitocondrias, y expresan varias proteínas estructurales como vimentina, colágeno VII alfa 1 en comparación con las otras células del TP (Hansson et al., 2014). También son más resistentes a estímulos apoptóticos y factores nocivos y se ha demostrado que contribuyen a la regeneración renal tras inyectarse en ratones con inmunodeficiencia combinada severa ratones SCID (del inglés; *severe combined immunodeficient mice*) en los que se había inducido un DRA (Angelotti et al., 2012). Sin embargo, las STCs no se han encontrado en riñones sanos de rata, y solo se ha observado una proliferación después del daño (Smeets et al., 2013).

Es importante tener en cuenta que los marcadores típicos de células madre como CD133 y CD24 no están presentes en los riñones de los roedores. De hecho, la isoforma glicosilada de CD133 se expresa específicamente en STCs y PEC en seres humanos, pero no en roedores. Además, no hay anticuerpos disponibles para CD24 en riñones de roedores (Berger et al., 2014). Por lo tanto, Smeets et al. usaron vimentina como marcador de STCs de ratas porque también está presente en la población de células positivas para CD24/CD133 en túbulos de riñones humanos (Smeets et al., 2013).

Una posible explicación de por qué las células STCs están presentes en riñones sanos de humanos, pero no de roedores la dieron los mismos autores. Explicaron que los riñones humanos utilizados en el estudio eran de pacientes mayores y tenían un cierto grado de nefroesclerosis benigna y un daño tubular leve asociado con el procedimiento de nefrectomía, mientras que los riñones de rata provenían de animales libres de patógenos específicos perfectamente sanos (Smeets et al., 2013). Cualquier lesión, aunque sea leve, como la proteinuria de bajo grado, podría inducir el fenotipo STC (Berger & Moeller, 2014). Una explicación opuesta, que apoya a la teoría de la población progenitora preexistente, es que existe una diferencia entre las especies que puede atribuirse al tamaño del cuerpo y a la longevidad, y que los animales más pequeños como los roedores podrían no requerir la existencia de dicha población en condiciones normales (Kusaba & Humphreys, 2014; Romagnani, 2013).

La respuesta definitiva a la importante pregunta de si las STCs representan células progenitoras fijas o un fenotipo transitorio parece ser difícil de encontrar. El gran obstáculo es la diferencia en la expresión de

INTRODUCCIÓN

marcadores entre humanos y ratones, como los marcadores de células madre CD133 y CD24 que no están presentes en los riñones de los ratones, lo que dificulta la comparación del patrón de expresión de STCs entre estas dos especies (Krawczyk, 2018).

2.2.2.2 Teoría de la supervivencia al azar

Otros estudios también argumentan contra la idea de que la población de células diseminadas sea una subpoblación celular preexistente (progenitora) y consideran que solo las células epiteliales diferenciadas son responsables de la regeneración tubular. En un estudio de 2011, Humphreys et al. demostraron que la reparación de los túbulos proximales no requiere una célula progenitora especializada. Después de una lesión, surgen nuevas células epiteliales a través de la replicación de las células supervivientes (Humphreys et al., 2011; Lombardi et al., 2016). Del mismo modo, Kusaba y cols. argumentan que las células que expresan el transportador de fosfato SLC34a1, presente solo en células completamente diferenciadas, son responsables de la regeneración. Los autores sugieren que las células TP pueden sufrir dediferenciación transitoria, y durante este periodo expresan marcadores de células madre como CD133 y CD24 e impulsan la regeneración (Kramann et al., 2015; Kusaba et al., 2014).

En dos importantes estudios, (Kang et al., 2016; Kumar et al., 2015), los autores utilizaron un enfoque de rastreo de linaje para analizar la fuente principal de células que contribuyen a la regeneración renal. Para este propósito, se centraron en Sox, una familia de factores de transcripción que participan en el desarrollo de los órganos, incluido el riñón. Descubrieron que la expresión de Sox9 se regula rápidamente después del daño, lo que representa una respuesta transcripcional temprana al daño renal agudo (DRA) y encontraron solo una expansión insignificamente pequeña de células tubulares residentes Sox9+ (Kumar et al., 2015). Sin embargo, encontraron una inducción significativa de Sox9 en las células supervivientes, que representan la fuente principal para la regeneración del compartimento tubular (Kumar, 2018).

En conclusión, sigue habiendo controversia en cuanto a la identidad de las células responsables de la reparación epitelial tras un daño renal. Las células epiteliales renales supervivientes ahora prevalecen como la fuente más relevante para la regeneración del tejido renal. Se propone que estas células terminalmente diferenciadas tienen la plasticidad para dediferenciarse y adquirir propiedades mitóticas y transdiferenciarse en otras células maduras (Coelho et al., 2018). Sin embargo, la nefrona podría poseer

múltiples mecanismos de reparación, lo que es una posibilidad importante a tener en cuenta. Por ejemplo, aunque todas las células epiteliales podrían ser capaces de dediferenciarse y proliferar, esta capacidad no descarta la existencia de una subpoblación de células competentes para la replicación que puede proliferar más rápido, o en respuesta a un estímulo de daño diferente y tal vez incluso contribuir a la mayor parte de las células nuevas durante la reparación renal (Chang-Panesso & Humphreys, 2017).

3 RECUPERACIÓN DEFICIENTE

Tras un daño renal, se pone en marcha una respuesta adaptativa para restaurar la normal homeostasis celular y tisular. No obstante, cuando la lesión es grave o prolongada, esta respuesta puede ser defectuosa y dar lugar a alteraciones celulares y tisulares prolongadas o permanentes (Zuk & Bonventre, 2016). Los mecanismos involucrados son, principalmente: la parada del ciclo celular en la fase G2/M, la inflamación persistente, la rarefacción vascular y la fibrosis intersticial (Figura 5) (Ferenbach & Bonventre, 2015; L. Yang et al., 2011).

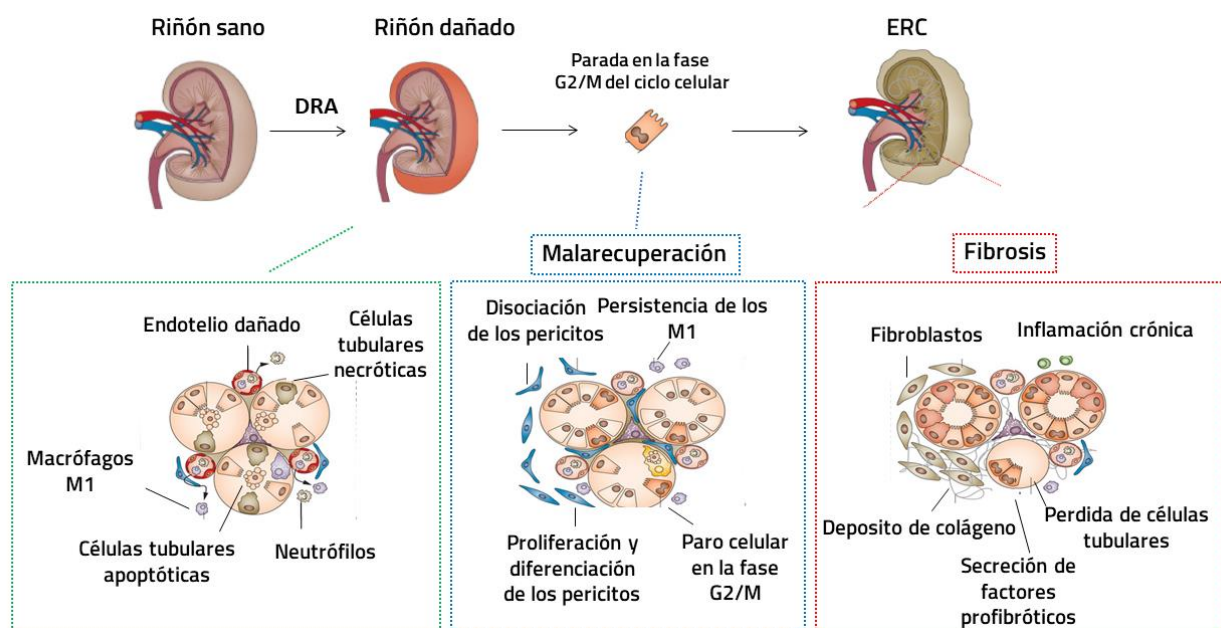


Figura 5: Mecanismos de recuperación deficiente tras un DRA (adaptado de Zuk & Bonventre, 2016).

3.1 Inflamación persistente

La inflamación es una importante respuesta protectora a las lesiones y desempeña un papel crucial en la regeneración del tejido. Tras un daño tisular, hay una liberación de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés *pathogen-associated molecular pattern*), patrones moleculares asociados al daño (DAMPs, del inglés *damage-associated molecular pattern*) y especies reactivas de oxígeno (ERO) en el epitelio (Karin & Clevers, 2016). En un contexto de DRA, los DAMPs incluyen componentes de restos celulares, así como componentes de matriz extracelular (Zuk & Bonventre, 2016).

Lo primero que se activa es el sistema inmunitario innato (Coelho et al., 2018). Las células inmunitarias innatas (que incluyen neutrófilos, macrófagos, células dendríticas (CD), células asesinas naturales (NK, del inglés *natural killer*), mastocitos, eosinófilos y basófilos) expresan receptores de reconocimiento de patrones (PPRs, del inglés *pattern recognition receptors*), como los receptores de tipo Toll (TLR, del inglés *toll-like receptor*), que reconocen DAMPs (Coelho et al., 2018). Esta unión lleva a la producción de citocinas (factor de necrosis tumoral (TNF, del inglés *tumor necrosis factor*), interleucinas) que desencadenan vías de señalización en las células epiteliales dañadas que culminan en la activación de factores de transcripción (AP-1 y NF- κ B, etc.). Posteriormente, estos generan una respuesta regenerativa al inducir genes que codifican factores de crecimiento, estimulan la progresión del ciclo celular, previenen la muerte celular, promueven la desdiferenciación y mejoran la movilidad y la migración celular (Karin & Clevers, 2016).

Estas respuestas son complejas, pero parecen ser componentes integrales de una respuesta de reparación orquestada (Manjeri A. Venkatachalam et al., 2010). Sin embargo, cuando la lesión es grave o sostenida, como ya se ha mencionado el equilibrio apunta a respuestas maladaptativas que conducen a inflamación crónica y fibrosis (Zuk & Bonventre, 2016).

Los macrófagos juegan un papel central tanto en la lesión renal como en su reparación (Takaori & Yanagita, 2016). Los macrófagos pueden diferenciarse en distintos fenotipos dependiendo del entorno tisular local en el que se encuentran. Por ejemplo, los factores liberados por patógenos o por células necróticas conducen a la polarización de los macrófagos hacia el fenotipo proinflamatorio "M1". En cambio, la fagocitosis de las células apoptóticas y otras señales antiinflamatorias favorecen la polarización de los macrófagos hacia el fenotipo antiinflamatorio "M2". Por último, cuando el microambiente renal se vuelve

dominado por factores de crecimiento y citocinas profibróticas como el TNF- β liberado del epitelio dañado, el fenotipo profibrótico "M2" se convierte en el predominante (Anders & Ryu, 2011).

Dependiendo de la expresión de la proteína Ly6C en la superficie de los macrófagos, se han identificado tres poblaciones, cada una con una firma genética única (Zuk & Bonventre, 2016):

- La población con expresión alta de Ly6C son macrófagos M1 que aparecen durante la fase de daño agudo y producen moléculas proinflamatorias. La persistencia de estos macrófagos estimula la entrada de más células inflamatorias, activando la cascada inflamatoria que contribuye al daño tisular (Coelho et al., 2018). La depleción de macrófagos M1 en ratones previa al daño está asociada a protección renal (S. Lee et al., 2011).
- La población con expresión intermedia de Ly6C son macrófagos M2 presentes durante la fase de reparación. Secretan distintos compuestos, incluyendo factores de crecimiento, fibronectina, Wnt-7b e IL-10, todos ellos ayudando a la proliferación y reparación epitelial y, su depleción previa al daño se asocia con un daño renal prolongado (Ferenbach & Bonventre, 2015).
- La población con expresión baja de Ly6C también son macrófagos M2, pero con un fenotipo profibrótico. Estos últimos secretan grandes cantidades de factor de crecimiento tumoral- β (TNF- β) y otras citocinas profibróticas y dominan durante la fase de progresión. La infiltración sostenida de macrófagos M2 está asociada al fenotipo profibrótico y puede contribuir a la progresión a ERC (Takaori & Yanagita, 2016). De hecho, el número de macrófagos M2 infiltrados correlaciona con el grado de fibrosis intersticial en muestras de biopsias renales de nefropatía IgA (Takaori & Yanagita, 2016) y pacientes con ERC (Zuk & Bonventre, 2016).

3.2 Parada del ciclo celular

La reparación maladaptativa de las células tubulares puede ocurrir cuando las células epiteliales no consiguen rediferenciarse por completo o se detiene el crecimiento en la fase G2 (David P Basile et al., 2016). Yang et al. caracterizaron la progresión del ciclo celular en el tiempo en cinco modelos in vivo de DRA y encontraron una fuerte correlación entre la parada en G2/M en células tubulares y el estado fibrótico (L. Yang et al., 2010). Demostraron que el túbulo proximal que se detiene en el punto de control G2/M activa la señalización de la quinasa c-jun NH2 terminal, y regula la producción de citocinas profibróticas, como

INTRODUCCIÓN

TGF β 1 y el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF, del inglés *connective tissue growth factor*), mientras que la inhibición farmacológica de la parada del ciclo celular en G2/M y de p53 (una proteína reguladora del ciclo celular) atenúa la fibrosis (L. Yang et al., 2011).

Es posible que la reparación normal no-fibrótica dependa de la dediferenciación eficiente de las células epiteliales supervivientes, que depende a su vez de una disminuida activación de la vía p53-p21 (L. Yang et al., 2010). La parada celular en G2/M representa un importante interruptor molecular que puede diferenciar la normal reparación de una respuesta profibrótica al daño renal (L. Yang et al., 2010). Recientemente, los biomarcadores de detención del ciclo celular como el factor de crecimiento insulínico tipo 7 (IGFBP-7, del inglés, *insulin-like growth factor-binding protein 7*) y el inhibidor tisular de las metaloproteinasas-2 (TIMP2, del inglés, *tissue inhibitor of metalloproteinases 2*) en la orina han demostrado ser útiles para detectar DRA en humanos (Takaori & Yanagita, 2016).

3.3 Rarefacción capilar peritubular

La pérdida de capilares peritubulares es otro hallazgo común tras un DRA (Takaori & Yanagita, 2016). Se ha demostrado que el DRA produce una disminución de la expresión de factores de angiogénesis, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, del inglés *vascular endothelial growth factor*), así como el desprendimiento de pericitos de los vasos, lo que lleva a un fallo en la regeneración de las células endoteliales y a una significativa rarefacción de los capilares peritubulares (Devarajan & Jefferies, 2016).

A diferencia de las células del túbulo proximal, las células vasculares renales tienen una menor capacidad de reparación, lo que puede conducir a una reducción persistente de la densidad vascular tras un daño agudo o crónico (Afsar et al., 2018).

3.4 Fibrosis

La fibrosis tubulointersticial es una característica clave de la respuesta maladaptativa después de un DRA (Duffield, 2014). La fibrosis es la acumulación excesiva de matriz extracelular (MEC) por miofibroblastos que puede llevar a una alteración de la arquitectura del tejido y a la pérdida de la función del órgano. La MEC intersticial está compuesta principalmente por colágeno I y III, así como por una miríada de otras proteínas, que incluyen la elastina y una forma alternativa de *splicing* de fibronectina con un dominio adicional A (EDA-

fibronectina) que es importante para la diferenciación de miofibroblastos inducida por TGF- β 1 (Jun & Lau, 2018).

En el riñón, la fuente de los fibroblastos intersticiales responsable de la deposición de tejido cicatricial ha sido un tema de debate. Los posibles candidatos incluyen progenitores circulantes (fibrocitos), transición epitelio-mesénquimal (EMT) y, más recientemente, pericitos renales o fibroblastos perivasculares (Ferenbach & Bonventre, 2015). Aunque las células derivadas de la médula ósea no parecen ser los principales contribuyentes a la transdiferenciación directa a miofibroblastos en el riñón, al igual que los macrófagos, pueden funcionar de manera paracrina para promover la cicatrización renal (Ferenbach & Bonventre, 2015). El papel de la transición epitelio-mesénquimal (EMT) como fuente de miofibroblastos ha generado mucho interés. No hay evidencias de transdiferenciación de células epiteliales a fibroblastos, pero la EMT puede contribuir a la fibrosis mediante la liberación de citocinas profibróticas que exacerban la activación y fibrogénesis de miofibroblastos (Ferenbach & Bonventre, 2015).

Varios estudios han demostrado que los fibroblastos y pericitos residentes son los principales contribuyentes a la fibrosis (Takaori & Yanagita, 2016). En los riñones sanos en adultos, los fibroblastos están situados en el espacio intersticial entre los capilares y el epitelio. Poseen múltiples procesos celulares, que los conectan a las membranas basales tubulares y capilares estabilizando la arquitectura del tejido. Tras la activación por las citocinas profibróticas y el estrés mecánico in vivo, los fibroblastos adquieren un fenotipo miofibroblástico (Y. Liu, 2011). Por su parte, los pericitos son un subconjunto de las células del estroma que cubren parcialmente las paredes capilares, estabilizando así el endotelio (Y. Liu, 2011). Cuando hay un daño endotelial, se separan del endotelio, migran y proliferan y se diferencian en miofibroblastos (Zuk & Bonventre, 2016).

3.4.1 Daño tubular y fibrosis

El túbulo proximal es el principal lugar de daño durante un DRA intrínseco, y varios grupos de investigación han sugerido que los túbulos proximales dañados tienen un papel importante en la progresión de la enfermedad (Manjeri A. Venkatachalam et al., 2015).

Los avances en biología molecular han hecho posible la generación de animales transgénicos susceptibles al daño selectivo de tipos celulares particulares como las células epiteliales tubulares renales, sin daño

INTRODUCCIÓN

asociado a los capilares circundantes, pericitos y otras células cercanas (Ferenbach & Bonventre, 2015). Se ha demostrado que el daño selectivo del túbulo proximal causa la transición de fibroblastos a miofibroblastos alrededor de los túbulos proximales dañados, provocando fibrosis (Takaori & Yanagita, 2016).

3.4.2 Resolución de fibrosis

A pesar de que se pensaba que la fibrosis era irreversible, ahora hay una creciente evidencia que sugiere que la fibrosis es reversible bajo ciertas circunstancias (Jun & Lau, 2018). El proceso de resolución de fibrosis está poco estudiado en el riñón, posiblemente debido a la falta de modelos animales adecuados (Duffield, 2014). Sin embargo, diferentes estudios encontraron que la fibrosis (Fioretto et al., 1998; Takaori et al., 2016) y glomeruloesclerosis (Aldigier et al., 2005) son reversibles.

Para que esta resolución sea efectiva se requieren tres componentes críticos: (a) erradicación de la causa del daño; (b) degradación y eliminación de la MEC fibrótica; y (c) eliminación de los miofibroblastos fibrogénicos.

Las enzimas más importantes que contribuyen a la vía extracelular de la degradación de colágeno son las metaloproteinasas de la matriz (MMP), una familia de endopeptidasas dependientes de Zn^{++} y Ca^{++} producidas por un amplio espectro de tipos celulares. No obstante, algunas MMPs pueden promover la fibrosis a través de actividades no relacionadas con la degradación directa de la ECM. Las actividades de MMP se inhiben por inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs) mediante su unión en una relación estequiométrica 1:1 (Jun & Lau, 2018).

Otro componente crítico en el metabolismo de la MEC es la función de los macrófagos. En el estado de resolución, los macrófagos fibrolíticos promueven la eliminación de la MEC innecesaria. Los macrófagos pueden digerir dichos depósitos de MEC mediante la secreción de MMPs (Anders & Ryu, 2011).

3.4.3 Fibrosis progresiva

Por si misma, la respuesta fibrótica es esencialmente una respuesta limitada que restringe el daño. El daño a los túbulos se asocia con fibrosis a su alrededor mientras que el intersticio circundante permanece

normal. Por tanto, dicha fibrosis no se expande de forma autónoma o invade el tejido normal (Manjeri A. Venkatachalam et al., 2015).

Sin embargo, la fibrosis renal puede progresar cuando ocurren lesiones adicionales en una estructura previamente dañada (David P Basile et al., 2016), o cuando el grado de fibrosis solo es lo suficientemente severo para establecer un círculo vicioso progresivo con la hipoxia (Tanaka et al., 2014). Cuando el proceso fibrótico progresa, al igual que después de una lesión grave, el colágeno secretado forma estructuras más rígidas y resistentes a la degradación proteolítica mediante la formación de enlaces cruzados catalizados por la lisil oxidasa (LOX) y la transglutaminasa tisular (TG2) que puede dificultar la resolución del proceso fibrótico (Jun & Lau, 2018).

Múltiples eventos celulares y moleculares, como la atrofia tubular, la rarefacción microvascular y la hipoxia tisular, promueven la formación de cicatrices y la progresión de la fibrosis (Y. Liu, 2011). Un fallo en la rediferenciación de células epiteliales tubulares puede resultar en una producción sostenida de factores de crecimiento y moléculas profibróticas. Cuando el microentorno renal se vuelve dominado por factores profibróticos, como ya se ha discutido anteriormente, el fenotipo profibrótico M2 se convierte en el predominante (Anders & Ryu, 2011) representando una fuente adicional de factores profibróticos (David P Basile et al., 2016).

Las señales paracrinias derivadas del entorno local del daño impulsan la expansión y el mantenimiento de las condiciones profibróticas (Y. Liu, 2011). Además, la pérdida de capilares peritubulares después un DRA genera una hipoxia local severa que dificulta la regeneración de los túbulos y promueve la fibrosis. La fibrosis tubulointersticial, a su vez, agrava la hipoxia ya que la fibrosis aumenta la distancia entre los capilares y las células tubulares epiteliales, lo que reduce la eficiencia de difusión de oxígeno. Por tanto, en estas condiciones la hipoxia y la fibrosis tubulointersticial forman un círculo vicioso que resulta en una fibrosis progresiva (Takaori & Yanagita, 2016) (Figura 6).

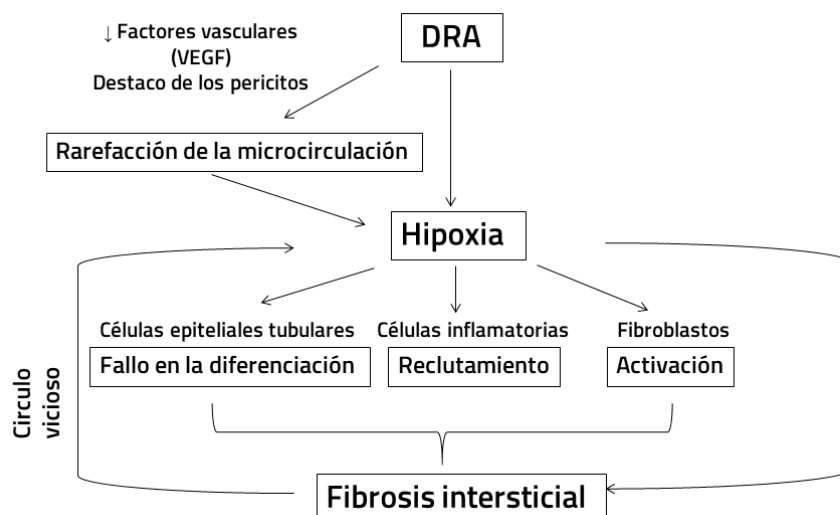


Figura 6: Círculo vicioso entre hipoxia y fibrosis (adaptado de Takaori & Yanagita, 2016).

4 LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA

4.1 Definición

La enfermedad renal crónica se define en la guía KDIGO 2012 como una “anormalidad en la estructura o función del riñón, presente por más de tres meses, con implicaciones para la salud” (J. a Kellum et al., 2012).

Por lo tanto, la ERC se define por una de las siguientes condiciones:

- Anormalidades estructurales o funcionales en el riñón, con o sin disminución en la TFG según a) anormalidades patológicas o b) marcadores de daño renal, incluidas anormalidades en la sangre u orina, o anormalidades observadas en imágenes.
- TFG < 60 ml/min/1,73m², con o sin daño renal.

Cabe señalar que incluso los individuos con función renal normal están incluidos en la definición de ERC si tienen evidencias de daño renal persistente, como anormalidades en la orina (p. ej. proteinuria o hematuria persistentes), en biopsia renal o pruebas de imagen (Devarajan & Jefferies, 2016).

Los resultados de diversos estudios clínicos y experimentales sugieren un rol importante rol de la proteinuria en la patogénesis de la progresión de la enfermedad. Por ello, para la evaluación del riesgo de progresión se utiliza un sistema de clasificación basado en la TFG y en la albuminuria (Figura 6). En este

sistema se divide la TFG en seis categorías (de G1 a G5 con el G3 dividido en 3a y 3b): 90-105 ml/min/1,73m² (G1), 60-89 ml/min/1,73m² (G2), 45-59 ml/min/1,73m² (G3a), 30-44 ml/min/1,73m² (G3b), 15-29 ml/min/1,73m² (G4), y menos de 15ml/min/1,73m² (G5). En cuanto a la albuminuria se utilizan 3 estadios en función del nivel de albuminuria (A1, A2, A3) (Figura 7) (Andrew S. Levey & Coresh, 2012).

Los primeros estadios de la ERC no se asocian normalmente con ningún síntoma de disminución de la TFG. Sin embargo, cuando esta disminución progresa como ocurre a estadios más altos, las complicaciones clínicas y las alteraciones en los parámetros analíticos se hacen más prominentes. Prácticamente, todos los sistemas orgánicos se ven afectados, pero las complicaciones más evidentes incluyen anemia y fatiga asociada a esta; disminución del apetito con malnutrición progresiva; anormalidades en el calcio, fósforo y hormonas reguladoras de minerales, como el calcitriol, la hormona paratiroidea (PTH) y el factor de crecimiento de fibroblastos 23 (FGF-23); y anormalidades en el sodio, potasio, agua y la homeostasis ácido-base (Longo et al., 2011).

El término "fallo renal crónico" (del inglés, *chronic renal failure*) aplica al proceso de reducción continua, significativa e irreversible en el número de nefronas y generalmente corresponde a una TFG menor de 15ml/min/1,73m², o la necesidad de tratamiento con diálisis o trasplante (Andrew S. Levey & Coresh, 2012).

Por su parte, el término "enfermedad renal en etapa terminal" (ESRD del inglés, *end stage renal disease*) representa la etapa de ERC donde la acumulación de toxinas, fluidos y electrolitos normalmente excretados por los riñones resulta en síndrome urémico. Este síndrome conduce a la muerte a menos que las toxinas sean eliminadas mediante terapia de reemplazamiento renal, diálisis o trasplante de riñón (Longo et al., 2011).

La distinción entre DRA y ERC es importante para un diagnóstico y tratamiento adecuados. La distinción es sencilla cuando la concentración reciente de CrPB está disponible, pero más difícil en aquellos casos en que se desconoce. En tales casos, las pistas sugestivas de ERC pueden provenir de estudios radiológicos o pruebas de laboratorio como la anemia normocítica o el hiperparatiroidismo secundario con hiperfosfatemia e hipocalcemia, consistente con la ERC. Sin embargo, ningún conjunto de pruebas puede

INTRODUCCIÓN

descartar el DRA superpuesto a la ERC, ya que el DRA es una complicación frecuente en pacientes con ERC, lo que dificulta aún más la distinción. No obstante, los análisis de sangre en serie que muestran un aumento sustancial continuo de CrP en un periodo de tiempo corto son una clara evidencia de DRA (Longo et al., 2011).

				Albuminuria (mg/g)				
				A1		A2	A3	
				Óptima y Normal-alta		Alta	Muy Alta y nefrótica	
				<10	10-29	30-299	300-1999	>2000
Etapas de la ERC según su TFG (ml/min por cada 1.73 m ²)	G1	TFG normal	>105					
			90-104					
	G2	Leve descenso	75-89					
			60-74					
	G3a	Leve-moderado	45-59					
	G3b	Moderado-severo	30-44					
	G4	Severo	15-29					
	G5	Diálisis	<15					

Figura 7: Prognosis de la ERC mediante la TFG y la albuminuria (Adaptado de Levey y Coresh, 2012).

4.2 Epidemiología y factores de riesgo

La ERC es un gran problema para los sistemas de salud que afecta alrededor del 11% de la población mundial (Nogueira et al., 2017; Wang et al., 2019). En un estudio de Global Burden of Disease, la ERC se ubicó en el puesto 18 de la lista global de causas de muerte, con un rápido aumento desde el puesto 27 en 20 años (Lozano et al., 2012). Se estima que esta enfermedad afecta a alrededor de 600 millones de personas en todo el mundo, con números que aumentan a un ritmo rápido (Couser et al., 2011). En los Estados Unidos, la prevalencia de las etapas 1-5 de la ERC (sin incluir la ESRD) de 2011 a 2014 se estimó en 14,8%, siendo la etapa 3 la más prevalente (Saran et al., 2017).

En los países desarrollados, la ESRD es un importante generador de costes para los sistemas de atención médica, con un crecimiento anual de programas de diálisis que oscila entre el 6% y el 12% en las dos últimas décadas y continúa creciendo, particularmente en los países en vías de desarrollo (Couser et al., 2011). Por este motivo, es importante identificar los factores que incrementan el riesgo de la ERC, incluso en

individuos con TFG normal. Estos factores incluyen hipertensión, diabetes mellitus, enfermedad autoinmune, mayor edad, ancestros africanos, historial familiar de enfermedad renal, episodios previos de daño renal agudo, presencia de proteinuria, sedimentos urinarios anormales o anomalías estructurales en el tracto urinario.

5 CONEXIÓN ENTRE DRA Y ERC

5.1 Evidencia epidemiológica

Los diagnósticos de DRA y ERC se abordan generalmente como dos entidades clínicas diferentes. No obstante, estas enfermedades están entrelazadas de forma única y se consideran cada vez más síndromes interconectados (Devarajan & Jefferies, 2016). Los estudios observacionales han demostrado que el DRA conduce a una ERC nueva, la progresión de una ya existente, un mayor riesgo a largo plazo de ESRD y un exceso de mortalidad (Chawla & Kimmel, 2012).

La primera revisión sistemática y estudio de meta-análisis sobre la asociación de DRA con ERC y ESRD mostró un aumento de 8,8 veces en el riesgo de ERC y de 3,3 veces en el riesgo de ESRD en pacientes que sobrevivieron a DRA después del alta hospitalaria (Coca et al., 2012). Además, varios hallazgos sugieren que el DRA está directamente relacionado con la ERC. En primer lugar, la mayor gravedad y frecuencia de DRA está relacionada con el desarrollo de ERC. En segundo lugar, el DRA está asociado independientemente con el desarrollo de ERC, después de tener en cuenta factores de riesgo de la ERC, como diabetes e hipertensión (Chawla et al., 2014).

Se han identificado numerosos factores de riesgo asociados con el continuo DRA-ERC, como la tasa de filtración glomerular basal estimada (eTFG), mayor edad, diabetes, proteinuria, duración y gravedad del DRA y episodios recurrentes del mismo (Macedo & Mehta, 2019). La vejez, como se acaba de comentar, es un factor de riesgo relevante en la progresión después de un DRA (Sato & Yanagita, 2018). Ishani et al. evaluaron el riesgo de ESRD después de un DRA en pacientes hospitalizados mayores de 67 años. En un grupo de 233.803 pacientes, aquellos con ERC tuvieron un aumento de 8 veces en el desarrollo de ESRD, mientras que aquellos con DRA tuvieron un aumento de 13 veces. En particular, los pacientes con DRA y

INTRODUCCIÓN

ERC tuvieron un aumento de 41 veces en comparación con aquellos sin antecedentes de ninguna de estas enfermedades (Ishani et al., 2009).

Por otro lado, diferentes estudios han demostrado que los pacientes dados de alta después de un DRA tienen riesgo de volver a ser hospitalizados por un nuevo episodio de DRA (Macedo & Mehta, 2019). En un estudio reciente, Liu et al. analizaron un grupo de 429.852 adultos que fueron hospitalizados entre 2006 y 2013. Identificaron DRA en el 9% de los pacientes durante la hospitalización, de los cuales el 28,6% experimentaron un segundo episodio de DRA. También encontraron que varias características de los pacientes, como vejez, raza negra, etnia hispana y bajo índice de masa corporal, se asociaban con un mayor riesgo de DRA recurrente (K. D. Liu et al., 2019).

Para evitar la clasificación errónea debido a la no distinción de un nuevo episodio de DRA de uno preexistente no resuelto, definieron DRA recurrente como la rehospitalización con un aumento del nivel de CrP $\geq 0,3\text{mg/dL}$ en 48 horas durante la readmisión o $\geq 50\%$ sobre el nivel de CrPB en los últimos 365 días. Si este último no estaba disponible, se definía usando solo un aumento del nivel de CrP $> 0,3\text{mg/dL}$ en 48 horas durante la hospitalización (K. D. Liu et al., 2019). Estas definiciones limitaron el análisis a los pacientes que demostraban un aumento en el nivel de CrP, reflejando DRA adquirido en el hospital, pero excluyendo a los pacientes con un nivel de CrP elevado en su ingreso que disminuye durante la hospitalización.

Este estudio de Liu et al. respalda la necesidad de realizar esfuerzos para controlar el DRA, no solo durante la hospitalización, sino también después del alta, ya que los datos de diversas fuentes muestran que el seguimiento programado después de un DRA es poco frecuente, y los nefrólogos atienden a una proporción muy pequeña de pacientes en los 3 meses posteriores al alta (Macedo y Mehta, 2019).

Los factores de conexión entre DRA y ERC se muestran en la Figura 8.

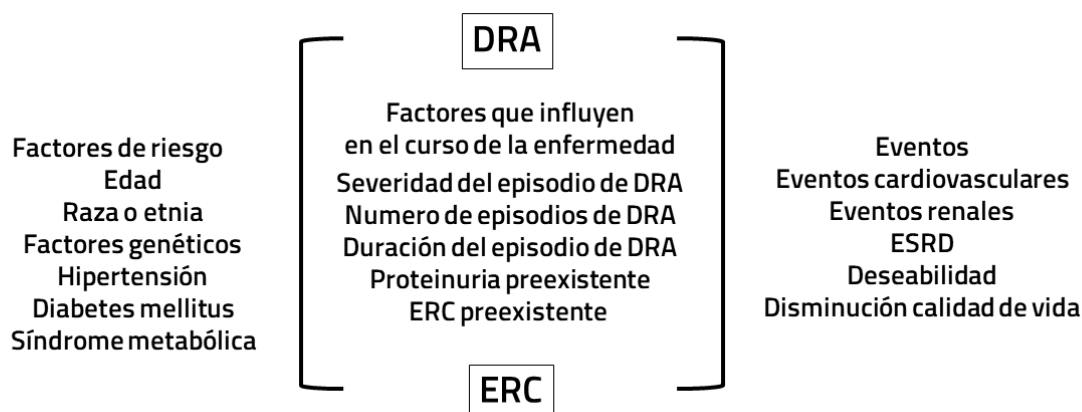


Figura 8: Factores de conexión entre DRA y ERC (Adaptado de Chawla y cols., 2014).

5.2 Evolución de la función renal después del DRA

Después de un daño, se ponen en marcha una mezcla de procesos de reparación adaptativos y maladaptativos casi simultáneamente, y el resultado neto de ambos mecanismos determinará el curso clínico posterior (Sato & Yanagita, 2018). Los riñones pueden modular la TFG y otras funciones renales en respuesta a una mayor demanda para mantener la homeostasis cuando se exponen a estrés. Cuando el daño es leve, la reserva renal puede compensarlo evitando cambios funcionales detectables en la CrP (DRA subclínico).

Cuando el daño es lo suficientemente grave como para resultar en un DRA detectable clínicamente, existen 3 escenarios posibles: una reversión rápida al nivel basal en las 48 horas (Figura 9, línea A); una elevación persistente en el nivel de CrP durante más de 48 horas (Figura 9, línea B) que puede bien resolverse en 7 días (línea B1), o bien continuar como enfermedad renal aguda (ERA) durante 7 a 90 días (línea B2); y una no recuperación con progresión a ERC a los 90 días (Figura 9, línea C). Cada una de estas trayectorias puede ocurrir con un episodio de novo de DRA o DRA superpuesto con ERC preexistente (Macedo & Mehta, 2019).

Según los niveles de CrP, incluso los pacientes con una supuesta recuperación completa de la función renal (línea A) tienen un mayor riesgo de progresión a ERC, eventos cardiovasculares y mortalidad. Además, están en riesgo de rehospitalización y de sufrir nuevos episodios repetidos de daño renal. Cada episodio de recurrencia se asocia con un mayor riesgo de progresión a ERC avanzada (Macedo & Mehta, 2019).

INTRODUCCIÓN

Por otro lado, es posible que después de un daño haya un cierto grado de reparación maladaptativa, que conduzca a una reducción en la reserva de la función renal. Dependiendo de la gravedad, esta reducción puede o no ser detectable como un aumento de CrP (Figura 9 C). Sin embargo, los riñones se vuelven más susceptibles a otros daños y pueden desarrollar DRA clínicamente evidente incluso ante una exposición leve.

En cuanto a la no recuperación, su sello distintivo es el desarrollo de fibrosis y cicatrización. Cuando el DRA se superpone con la ERC con una reserva mínima, la respuesta fibrótica se exagera, ya que los mecanismos de reparación ya están agotados, y las lesiones adicionales provocan una mayor separación entre los dos procesos (Figura 10 C)(David P Basile et al., 2016).

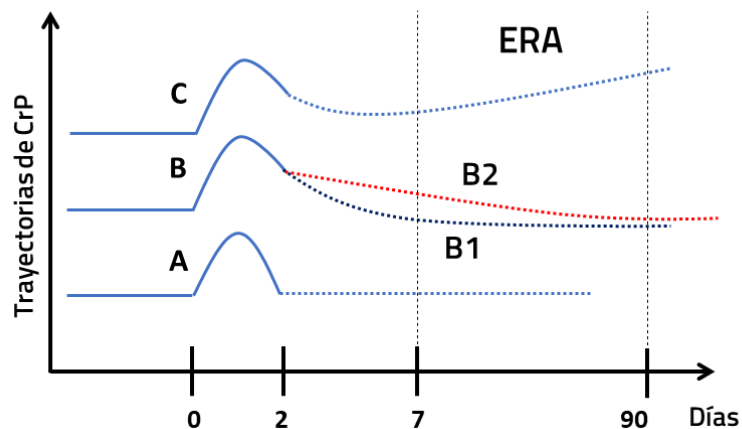


Figura 9: Posibles trayectorias de la CrP tras un DRA (adaptado de Macedo & Mehta, 2019). En la trayectoria **A** la CrP vuelve a valores normales las 48h después del DRA. La trayectoria **B** se divide en dos: en B1 la CrP vuelve a valores normales en un periodo entre 2 y 7 días; en B2 la CrP vuelve a valores normales en el periodo ERA (7-90 días). En la trayectoria **C** la CrP nunca vuelve a valores basales después el DRA y progresa negativamente.

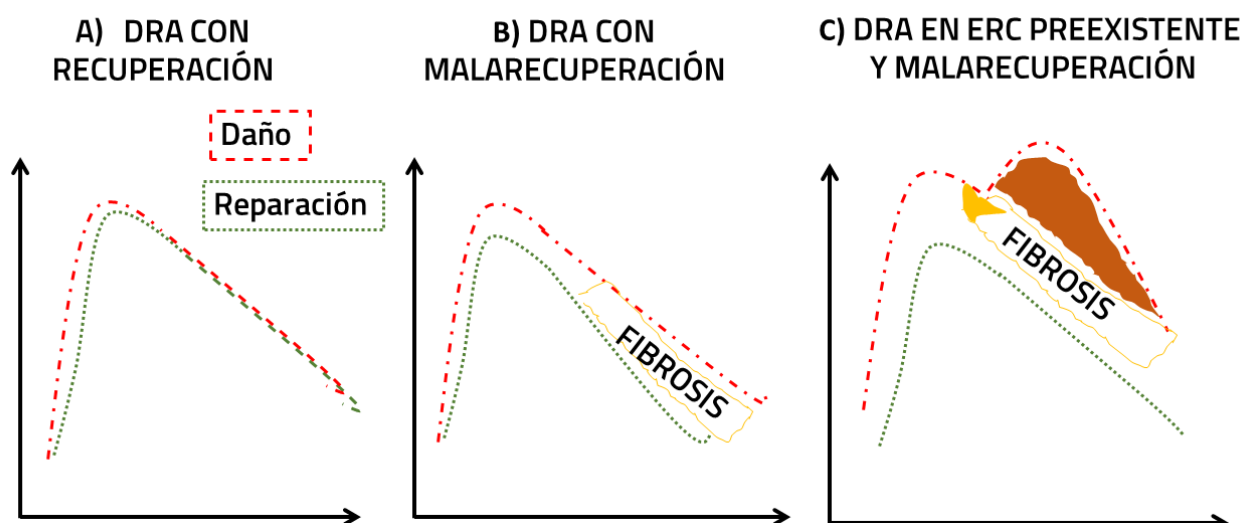


Figura 10: Ilustración conceptual de lo que puede ocurrir tras un DRA (adaptado de Basile et al., 2016). Cuando la recuperación es completa tras un DRA no quedan trazas en la estructura renal (A), sin embargo, cuando el daño es severo la respuesta de reparación es defectuosa y se desarrolla fibrosis (naranja) (B). Cuando un segundo insulto se superpone a un primero que todavía no se ha resuelto, la respuesta fibrótica se exagera porque los mecanismos de reparación están agotados (los dos tonos marrón y naranja muestran las contribuciones de la lesión original y de la segunda lesión) (adaptado de Basile et al., 2016).

5.3 ERC *de novo* frente a disminución progresiva función renal

Un posible escenario después de un DRA es la “ausencia de recuperación”, es decir, una caída en la TFG durante el episodio de DRA que no vuelve nunca a los niveles basales (Figura 11, línea discontinua rosa). No obstante, otra posibilidad es una disminución gradual de la función renal después de que el episodio de DRA se haya resuelto (Figura 11, línea continua roja). Esta distinción entre la progresiva disminución y la ausencia total de recuperación es crucial en la práctica clínica (Sawhney et al., 2017).

Sawhney et al. (2017) pretendieron separar la “ausencia de recuperación” de la disminución progresiva usando las eTFG posteriores al alta hospitalaria en pacientes seguidos de 2003 a 2013 (Sawhney et al., 2017). Encontraron que la progresión a ERC tras un DRA debido a la “ausencia de recuperación” (ERC *de novo*) fue el 26% en lugar de una disminución progresiva (14%). La muerte después del DRA fue el evento predominante (37,5%). Por tanto, incluso si la función renal después del alta vuelve a la normalidad, el ingreso hospitalario con DRA se asocia a un aumento en la progresión de la enfermedad renal que persiste durante 10 años.

INTRODUCCIÓN

Otros estudios han examinado la progresión de la TFG después del DRA (Coca, 2017). Heung et al. demostraron que mientras que el 20,6% de los pacientes con DRA mueren en un año, el 34% de los pacientes con DRA transitorio que recuperaron los valores normales en los primeros 10 días desarrollaron posteriormente ERC en estadio 3 o peor en el año en comparación con el 16% de aquellos sin DRA (Heung et al., 2016). Por otro lado, Bucaloiu et al., demostraron que la ERC *de novo* ocurrió en aproximadamente el 35% de los pacientes con DRA dentro del año en comparación con aproximadamente el 18% de aquellos sin DRA (Bucaloiu et al., 2012).

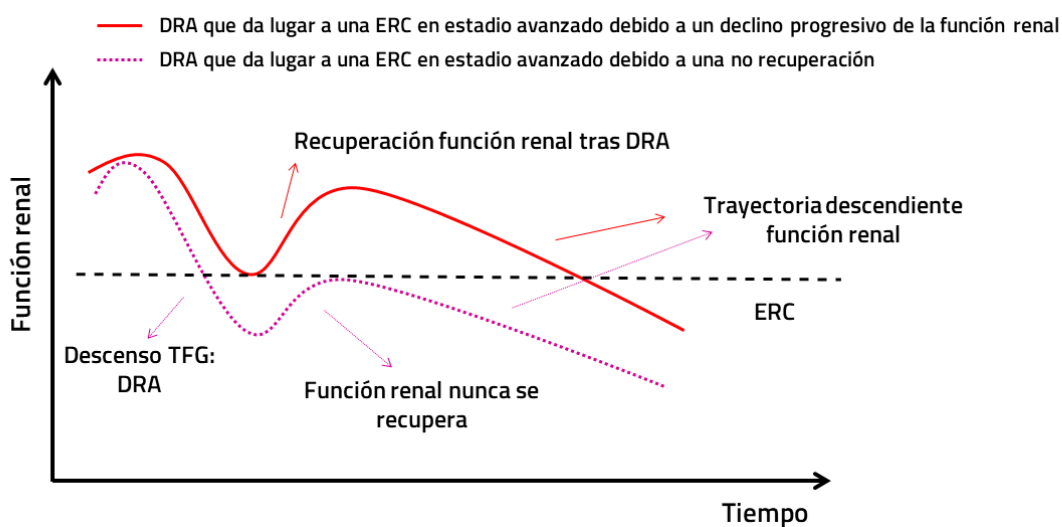


Figura 11: Dos posibles trayectorias para el desarrollo de una ERC progresiva tras un DRA: no recuperación vs deterioro progresivo de la función renal (adaptado de Sawhney et al., 2017). La línea roja representa la trayectoria de la función renal de un paciente que se recupera inicialmente tras el DRA y posteriormente progresa gradualmente hacia una ERC. La línea fucsia muestra la trayectoria de la función renal de un paciente que nunca recupera su función tras el DRA y además progresa.

5.4 Factores que influyen en el deterioro progresivo función renal

Se debería adoptar una terminología clara y precisa para describir tanto el deterioro funcional continuo como el daño estructural que persiste en el riñón después de un DRA (David P Basile et al., 2016).

La progresión se caracteriza por una erosión continua e irreversible de la estructura renal debido a la pérdida de nefronas y a su reemplazo por tejido cicatricial. Implica procesos patológicos como arteriosclerosis, glomeruloesclerosis y fibrosis tubulointersticial (Manjeri A. Venkatachalam et al., 2010). Además, estudios recientes han identificado la hipoxia renal persistente como papel clave en la patogénesis de la progresión después del DRA (Tanaka et al., 2014).

Como se ha descrito anteriormente, se ha demostrado que el DRA produce una rarefacción capilar peritubular. Esto exacerba aún más la hipoxia tisular y tiene tres efectos principales que promueven la fibrosis tubulointersticial: (a) fallo de las células epiteliales tubulares para regenerarse y repararse, (b) reclutamiento de células inflamatorias que secretan citocinas profibróticas y (c) activación de fibroblastos (Devarajan & Jefferies, 2016). Por lo tanto, la fibrosis renal es el resultado final común de la enfermedad renal progresiva independientemente del daño inicial (Jun & Lau, 2018; Lv et al., 2018).

La fibrosis intersticial interfiere con la función normal de los túbulos para secretar sustancias de desecho de los capilares peritubulares, mediar el transporte a los capilares y recibir nutrientes de la circulación. A medida que la ERC progresa, la matriz fibrótica se expande y las nefronas y sus capilares de soporte se pierden, lo que resulta en una disminución del volumen renal y una perfusión comprometida (Duffield, 2014). No obstante, por sí sola la fibrosis renal no conduce a una enfermedad renal progresiva. La progresión requiere de condiciones adicionales y un parámetro importante a considerar es la reducción de la masa renal (RMR) (Manjeri A. Venkatachalam et al., 2010).

Cuando la masa renal se reduce, las nefronas restantes sufren hipertrofia funcional y estructural. La adaptación en la microcirculación de glomérulos remanentes da como resultado un aumento en la presión hidrostática en cada glomérulo y, por lo tanto, un marcado aumento en la TFG. La magnitud del aumento en la TFG de una única nefrona se correlaciona estrechamente con la cantidad de masa renal que se ha perdido (Hostetter et al., 2001). Diversos estudios han demostrado que el aumento de la carga de trabajo tubular en el contexto de RMR tiene el potencial de afectar negativamente la recuperación después del DRA y puede conducir a la progresión de la enfermedad. Por ejemplo, se ha demostrado que tras una isquemia unilateral después de la uninefrectomía (RMR al 50%) el grado de fibrosis tubulointersticial es más severo que en los riñones de ratas sometidas a isquemia unilateral sin previa uninefrectomía (Azuma et al., 1997).

Suponiendo que la reducción quirúrgica de la masa renal en un 50% es un modelo fiable para proyectar lo que podría suceder en las nefronas restantes después de un grado comparable de destrucción de tejido por la enfermedad, estos hallazgos experimentales en ratas proporcionan una base para explicar por qué

INTRODUCCIÓN

el DRA en pacientes humanos con ERC es seguido de una pobre recuperación y una progresión a ESRD (Manjeri A. Venkatachalam et al., 2010).

Con la ablación renal de mayor grado, los cambios estructurales glomerulares remanentes tienen lugar antes y se asocian con mayores aumentos en la presión, en los flujos capilares glomerulares y en la ERC progresiva (Meyer et al., 1983). En el modelo de ERC "nefrectomía 5/6" en ratas, la extracción de un riñón se combina con la ablación de dos tercios del otro riñón para simular una pérdida significativa del parénquima renal asociada a la enfermedad. El "riñón remanente" desarrolla adaptaciones compensatorias (aumento del flujo sanguíneo e hiperfiltración glomerular) que mantienen la función a niveles aumentados por nefrona y conducen a la hipertrofia de los glomérulos y túbulos. Sin embargo, como consecuencia de estas adaptaciones, la estructura y la función renal se deterioran de manera constante, alcanzando una etapa final en varios meses. Estos riñones exhiben arteriosclerosis, glomeruloesclerosis y fibrosis tubulointersticial, como en humanos (Manjeri A. Venkatachalam et al., 2010)

Los cambios estructurales glomerulares que ocurren tras la ablación renal grave se ven no solo en el riñón remanente después de una nefrectomía quirúrgica sino también en otros tipos de enfermedad renal. Presumiblemente en la ERC progresiva, estos glomérulos hiperfuncionales se deterioran de la misma manera que los glomérulos remanentes en ratas sometidas a una ablación renal extensa (Meyer et al., 1983). La disminución progresiva en la función renal no es necesariamente lineal después de un episodio de DRA y puede estar relacionada con episodios superpuestos de DRA y con patologías insospechadas que pueden acelerar la progresión de manera aguda (Manjeri A. Venkatachalam et al., 2010). Como se ha descrito anteriormente, el riesgo de un nuevo episodio de DRA aumenta en pacientes con DRA y ERC y estos últimos, en el contexto de RMR, tienen más riesgo de recuperación incompleta y disminución progresiva de la función renal. Por último, otros factores como las patologías concomitantes, como la hipertensión y la diabetes, o la edad del paciente deben considerarse con respecto al riesgo de la progresión después del DRA.

6 BIOMARCADORES DE DAÑO RENAL

6.1 ¿Por qué son necesarios?

Los parámetros funcionales actuales utilizados por los médicos para determinar el DRA y la recuperación renal son la concentración de CrP y el flujo urinario. Sin embargo, como se ha descrito anteriormente, la CrP se considera un marcador subóptimo de función renal (Bellomo et al., 2012; Edelstein, 2008; Zoltán H. Endre, 2018; Koza, 2014; Ronco et al., 2012). Además, una disminución de la CrP a rangos normales o al nivel basal después de un episodio de DRA no refleja necesariamente una recuperación funcional renal completa o una reconstitución completa de la estructura renal normal (Humphreys et al., 2016). En lo que se refiere a los cambios en la producción de orina durante un DRA, podrían ser más sensibles que la CrP, pero parecen ser menos específicos. En algunos casos de DRA (p. ej. nefritis intersticial aguda), puede aparecer poliuria como resultado de defectos en la capacidad tubular de concentrar la orina (Ronco et al., 2019).

Por lo tanto, se necesitan nuevos biomarcadores no solo para ayudar al diagnóstico temprano sino también para otros propósitos. Idealmente, podrían ser una herramienta para discernir entre DRA prerrenal, intrarrenal o posrenal, así como para ayudar a identificar etiologías de DRA como isquemia, toxinas o sepsis, y apoyar la diferenciación de distintas causas de DRA (Urbschat et al., 2011). Asimismo, una nueva área de investigación tiene como objetivo encontrar biomarcadores que permitan determinar el riesgo de desarrollar DRA, lo que podría permitir un diagnóstico preventivo. Otra área de interés se refiere a la identificación de biomarcadores para predecir la recuperación de DRA o la progresión a ERC.

6.2 ¿Qué son los biomarcadores?

Un biomarcador se define como un cambio en un parámetro estructural, bioquímico, fisiológico o genético que indica la presencia, gravedad o progreso de una enfermedad (Beker et al., 2018). Deben ser específicos para el daño, lo suficientemente sensibles como para detectar incluso los daños más leves, no invasivos (detectables en una muestra de plasma sanguíneo u orina) y fáciles de analizar. Además, deberían ser lo suficientemente económicos como para que su uso sea sostenible (Beker et al., 2018; Nguyen & Devarajan, 2008; Ronco et al., 2012).

INTRODUCCIÓN

Los niveles de biomarcadores de daño renal pueden variar por varios mecanismos:

- En plasma: por exceso de síntesis en los tejidos extrarrenales o por liberación por las células circulantes.
- En orina: los biomarcadores se pueden acumularse en la orina bien por una síntesis intrarrenal inducida tras el daño en diferentes partes de la nefrona (IL-18, NAG, KIM-1) o bien como efecto de una disminución en la reabsorción en el túbulo proximal (NGAL, cistatina C). La secreción de biomarcadores por parte de las células inmunes que migran al lumen tubular también puede ser una fuente (NGAL, IL-18) (Mårtensson et al., 2012).

6.3 La orina como fuente de biomarcadores

En comparación con otros fluidos corporales, la orina posee varias características que la convierten en una muestra ideal para el descubrimiento de biomarcadores (McMahon & Waikar, 2013):

- Se puede obtener en grandes cantidades utilizando procedimientos no invasivos.
- Los péptidos urinarios y las proteínas de menor peso molecular son generalmente solubles. Por esta razón, la solubilización (un proceso con una gran influencia en el análisis proteómico de células o tejidos) no suele ser un problema.
- En general, el contenido de proteína urinaria es relativamente estable a la degradación proteolítica de proteasas endógenas.
- La orina está en contacto cercano con el lugar de la lesión (el riñón) y, como tal, es un sitio donde los biomarcadores pueden acumularse tras ser liberados por el tejido renal dañado.

A pesar de esto, la orina tiene la desventaja de que varía ampliamente en las concentraciones de proteínas y péptidos, principalmente debido a las diferencias en la ingesta diaria de líquidos. Además, hay cambios significativos en el proteoma urinario durante el día. Es probable que estos cambios sean causados por variaciones en la dieta, procesos metabólicos o catabólicos, ritmos circadianos y ejercicio, así como niveles circulatorios de varias hormonas (Decramer et al., 2008).

6.4 Normalización de biomarcadores urinarios

Debido a que el riñón tiene la capacidad de reabsorber agua en un amplio rango, la concentración de un biomarcador en la orina depende no solo de su tasa de producción sino también de la tasa de producción de orina. Por este motivo, los valores absolutos de los biomarcadores urinarios cambiarán significativamente dependiendo del volumen urinario producido, haciéndolos difícil de interpretar.

Se deberían normalizar estos biomarcadores con respecto a una sustancia que sea excretada por los riñones a una velocidad constante. En la práctica, se suelen normalizar en función de la concentración de creatinina urinaria. Esto es así porque se supone que la producción de creatinina es relativamente constante entre individuos. Sin embargo, existen 4 escenarios donde la normalización de creatinina podría generar resultados engañosos:

1. Donde hay tasas de generación de creatinina significativamente superiores o inferiores (p. ej. aumento o reducción de masa muscular) o mayor degradación extrarrenal de creatinina (ej en pacientes con ERC avanzada);
2. En el contexto de un cambio agudo en la TFG (durante un DRA) donde la excreción de creatinina no ha alcanzado un estado estable;
3. En el contexto de una secreción tubular de creatinina marcadamente incrementada o disminuida;
4. En estados de bajo flujo de orina donde puede haber reabsorción de creatinina en el túbulo proximal.

Otro modo sería normalizar la concentración urinaria de los biomarcadores con respecto al volumen de orina producido en el tiempo de la recolección, a pesar de que medirlo de forma precisa puede resultar complicado. El tiempo adecuado debería ser de 24 horas, en cambio, generalmente se recolectan unos pequeños volúmenes (en inglés *spots*) de orina para mayor comodidad del paciente (McMahon & Waikar, 2013; Tang et al., 2015; Waikar et al., 2010).

6.5 Biomarcadores de recuperación/progresión tras un DRA

Se ha realizado un esfuerzo significativo para predecir la recuperación tras un DRA o su transición a ERC en función de las variables clínicas disponibles, que incluyen género, edad, raza, presencia de NTA o diabetes

INTRODUCCIÓN

mellitus, necesidad de TRS, concentraciones de albúmina plasmática basal y hospitalaria, hemoglobina basal, y hemoglobina media durante la hospitalización. Aunque estos modelos clínicos son extremadamente útiles en el pronóstico de resultados de DRA, todavía se necesitan biomarcadores que confirmen la recuperación o la progresión (Kashani & Kellum, 2015).

En el pasado, la mayoría de los esfuerzos se han hecho en la búsqueda de biomarcadores de daño renal temprano, es decir, marcadores que permiten diagnosticar la enfermedad antes de que aumenten los niveles de CrP. Estos marcadores son moléculas que están relacionadas principalmente con las alteraciones estructurales o funcionales que ocurren en el riñón durante el daño, y con los procesos asociados como la inflamación, la apoptosis o la proliferación celular (Cuesta Apausa, 2019). Se ha utilizado una disminución de determinados biomarcadores de daño renal para predecir la recuperación tras un DRA. Sin embargo, la persistencia de estos biomarcadores también proporciona información sobre la no recuperación y puede reflejar el riesgo de progresión a ERC (Zoltán H. Endre, 2018).

Existen algunos estudios que evaluaron el papel de los biomarcadores de daño en la predicción de recuperación/progresión renal después de un DRA. Actualmente, NGAL es el que ha recibido la mayor atención en este contexto. NGAL es una proteína 21-kDa de la superfamilia de las lipocalinas, una clase de proteínas que se unen y transportan moléculas de bajo peso molecular (Schmidt-Ott et al., 2006). Se descubrió por primera vez como una proteína en gránulos de neutrófilos humanos. Forma un complejo con pequeños sideróforos que se unen al hierro (NGAL:sideróforo:Fe) (J. Yang et al., 2002) y por esta propiedad puede realizar dos funciones principales:

- Acción antimicrobiana mediante la unión a enterobactina, que es producida por algunas cepas de bacteria para internalizar el hierro y asegurar su suministro (Schmidt-Ott et al., 2007). De hecho, su síntesis aumenta después de una infección bacteriana (Nasioudis & Witkin, 2015).
- Suministro endocítico de hierro a las células (Devireddy et al., 2005): NGAL puede tener efectos protectores de los tejidos en el túbulo proximal (Mori et al., 2005).

Los niveles de NGAL aumentan significativamente después de la inflamación y el daño renal y puede detectarse en el plasma y en la orina en las 2 horas posteriores al DRA asociado a la derivación cardiopulmonar (Longo et al., 2011).

Diversos estudios han evaluado el papel de la NGAL en la predicción de recuperación/progresión después de un DRA. En un grupo multicéntrico de pacientes con un DRA adquirido en el hospital que requirió diálisis, los valores plasmáticos de NGAL resultaron útiles para pronosticar la recuperación renal (Srisawat, Murugan, et al., 2011). En otro grupo multicéntrico de pacientes con DRA que requiere diálisis que tenían niveles de NGAL en orina medidos en los días 1, 2 y 14, los niveles decrecientes en serie de NGAL en orina se asociaron con mayores probabilidades de recuperación renal (Srisawat, Wen, et al., 2011). Los estudios transversales también revelaron que la ERC se asocia con mayores concentraciones de NGAL tanto en orina como en plasma en comparación con individuos normales, aunque no en la misma medida que en DRA (Devarajan & Jefferies, 2016). Estos estudios sugieren que NGAL es un importante biomarcador para predecir la recuperación o la transición a ERC.

Otro biomarcador de daño importante es la molécula de daño renal-1 (KIM-1, del inglés *kidney injury molecule 1*) (Ko et al., 2010). KIM-1 es una proteína transmembrana de tipo 1 que se expresa abundantemente en las células tubulares proximales dañadas por isquemia o nefrotoxinas como el cisplatino, mientras que no se expresa en cantidades apreciables en ausencia de daño tubular o en tejidos extrarrenales. Su papel funcional puede ser conferir propiedades fagocíticas a las células tubulares, lo que les permite eliminar los desechos del lumen tubular después de un daño renal. Puede detectarse poco después de un daño isquémico o nefrotóxico en la orina y, por lo tanto, puede ser un biomarcador fácilmente analizado en el contexto clínico (Han et al., 2002; Longo et al., 2011).

Una disminución de KIM-1 en la orina puede ser útil para estimar la recuperación renal (Seo et al., 2013). También se ha informado de su utilidad potencial como biomarcador de ERC. En un estudio de biopsia renal de 74 pacientes con ERC de diversas etiologías, la expresión de KIM-1 se correlacionó positivamente con el daño morfológico y negativamente con la función renal (Mirjan M. van Timmeren et al., 2007). Asimismo, KIM-1 también está emergiendo como un marcador prometedor de progresión de la ERC en varios grupos, incluyendo adultos con insuficiencia cardíaca crónica, infección por VIH y diabetes tipo I. Por tanto, debería añadirse como un biomarcador prometedor para la detección temprana de la ERC y para predecir la progresión de la ERC (Devarajan & Jefferies, 2016).

INTRODUCCIÓN

Más recientemente, se han estudiado otros dos biomarcadores prometedores de DRA para predecir la recuperación: el inhibidor tisular de metaloproteinasas-2 (TIMP-2) y la proteína 7 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP7). Una fase de validación que incluyó 728 pacientes adultos críticamente enfermos (KDIGO etapa 2-3 DRA) mostró que el riesgo de mayores eventos renales adversos a los 30 días aumentó con un valor urinario [TIMP-2]x[IGFBP-7] superior a 0,3 y se duplicó por encima de 2,0. Tanto TIMP-2 como IGFBP7 son marcadores de detención del ciclo celular en G1 que se cree que ocurre en las células tubulares renales después de una lesión (Coelho et al., 2018).

Por otro lado, la proteinuria se ha establecido como un marcador de daño renal en estudios experimentales y los médicos consideran que una reducción temprana de albuminuria es indicativa de una respuesta favorable al tratamiento. La albuminuria es un marcador sensible de la progresión de la enfermedad renal en las primeras etapas de la ERC y parece ser una causa de la progresión de la ERC en algunas enfermedades (Inker et al., 2014). Los marcadores de daño (incluidos los descritos anteriormente) que se están estudiando para predecir la recuperación o la progresión tras un DRA se enumeran en la Tabla 1 (Forni et al., 2017):

MOLÉCULA	FUNCIÓN	UBICACIÓN DEL DAÑO
NGAL	Al menos 3 tipos diferentes: glucoproteína monomérica de 25kDa producida por neutrófilos y células epiteliales, incluidos los túbulo renales; proteína homodimérica de 45kDa producida por neutrófilos; y proteína heterodimérica de 135kDa producida por células tubulares renales liberadas en la orina después de la producción sistémica o lesión tubular.	Túbulo distal, colector y proximal
Albúmina	Proteína transportadora mayoritaria en suero.	Glomérulo y túbulo proximal
KIM-1	Glucoproteína transmembrana de 39kDa involucrada en la regeneración tubular; liberada en la orina después de un daño isquémico o nefrotóxico de las células tubulares.	Túbulo proximal
Clusterina	Transporte de lípidos, interacción célula-célula y adhesión celular.	Túbulo proximal y túbulo distal
TIMP-2 e IGFBP-7	Proteínas de 29kDa y 21 kDa involucradas en la detención del ciclo celular; liberadas en la orina tras estrés en células tubulares.	Por determinar

Cistatina C urinaria	Inhibidor de cisteína proteasa de 13kDa producido por todas las células humanas nucleadas; filtrado libremente por los glomérulos.	Glomérulo y túbulo proximal
IL-18	Citocina proinflamatoria de 18 kDa; regula la inmunidad innata y adaptativa; liberada en la orina tras un daño celular tubular proximal.	Túbulo proximal
NAG	Enzima lisosómica de >130kDa; producida en las células tubulares proximales y distales; liberada en la orina después de un daño celular tubular.	Túbulo proximal
L-FABP1	Chaperona lipídica intracelular de 14kDa producida en células tubulares proximales; ayuda en la regulación de la absorción de ácidos grasos y el transporte intracelular; se excreta en la orina después de un daño tubular.	Túbulo proximal

Tabla 2: Lista de biomarcadores utilizados para seguir la recuperación renal tras un DRA (Adaptado de Forni et al., 2017).



HIPOTESIS Y OBJETIVOS

A lo largo de los últimos años, numerosos estudios observacionales han mostrado que existe una conexión directa entre el DRA y el desarrollo posterior de ERC. Además, se ha observado que en el periodo posterior a un DRA pueden existir en los riñones secuelas estructurales imposibles de detectar mediante los parámetros clínicos comúnmente utilizados para el diagnóstico de su recuperación. Teniendo en cuenta estos datos, planteamos la hipótesis de que es posible generar un modelo experimental de ERC producido por episodios sucesivos de daños agudos. Nuestra hipótesis también contempla que este nuevo modelo permitirá identificar marcadores urinarios asociados a las fases de transición subclínica a la ERC y a su evolución posterior.

Por ello, en este trabajo, se plantearon los siguientes objetivos:

- 1) Generar un modelo animal de transición de DRA a ERC progresiva mediante la aplicación de episodios repetidos de DRA.
- 2) Identificar biomarcadores urinarios relacionados con las secuelas de los daños agudos, con la progresión a la ERC y con su evolución.



**MATERIALES
Y MÉTODOS**

1 MATERIALES

Los materiales utilizados en este trabajo de investigación se encuentran en las tablas 9, 10, 11 al final de la sección Métodos.

2 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

2.1 Mantenimiento y manejo de los animales

Los animales de experimentación empleados para este trabajo fueron ratas Wistar de sexo masculino de 220-250 g de peso corporal al principio de cada experimento, procedentes del Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Salamanca. Se mantuvieron durante todos los experimentos en condiciones controladas de temperatura (20°C), humedad (60%), ciclos de luz-oscuridad de 12 horas y sistema de renovación y filtrado del aire, en el animalario SEA ubicado en nuestro centro de investigación.

En cuanto a la alimentación, se utilizaron pellets completos de todos los nutrientes con la siguiente composición: proteína bruta (17,62 % del total), materias grasas brutas (2,50 %), celulosa bruta (4,05 %), cenizas brutas (4,38 %), almidón (43,30 %), calcio (0,66 %), fósforo (0,49 %), sodio (0,14 %), lisina (0,85 %), metionina (0,29 %), vitamina A (19.900 UI/kg), vitamina D (1.500 UI/kg) y vitamina E (tocoferol) (110 mg/kg). De esta forma, se evitaron alimentaciones selectivas para aumentar la reproducibilidad de los experimentos.

Se controló de forma frecuente en los diferentes experimentos el estado de salud general, de movilidad, color del pelo de los animales y se respetaron todas las disposiciones establecidas en el RD 53/2013 que aplica las disposiciones de la Directiva 2010/63/UE del Parlamento y del Consejo de la Unión Europea, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.

2.2 Descripción del modelo animal y de los experimentos realizados

En este apartado se describe el modelo animal y los diferentes experimentos realizados, así como los aspectos generales y los procedimientos específicos utilizados en cada modelo. Los procedimientos de cirugía están descritos en el apartado 3.2.

2.2.1 Modelo de episodios múltiples de daño renal

Con el objetivo de estudiar el desarrollo de una ERC mediante episodios de DRA previos, se generó un modelo animal en el que se indujeron tres episodios de DRA como se describe a continuación (Figura12):

1. Administración de cisplatino (5mg/kg) en el día basal (B).
2. Isquemia-reperfusión de 60 minutos en el riñón izquierdo en el día de recuperación de la función renal (día R), tras la administración de cisplatino (entre 7-10 días tras su administración).
3. Isquemia-reperfusión de 60 minutos en el riñón derecho 24 días después administración de cisplatino (D24).

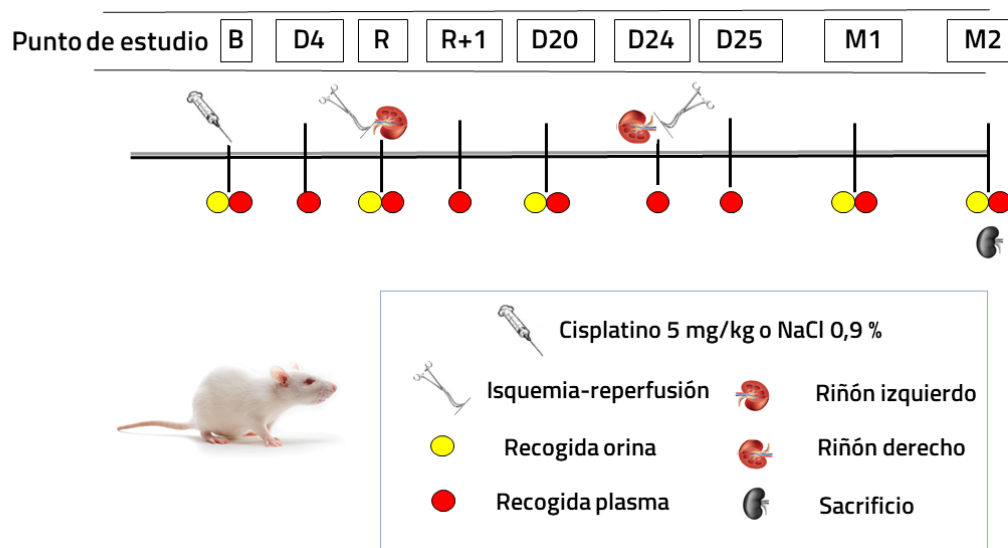


Figura 12: Representación esquemática del modelo de múltiples daños. Se indican los puntos de estudio, así como los momentos en que se recogen las muestras de sangre y orina o se lleva a cabo el sacrificio para la extracción de los riñones.

Para esto, se utilizaron dos diferentes modelos experimentales:

1. DRA inducido por la administración de un agente nefrotóxico (cisplatino 5 mg/kg).
2. DRA inducido por una isquemia-reperfusión de 60 minutos (I/R60) unilateral.

2.2.1.1 DRA inducido por el cisplatino

El modelo de DRA inducido por cisplatino se basa en la administración de una dosis única (5mg/kg) de este medicamento nefrotóxico por vía intraperitoneal (i.p.). Cuatro días tras la administración de la dosis, se manifiesta el DRA, caracterizado por una subida en los valores plasmáticos de creatinina y de urea (BUN).

Ocho-diez días tras la administración de cisplatino, los valores de creatinina vuelven a valores similares a los basales en la mayoría de los animales, recuperando por lo tanto su función renal.

Descripción del procedimiento: el mismo día de la administración se preparó la disolución de cisplatino en suero salino 0,9% p/v estéril atemperado (37°C) en concentraciones de 1,25 mg/ml, de forma que el volumen en µl a administrar se correspondiera con 4 veces el peso del animal en gramos (por ejemplo, para un animal de 250 g de peso corporal se administraría 1ml). La preparación se mantuvo en agitación constante durante unas horas, hasta su completa disolución controlando su aspecto homogéneo y la ausencia de partículas en suspensión.

2.2.1.2 DRA producido por isquemia-reperfusión unilateral

El segundo tipo de modelo de daño renal utilizado consiste en una isquemia-reperfusión de 60 minutos (I/R 60) unilateral, es decir, en uno solo de los dos riñones. El día después de la I/R60 se manifiesta un DRA caracterizado por una subida en los valores de CrP de menor intensidad respecto al DRA por cisplatino, ya que el otro riñón, que no sufre la I/R es capaz de compensar parte de la pérdida de la función renal.

Este tipo de procedimiento se describe en el **apartado 3.2.2.**

2.2.2 Estudio comparativo entre los grupos de diferente incidencia de DRA

Con el objetivo de estudiar las consecuencias generadas por la exposición a episodios repetidos de DRA en las secuelas renales resultantes y en el desarrollo de ERC, se realizó un experimento en el que los animales se dividieron en los siguientes grupos experimentales:

- **Grupo de triple daño (CDDP5-I/R60-I/R60; n=6):** administración de cisplatino 5 mg/kg i.p. en D0. I/R60 en el riñón izquierdo en R. I/R60 en el riñón derecho en D24. Sacrificio en M2.
- **Grupo (CDDP5-I/R60; n=6):** administración de cisplatino 5 mg/kg i.p. en D0. I/R60 en el riñón izquierdo en R. Sacrificio en M2.
- **Grupo (CDDP5; n=6):** administración de cisplatino 5 mg/kg i.p. en D0. Cirugía sham, en R. Sacrificio en M2.
- **Grupo (I/R60; n=6):** Inyección de suero en D0. I/R60 en el riñón izquierdo en R. Sacrificio en M2.
- **Grupo (SHAM-; n=6)** Inyección de suero en D0. Cirugía sham en R. Sacrificio en M2.

MATERIALES Y MÉTODOS

En la **tabla 3** se muestran los distintos puntos de estudio establecidos en este trabajo.

PUNTO DE ESTUDIO	NOMENCLATURA
Basal, día de administración de cisplatino.	D0
DRA.	D4
Día en que se recupera la función renal y se aplicó una I/R60 en el riñón izquierdo.	R
Día después de la I/R60.	R+1
Día en que se determinó el aclaramiento de creatinina.	D20
Día en que se realizó una I/R60 en el riñón derecho.	D24
Día en que se determinó el aclaramiento de creatinina.	M1 (primer mes)
Día en que se sacrificaron todos los animales.	M2 (segundo mes)

Tabla 3: Puntos de estudio del experimento 1.

Se midieron los niveles de creatinina plasmática (CrP) para el diagnóstico del DRA, así como para determinar el momento en que se producía la recuperación del daño renal (CrP en valores basales). Se determinó la presencia de DRA si la concentración plasmática de creatinina era superior al doble de la concentración que tenía a nivel basal.

Para determinar en qué momento se producía la recuperación de la función renal se calculó la CrP diariamente desde el 7^o día post-administración de cisplatino hasta que sus valores volvieron similar a los basales (0,4 -0,7 mg/dl). Además, se monitorizó la función renal en los días en los que se realizaron las I/R60 (R, D24) y en los días posteriores (R+1, D25), en D20, en el día de sacrificio (M2) y en un día intermedio entre este y el D25 (M1). Todos los animales se sacrificaron después de dos meses (M2) para la obtención de muestras de tejido renal con el fin de realizar estudios histológicos, de inmunohistoquímica o PCR en tiempo real (qPCR).

2.2.2.1 Estudio de la evolución temporal de la fibrosis.

Con el objetivo de estudiar la evolución de la fibrosis en el tiempo y su correlación con el número de daños aplicados, se utilizaron los siguientes grupos experimentales:

- **Grupo (CDDP5-I/R60; n=6):** administración de cisplatino 5 mg/kg i.p. en D0. I/R60 en el riñón izquierdo en R. Sacrificio: en D20 (n=3); M2 (n=3).
- **Grupo (CDDP5; n=6):** administración de cisplatino 5 mg/kg i.p. en D0. Cirugía sham, en R. Sacrificio: en D20 (n=3); M2 (n=3).
- **Grupo (I/R60; n=6):** Inyección de suero en D0. I/R60 en el riñón izquierdo en R. Sacrificio: en D20 (n=3); M2 (n=3).
- **Grupo (SHAM; n=6):** Inyección de suero en D0. Cirugía sham en R. Sacrificio: D20 (n=3); M2 (n=3).

Se midieron los niveles de CrP para el diagnóstico del DRA (D4), en el día siguiente a la isquemia (R+1), así como para determinar el momento en que se producía la recuperación del daño renal (R). Se monitorizó la función renal en término mediante aclaramiento de creatinina en los días en los que se realizaron los sacrificios (D20; M2) y en un día intermedio entre D20 y el M2 (M1).

Los animales se sacrificaron en dos diferentes tiempos (Figura 13):

- Día 20: se sacrificaron 3 animales por cada grupo.
- M2: se sacrificaron 3 animales por cada grupo.

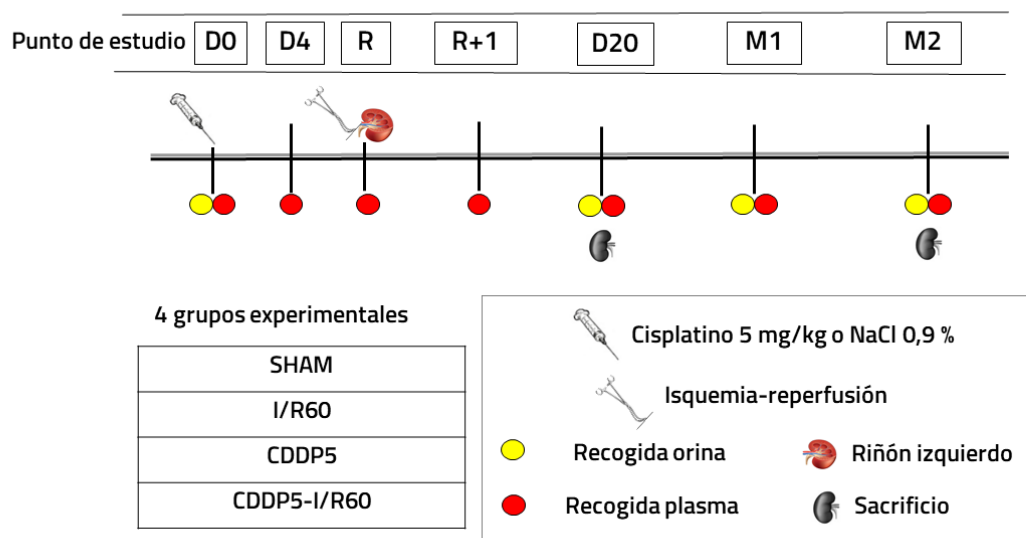


Figura 13: Representación esquemática del experimento 2. Se indican los puntos de estudio, así como los momentos en que se recogen las muestras de sangre y orina o se lleva a cabo el sacrificio para la extracción de los riñones.

En la **tabla 4** se muestran los distintos puntos de estudio establecidos en este trabajo.

PUNTO DE ESTUDIO	NOMENCLATURA
Basal, antes de la administración de cisplatino.	D0
DRA.	D4
Día en que se recupera la función renal y se aplicó una I/R60 en el riñón izquierdo.	R
Día después de la I/R60.	R+1
Día en que se sacrificaron 3 animales por cada grupo.	D20
Día en que se determinó el aclaramiento de creatinina.	M1
Día en que se sacrificaron 3 animales por cada grupo.	M2

Tabla 4: Puntos de estudio para el experimento 2.

2.2.2.2 Estudio de evolución de la función renal en tiempos largos (9 meses)

Para poder determinar si las alteraciones estructurales y funcionales encontradas en el grupo de triple daño pudieran dar lugar en el tiempo a un deterioro progresivo de la función renal y además para el estudio de biomarcadores urinarios de ERC y de fibrosis se realizó el siguiente modelo experimental.

Se utilizaron 4 grupos experimentales:

- **Grupo de triple daño (CDDP5-I/R60-I/R60; n=21):** administración de cisplatino 5 mg/kg i.p. en D0. I/R60 en el riñón izquierdo en R. I/R60 en el riñón derecho en D24. Sacrificios: D20 (n=3); M2 (n=3); M6 (n=6); M9 (n=6).
- **Grupo 5/6 Nefrectomía (5/6 NEF; n=16):** escisión quirúrgica de ambos polos en el riñón izquierdo, con extirpación del riñón contralateral (descripción en el apartado 3.2.3). Sacrificios: D20 (n=3); M2 (n=3); M6 (n=4); M9 (n=3).
- **Grupo Nefrectomía (UNX; n=17):** nefrectomía riñón derecho (descripción en el apartado 3.2.3). Sacrificios: D20 (n=3); M2 (n=3); M6 (n=4); M9 (n=4).
- **Grupo (SHAM; n=21):** Inyección de suero en D0. Cirugía sham en R0. Sacrificios: D20 (n=3); M2 (n=3); M6 (n=6); M9 (n=6).

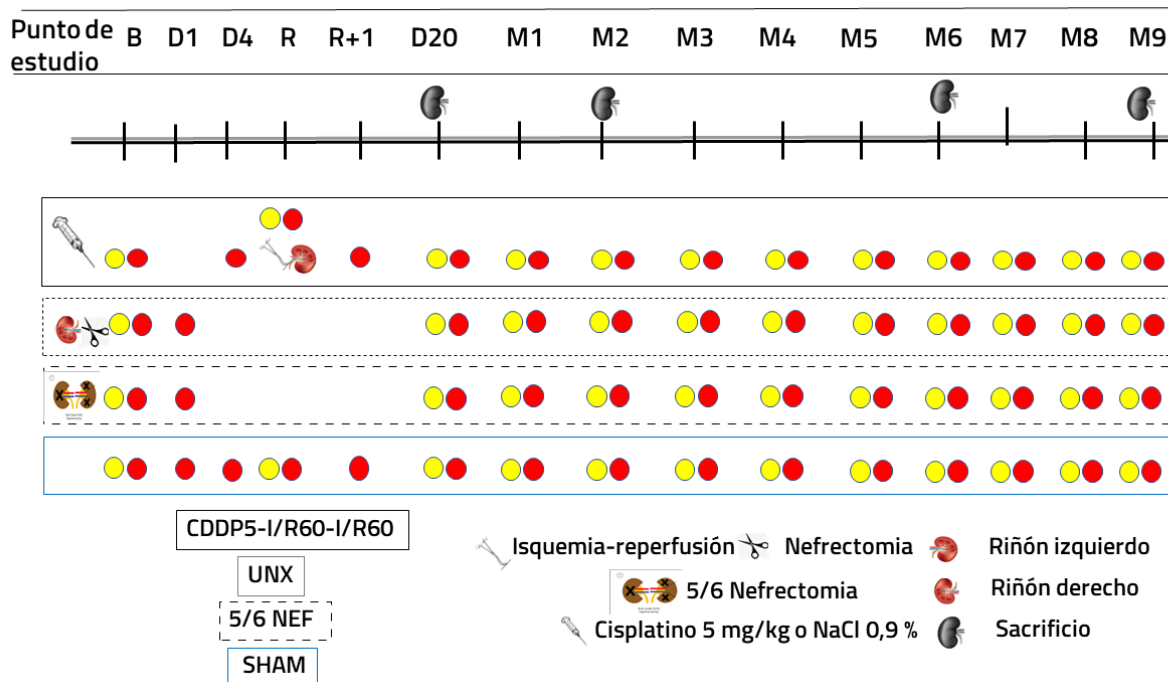


Figura 14: Representación esquemática del experimento 3. Se indican los puntos de estudio, así como los momentos en que se recogen las muestras de sangre y orina o se lleva a cabo el sacrificio para la extracción de los riñones.

3 TÉCNICAS EXPERIMENTALES IN VIVO

3.1 Anestesia

La anestesia es un estado reversible producido por fármacos, caracterizado por la ausencia de cualquier tipo de percepción sensorial, ya sea dolorosa o no. La elección de una técnica anestésica depende de factores tales como la especie, el estado del animal, el tipo de procedimiento y su duración y la experiencia del investigador (Martín Zúñiga & Orellana Muriana, 2016).

La anestesia inhalatoria generalmente se prefiere a los anestésicos por inyección, ya que la inducción y la recuperación es rápida y más segura (causa menor depresión cardiovascular) y permite un control preciso sobre la profundidad de la anestesia (Jeong et al., 2017; Le Clef et al., 2016; Xiong et al., 2003). Sin embargo, se ha demostrado que el uso de los anestésicos gaseosos está contraindicado para la realización de una isquemia-reperfusión (I/R) en cuanto produce un efecto protector antiinflamatorio (H. T. Lee et al., 2004).

Otros anestésicos contraindicados para I/R son los barbitúricos como el pentobarbital sódico ya que reducen el flujo sanguíneo al riñón, secundario a una disminución en la presión sanguínea y además tienen

MATERIALES Y MÉTODOS

un margen de seguridad muy estrecho (Le Clef et al., 2016). Estos fármacos están más indicados en procesos terminales como en la perfusión de órganos.

La asociación de ketamina y xilacina (40-90 /5-10 mg/kg) es el método recomendado para anestesia en rata y permite un efecto anestésico de una duración entre 45-90 minutos (AHC Research Services - University of Minnesota, 2020). El hidrocloreuro de ketamina es un anestésico disociativo que se usa en combinación con un alfa-2 agonista para reducir sus efectos adversos como hipertonicidad muscular, mioclonía y recuperación violenta. El hidrocloreuro de xilacina es un agonista alfa-2 típico del grupo no opioide con efectos analgésicos, sedantes y relajantes musculares (Gonca, 2015).

En este trabajo, los animales se anestesiaron por vía intraperitoneal, con una mezcla de hidrocloreuro de ketamina (80 mg/kg) e hidrocloreuro de xilacina (10 mg/kg), diluida en solución salina estéril hasta una concentración de: ketamina (40 mg/ml) y xilacina (5 mg/ml). En estas concentraciones el volumen de la mezcla a administrar corresponde al doble en μl que el peso del animal en gramos (para un animal de 220 g se administran 440 μl).

Un ejemplo de preparación para 10 animales de peso alrededor de 250 g sería: el volumen de mezcla necesario sería el doble del peso total de los animales $250 \times 10 \text{ animales} \times 2 = 5000 \mu\text{l}$. Teniendo en cuenta un exceso necesario para el mantenimiento de la anestesia se prepararían 6 ml de mezcla: 2,4 ml de ketamina (100 mg/ml), 1,5 ml de xilacina (20 mg/ml) y 2,1 ml de suero.

3.2 Operaciones quirúrgicas

3.2.1 Preparación preoperatoria

Antes de iniciar el abordaje quirúrgico, se rasuró el abdomen del animal empleando una rasuradora con un tamaño de dientes pequeño para limitar fenómenos de irritación cutánea. El pelo se eliminó totalmente para impedir su entrada en la herida y constituir un foco de infección y se desinfectó la zona con una gasa impregnada primero en alcohol 96° y después con povidona yodada. Después el animal se colocó en decúbito supino sobre una plancha metálica rectangular previamente puesta encima de una almohadilla calefactora de 38 x 27 cm y se inmovilizó el animal fijando con esparadrapo las cuatro extremidades.

La aplicación de calor durante la cirugía es un factor clave en las intervenciones quirúrgicas en pequeños animales para evitar la aparición de hipotermia, una de las principales causas de muerte en estos procedimientos (Martín Zúñiga & Orellana Muriana, 2016).

Antes de iniciar la cirugía, se determinó la profundidad de la anestesia comprobando la ausencia de:

- Reflejo pupilar: se tocó la esquina medial del ojo que no debe dar lugar a una respuesta.
- Reflejo pata trasera: se aplicó una presión con una uña en la pata trasera del animal que no debe retirarse.

3.2.2 Isquemia-reperfusión unilateral

Se realizó una laparotomía mediante un corte en la línea alba de unos 3-4 cm de tamaño a la altura del pedículo renal interesado.

Una vez realizado el corte en la piel se visualizó inmediatamente debajo la capa muscular. Se levantó la capa muscular con unas pinzas para crear un espacio entre la misma y las vísceras abdominales y se realizó un corte con tijera, que se amplió posteriormente en toda la longitud requerida de la incisión. Con unos bastoncillos de algodón humedecidos en suero salino estéril, se apartaron cuidadosamente los intestinos para que el pedículo renal del riñón izquierdo quedara expuesto.

El pedículo renal se disecó cuidadosamente con la ayuda de unas pinzas de punta fina y de bastoncillos de algodón para eliminar el tejido adiposo y exponer los vasos sanguíneos. Con unas pinzas de punta curva abiertas se tensó el pedículo renal y se realizó el pinzamiento de la arteria y vena renal tras el cual se observó un cambio gradual de color del riñón de rojo a púrpura oscuro en unos 1-2 minutos (Figura 15). La temperatura corporal se controló cada 10 minutos a nivel rectal mediante un termómetro y se mantuvo entre 37-38 grados centígrados.

El control de la temperatura durante la isquemia es uno de los aspectos más importantes y es necesario para la reproducibilidad. Se ha demostrado que una temperatura corporal más alta durante la isquemia se relaciona con un mayor daño. Sin embargo, la hipotermia durante la I/R representa un factor de protección ya que ejerce un efecto antiinflamatorio y aumenta la tolerancia celular al estrés isquémico (Delbridge et al., 2007; Zager et al., 1989).

MATERIALES Y MÉTODOS

Trascurridos los 60 minutos se retiró el pinzamiento y empezó la reperfusión. Se controló que el color del riñón volviera hacia un color rojizo. Después se realizó el cierre de la herida mediante una sutura continua del peritoneo y de la pared muscular con sutura absorbible de 4/0. Posteriormente, se suturó la piel, con puntos sueltos de sutura absorbible de 4/0. Se administró 1 ml de suero salino para compensar la pérdida de líquidos durante la cirugía y el analgésico buprenorfina a una dosis de 0,03 mg/Kg por vía subcutánea.

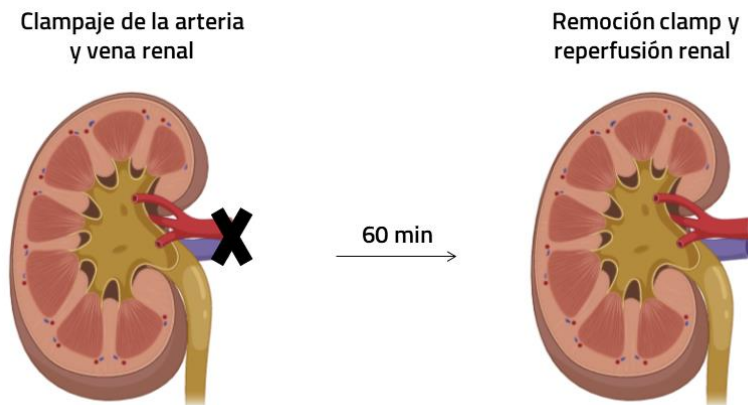


Figura 15: Representación esquemática de una isquemia reperfusión unilateral

3.2.3 Nefrectomía de 5/6

Este tipo de cirugía consiste en la extirpación de un riñón y en la remoción de los dos polos renales en el riñón restante, de forma que se extirpan 5/6 de la masa renal. Se realizó en dos etapas (Figura 16).

- **Extirpación de los polos renales:** se hizo una incisión ventral en la línea alba en el abdomen y se expuso el riñón izquierdo del animal, y el órgano se liberó de la cápsula y del resto de tejido circundante. Con un hilo de sutura se hicieron dos ligaduras alrededor de cada polo del riñón en su posición de un tercio. El tercio de cada polo se extirpó cortando más allá de las ligaduras (hacia los polos). Tras el corte se aplicó en los dos polos un apósito hemostático absorbible.
- **Nefrectomía contralateral:** el riñón derecho del animal quedó expuesto y liberado del tejido circundante. Se hicieron dos ligaduras, una a nivel de los vasos sanguíneos renales y otra en el uréter. Luego se extrajo el riñón al seccionar los vasos y el uréter justo distalmente a la ligadura. Después se procedió con el cierre de la herida como descrito anteriormente.

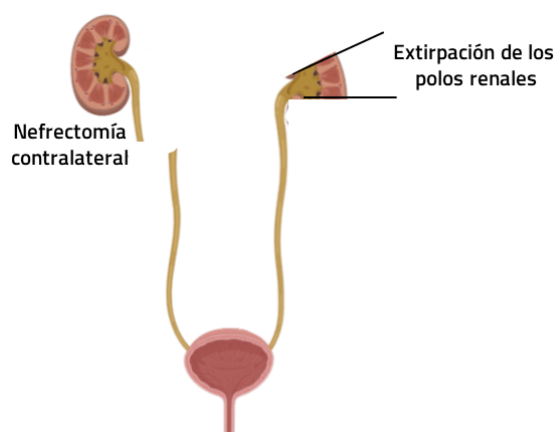


Figura 16: Representación esquemática de una 5/6 nefrectomía.

3.2.4 Nefrectomía unilateral

Como descrito en el apartado 3.2.3.

3.2.5 Cuidado post-operatorio

Los animales se transfirieron en jaulas individuales y se dejaron con suministro de calor hasta su completa recuperación (unas 5-6 horas). Durante los 2 días siguientes y a intervalos de 12 horas se administró el analgésico Buprenorfina (0,03 mg/Kg; s.c) y se controló que los puntos de sutura estuvieran bien cerrados y sin presencia de infección. Unos 2-3 días después la intervención, los animales se agruparon manteniéndose en un número de 3-5 por jaula (dependiendo del peso).

3.3 Recogida y procesamiento de orina de 24 horas

Para la recogida de orina en las 24h se usaron jaulas metabólicas (Figura 17). Las jaulas metabólicas son dispositivos diseñados para separar eficazmente las heces y la orina en colectores. Cada animal, de forma individual se sitúa en una cámara de policarbonato transparente con suelo de rejilla que permite la caída de la orina y de las heces hacia una estructura inferior donde se realiza su separación. Los animales tienen acceso a la comida mediante una pequeña cámara extraíble hacia el exterior. El acceso a la bebida es garantizado mediante un bebedero.

La separación de la orina y de las heces se basa en el principio de capilaridad por el cual la orina va bajando por adhesión a la pared de un embudo y cae en un colector posicionado al final de este, sin embargo, las heces caen por gravedad hacia otro colector (Kurien et al., 2004). Los roedores alojados en las jaulas

MATERIALES Y MÉTODOS

metabólicas no realizan sus comportamientos naturales, y el aislamiento social puede resultar estresante para el animal (Zymantiene et al., 2016). Por esta razón es conveniente realizar un periodo de acostumbramiento antes de la primera recogida de orina.

El acostumbramiento consiste en alojar los animales durante unas 24 horas algunos días antes de la primera recogida. Para estudios crónicos de marcadores urinarios ya no se utilizó el periodo de acostumbramiento antes de cada recogida ya que los animales conocen la estructura reduciendo al mínimo su estrés limitando posibles alteraciones en los resultados. Se añadió a cada colector 1ml de aceite mineral que forma una capa protectora en la superficie de la orina reduciendo su evaporación, y 100 µl de azida sódica que limita la contaminación bacteriana.



Figura 17: *Jaula metabólica individual.*

La orina se procesó mediante centrifugación a 2.000 x g durante 8 minutos a temperatura ambiente. Una vez centrifugada se forman tres fases: la fase menos densa es el aceite mineral, la fase central (orina pura) y la fase más densa que consiste en los restos de comida, pelos del animal etc. Una vez separada la orina de las otras dos fases, se midió su volumen y se determinó el flujo urinario (FU), expresado como mL de orina recogidos en las 24 horas. Por último, se almacenaron unas alícuotas a -20 °C y la restante parte a -80 °C.

3.4 Recogida y procesamiento de las muestras de sangre

Para la extracción de sangre los animales se anestesiaron con anestesia inhalatoria isoflurano al 5% para la inducción y al 2% para el mantenimiento para evitar el sufrimiento del animal. Se canuló la vena caudal con un catéter de 25 G y la sangre se recogió con capilares heparinizados que se pasaron a tubos eppendorf de 1,5 ml y se pusieron en hielo. Se vaciaron los capilares mediante la ayuda de una pipeta p1000 y se centrifugó la sangre a $7000 \times g$, durante 4 minutos a 4 grados centígrados. El plasma se conservó en eppendorf etiquetados a -20°C

3.5 Perfusión y extracción de órganos

Para poder realizar estudios histológicos y bioquímicos, en los puntos de sacrificio se realizó la extracción de los riñones. Para esto, los animales se perfundieron con suero salino 0,9% heparinizado 5 UI/ml. La perfusión es una técnica que permite remplazar la sangre con suero salino para limpiar los órganos y facilitar su estudio posterior.

Se siguieron los pasos que se describen a continuación:

- Se anestesiaron los animales con Pentobarbital sódico y se colocaron en posición decúbito supino.
- Se realizó una incisión en la línea alba y se retiró el paquete intestinal hacia el lado izquierdo del animal. Se expuso la aorta y de forma cuidadosa y se limpió del tejido conectivo y adiposo circunstante.
- Se canuló la aorta con un catéter conectado a una bomba de infusión a unos 0,5- 1 cm de la bifurcación que se encuentra por debajo de las arterias renales.
- Rápidamente, con unas tijeras pequeñas se cortaron las venas iliacas, se encendió la bomba a una velocidad de perfusión de 3ml/min y se clampó la aorta por encima de las arterias renales.

Una vez perfundidos, los riñones rápidamente se descapsularon, se pesaron y se cortaron en dos mitades. Una se incluyó en formaldehído al 3,7% para estudios histológicos y la otra mitad se ultracongeló en nitrógeno líquido y se conservó a -80°C para estudios bioquímicos.

4 DETERMINACIONES BIOQUIMICAS

4.1 Determinación de la concentración de creatinina en el plasma y la orina

Para determinar la concentración de la creatinina en el plasma y en la orina se utilizó un kit comercial (*Quantichrom creatinine assay kit, BioAssay System*), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

El kit consta de dos reactivos, el ácido pícrico y el hidróxido de sodio. El ácido pícrico es un compuesto orgánico que presenta características ácidas por la presencia de tres grupos nitro electrón atractores, que estabilizan la base conjugada (picrato) haciendo que el hidrógeno del grupo OH se disocie con facilidad en medios básicos. El medio básico es garantizado por la presencia de hidróxido de sodio. La creatinina es capaz de formar un complejo coloreado (complejo de Janvosky) con el picrato, cuya absorbancia es proporcional a la cantidad de complejo que se forma. Esta reacción se conoce como reacción de Jaffe (Syal et al., 2013) (Figura 18).

Para medir la concentración de creatinina en las muestras de plasma y de orina se prepararon los puntos patrones de la recta estándar a partir de un stock de creatinina (incluido en el kit) cuya concentración es de 50 mg/dl.

Para muestras de plasma se prepararon patrones de la recta estándar en concentraciones de 0, 0,5, 1, 2,5, 5 (mg/dl) y se añadieron 30 μ L de estos y de plasma puro (sin diluir) en una placa de 96 pocillos. Se preparó una mezcla de reactivo A y B en proporción 1:1 y se añadieron 200 μ L de la mezcla en cada pocillo. La absorbancia se midió inmediatamente después a 490 nm (Abs0) y después de 5 minutos (Abs5).

Para la orina se utilizaron los puntos de la recta 0, 2,5, 5, 10, 50 (mg/dl) y se añadieron 5 μ L de los estándares y de la orina previamente diluida 1:10 en la placa de 96 pocillos.

Se añadieron 200 μ L de la mezcla de reactivos A, B y agua destilada (proporción 1:1:2) a cada pocillo y se midió la absorbancia siguiendo los pasos explicados anteriormente.

En ambos casos se determinó la concentración de creatinina, de la siguiente manera:

- Se calculó la diferencia entre el valor de absorbancia al tiempo 5 y el del tiempo 0 (Abs5-Abs0).

- Se calculó la ecuación de la recta obtenida utilizando los valores de ΔAbs de cada estándar (puntos de ordenada) y los valores correspondientes de concentraciones conocidos por cada estándar (puntos de abscisas).

Con la ecuación de la recta y los valores de absorbancia de cada muestra se extrapolaron los valores de concentración de creatinina correspondientes.

Para las muestras de orina estos valores se multiplicaron por 10 (factor de dilución).

El aclaramiento de la creatinina (ClCr) usado para estimar la tasa de filtración glomerular (TFG) se calculó según la siguiente fórmula:

$$\text{ClCr} = \frac{\text{FU} \left(\frac{\text{ml}}{\text{min}} \right) \times \text{CrU} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right)}{\text{CrP} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right)} = \text{TFG} \left(\frac{\text{ml}}{\text{min}} \right)$$

Donde:

FU: flujo urinario en las 24 horas expresado en ml/min.

CrU: creatina urinaria en mg/dL.

CrP: creatina plasmática en mg/dL.

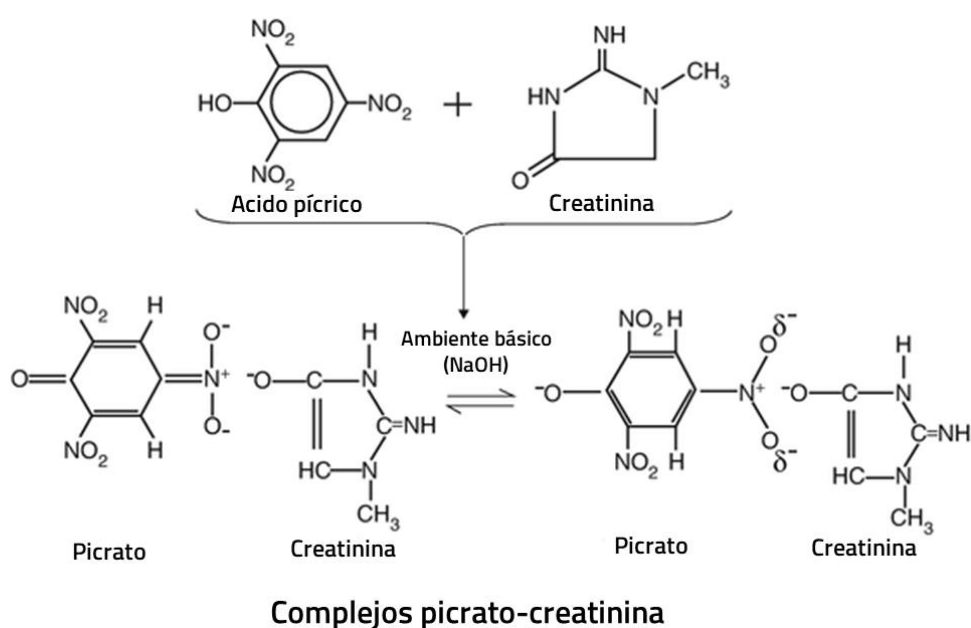


Figura 18: Reacción de jaffe. La creatinina en ambiente básico forma un complejo coloreado con el picrato.

4.2 Medida de la concentración de proteínas en la orina

Para determinar la concentración de proteínas en las muestras se usó un kit comercial (*Quantichrom Protein Assay, BioAssay System*) cuya técnica de análisis se basa en el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976). El método de Bradford se basa en la capacidad del compuesto Comassie G-250 de unirse a las proteínas en condiciones ácidas cambiando su absorbancia máxima de 465 a 595 nm. Esta unión provoca un cambio de color cuya intensidad será proporcional a la cantidad de proteínas presentes en la muestra que se puede cuantificar comparando la absorbancia resultante con una recta de calibrado preparada usando la albumina de suero bovino (BSA) a diferentes concentraciones (Corley, 2005).

Se colocaron 10 µL de las muestras de orinas previamente diluidas 1:10, y de los calibradores de una recta patrón estándar de BSA (rango 0 a 1 mg/mL de BSA) en una placa de 96 pocillos según el protocolo comercial. Después, se añadieron 200 µL del reactivo comercial previamente diluido 1:5. Se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro de placas (marca, casa comercial). Tras obtener las absorbancias correspondientes a cada calibrador, se creó la recta estándar y se extrapoló la concentración de proteínas de cada una de las muestras analizadas, teniendo en cuenta el factor de dilución.

La excreción de proteínas totales por día se calculó de la siguiente fórmula:

$$\text{Excreción urinaria de proteínas } \left(\frac{\text{mg}}{\text{día}} \right) = \text{ConcP} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) \times \text{FU} \left(\frac{\text{mL}}{\text{día}} \right)$$

Donde ConcP es la concentración de proteínas en la orina y FU es el flujo urinario

4.3 Medida de la concentración de urea en el plasma (BUN, de *blood urea nitrogen*)

La determinación de la concentración de BUN se llevó a cabo con un kit comercial (*Urea assay kit*, de *BioChain*). Este kit utiliza el método de Jung mejorado, en el que el compuesto o-phtalaldehído and N-(1-naphthyl) etilendiamina forma un complejo con la urea cuya intensidad es proporcional a la cantidad de urea en la muestra (D. Jung et al., 1975).

Se prepararon los patrones de la recta a una concentración de 0, 2,5, 5, 10, 50, a partir de un stock de urea (50 mg/dl) incluido en el kit. Se añadieron 5 µL de los estándares y de las muestras de plasma diluidas previamente 1:5, en una placa de 96 pocillos. Se añadieron 200 µL de una mezcla del reactivo A y B en

proporción 1:1 por cada pocillo y después de 20 minutos se calcularon los valores de absorbancia a 540 nm. Se restó el valor del blanco a todos los pocillos y se generó la recta a partir de los valores de absorbancia de los patrones. Se extrapolaron los valores de concentración de urea para las muestras a partir de la recta y se multiplicaron por el factor de dilución.

5 IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR *WESTERN BLOT*

El Western blot es una técnica usada para la detección de proteínas en muestras biológicas como plasma, orina, lisado celular, tejido, etc. El primer paso consiste en la separación de las proteínas en base a su peso molecular en un gel de poliacrilamida. Este proceso se conoce como electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE, del inglés *polyacrilamide gel electrophoresis*). A continuación, se realiza una transferencia de las proteínas desde el gel hacia una membrana para que puedan ser posteriormente identificadas mediante el uso de anticuerpos específicos (Figura 19). Existen dos tipos de anticuerpos: los anticuerpos primarios que se unen directamente a las proteínas y los secundarios que se unen a los anticuerpos primarios. Los anticuerpos secundarios son aquellos que han sido producidos en una especie que reconoce anticuerpos de una especie diferente (por ejemplo, anticuerpos realizados en cabra que son anti-ratón (reaccionan contra anticuerpos de ratón), o anticuerpos de conejo anti-cabra, etc. (Corley, 2005).

La detección de la señal se basa en que los anticuerpos secundarios están conjugados con una enzima que es capaz de reaccionar con un sustrato específico. Esto genera una señal proporcional a la cantidad de anticuerpo secundario, que será a su vez proporcional a la cantidad de primario unido a la proteína en la muestra. Finalmente, la cantidad de anticuerpos primario es proporcional a la cantidad de la proteína a la que se une. Un ejemplo de enzima conjugada con anticuerpos secundarios es el HRP (enzima peroxidasa de rábano picante, del inglés *horseradish peroxidase*) que reacciona con el luminol en presencia de peróxido de hidrógeno y, entre otras cosas, produce emisión de luz. La cuantificación de la luz proporciona, por lo tanto, una medida de la cantidad de la proteína estudiada.

5.1 Preparación de las muestras, electroforesis y transferencia

En primer lugar, la cantidad de orina a cargar en cada pocillo se calculó teniendo en cuenta el flujo urinario diario (FU) de cada animal, de forma que fuera proporcional al FU en relación 1:1000, es decir, si el FU fue

MATERIALES Y MÉTODOS

de 10 ml la cantidad a cargar serían 10 μ L. En el caso en que el volumen de orina a cargar fuera inferior a 21 μ L, se añadía agua destilada hasta llegar a los 21 μ L de forma que la cantidad de tampón de carga Laemmli (Tris 125 mM, glicerol al 10 %, duodecil sulfato sódico (SDS) al 2 %, β -mercaptoetanol al 1 % y azul de bromofenol al 0,0005 %; pH 6,8) a añadir fuera de 7 μ L (en proporción 1:3 con las muestras). Sin embargo, para volúmenes de orinas mayores de 21 μ L, correspondientes a FU mayores de 21 ml, se añadió solo el tampón de carga en proporción 1:3 con la muestra.

Una vez preparadas, las muestras se hirvieron a 100 °C durante 5 minutos.

Cuando las muestras hierven en presencia de SDS (un tensoactivo cargado negativamente), las proteínas pierden su estructura terciaria y se desnaturalizan. El SDS se une a las proteínas desnaturalizadas de forma cuantitativa, de manera que el número de moléculas que se unen será proporcional al número de aminoácidos de las proteínas. Las proteínas de mayor tamaño tendrán una mayor carga negativa. Además, la presencia de β -mercaptoetanol favorece condiciones reductoras, en las que se rompen los enlaces covalentes (puentes disulfuros) eventualmente existentes entre complejos multiméricos o en el interior de esta (Corley, 2005).

Se cargó en uno de los pocillos el marcador de pesos moleculares (*Termo Fischer Scientific*).

Las proteínas se separaron mediante electroforesis vertical en geles de acrilamida o SDS-PAGE. Se utilizaron geles comerciales con un porcentaje de acrilamida 4-20 % (*Bio-Rad*). La electroforesis se realizó en cubetas Mini-PROTEAN®III (*Bio-Rad*) y se usó el tampón de electroforesis preparado de la siguiente manera (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, pH 8,3, SDS al 0,1 %). Gracias al SDS, las proteínas cargadas negativamente se desplazan hacia el polo positivo separándose únicamente por su peso molecular.

Terminada la electroforesis, los geles se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivílideno (PVDF del inglés *polyvinylidene difluoride*; *Immobilon P*, *Millipore*). Se utilizó el método de transferencia semiseca, empleando el tampón de transferencia comercial (*Transblot Turbo Transfer Buffer*, *Bio-Rad*) y el equipo (*Transblot Turbo*, *Bio-Rad*). Para realizar la transferencia, se construyó un "sándwich" de la siguiente forma: esponja, papel de filtro, membrana, gel, otro papel de filtro terminando con otra esponja.

Mediante la aplicación de un flujo de corriente eléctrica a través del gel, las proteínas migran del polo negativo, donde se encuentra el gel, hacia el polo positivo, donde se encuentra la membrana, quedando atrapadas en ésta.

5.2 Bloqueo e incubación con los anticuerpos

Finalizada la transferencia, las membranas se incubaron con un tampón de bloqueo preparado a partir del tampón de lavado salino tamponado con fosfato (PBS, del inglés *phosphate-buffered saline*) 1X (100 mL PBS 10X, 1 mL de Tween-20 y c.s.p. 1 L de H₂O destilada) con BSA a 3% durante 3 horas. El bloqueo sirve para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos.

Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario, diluido en solución de tampón de lavado con BSA al 1%, a 4°C durante toda la noche.

El día siguiente se retiró el anticuerpo primario, se realizaron 3 lavados de 7 minutos con tampón de lavado y se añadió el anticuerpo secundario diluido en solución de tampón de lavado con BSA al 3%, durante 1 h a temperatura ambiente. Terminada la hora, se lavaron las membranas como se ha explicado anteriormente.

Las tablas 5 y 6 muestran los anticuerpos primarios y secundarios utilizados, su dilución y condiciones.

ANTICUERPO PRIMARIO	REFERENCIA Y CASA COMERCIAL	DILUCIÓN	% BSA	TIEMPO
Ac de pollo anti-albúmina	NBP1-77027(NovusBio)	1:1000	1%	o/n
Ac de cabra anti-clusterina	sc-6420 (Santa Cruz Biotech)	1:1000	1%	o/n
Ac de cabra anti-Fetuina-A	sc-20872 (Santa Cruz Biotech)	1:1000	1%	o/n
Ac de conejo anti-Gm2ap	Immunostep	1:1000	1%	o/n
Ac de cabra anti-Reg-IIIb	AF1996 (R&D Systems)	1:1000	1%	o/n
Ac de conejo anti-TCP-1	NBP2-20588 (Novus Biologicals)	1:500	1%	o/n
Ac de cabra anti-transferrina	Sc-22597 (Santa Cruz-Biotech)	1:1000	1%	o/n

Tabla 5: Relación de anticuerpos primarios utilizados para la técnica de Western Blot. Ac: anticuerpo; BSA: albúmina de suero bovino (del inglés, bovine serum albumine); o/n: toda la noche (del inglés, over night); Reg IIIb: Proteína 3-β derivada de islote regenerador; TCP-1: del inglés *tailless complex polypeptide*.

ANTICUERPO SECUNDARIO	REFERENCIA Y CASA COMERCIAL	DILUCIÓN	% BSA	TIEMPO
Cabra anti conejo IgG (H+L)-HRP	4052-05 (Southern Biotech)	1:10000	3%	1 hora
Cerdo anti cabra IgG (H+L)-HRP	6300-05 (Southern Biotech)	1:10000	3%	1 hora
Cabra anti ratón IgG (H+L)	1034-05 (Southern Biotech)	1:5000	3%	1 hora
Cabra anti pollo IgY HRP	NB7303 (NovusBio)	1:10000	3%	1 hora

Tabla 6: Relación de anticuerpos secundarios utilizados para la técnica de Western Blot. BSA: albúmina de suero bovino (del inglés bovine serum albumine); HRP: enzima peroxidasa de rábano picante (del inglés horseradish peroxidase); IgG: inmunoglobulina.

5.3 Revelado

Para detectar la señal emitida por el anticuerpo secundario, se incubaron las membranas durante 1 minuto en una solución de revelado (Tris-HCl 1 M, pH 9,35; luminol 2,2 mM, p-iodofenol 2,2 mM) suplementada con H_2O_2 al 0,03-0,06 %.

La enzima HRP unida al anticuerpo secundario cataliza la descomposición del H_2O_2 y libera O_2 que oxida el luminol. El luminol oxidado emite una señal de luminiscencia, que será mayor cuanto más proteína haya, puesto que unirá mayor cantidad de anticuerpo y habrá más catálisis enzimática en ese punto. La quimioluminiscencia emitida se detectó con el dispositivo ChemiDoc™ MP imager y las imágenes resultantes se cuantificaron mediante el programa Image Lab 6.0.1 software (Bio Rad).

Las etapas principales del Western blot se resumen en la Figura 19.

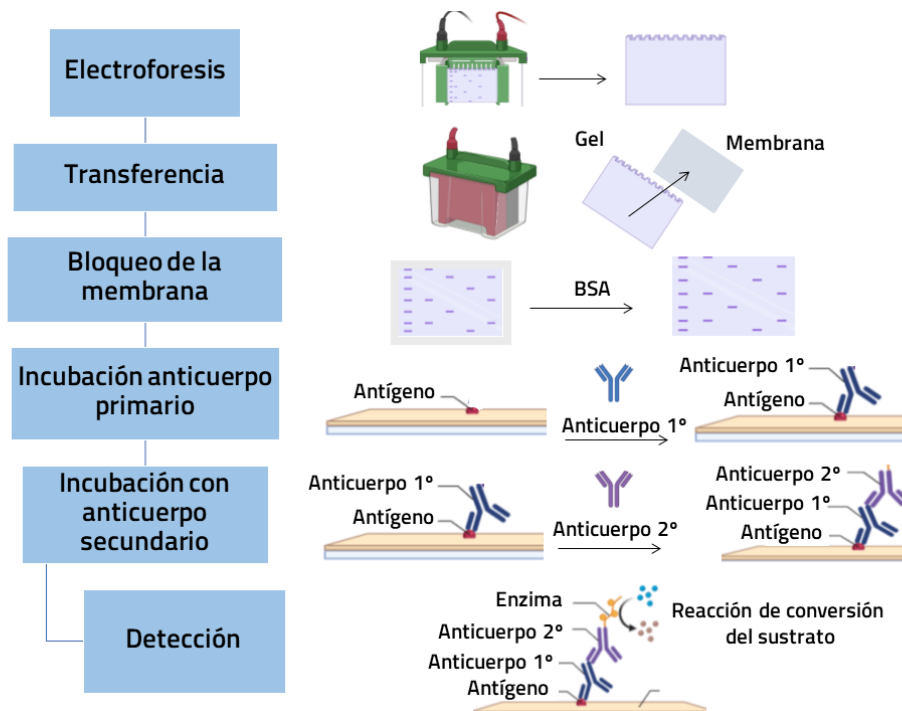


Figura 19: Representación esquemática del Western blot. Se muestran las principales etapas.

5.4 Normalización de datos

En todos los *Western blot* se ha utilizado un control positivo (C+), la orina de una rata con DRA inducido por gentamicina 150 mg/Kg, en la cual se expresaban todos los biomarcadores analizados. Se han utilizado diluciones diferentes de control positivo que se han elegido dependiendo de la proteína analizada para poder generar una recta de regresión con el programa Image Lab 6.0.1 software (Bio Rad).

Empleando el programa anterior se calcularon las cantidades relativas de proteína en las muestras a partir de la recta de regresión generada. Los valores obtenidos que se refieren a la cantidad de proteína presente son cantidades relativas a las del control positivo y se expresan en unidades arbitrarias (UU.AA.).

6 ELISA

La técnica ELISA (del inglés, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) fue descrita por primera vez por Engvall and Perlman en el 1971 (Engvall & Perlmann, 1971). Este método permite la cuantificación de antígenos solubles y de anticuerpos presentes en diferentes tipos de muestras biológicas, de forma altamente específica y con elevada sensibilidad. La forma más básica de esta técnica se usa para la cuantificación de

MATERIALES Y MÉTODOS

anticuerpos, y consiste en recubrir los pocillos de una placa de 96 con un antígeno. Después, se añade la muestra biológica que supuestamente contiene el anticuerpo de interés (por ejemplo, el suero de un animal o de un paciente inmunizado, o el sobrenadante proveniente de un cultivo celular que se ha utilizado para la producción de anticuerpos monoclonales), y se deja incubar un tiempo. Tras unos lavados, se añade un anticuerpo secundario acoplado a una enzima (de allí el nombre *enzyme-linked*). La conversión del sustrato será directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo secundario, a su vez proporcional a la cantidad de anticuerpo unido al antígeno (Corley, 2005).

El tipo de ELISA empleado en este trabajo fue el ELISA tipo "sándwich". En este caso, la placa está recubierta con un anticuerpo y se añade una muestra conteniendo el antígeno. El anticuerpo que recubre la placa se utiliza como anticuerpo de captura para la inmovilización del antígeno de interés. Después se añade otro anticuerpo primario, llamado de detección, que es capaz de unirse con el antígeno, pero en un epítipo diferente al anticuerpo de captura. Los dos anticuerpos forman un "sándwich" con el antígeno y de allí el nombre de este ensayo. El anticuerpo de detección está conjugado con biotina y tras el periodo de incubación, se añade la proteína estreptavidina asociada a la enzima HRP.

La estreptavidina tiene gran afinidad por la biotina, formando un complejo con el anticuerpo de detección. La adición de un sustrato coloreado de la enzima HRP (generalmente TMB, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina) permite obtener una señal cuantificable por espectrofotometría.

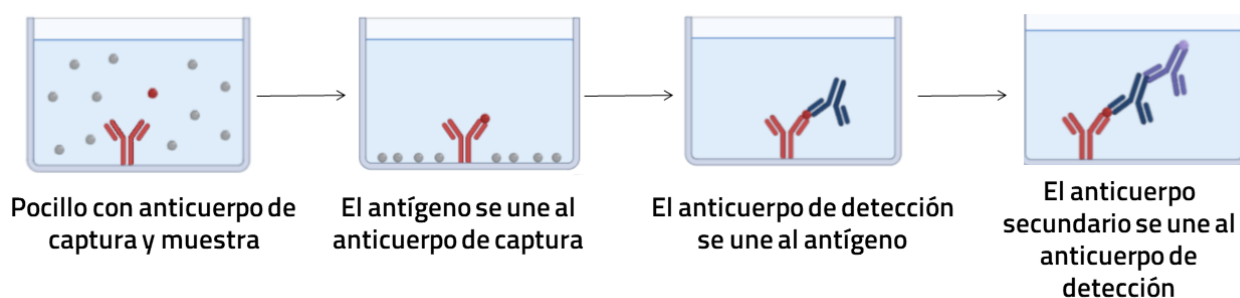


Figura 20: Representación esquemática del ELISA tipo sándwich.

En la tabla 7 se resumen los kits ELISA utilizados en este trabajo.

PROTEÍNA	NOMBRE	REFERENCIA Y CASA COMERCIAL	RANGO DE DETECCIÓN	DILUCIÓN MUESTRAS
ALBÚMINA	Rat albumin ELISA kit	Ab108789 Abcam	0,781-200 ng/ml	1:1000 controles Hasta 1:40000 en grupos de 5/6 NEF y CDDP5-I/R60-I/R60 en M8 Y M9
IGFBP-7	ELISA kit for Insulin like growth factor binding protein-7	SEB673Ra Cloude-clone	62,5-4.000 pg/mL	1:2 controles 1:5 D20 grupo triple daño 1:10 D30 grupo triple daño; D4 cisplatino;
KIM-1	Rat Kidney Injury Molecule, KIM-1, ELISA kit	CSB-E08808r Cusabio	0,31-20 ng/mL	1:2 Controles 1:10 otras
NGAL	Rat NGAL ELISA kit	KIT-046 Bioporto	4-400 pg/mL	1:20.000 todas
RBP4	Retinol Binding protein 4 (RBP4) Rat Simplestep ELISA.	Ab203362 Abcam	13-850 pg/ml	1:250 controles 1:1000 D20 grupo triple daño; 5/6 NEF; CTRL-I/R60; CDDP5-SHAM 1:5000 M1 grupo triple daño; D4 cisplatino; M2-M3-M4-M5 5/6NEF
TIMP-2	Rat TIMP-2 ELISA Kit	Ab213923 Abcam	156,25-5.000 pg/mL	1:2 controles 1:5 D20 grupo triple daño; 5/6 NEF; CTRL-I/R60; CDDP5-SHAM 1:10 D30 grupo triple daño; D4 cisplatino; M2-M3-M4-M5 5/6NEF

TRANSFERRINA	Rat transferrin ELISA kit	Ab137992 Abcam	0.313-20 ng/ml	1:100 controles Hasta 1:10000 en grupos de 5/6 NEF y CDDP5-I/R60-I/R60 en M8 Y M9
---------------------	---------------------------	-------------------	-------------------	--

Tabla 7: Resumen de los kits de ELISA empleados en este trabajo.

7 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés, *Polymerase chain reaction*), es una técnica que se utiliza para la amplificación de secuencias de ADN in vitro. Consiste en la repetición de ciclos de temperaturas (mediante el uso de un termociclador) que consisten en tres pasos (Corley, 2005):

- Desnaturalización del ADN para separarlo en sus cadenas sencillas (T^a 94-95 °C).
- Fase de hibridación de los cebadores (en inglés, "*annealing*"). La temperatura necesaria en esta fase depende de la pareja de cebadores utilizado (entre 40-68 °C).
- Reacción de extensión de ADN mediante una polimerasa estable a altas temperaturas. Para la polimerasa Taq (del latín, *Thermus aquaticus*, nombre de la bacteria donde fue aislada por primera vez) la temperatura que se suele utilizar es de 72 °C.

La PCR puede ser utilizada también para identificar ARN en una muestra. Esta técnica se conoce como RT-PCR (del inglés, *reverse transcription PCR*) y consiste en dos pasos que pueden realizarse por separado o a la vez: 1) la retrotranscripción del ARN a ADN complementario (ADNc, del inglés, *complementary DNA*) mediante el uso de la enzima transcriptasa reversa, de nucleótidos y de cebadores inespecíficos, y 2) amplificación del ADNc con cebadores específicos para el segmento que se quiere amplificar.

Para hacer comparaciones entre diferentes muestras en cuanto a la cantidad de ADN presente en las muestras, se usa la técnica qPCR (del inglés, *quantitative real-time PCR*) también conocida simplemente como *real time PCR*, que permite la detección en tiempo real de los productos generados por PCR mediante un compuesto fluorescente. En este trabajo se ha utilizado el SYBR Green (Bio Rad) un compuesto capaz de unirse a la doble cadena de ADN, emitiendo fluorescencia que el aparato detecta en tiempo real.

Mediante la comparación del producto generado por PCR, con la amplificación de otro gen de referencia (en inglés, "*housekeeping genes*"), se pueden hacer comparaciones entre distintas muestras (Corley, 2005).

En este trabajo se ha utilizado una RT-qPCR, es decir una PCR en tiempo real (qPCR) precedida por la retrotranscripción de ARN a ADNc, como se explica con más detalle a continuación.

7.1 Extracción del ARN del tejido renal

Para la extracción de ARN de tejido renal se usó del kit comercial RNeasy *Mini Kit* (Qiagen).

En primer lugar, se pesaron 25-30 mg de tejido pulverizado y se lisaron en el tampón RA1 del kit suplementado con β -mercaptoetanol al 1 %. Para cada muestra se han añadido 350 μ l del tampón RA1 y 3,5 μ l de β -mercaptoetanol. El lisado se pasó a una columna y se centrifugó durante 1 minuto a 11.000 x g para eliminar los componentes no lisados y reducir su viscosidad. Después, se añadieron 350 μ l de etanol 70% a cada muestra, y esta mezcla se cargó en una columna de sílice que se centrifugó a 11.000 x g durante 30 segundos. El etanol sirve para garantizar unas condiciones adecuadas para que el ARN quede unido a la membrana de sílice en la columna. En condiciones nativas los ácidos nucleicos son solubles en solución acuosa ya que están recubiertos de una capa de moléculas de agua. Tras la adición de agentes caotrópicos al medio, los ácidos nucleicos se recubren de una capa hidrófoba y son fácilmente retenidos en la membrana de sílice de las columnas (R. P. Johnson et al., 2014).

Posteriormente se incubaron las membranas con ADNasa recombinante para eliminar el ADN residual que pudiera permanecer en ellas.

Se hicieron 3 lavados con los tampones RAW2 y RA3 para eliminar contaminantes y finalmente el ARN se eluyó con 60 μ l de H₂O libre de ARNasas.

El ARN obtenido se cuantificó en un espectrofotómetro de tipo Nanodrop ND-1000 (casa comercial) y seguidamente se realizó la retrotranscripción de ARN a ADNc.

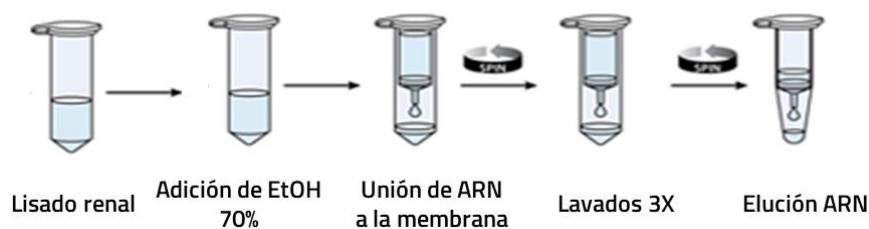


Figura 21: Esquema del proceso de extracción de ARN usando columnas de sílice (kit comercial).

7.2 Obtención de ADNc

Se diluyeron 5 μg de ARN de cada muestra con agua bidestilada libre de ARNasas hasta un volumen final de 80 μL (concentración $\frac{1}{16} (\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}})$). De estos 80 μL se cogieron 32 μL (que corresponden a 2 μg de ARN) a los que se añadieron 8 μL de la iScript RT Supermix 5X (Bio Rad), que contiene transcriptasa reversa, dNTP, oligo(dT), cebadores aleatorios, inhibidor de ARNasas, estabilizadores de MgCl_2 y el tampón de reacción. Los 40 μL totales se incubaron en un termociclador MyCycler a 25 °C durante 5 minutos, seguidos de 30 minutos a 42 °C y 5 minutos finales a 85 °C. El ADNc obtenido se almacenó a -20 °C. Los restantes μL de ARN puro, y ARN diluido $\frac{1}{16} (\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}})$ se guardaron a -80 °C. El ADNc se guardó a -20 °C.

7.3 Diseño de los cebadores

Para el diseño de cebadores, se utilizó la base de genes del NCBI (del inglés, *National Center for Biotechnology Information*). Mediante la herramienta Primer-BLAST, se seleccionó la pareja de cebadores que mejor reunía los requisitos: porcentaje de pares GC en torno al 50%, longitud del amplicón en torno a 100 pb, y grado de autocomplementariedad bajo.

Se llevaron a cabo dos pruebas para verificar en cada caso el funcionamiento de la pareja de cebadores. En primer lugar, un gradiente de temperaturas consistente en una qPCR que utiliza diferentes temperaturas de anillamiento. Esta prueba nos permitió, por una parte, elegir la temperatura de anillamiento a la que mejor funcionasen los cebadores. Por otro lado, el análisis de la curva de disociación del producto de PCR nos permitió saber si se había amplificado un solo producto o había habido amplificaciones inespecíficas que por tanto invalidasen el uso de estos cebadores. Debido a la posibilidad de que dos productos de PCR de diferente longitud tuviesen una curva de disociación similar por su composición en pares de bases,

llevamos a cabo una electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos en la anterior prueba. De este modo, pudimos comprobar que nuestra pareja de cebadores sólo ofrecía un producto de PCR.

Posteriormente, comprobamos la eficiencia de amplificación de nuestra pareja de cebadores, amplificando diluciones seriadas 1:3 de una muestra, y comprobando que el producto de PCR obtenido en cada muestra conservaba la proporción con respecto a la muestra sin diluir. Así, se elaboró una recta que enfrentaba el Ct (ciclo umbral) con la dilución de la muestra. Se consideraron válidas rectas con un valor de R^2 superior a 0,99. Además, la eficiencia, es decir, la proporción de ADN que rendía la reacción de PCR en cada muestra, o pendiente de la recta, debía estar entre el 90 y el 110 %. Un resultado positivo en ambas pruebas validaba los cebadores para su uso.

Como *house keeping* se han usado la proteína Beta 2 microglobulina (B2M, del inglés *Beta-2 microglobulin*) y la ARN polimerasa 2A (Polr2A).

Las parejas de cebadores utilizadas en este trabajo se detallan en la tabla 8.

GEN	SECUENCIA DE CEBADORES (5'—3')	T° DE ANILLAMIENTO
B2M	GCTTGCAGAGTTAAACACGTC	55
CLUSTERINA	CACTACGGGCCTCTGAGCTT	64,5
GM2AP	TTCCCCCTCACTTCTCCTCAG	59
IGFBP-7	TTCCGCCTTCCCTGCAATTA	59
KIM-1	GTGAGTGGACCAGGCACACA	64,5
NGAL	TCTGGGCCTAAGGATAACAACGACAGGTGGGACCTGAACCA	64,5
Polr2A	ACCCTAACCTATCCATTGACC	55
Reg3b	CACTCTTGGTGGAGAACCCA	64,5
TIMP-2	AGGACCTGACAAGGACATCG	58
TCP-1	GGGCCATCAAGAACGACTCT	65

Tabla 8: Cebadores de diseño propio y condiciones empleadas en la técnica qPCR

7.4 PCR a tiempo real

Para llevar a cabo la reacción de PCR, se mezclaron 1 μL de ADNc de cada muestra, 10 μL de la Supermix iQ™SYBR®Green, 0,4 μL de cada cebador y 8,2 μL de H₂O bidestilada. Todos los análisis se hicieron por triplicado.

Se utilizó un termociclador iQTM 5 (*Bio-Rad*) empleando el siguiente protocolo para llevar a cabo las diferentes etapas de la reacción: 5 minutos a 95 °C, 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C (desnaturalización), 30 segundos a la temperatura de anillamiento específica, 30 segundos a 72 °C (elongación). Cuando el protocolo finaliza, se produce un aumento en la temperatura del termociclador de 70 °C a 90 °C que conlleva la desnaturalización del ADN y un decaimiento de la señal fluorescente, obteniendo la curva de disociación del producto de PCR. Para confirmar que estamos amplificando un solo producto, esta curva debe ser única. El software establece una línea horizontal que corta a las curvas de amplificación de cada muestra cuando están en su fase exponencial, denominada línea de umbral. Posteriormente, a partir de los Ct de las muestras (ciclo de amplificación de cada muestra en el que la curva de amplificación en fase exponencial corta la línea de umbral) calcula los niveles de expresión relativos de las distintas muestras de estudio. Un Ct más bajo implica que en esa muestra se alcanza antes la fase exponencial de amplificación y por tanto hay una mayor cantidad de ADN del gen analizado.

8 ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Los riñones fijados en formaldehído al 4% se deshidrataron con una batería de concentraciones crecientes de etanol, empezando con etanol 50% y continuando con diluciones de 70%, 80%, 90%, 96% hasta 100%. Después se incluyeron en parafina en una estufa a 60 °C durante 24 horas. Los bloques se cortaron con un micrótopo (HM-310, Microton), en sección de 5 μm de grosor, que se depositaron en un portaobjeto, dejándose secar en una estufa durante un día entero.

Antes de cada tinción, se removió la parafina utilizando xileno y se rehidrataron con concentraciones decrecientes de etanol hasta finalizar con una solución 100% de agua destilada.

Una vez finalizada cada tinción, se añadió el medio de montaje DPX (casa comercial) a cada portaobjeto y se colocó un cubreobjetos para proteger los cortes teñidos. Se codificaron los portaobjetos y se aplicó la

técnica microscópica DotSlide que permite hacer una digitalización de toda la preparación histológica gracias a un escáner y un microscopio robotizado. A continuación, se analizaron las imágenes con el Software Olyvia (*Olympus Life Science*).

8.1 Tinción de hematoxilina-eosina

Esta tinción permite estudiar la morfología de las células que forman parte del tejido renal.

Para realizar esta tinción se emplean dos colorantes: la hematoxilina y la eosina.

La hematoxilina oxidada es capaz de colorar de azul los componentes ácidos de las células, constituidos principalmente por los ácidos nucleicos del ADN y por lo tanto el núcleo de la célula. La eosina es un colorante ácido que presenta afinidad para las estructuras básicas y por lo tanto permite marcar de rosa las proteínas en el citoplasma, el intersticio y las membranas basales de rosa.

El tejido sin parafina e hidratado se inmergió primero en hematoxilina durante unos minutos. Después se lavaron en agua corriente y se sumergieron en eosina durante unos segundos. Posteriormente, se deshidrató de nuevo el tejido con alcohol siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente.

8.2 Tinción de ácido peryódico y reactivo de Schiff (PAS)

Esta técnica permite la detección de polisacáridos, mucopolisacáridos en tejidos que están presentes en componentes celulares como en las glicoproteínas de membranas celulares. Esta tinción se ha empleado para estudiar el borde en cepillo de las células tubulares proximales que tiene afinidad para este reactivo.

La tinción se basa en que el reactivo de Schiff es capaz de reaccionar con los grupos aldehídos que encuentra tiñéndolos de color magenta. Para esto es necesaria la previa oxidación del tejido mediante el ácido peryódico de manera que los grupos hidroxilos presentes en la porción glucídica generen grupos aldehídos.

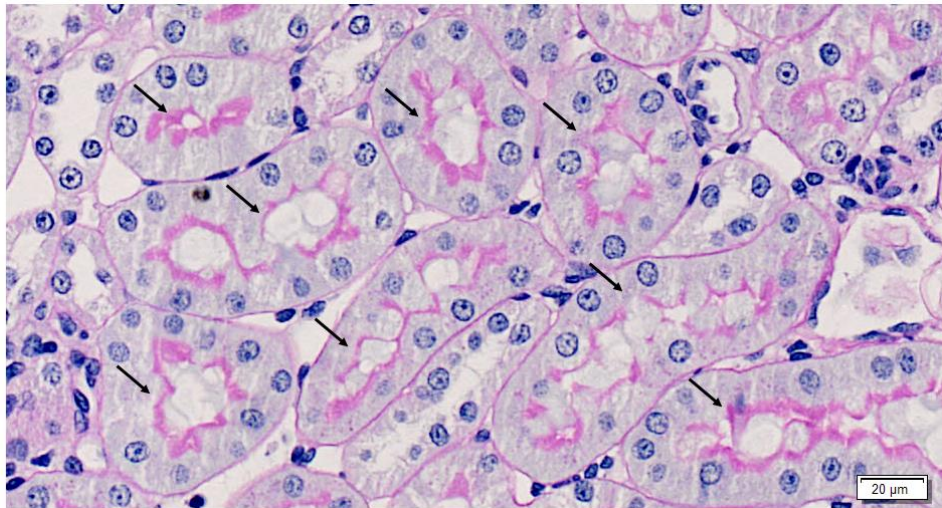


Figura 22: Imagen representativa de un riñón (200X) teñido con PAS. Se diferencia el borde en cepillo (flecha).

Para llevar a cabo la tinción se sumergió el riñón sin parafina e hidratado en ácido peryódico durante 5 minutos, se lavó con agua y se sumergió en ácido de Schiff durante 15 minutos. Tras tres lavados de 10 minutos con agua se sumergió en hematoxilina de Mayer durante 1 minuto y se lavaron los restos de colorante con agua. Por último, se deshidrató nuevamente el tejido con etanol en distintas concentraciones siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

8.3 Tinciones para el estudio de la fibrosis

Para poder visualizar la fibrosis renal generada en los diferentes modelos experimentales se han utilizado dos tipos de tinciones:

- Rojo sirio.
- Tricrómico de Masson.

Ambas tinciones permiten marcar las fibras de colágeno.

El colágeno es la proteína más abundante del cuerpo humano y ejerce un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad estructural de los tejidos y órganos. Se han identificado hasta ahora más de 27 tipos diferentes de colágenos, clasificados y agrupados en familias y subfamilias dependiendo de su peso molecular y forma. Entre estos el colágeno I es el más abundante de todos (Koide, 2007). Todas las moléculas de colágeno se caracterizan por el poseer una estructura terciaria basada en una triple hélice de

tres cadenas peptídicas. En cada cadena, el aminoácido glicina constituye el 33% de todos los aminoácidos y está presente cada tres aminoácidos formando un patrón repetido (Gly-X-Y). X y Y están constituidos comúnmente por el aminoácido prolina y hydroxiprolina, de forma que el patrón más común en la estructura es Pro-Hyp-Gly. Las triples hélices se agrupan en estructuras más complejas, dando lugar a las fibras de colágeno (Beck & Brodsky, 1998).

8.3.1 Tinción de rojo sirio

El rojo sirio es una técnica frecuentemente utilizada en el estudio y cuantificación de la fibrosis tisular, ya que es capaz de teñir las fibras de colágeno de color rojo (Masseroli et al., 1998).

El rojo sirio se une a la secuencia Gly-X-Pro no discriminando entre los diferentes tipos de colágeno.

Para realizar esta tinción, se removió la parafina de los cortes, se hidrataron y se lavaron durante 10 minutos con agua corriente. Se preparó la solución de Rojo Sirio mezclando 10 mL de Rojo Sirio con 90 mL de una solución saturada de ácido pícrico y se dejó reposar durante 48 horas, efectuándose posteriormente la coloración durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos se mantuvieron durante 5 días en etanol absoluto, se aclararon y se montaron.

8.3.2 Tinción de tricrómico de Masson

Es una tinción que se usa principalmente para estudios cualitativos de fibrosis a nivel tisular ya que las fibras de colágeno resultan teñidas de color verde/azulado. Además, esta técnica permite detectar la presencia de material hialino que resulta marcado por hematoxilina-fucsina. Esta tinción se une principalmente a las fibras de colágeno de tipo I (Calvi et al., 2012).

Se removió la parafina de los cortes y se hidrataron. Se mantuvieron durante una noche en líquido de Bouin (750 mL de solución acuosa saturada de ácido pícrico (al 1-2% en agua destilada), 250 mL de formalina concentrada (40% de formaldehído con un 60% de metanol) y 50 mL de ácido acético glacial, pH 2,2). Se lavaron los cortes con agua destilada hasta la desaparición del color amarillo. A continuación, se tiñeron con hematoxilina férrica de Weigert (0,5 g de hematoxilina cristalizada, 0,75 g de cloruro férrico, 1 mL de ácido acético glacial en 100 mL de agua) durante 10 minutos. De nuevo se lavaron las preparaciones con agua destilada y se tiñeron con la solución escarlata de Biebrich-fucsina ácida (90 mL de Escarlata de

MATERIALES Y MÉTODOS

Biebrich al 1% en agua destilada, 10 mL de fucsina ácida en solución acuosa al 1%, 1 mL de ácido acético glacial) durante 2-5 minutos. Se lavaron con agua destilada y, durante 10 minutos, se tiñeron con una solución acuosa de ácido fosfotúngstico al 5%. Posteriormente, se tiñeron con solución de verde tenue (light green) al 2% (99 ml de agua destilada, 2 g de verde tenue SF amarillento (C.I. 42095) y 1 mL de ácido acético glacial). Los cortes así teñidos se lavaron y se diferenciaron con ácido acético al 1% durante 3-5 minutos. Después de la deshidratación, se montaron las preparaciones y se almacenaron hasta su observación en el microscopio óptico.

8.4 Cuantificación de colágeno mediante tinción con Rojo Sirio

Para la cuantificación de la fibrosis se utilizaron los cortes teñidos con el rojo sirio.

Se elaboró un protocolo basado en estudios previos de nuestro laboratorio y de otros investigadores (Hadi et al., 2011). El primer paso consistió en la realización de capturas de imágenes de los riñones, utilizando el programa informático Olyvia, siguiendo los pasos que se explican a continuación:

- Se seleccionó la barra de escala en un tamaño de 50µm. Este paso es importante para la cuantificación de los píxeles con el siguiente programa informático Image J (como se explica más adelante).
- Se capturaron las fotos con un aumento de 10X y se controló que el tamaño fuera el mismo en todas las imágenes.
- Se ajustó el brillo y el contraste.

Se guardaron las imágenes en formato TIFF con el programa de Power point, fijando unos valores de dimensiones de altura y anchura iguales en todas.

Los siguientes pasos se realizaron con el programa Image J. Una vez abierto el programa:

- Se transformó la escala de la imagen de pulgadas a micras: para poder hacer esto se había fijado previamente una escala de barra con el programa Olyvia de 50µm. Se indicó al programa esta información para que pudiera realizar la conversión de pulgadas a micras (Figura 23).
- Se transformó la imagen de RGB Color (predeterminado) a blanco y negro separándola en 3 canales a RGB stack (acrónimo inglés por *red, green, blue*) (Figura 24).

Se midió el área marcada en rojo ocupada por el colágeno. En todas las imágenes se cuantificó exclusivamente el colágeno intersticial como se muestra en la imagen a continuación.

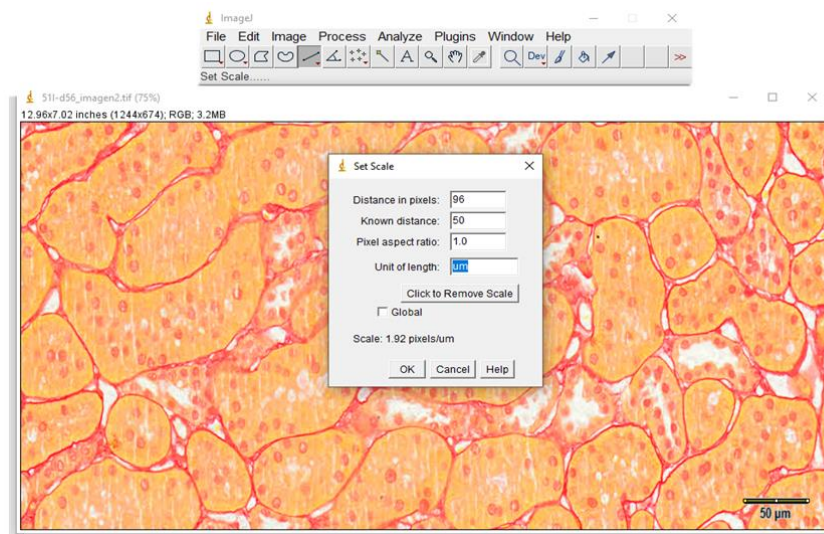


Figura 23: Representación del paso de conversión de pulgadas a micras.

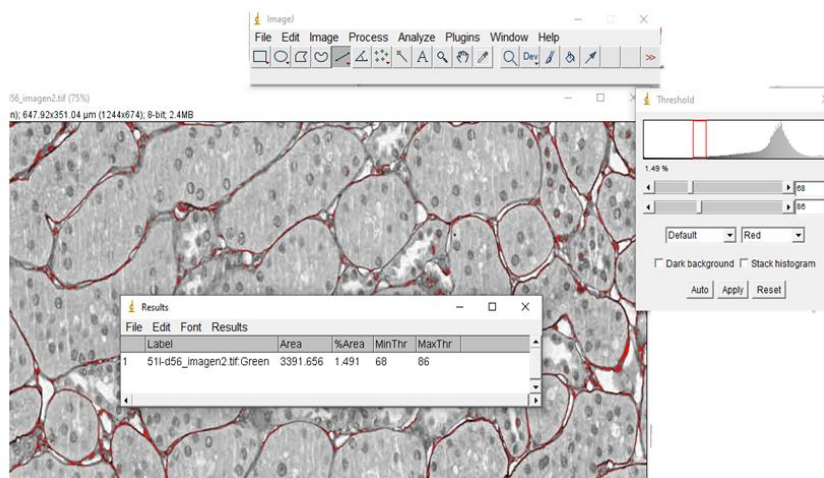


Figura 24: Transformación de la imagen a blanco y negro.

9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados se expresan como la media $\pm$ error estándar de la media (EEM). Se utilizaron entre 3 y 20 animales por cada grupo experimental.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se aplicó el test de Kolmogorov-Smirnov a los diferentes conjuntos de datos para comprobar si su distribución era normal (se ajustaba a una campana de Gauss) o no lo era. En caso afirmativo, se aplicaron test estadísticos paramétricos.

Para datos normales, se utilizó el *test* estadístico de análisis de la varianza (ANOVA) de doble vía para determinar las diferencias significativas entre el grupo control y el grupo de estudio. Para un mismo grupo en los diferentes días de tratamiento se utilizó un ANOVA de una vía. Consideramos significativo un valor de $p < 0,05$ y muy significativo un valor de $p < 0,01$. En caso de encontrar diferencias significativas en el estudio de ANOVA, empleamos para las comparaciones "post hoc" el test de Bonferroni para comparar el grupo de estudio con el grupo control o para comparar el mismo grupo experimental en los diferentes días de estudio.

En el caso de que los datos no presentaran una distribución normal, se utilizaron los *tests* estadísticos no paramétricos. Se empleó el *test* de Kruskal-Wallis para comparar un mismo grupo en los diferentes días de tratamiento. Empleamos el test de Dunn's para las comparaciones "post hoc" y consideramos significativo un valor de $p < 0,05$ y altamente significativo un valor de $p < 0,01$.

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software *GraphPad Prism 7.0*.

10 REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

REACTIVO/PRODUCTO	REFERENCIA	CASA COMERCIAL
Aceite mineral	141003.1211	Panreac
ADN Polimerasa	10.003	Bitools
ADNasa	D5025	Merck
Agujas 23G	4657667	Braun
Alcohol 96° (Acofar)	3496629	Acofarma
Almohadilla Eléctrica DAGA PH	10104283	Daga PH
Azida sódica	6688	Merck
Azul de bromofenol	8026	Sigma-Aldrich

Albúmina sérica bovina (BSA)	A7906	Sigma-Aldrich
Bastoncillos de algodón	004744	Cotoni
Betadine (povidona yodada)	716720	Meda Pharma S.A.U.
Buprex 0,3 mg solución inyectable (Buprenorfina)	679588	Indivior
Capilares heparinizados	7301	Deltalab
Cebadores comerciales qPCR	-	Isogen Life Science
Cisplatino	P4394	Sigma-Aldrich
Cubreobjetos	200x200	Termo Fischer Scientific
Doletal (Pentobarbital)	424126	Vetoquinol
ELISA ALBÚMINA	Ab108789	Abcam
ELISA IGFBP-7	SEB673Ra	Cloud-clone
ELISA KIM-1	CSB-E08808r	Cusabio
ELISA NGAL	KIT-046	Bioporto
ELISA RBP4	Ab203362	Abcam
ELISA TIMP-2	Ab213923	Abcam
ELISA TRANSFERRINA	Ab137992	Abcam
Eosina surgipath	353501601	Casa Álvarez
Etanol	100983	Merck
Formaldehído	344198	Calbiochem
Geles Criterion TGX 4-20%	5678094	Bio-Rad
Glicerol	D4751	Sigma-Aldrich
H₂O₂	H-6520	Sigma-Aldrich
Hematoxilina de Harris	10-2332	Casa Álvarez
Hematoxilina de Mayer	MHS16	Sigma-Aldrich
Hemostático absorbible 10X 20 (PAHACEL)	APOHE005	Iberomed
Heparina 5%	6547533	Hospira

Isoflurano (Vetflurane)	305845	Virbac
Jeringuillas 1 mL	9161406V	Braun
Jeringuillas 2 mL	4606027V	Braun
Imalgene (Ketamina hidrocloreto)	01MER122	Boehringer
Luminol	A8511	Sigma-Aldrich
Marcador 1kb	107-87-018	Termo Fischer Scientific
Marcador pesos moleculares PageRuler™	26616	Termo Fischer Scientific
Material quirúrgico	-	Fine Scientific Tools (F.S.T)
Medidor de Na ⁺	B-722 Na ⁺	Horiba
Medio de montaje DPX	10-8500	Casa Álvarez
Membranas de PVDF	66543	Pall Corporation
Metanol	34885	Sigma-Aldrich
NaCl	S3014	Sigma-Aldrich
NaOH	28245.29	Prolabo
Parafina	-	Casa Álvarez
Kit de tinción de PAS	1016460001	Merck
PBS	1610780	Bio-Rad
p-yodofenol	I10201	Sigma-Aldrich
Pipetas de plástico de 5,10 y 25mL	-	Corning
Portaobjetos	76x26	Termo Fischer Scientific
Puntas micropipeta con filtro	-	Neptune
Puntas micropipeta sin filtro	200/80/16	Deltalab
Quantichrom™ Creatinine assay kit	DICT-500	BioAssay Systems
Quantichrom™ Protein assay kit	QPCR-500	BioAssay Systems
Urea assay kit	Z5030016	BioChain®
XILAGESIC 2% 25 ML (xilacina hidrocloreto)	01CLR034	Calier

RNeasy Mini Kit	74104	Qiagen
Dodecil Sulfato Sódico (SDS)	152002C	Bio-Rad
Tiourea	141743	Panreac
Tampón de transferencia Trans-blot turbo™	10026929	Bio-Rad
Termómetro digital	BP13	VitrotecLabs
Tris base	443566G	Merck
Tris-glicina 10X	1610771	Bio-Rad
Tris-HCl	RES3098	Sigma-Aldrich
Tubos de plástico de 10, 15 y 20mL	-	Corning
Tubos de plástico de 2 mL	4092.7N	Deltalab
Tween-20	P7949	Sigma-Aldrich
Xileno	141769	Panreac
β-mercaptoetanol	M6250	Sigma-Aldrich

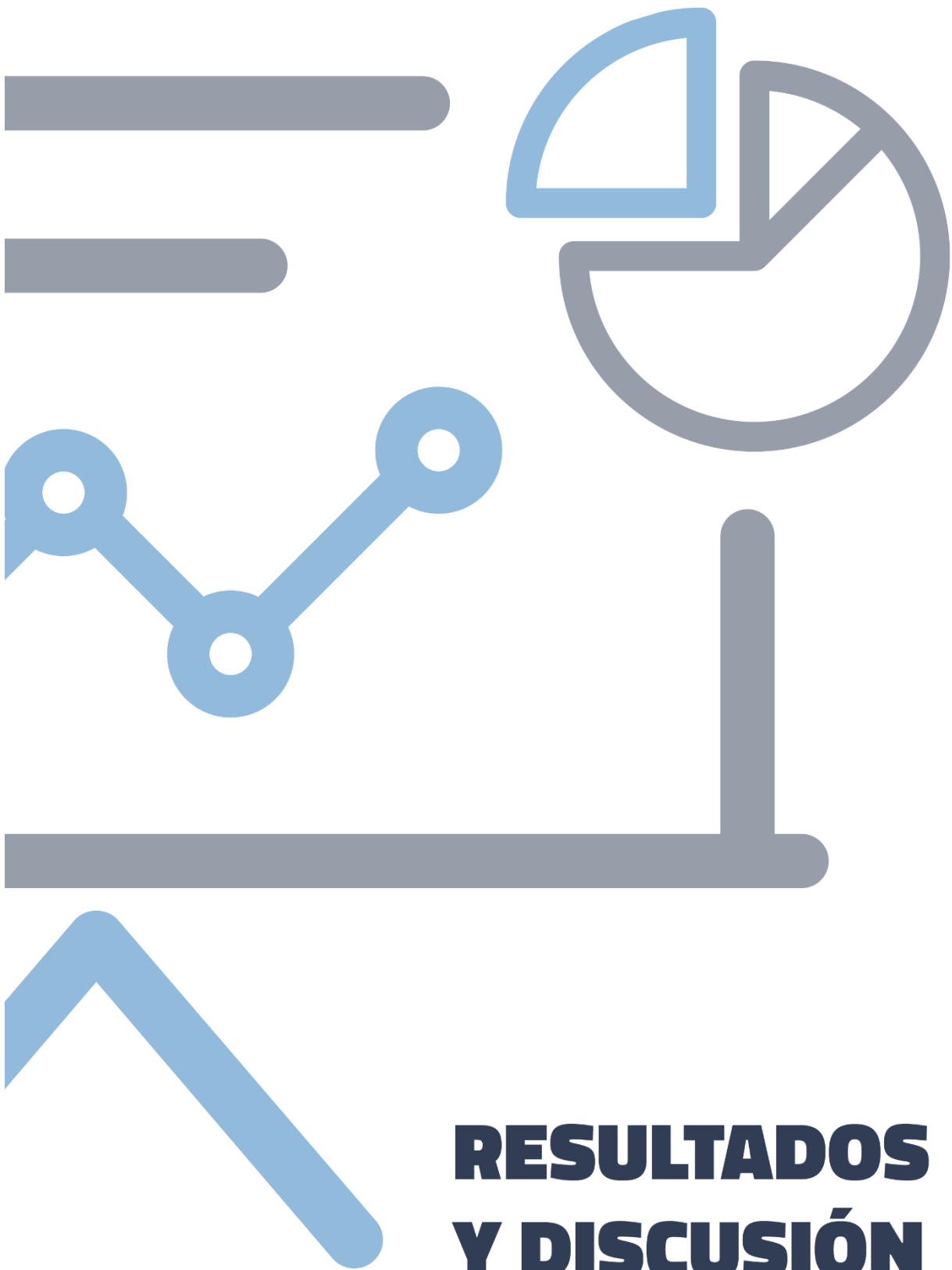
Tabla 9: Reactivos y productos utilizados.

EQUIPO	CASA COMERCIAL
Agitador	Grant BOEKE
Baño húmedo	Indelan
Baño seco	Termolyne, modelo 17600
Bomba de infusión	Dinko Instruments
Centrífugas	Eppendorf
ChemiDoc™ MP imager	Bio-Rad
DotSlide	Olympus BX51
Equipo electroforesis western blot	Bio-Rad

Tabla 10: Equipos y aparatos utilizados

PROGRAMA INFORMÁTICO	CASA COMERCIAL
Adobe Photoshop 7.0	Adobe
Fiji (Image J)	Fiji
GraphPad Prism 7	GraphPad
Gen 5.0	Bio-Tek
Image Pro Plus	Media Cybernetics
Image Lab 6.0.1 software	Biorad
Mendeley Desktop	Mendeley
Microsoft Excel 2019	Microsoft
Microsoft Word 2019	Microsoft
Olyvia	Olympus
Primer Blast	NCBI (National Center for Biotechnology Information)
Scion Image	Scion Corporation

Tabla 11: Programas informáticos utilizados



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1 CARACTERIZACIÓN DEL MODELO ANIMAL

La asociación entre DRA y ERC es un asunto de gran importancia clínica. Diferentes estudios epidemiológicos han descrito un aumento en el riesgo de desarrollo de ERC tras episodios de DRA (Chawla et al., 2014; Ishani et al., 2009; Kurzhagen et al., 2020), especialmente cuando estos son graves o recurrentes, y todavía no se conocen los mecanismos subyacentes a este proceso (Chawla et al., 2014).

Con el objetivo de profundizar en las secuelas resultantes de episodios de DRA y el desarrollo de ERC, se generó en ratas Wistar un modelo experimental de múltiples episodios de DRA. El primer episodio se indujo mediante la administración de una única dosis tóxica de 5 mg/kg de cisplatino por vía intraperitoneal. El cisplatino es un fármaco antineoplásico ampliamente empleado en el tratamiento de varios tumores sólidos (testículos, ovarios, vejiga, esófago, pulmones) (Ho et al., 2016) que, como principal efecto adverso, presenta una nefrotoxicidad dosis dependiente. Más de un tercio de los pacientes tratados con una dosis superior a 50 mg/m² (Ozkok & Edelstein, 2014) manifiestan nefrotoxicidad causada por una acumulación de este fármaco en los túbulos renales, donde es activamente concentrado mediante los transportadores tubulares CTR1 y OCT2 (Miller et al., 2010; Sánchez-González et al., 2011; Yao et al., 2007). Se eligió una dosis de 5 mg/kg, puesto que estudios previos en nuestro laboratorio mostraron que era capaz de inducir un DRA seguido por una recuperación de la función renal (Cuesta Apausa, 2019).

En el día de recuperación de la función renal, se indujo un segundo daño mediante la realización de un procedimiento de isquemia-reperfusión unilateral de 60 minutos en el riñón izquierdo. Se eligió un daño isquémico dado que este puede ocurrir con frecuencia tras intervenciones quirúrgicas que implican una pérdida de sangre significativa (Kolh, 2009); y unilateral por múltiples razones, entre las cuales encontramos la reducción del riesgo de mortalidad en los animales, con una mejor supervivencia para estudios a tiempos largos (Le Clef et al., 2016). En cuanto al tiempo de duración de la isquemia, se eligió una duración de 60 minutos, por estudios previos de nuestro laboratorio sobre DRA causados por I/R, que mostraron cómo este tiempo era suficiente para generar un daño consistente pero no irreversible en el riñón afectado. El tercer y último daño se realizó dos semanas tras la aplicación del segundo y consistió en una I/R unilateral de 60 minutos en el riñón derecho.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para estudiar el impacto que tiene la exposición a episodios repetidos de DRA en las secuelas renales resultantes y en el desarrollo de ERC, comparamos nuestro modelo experimental durante dos meses con otros modelos con menor número de episodios de DRA. En concreto, se utilizaron dos grupos experimentales de un solo daño, inducido o por inyección de cisplatino (5 mg/kg), o por I/R60 unilateral en el riñón izquierdo y, por último, un grupo de doble daño mediante la combinación de los dos anteriores. Se realizó además un estudio largo (de 9 meses), para analizar las consecuencias a largo plazo generadas por los múltiples daños y se comparó nuestro modelo con otro modelo conocido de ERC, el de reducción de 5/6 de la masa renal. Se utilizaron como controles un grupo de ratas uninefrectomizadas ("UNX") (como control de reducción de masa renal) y un grupo de cirugía simulada ("SHAM").

1.1 EVOLUCIÓN DEL PESO CORPORAL

Todos los animales aumentaron de peso a lo largo del estudio. Se observan diferencias significativas solo entre el grupo de triple daño CDDP5-I/R60-I/R60 y el grupo SHAM" en el primer mes de estudio (M1) (Figura 25 y Tabla 12).

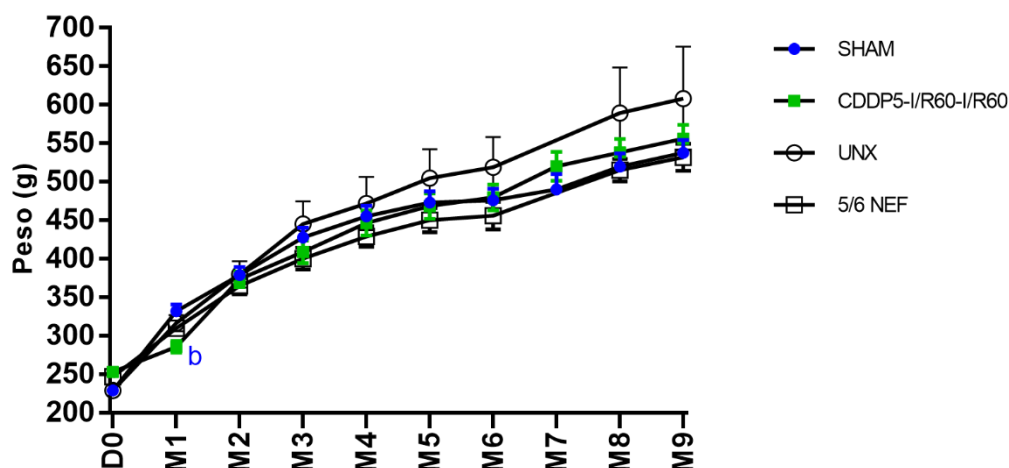


Figura 25: Evolución del peso corporal (g) a lo largo de los 9 meses (D0= comienzo experimento, M=mes), de los diferentes grupos experimentales: grupo "SHAM", "UNX", "5/6 NEF" y de triple daño "CDDP5-I/R60-I/R60". Los valores están expresados como media $\pm$ EEM (^a $p < 0,05$ vs SHAM; ^b $p < 0,01$ vs SHAM; ^c $p < 0,001$ vs SHAM; ^{*} $p < 0,05$ vs UNX; ⁺⁺ $p < 0,01$ vs UNX; ⁺⁺⁺ $p < 0,001$ vs UNX; ^{*} $p < 0,05$ vs 5/6 NEF; ^{**} $p < 0,01$ vs 5/6 NEF; ^{***} $p < 0,001$ vs 5/6 NEF).

	SHAM	CDDP5-I/R60-I/R60	UNX	5/6 NEF
D0	(13) 230 $\pm$ 3.6	(13) 252 $\pm$ 5.2	(13) 224 $\pm$ 7.8	(13) 225 $\pm$ 10.9
M1	(14) 332 $\pm$ 8.9	(14) 285 $\pm$ 7.7	(11) 316 $\pm$ 10.5	(12) 310 $\pm$ 9.1
M2	(11) 379 $\pm$ 10.6	(14) 373 $\pm$ 10.3	(11) 380 $\pm$ 17.2	(12) 365 $\pm$ 10.7
M3	(12) 428 $\pm$ 12.6	(11) 409 $\pm$ 14.7	(8) 445 $\pm$ 29.6	(9) 400 $\pm$ 14.0
M4	(12) 455 $\pm$ 13.6	(11) 446 $\pm$ 16.0	(8) 472 $\pm$ 34.6	(9) 429 $\pm$ 13.6
M5	(12) 473 $\pm$ 14.8	(11) 468 $\pm$ 16.6	(8) 505 $\pm$ 37.5	(9) 450 $\pm$ 16.1
M6	(12) 476 $\pm$ 15.3	(11) 480 $\pm$ 16.6	(8) 518 $\pm$ 39.5	(9) 456 $\pm$ 18.0
M7	(7) 490 $\pm$ 20.0	(6) 520 $\pm$ 18.8		
M8	(7) 520 $\pm$ 15.3	(6) 538 $\pm$ 16.6	(4) 589 $\pm$ 39.5	(3) 515 $\pm$ 18.0
M9	(5) 538 $\pm$ 16.8	(6) 556 $\pm$ 18.0	(4) 608 $\pm$ 67.8	(3) 532 $\pm$ 18.0

Tabla 12: Valores de peso corporal (g) en los diferentes grupos experimentales. Los datos representan la media $\pm$ EEM. Al lado de cada valor se detalla entre paréntesis el número de animales utilizado (n).

1.2 FUNCIÓN RENAL

1.2.1 Evolución de la creatinina plasmática

El parámetro utilizado habitualmente en la clínica para la evaluación de la función renal es la creatinina plasmática, por su rapidez y sencillez (Mian & Schwartz, 2011; Phan et al., 2008). El criterio KDIGO para el diagnóstico del DRA en pacientes define como estadio 1 de DRA la presencia de valores de CrP 1,5-1,9 veces superiores al valor basal o un aumento de la CrP de 0,3 mg/dl en las 48h (J. a Kellum et al., 2012).

En la Figura 26 y Tabla 13 se muestran las variaciones de CrP durante el estudio comparativo entre los distintos modelos de daño. Los animales tratados con el cisplatino desarrollaron un DRA cuatro días después de su administración (D4). En el día R (recuperación), estos animales presentaron valores de CrP normales, es decir iguales a los basales, y a los de los controles.

En la clínica, el diagnóstico de recuperación se basa habitualmente en la normalización de los mismos parámetros utilizados para el diagnóstico del DRA, siendo la CrP el criterio estándar. Esta definición presenta muchas limitaciones, ya que la normalización de la CrP no siempre se corresponde con una completa recuperación. Esto se debe a múltiples factores, entre los cuales encontramos la reserva funcional renal, que representa la capacidad de los riñones de aumentar su funcionalidad, compensando una eventual pérdida de función; y además los límites intrínsecos de la CrP, que carece de excesiva sensibilidad, puesto que una persona sana debe perder más de un 50% de función renal para que aumenten sus niveles en sangre (Chawla et al., 2017; Forni et al., 2017; Göcze et al., 2017; Goldstein et al., 2014; Macedo et al., 2008; MacEdo & Mehta, 2016).

Estudios previos en nuestro laboratorio sobre la recuperación renal en un modelo animal de nefrotoxicidad por cisplatino han mostrado cómo en el día R existen secuelas estructurales en los riñones de los animales tratados, aunque aparentemente se haya normalizado la función renal. La recuperación completa, es decir, una recuperación funcional acompañada además por una reparación del tejido renal, necesita más tiempo, y esto hace que durante este tiempo exista una mayor susceptibilidad a sufrir otro DRA (Cuesta Apausa, 2019). Teniendo en cuenta estos datos, se eligió el día R para la inducción del segundo daño mediante una I/R de 60 minutos unilateral en el riñón izquierdo. Además, se indujo una I/R60 en el grupo de animales de daño único no tratados previamente con cisplatino (grupo I/R60). El día siguiente (R+1), en estos animales

se observa un aumento en los valores de CrP, estadísticamente significativo con respecto al grupo control. El menor incremento en la CrP tras la aplicación del daño isquémico con respecto al D4 puede ser una consecuencia de la compensación funcional por parte del otro riñón no dañado directamente.

En D20 no se observa ninguna diferencia en los valores de CrP. En los grupos de único y doble daño, los valores de CrP se mantuvieron inalterados hasta el día de sacrificio (M2). Sin embargo, tras la aplicación del tercer daño (D24), los valores de CrP se mantuvieron significativamente más elevados en el grupo CDDP5-I/R60-I/R60 hasta el día de sacrificio (M2).

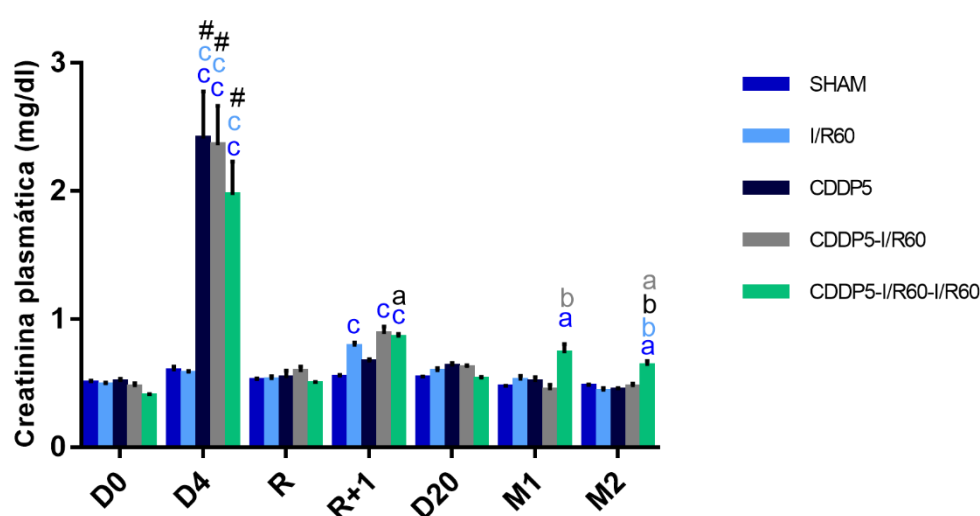


Figura 26: Valores de creatinina plasmática (mg/dl) en los diferentes modelos de daño renal durante los 2 meses de estudio (D0=comienzo experimento, D4= día 4, R= día recuperación, R+1= 1 día después de R, D20= día 20, M=mes). Se muestran los valores de CrP de los animales controles "SHAM", de los dos grupos de un solo daño ("CDDP5"; "I/R60"), de doble ("CDDP5-I/R60") y de triple daño ("CDDP5-I/R60-I/R60"). Cada diagrama representa la media $\pm$ EEM ($^a p < 0,05$; $^b p < 0,01$; $^c p < 0,001$; $^# p < 0,01$ vs basal). El color de las letras a, b y c indica el grupo experimental con respecto al cual se refiere la significación.

	SHAM	I/R60	CDDP5	CDDP5-I/R60-	CDDP5-I/R60-I/R60
D0	(19) 0,50 $\pm$ 0,02	(15) 0,5 $\pm$ 0,02	(15) 0,5 $\pm$ 0,02	(16) 0,5 $\pm$ 0,03	(14) 0,4 $\pm$ 0,02
D4	(13) 0,6 $\pm$ 0,04	(15) 0,6 $\pm$ 0,02	(13) 2,4 $\pm$ 0,4	(12) 2,4 $\pm$ 0,3	(14) 2,0 $\pm$ 0,3
R	(13) 0,5 $\pm$ 0,02	(15) 0,5 $\pm$ 0,03	(10) 0,5 $\pm$ 0,06	(14) 0,6 $\pm$ 0,04	(20) 0,5 $\pm$ 0,02
R+1	(19) 0,5 $\pm$ 0,02	(11) 0,8 $\pm$ 0,03	(11) 0,7 $\pm$ 0,03	(14) 0,9 $\pm$ 0,06	(18) 0,9 $\pm$ 0,03
D20	(11) 0,6 $\pm$ 0,02	(9) 0,6 $\pm$ 0,03	(9) 0,6 $\pm$ 0,03	(7) 0,6 $\pm$ 0,03	(13) 0,5 $\pm$ 0,02
M1	(12) 0,5 $\pm$ 0,01	(6) 0,5 $\pm$ 0,04	(9) 0,5 $\pm$ 0,04	(9) 0,4 $\pm$ 0,04	(14) 0,7 $\pm$ 0,07
M2	(12) 0,5 $\pm$ 0,02	(6) 0,4 $\pm$ 0,03	(8) 0,4 $\pm$ 0,02	(9) 0,5 $\pm$ 0,03	(14) 0,6 $\pm$ 0,04

Tabla 13: Valores de creatinina plasmática (mg/dl) en los diferentes grupos experimentales. Los datos representan la media $\pm$ EEM. Al lado de cada valor se detalla entre paréntesis el número de animales utilizado (n).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 27 y Tabla 14 se muestran los valores de CrP de los 4 grupos (SHAM, UNX, 5/6 NEF y CDDP5-I/R60-I/R60) seguidos durante 9 meses. Los valores de CrP en el grupo control se mantuvieron en un rango entre 0,4-0,6 mg/dl durante todo el estudio. En el grupo UNX, los valores de CrP fueron más altos con respecto al grupo control desde M3, mostrando diferencias significativas con respecto al grupo control solo en M6. En el grupo de triple daño, los valores de CrP se mantuvieron significativamente más altos con respecto al grupo control durante los 9 meses de estudio. En el modelo de 5/6 NEF, la CrP también estuvo aumentada con respecto al grupo control durante todo el periodo de estudio y, además, se observa un incremento progresivo y constante durante los 9 meses, pasando de unos valores de 0,44 mg/dl en M1 hasta 0,9 mg/dl en M9. Cabe destacar que fueron excluidos del estudio dos animales que progresaron más rápidamente, llegando a tener valores de creatinina plasmática hasta 2,0 mg/dl en M6 y que se tuvieron que ser sacrificados en este punto.

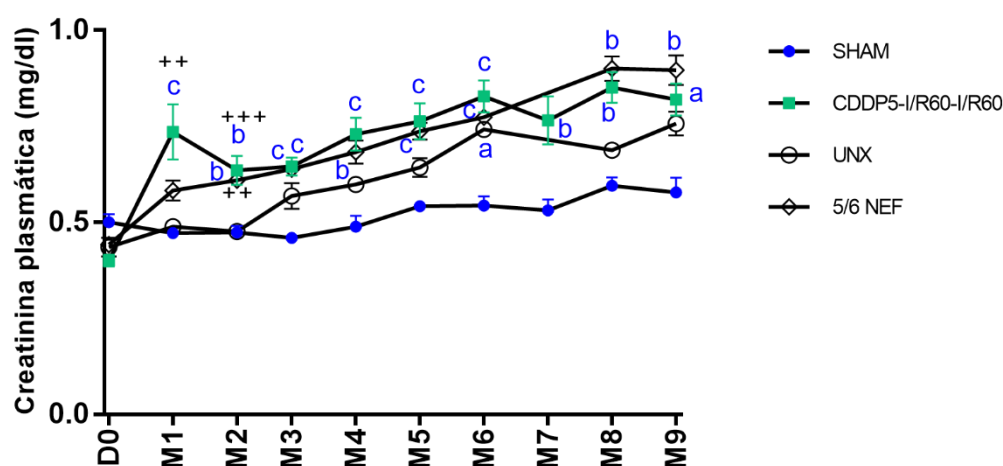


Figura 27: Evolución de la concentración plasmática de la creatinina a lo largo de los 9 meses (D0= comienzo experimento, M=mes) de los animales control "SHAM", "UNX", "5/6 NEF" y de triple daño "CDDP5-I/R60-I/R60". Los valores están expresados como media $\pm$ EEM (^a $p < 0,05$ vs SHAM; ^b $p < 0,01$ vs SHAM; ^c $p < 0,001$ vs SHAM; ^{*} $p < 0,05$ vs UNX; ⁺⁺ $p < 0,01$ vs UNX; ⁺⁺⁺ $p < 0,001$ vs UNX; ^{*} $p < 0,05$ vs 5/6 NEF; ^{**} $p < 0,01$ vs 5/6 NEF; ^{***} $p < 0,001$ vs 5/6 NEF).

	SHAM	CDDP5-I/R60-I/R60	UNX	5/6 NEF
D0	(19) 0,50 $\pm$ 0,02	(14) 0,40 $\pm$ 0,02	(15) 0,44 $\pm$ 0,02	(18) 0,44 $\pm$ 0,02
M1	(12) 0,47 $\pm$ 0,08	(14) 0,74 $\pm$ 0,07	(8) 0,49 $\pm$ 0,02	(12) 0,58 $\pm$ 0,03
M2	(12) 0,47 $\pm$ 0,02	(13) 0,64 $\pm$ 0,04	(10) 0,48 $\pm$ 0,01	(12) 0,61 $\pm$ 0,02
M3	(12) 0,46 $\pm$ 0,01	(11) 0,65 $\pm$ 0,02	(7) 0,57 $\pm$ 0,03	(8) 0,64 $\pm$ 0,02
M4	(12) 0,49 $\pm$ 0,03	(11) 0,73 $\pm$ 0,04	(8) 0,60 $\pm$ 0,02	(6) 0,68 $\pm$ 0,03

M5	(10) 0,54 ±0,01	(11) 0,76±0,05	(7) 0,64 ±0,02	(6) 0,74±0,02
M6	(10) 0,54 ±0,02	(11) 0,83±0,04	(8) 0,74±0,02	(6) 0,77±0,01
M7	(7) 0,53±0,03	(6) 0,77±0,06		
M8	(7) 0,60 ±0,02	(6) 0,85±0,04	(4) 0,69±0,02	(3) 0,90±0,03
M9	(5) 0,58±0,04	(6) 0,82±0,04	(4) 0,76±0,03	(3) 0,90±0,04

Tabla 14: Valores de creatinina plasmática (mg/dl) en los diferentes grupos experimentales. Los datos representan la media ± EEM. Al lado de cada valor se detalla entre paréntesis el número de animales utilizado (n).

1.2.2 Evolución del aclaramiento de creatinina

Otro parámetro para la estimación de la función renal es el aclaramiento de creatinina (ClCr). El ClCr representa el volumen de sangre que queda depurado de Cr en una unidad de tiempo. Se calcula dividiendo la concentración de Cr en una muestra de orina recogida durante 24 horas por la concentración de CrP y multiplicando esta fracción por el flujo urinario de las 24 h expresado en ml/min.

Teniendo en cuenta que no toda la creatinina se elimina por filtración y que una cantidad variable se secreta, el valor de ClCr, no se corresponde exactamente con la TFG, por lo que sobrestima su valor (McWilliam & Macnab, 2009). Si la Cr fuera eliminada exclusivamente por filtración glomerular (sin fenómenos de secreción), se correspondería exactamente con la TFG. Aunque la estimación de la TFG mediante el aclaramiento sea más precisa que la determinación basada en la CrP, presenta una limitación muy importante, que es la recogida de la orina durante 24h (Traynor et al., 2006) y por este motivo no se usa a menudo.

En las ratas Wistar, los valores de ClCr no se mantienen constantes a lo largo de su vida. En concreto, se ha demostrado que existe un incremento de la TFG en los primeros meses que está relacionado a su vez con un aumento del tamaño de los riñones y del peso del animal (Potter et al., 1969). El rango normal de ClCr para ratas de entre 2 y 9 meses de edad está entre 1-3 ml/min (Potter et al., 1969). Los animales tratados con cisplatino presentan una reducción significativa de ClCr en D4 compatible con el incremento en la CrP observado anteriormente, y unos valores de ClCr similares a los controles en R. El ClCr se mantuvo similar entre los grupos hasta el tercer daño (D24), tras el cual el único grupo que presenta un ClCr reducido es el grupo de triple daño (Figura 28 y Tabla 15).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

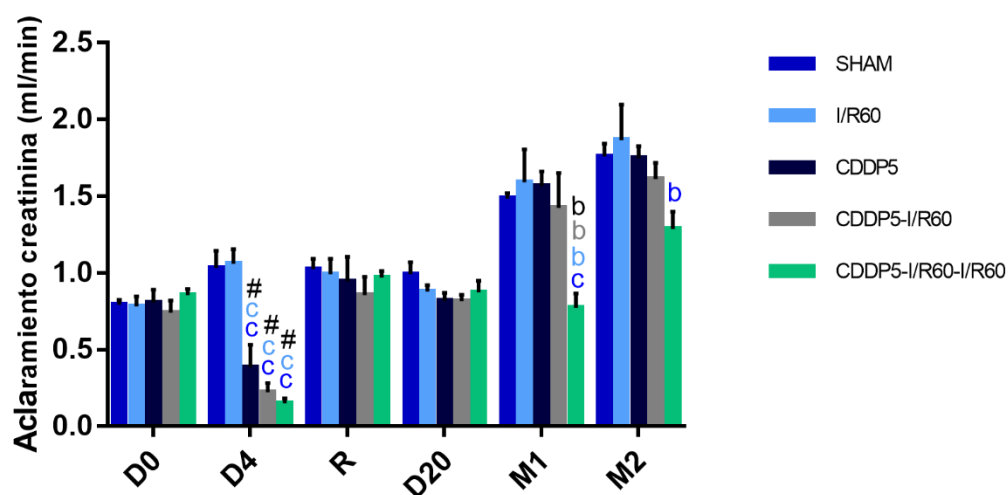


Figura 28: Valores del aclaramiento de creatinina (ml/min) en los diferentes modelos de daño renal durante los 2 meses de estudio (D0=comienzo experimento, D4= día 4, R= día recuperación, D20= día 20, M=mes). Se muestran los valores de CICr de los animales controles (grupo "SHAM"), de los grupos de un solo daño ("CDDP5"; "I/R60"), de doble ("CDDP5-I/R60") y de triple daño ("CDDP5-I/R60-I/R60"). Cada diagrama representa la media $\pm$ EEM ($^a p < 0,05$; $^b p < 0,01$; $^c p < 0,001$; $^# p < 0,01$ vs basal). El color de las letras a, b y c indica el grupo experimental con respecto al cual se refiere la significación.

	SHAM	I/R60	CDDP5	CDDP5-I/R60-	CDDP5-I/R60-I/R60
D0	(18) 0,8 $\pm$ 0,03	(13) 0,8 $\pm$ 0,07	(13) 0,8 $\pm$ 0,08	(12) 0,7 $\pm$ 0,08	(18) 0,9 $\pm$ 0,04
D4	(5) 1,0 $\pm$ 0,04	(7) 1,1 $\pm$ 0,02	(7) 0,4 $\pm$ 0,20	(8) 0,2 $\pm$ 0,60	(7) 0,2 $\pm$ 0,03
R	(12) 1,0 $\pm$ 0,07	(13) 1,0 $\pm$ 0,10	(8) 0,9 $\pm$ 0,20	(10) 0,9 $\pm$ 0,10	(19) 1,0 $\pm$ 0,04
D20	(11) 1,0 $\pm$ 0,08	(10) 0,9 $\pm$ 0,04	(8) 0,8 $\pm$ 0,05	(15) 0,8 $\pm$ 0,04	(12) 0,9 $\pm$ 0,07
M1	(9) 1,5 $\pm$ 0,04	(5) 1,6 $\pm$ 0,20	(8) 1,6 $\pm$ 0,10	(7) 1,4 $\pm$ 0,20	(14) 0,8 $\pm$ 0,10
M2	(12) 1,8 $\pm$ 0,10	(6) 1,9 $\pm$ 0,20	(8) 1,7 $\pm$ 0,10	(8) 1,6 $\pm$ 0,10	(14) 1,3 $\pm$ 0,10

Tabla 15: Valores de aclaramiento de creatinina (ml/min) en los diferentes grupos experimentales. Los datos representan la media $\pm$ EEM. Al lado de cada valor se detalla entre paréntesis el número de animales utilizado (n).

En la Figura 29 se muestra la evolución del CICr durante los 9 meses de estudio. En el grupo SHAM los valores de CICr aumentaron en los primeros meses hasta estabilizarse. El grupo UNX presentó un CICr que se mantuvo alrededor del 75% con respecto al grupo control durante los 9 meses (Tabla 16). Estos resultados están de acuerdo con otros estudios que han mostrado cómo en el riñón restante, tras una nefrectomía, se activan unos mecanismos adaptativos que determinan el aumento de su función (Brenner et al., 1996; Nath et al., 1990; Schreuder, 2018).

En el grupo 5/6 NEF, el CICr disminuyó progresivamente desde M3 (Figura 29). Por último, en el grupo CDDP5-I/R60-I/R60 se observó una bajada marcada del CICr en el primer mes, tras la aplicación del tercer

daño. Después, sus valores se recuperaron hasta los de partida (D0), pero permanecieron más bajos durante todo el estudio ($\approx 60\%$ con respecto al grupo control). Cabe destacar que el CICr en este grupo fue también menor que el grupo UNX y esto indica una pérdida de función equivalente a más del 50% de la masa renal en estos animales.

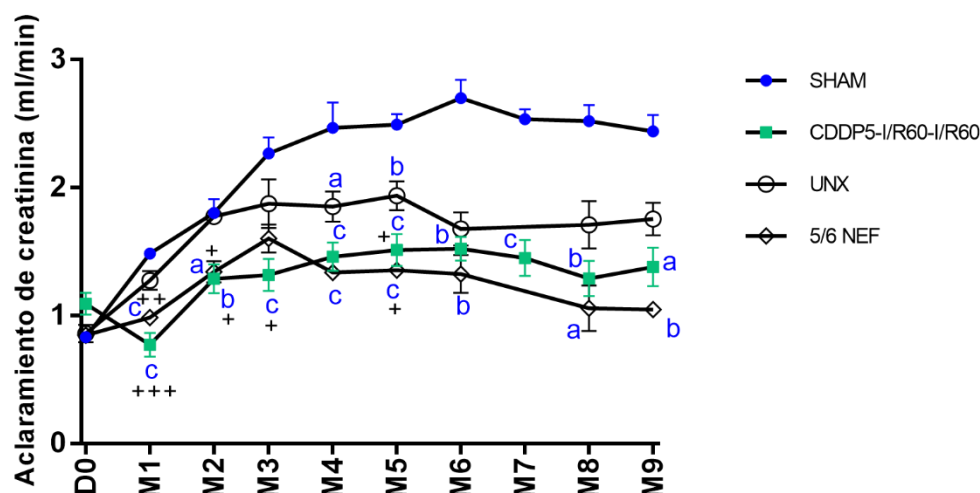


Figura 29: Evolución del aclaramiento de creatinina (ml/min) a lo largo de los 9 meses (D0= comienzo experimento, M=mes) de los animales control (grupo "SHAM"), del grupo "UNX", de "5/6 NEF" y de triple daño "CDDP5-I/R60-I/R60". Los valores están expresados como media $\pm$ EEM (^a $p < 0,05$ vs SHAM; ^b $p < 0,01$ vs SHAM; ^c $p < 0,001$ vs SHAM; ⁺ $p < 0,05$ vs UNX; ⁺⁺ $p < 0,01$ vs UNX; ⁺⁺⁺ $p < 0,001$ vs UNX; ^{*} $p < 0,05$ vs 5/6 NEF; ^{**} $p < 0,01$ vs 5/6 NEF; ^{***} $p < 0,001$ vs 5/6 NEF).

	SHAM	CDDP5-I/R60-I/R60	UNX	5/6 NEF
D0	(19) 0,8 $\pm$ 0,03	(17) 1,1 $\pm$ 0,08	(14) 0,9 $\pm$ 0,07	(15) 0,9 $\pm$ 0,05
M1	(9) 1,5 $\pm$ 0,04	(14) 0,8 $\pm$ 0,09	(11) 1,3 $\pm$ 0,07	(12) 1,0 $\pm$ 0,06
M2	(9) 1,8 $\pm$ 0,10	(14) 1,3 $\pm$ 0,10	(10) 1,8 $\pm$ 0,06	(12) 1,3 $\pm$ 0,08
M3	(11) 2,3 $\pm$ 0,10	(10) 1,3 $\pm$ 0,10	(8) 1,9 $\pm$ 0,20	(6) 1,7 $\pm$ 0,1
M4	(12) 2,5 $\pm$ 0,20	(11) 1,5 $\pm$ 0,10	(8) 1,9 $\pm$ 0,10	(6) 1,3 $\pm$ 0,04
M5	(10) 2,5 $\pm$ 0,08	(11) 1,5 $\pm$ 0,13	(8) 1,9 $\pm$ 0,11	(6) 1,3 $\pm$ 0,06
M6	(6) 2,7 $\pm$ 0,14	(11) 1,5 $\pm$ 0,09	(6) 1,7 $\pm$ 0,13	(6) 1,3 $\pm$ 0,1
M7	(7) 2,5 $\pm$ 0,08	(6) 1,5 $\pm$ 0,10		
M8	(7) 2,5 $\pm$ 0,13	(6) 1,3 $\pm$ 0,14	(4) 1,7 $\pm$ 0,19	(3) 1,1 $\pm$ 0,18
M9	(5) 2,4 $\pm$ 0,13	(6) 1,4 $\pm$ 0,15	(4) 1,8 $\pm$ 0,13	(3) 1,0 $\pm$ 0,03

Tabla 16: Valores de aclaramiento de creatinina (ml/min) en los diferentes grupos experimentales. Los datos representan la media $\pm$ EEM. Al lado de cada valor se detalla entre paréntesis el número de animales utilizado (n).

1.2.3 Evolución de la urea plasmática

La urea plasmática (BUN, del inglés *blood urea nitrogen*) se produce en el hígado a partir del amoníaco, producto tóxico de la degradación de los aminoácidos ingeridos en la comida, y se elimina principalmente mediante filtración renal (Baum et al., 1975). En condiciones normales su nivel plasmático en humanos se mantiene entre 5-20 mg/dl. Sin embargo, en caso de alteración en la función renal, su filtración se reduce provocando un aumento de su concentración plasmática (Hosten, 1990).

La urea se considera un parámetro menos fiable que la CrP en la estimación de la función renal ya que su concentración plasmática puede estar alterada en diferentes condiciones no relacionadas con cambios en la TFG (Traynor et al., 2006) como después de la administración de medicamentos, cambios en la dieta (en la ingesta de proteínas), estado de hidratación, daño hepático, y puede estar sometida a procesos de secreción y reabsorción.

Nuestros resultados muestran que en D4 hubo un fuerte aumento en la urea plasmática en los animales tratados con cisplatino en D4 que se normalizó en R. Tras la aplicación del segundo daño (R+1), se observa una elevación en el BUN en los animales que habían recibido cisplatino previamente. Por último, tras el tercer daño, el grupo CDDP5-I/R60-I/R60 fue el único que presentó valores más altos hasta M2 (Figura 30 y Tabla 17).

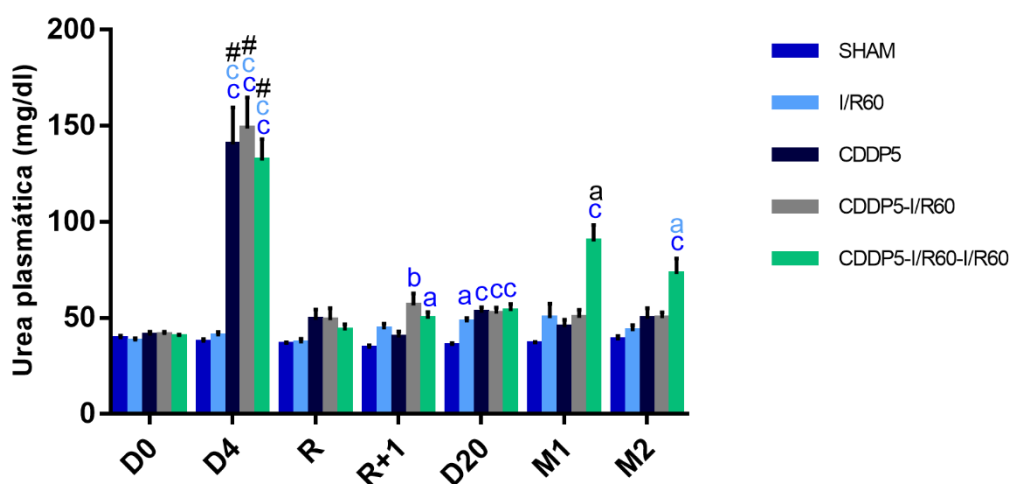


Figura 30: Valores de urea plasmática (mg/dl) en los diferentes modelos de daño renal durante 2 meses (D0= comienzo experimento, D4= día 4, R= día recuperación, R+1= 1 día después de R, D20= día 20, M=mes). Se muestran los valores de urea de los animales controles (grupo "SHAM"), de los grupos de un solo daño ("CDDP5"; "I/R60"), de doble ("CDDP5-I/R60") y de triple daño ("CDDP5-I/R60-I/R60"). Cada diagrama representa la media $\pm$ EEM (^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$; [#] $p < 0,01$ vs basal). El color de las letras a, b y c indica el grupo experimental con respecto al cual se refiere la significación.

	SHAM	I/R60	CDDP5	CDDP5-I/R60-	CDDP5-I/R60-I/R60
D0	(19) 38,9±1,9	(15) 37,8±1,7	(15) 40,7±2,1	(15) 41,2±1,5	(17) 40±1,3
D4	(13) 37,2±1,7	(15) 40,5±2,1	(15) 140,5±19,2	(16) 148,6±16,1	(20) 131,9±11,3
R	(12) 35,9±1,4	(15) 36,8± 2,4	(10) 49,1± 5,4	(12) 51,5±5,4	(15) 47,2 ±4,3
R+1	(8) 33,9±1,9	(10) 44,1±3,1	(10) 39,7±3,2	(11) 56,7±6,1	(17) 49,6±3,6
D20	(15) 35,4±1,4	(10) 47,8±2,2	(8) 52,7±2,9	(12) 52,3±3,1	(13) 53,6±3,2
M1	(18) 36,2±1,2	(7) 49,9±7,6	(8) 45,2 ±3,9	(8) 50,2±4,0	(14) 89,7±8,6
M2	(12) 38,2±2,4	(6) 43,1±3,1	(7) 49,5±5,6	(9) 50,0±2,9	(14) 73,0±7,9

Tabla 17: Valores de urea plasmática (mg/dl) en los diferentes grupos experimentales. Los datos representan la media ± EEM. Al lado de cada valor se detalla entre paréntesis el número de animales utilizado (n).

En la Figura 31 se muestra la evolución de los valores de la urea durante los 9 meses. En el grupo SHAM se mantuvo en un rango entre 25-40 mg/dl durante todo el periodo (Tabla 18). El grupo UNX presentó valores más altos que el grupo control, pero sin significación estadística (excepción en M1). En cuanto al grupo 5/6 NEF, los valores fueron significativamente más altos con respecto al grupo control durante todo el estudio, pero su trayectoria no fue coherente con una pérdida progresiva de la función renal como ocurrió con la CrP y el ClCr, resultando ser un parámetro menos preciso que los dos anteriores para su estimación. Sus limitaciones en la estimación de la función renal se hacen todavía más grandes en humanos, ya que las ratas representan una población más homogénea. En lo que respecta al grupo de triple daño, se observó un pico de BUN en M1 tras el tercer daño, y posteriormente los valores bajaron hasta M3, manteniéndose más altos con respecto al grupo control durante todo el periodo de estudio.

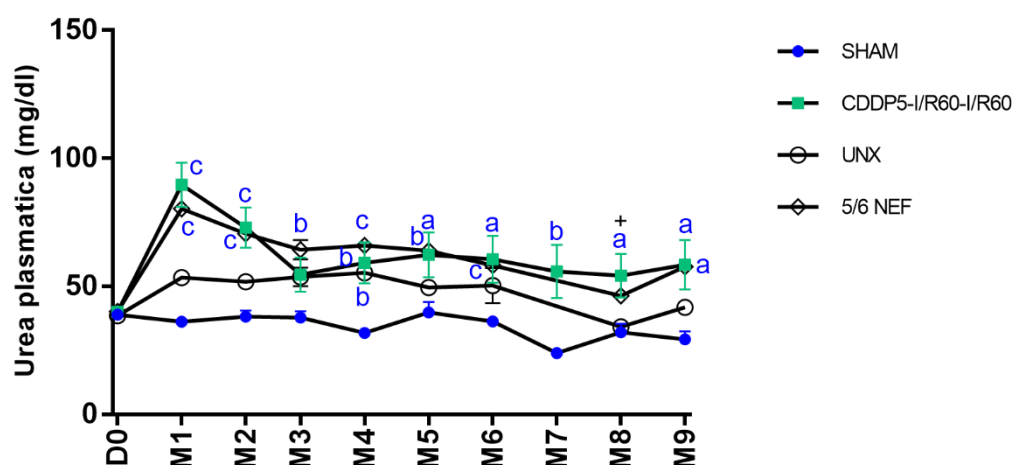


Figura 31: Evolución de la urea plasmática (mg/dl) a lo largo de los 9 meses (D0= comienzo experimento, M=mes) de los animales control (grupo "SHAM"), del grupo "UNX", de "5/6 NEF" y de triple daño "CDDP5-I/R60-I/R60". Los valores están expresados como media ± EEM

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

^a $p < 0,05$ vs SHAM; ^b $p < 0,01$ vs SHAM; ^c $p < 0,001$ vs SHAM; ^{*} $p < 0,05$ vs UNX; ^{**} $p < 0,01$ vs UNX; ^{***} $p < 0,001$ vs UNX; ^{*} $p < 0,05$ vs 5/6 NEF; ^{**} $p < 0,01$ vs 5/6 NEF; ^{***} $p < 0,001$ vs 5/6 NEF).

	SHAM	CDDP5-I/R60-I/R60	UNX	5/6 NEF
D0	(19) 38,9±1,9	(17) 40±1,3	(15) 38,5±1,5	(14) 40,2±2,7
M1	(18) 36,2 ±1,2	(14) 89,7±8,6	(11) 53,4±2,6	(9) 80,3±2,6
M2	(12) 38,2 ±2,4	(14) 73± 7,9	(10) 51,8± 2,5	(9) 70,6 ±2,6
M3	(12) 37,8±2,5	(11) 54,6 ±6,6	(8) 53,7±3,7	(7) 64,3±3,8
M4	(12) 31,8±1,3	(11) 59,2±8,1	(7) 55,3±2,7	(7) 65,9± 3,0
M5	(12) 39,8±4,2	(11) 62,4±8,8	(8) 49,5 ±2,3	(7) 63,9±2,0
M6	(10) 36,3±2,2	(10) 60,5±9,2	(6) 50,3 ±6,9	(7) 58,2±1,9
M7	(7) 23,9±1,5	(6) 55,8±10,4		
M8	(7) 32,1±3,4	(6) 54,2±8,5	(4) 34,2 ±1,3	(3) 46,3±1,6
M9	(5) 29,4±3,2	(6) 58,4±9,7	(4) 41,9 ± 0,9	(3) 57,7±2,6

Tabla 18: Valores de urea plasmática (mg/dl) en los diferentes grupos experimentales. Los datos representan la media ± EEM. Al lado de cada valor se detalla entre paréntesis el número de animales utilizado (n).

1.2.4 Evolución de la proteinuria

La proteinuria también puede indicar un problema renal, puesto que normalmente, gracias a la barrera de filtración glomerular, la mayoría de las proteínas no se pierden en la orina. Esta barrera está constituida por el endotelio fenestrado de los capilares, la membrana basal y los podocitos que impiden el paso de las proteínas por repulsión electrostática (ambas están cargadas negativamente) y, en menor grado, por su tamaño (Gorriz & Martinez-Castelao, 2012). Además, las proteínas que consiguen superar esta barrera se reabsorben en los túbulos renales mediante diferentes mecanismos, entre los cuales se encuentra la endocitosis mediada por clatrina (De Matteis et al., 2017). La proteinuria puede entonces indicar un problema a nivel tubular, en la barrera de filtración o en ambos.

La albuminuria es un parámetro utilizado para el diagnóstico y pronóstico de la ERC y valores altos de la misma pueden indicar un riesgo elevado de progresión de ERC también con una TFG normal (Andrew S. Levey & Coresh, 2012). Se ha observado una clara relación entre la proteinuria y la progresión de la ERC (Gorriz & Martinez-Castelao, 2012). En ratas, el rango de valores normales está entre 5-10 mg/día (Bolant et al., 1983). Nuestros resultados muestran que hubo un aumento de la proteinuria en D4, que

posteriormente se normalizó y se mantuvo inalterado en todos los grupos durante todo el experimento, observándose solo un pequeño aumento en el grupo de triple daño en M2 (Figura 32, Tabla 19).

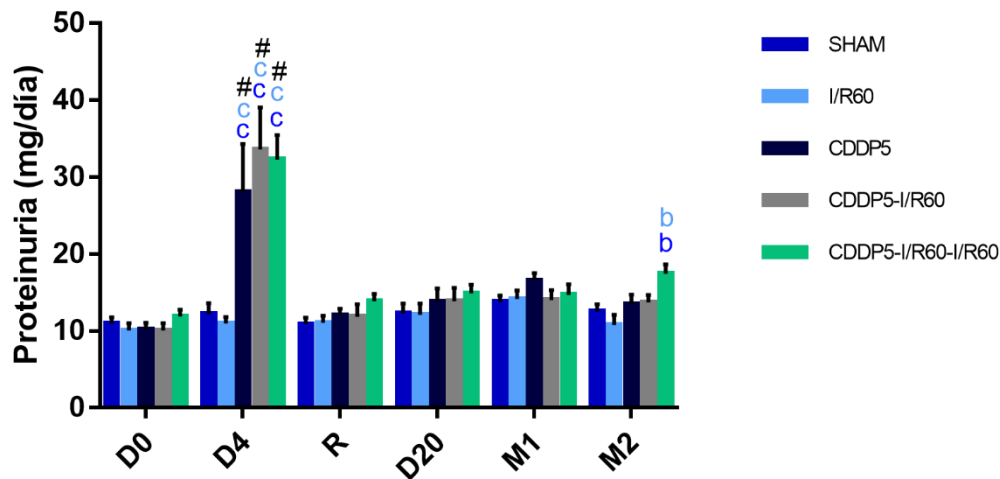


Figura 32: Valores de proteinuria (mg/día) en los diferentes modelos de daño renal durante dos meses (D0=comienzo experimento, D4= día 4, R0= día de recuperación, D20= día 20, M=mes). Se muestran los valores de urea de los animales controles (grupo "SHAM"), de los grupos de un solo daño ("CDDP5"; "I/R60"), de doble ("CDDP5-I/R60") y de triple daño ("CDDP5-I/R60-I/R60"). Cada diagrama representa la media $\pm$ EEM (^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$; [#] $p < 0,01$ vs basal). El color de las letras a, b y c indica el grupo experimental con respecto al cual se refiere la significación.

	SHAM	I/R60	CDDP5	CDDP5-I/R60-	CDDP5-I/R60-I/R60
D0	(18) 10,9 $\pm$ 0,8	(13) 10,1 $\pm$ 0,9	(13) 10,2 $\pm$ 0,9	(14) 10,1 $\pm$ 1,0	(17) 11,9 $\pm$ 0,9
D4	(5) 12,2 $\pm$ 1,4	(7) 11,0 $\pm$ 0,8	(7) 28,0 $\pm$ 6,3	(8) 33,6 $\pm$ 5,5	(7) 32,2 $\pm$ 3,2
R	(13) 10,9 $\pm$ 0,9	(13) 11,1 $\pm$ 0,9	(7) 12 $\pm$ 0,9	(10) 11,9 $\pm$ 1,6	(8) 13,8 $\pm$ 1,0
D20	(15) 12,3 $\pm$ 1,3	(10) 12,1 $\pm$ 1,4	(9) 13,8 $\pm$ 1,7	(10) 13,9 $\pm$ 1,7	(13) 14,9 $\pm$ 1,1
M1	(20) 13,8 $\pm$ 0,8	(7) 14,1 $\pm$ 1,1	(9) 16,6 $\pm$ 1,0	(9) 14,0 $\pm$ 1,3	(14) 14,7 $\pm$ 1,4
M2	(12) 12,5 $\pm$ 1,0	(7) 10,8 $\pm$ 1,3	(8) 13,4 $\pm$ 1,3	(9) 13,7 $\pm$ 0,9	(13) 17,4 $\pm$ 1,2

Tabla 19: Valores de proteinuria (mg/día) en los diferentes grupos experimentales. Los datos representan la media $\pm$ EEM. Al lado de cada valor se detalla entre paréntesis el número de animales utilizado (n).

Los valores de proteinuria en el grupo SHAM se mantuvieron en un rango normal durante los 9 meses (Figura 33 y Tabla 20). Sin embargo, en el grupo de 5/6 NEF se observó un aumento progresivo de la proteinuria desde los primeros meses (Tabla 20). Estos resultados están de acuerdo con otros autores (Shimamura & Morrison, 1975) que han mostrado como la proteinuria progresiva en este grupo es una consecuencia de las adaptaciones funcionales, caracterizadas principalmente por hipertrofia e hipertensión

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

glomerular, que dan lugar con el tiempo a un daño glomerular y a una pérdida progresiva de selectividad en la barrera de filtración glomerular (Meyer et al., 1987). La proteinuria se considera, en general, el elemento común a todas las enfermedades renales progresivas (Bidani & Griffin, 2004; El Nahas & Bello, 2005; K. A. Griffin, 2017; K. A. Griffin & Bidani, 2006; Remuzzi et al., 2006; Zandi-Nejad et al., 2004).

El grupo UNX también presentó una proteinuria más alta con respecto al grupo control, aunque con diferencias significativas solo en M3. En cuanto al grupo de triple daño, los valores se mantuvieron un poco más elevados con respecto al grupo control y sin diferencias significativas (excepción M2) hasta el séptimo mes. Desde M7 se observó un aumento progresivo en los valores de proteinuria hasta M9 (Figura 33 y Tabla 20). El aumento de proteinuria observado al final del estudio podría indicar una progresión consistente en este grupo, que no resultó tan evidente con el CICr y la CrP. Las adaptaciones funcionales posteriores a la pérdida de masa renal como consecuencia de los diferentes daños aplicados podrían haber progresado de forma más lenta con respecto a un modelo muy drástico de RMR como el de 5/6 NEF.

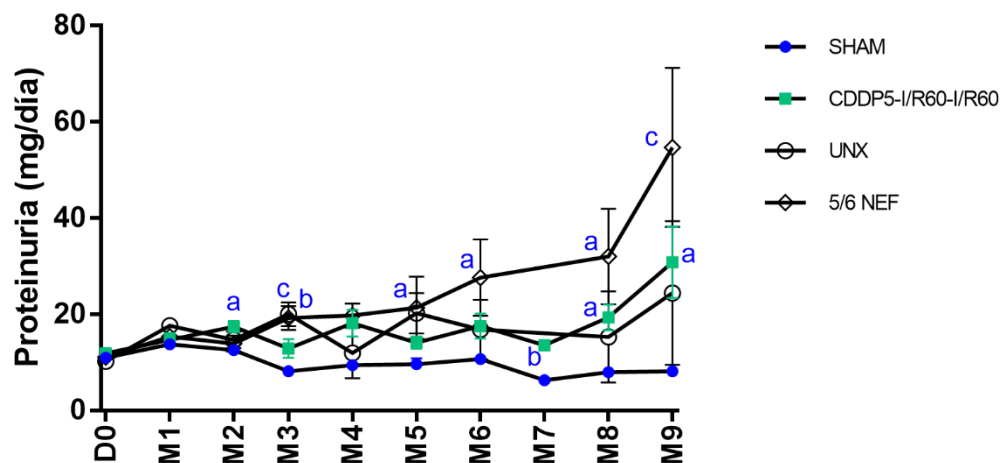


Figura 33: Evolución de la proteinuria (mg/día) a lo largo de los 9 meses (D0= comienzo experimento, M=mes) de los animales control (grupo "SHAM"), del grupo "UNX", de "5/6 NEF" y de triple daño "CDDP5-I/R60-I/R60". Los valores están expresados como media $\pm$ EEM (^a $p < 0,05$ vs SHAM; ^b $p < 0,01$ vs SHAM; ^c $p < 0,001$ vs SHAM; ^{*} $p < 0,05$ vs UNX; ^{**} $p < 0,01$ vs UNX; ^{***} $p < 0,001$ vs UNX; ^{*} $p < 0,05$ vs 5/6 NEF; ^{**} $p < 0,01$ vs 5/6 NEF; ^{***} $p < 0,001$ vs 5/6 NEF).

	SHAM	CDDP5-I/R60-I/R60	UNX	5/6 NEF
D0	(18) 10,9 $\pm$ 0,8	(17) 11,9 $\pm$ 0,9	(14) 10,2 $\pm$ 0,7	(10) 11,1 $\pm$ 0,9
M1	(20) 13,8 $\pm$ 0,8	(14) 14,7 $\pm$ 1,4	(11) 17,6 $\pm$ 1,1	(12) 16,4 $\pm$ 1,4
M2	(12) 12,5 $\pm$ 1,0	(13) 17,4 $\pm$ 1,2	(11) 14,7 $\pm$ 1,8	(8) 13,9 $\pm$ 1,7
M3	(11) 8,2 $\pm$ 1,2	(10) 12,9 $\pm$ 2,0	(8) 20,0 $\pm$ 2,5	(7) 19,2 $\pm$ 2,4

M4	(12) 9,4±0,9	(11) 18,2±2,8	(8) 12,0± 5,2	(7) 19,8±2,5
M5	(11) 9,6±1,2	(9) 14,1±1,3	(7) 20,3±4,2	(7) 21,4±6,5
M6	(10) 10,7 ±1,2	(11) 17,6±2,6	(8) 16,9 ±6,3	(7) 27,6±7,9
M7	(7) 6,3±0,4	(6) 13,6±1,1		
M8	(7) 8,0±0,4	(6) 19,4±2,7	(3) 15,3±9,5	(3) 32,1±10,0
M9	(5) 8,2±0,2	(6) 30,9 ±7,4	(3) 24,4±15	(3) 54,7±16,5

Tabla 20: Valores de proteinuria (mg/día) en los diferentes grupos experimentales. Los datos representan la media ± EEM. Al lado de cada valor se detalla entre paréntesis el número de animales utilizado (n).

1.2.5 Flujo urinario

En la Figura 34 y Tabla 21 se muestran los valores del flujo urinario. El grupo SHAM presenta valores de flujo urinario entre 8-13 ml/día durante todo el estudio. En el grupo UNX, los valores fueron similares a los controles con la excepción de M3 y M5, donde se observaron diferencias significativas. El grupo 5/6 NEF presentó una diuresis significativamente más alta que el grupo SHAM durante todo el estudio (excepción M4). También en el grupo de triple daño, el flujo urinario resultó más elevado que en los grupos SHAM y UNX durante todo el estudio.

La poliuria crónica es una característica común a la ERC y puede deberse a múltiples causas como un aumento en la osmosis por la mayor excreción de moléculas en la orina o por una reducción en la capacidad de concentración de esta (Feinfeld & Danovitch, 1987; Fukuda et al., 2006). Otros autores han mostrado que tras una isquemia reperusión se genera una poliuria por una reducción de la capacidad de concentrar la orina consecuente a una pérdida de capilares peritubulares y a alteraciones en el mecanismo de contracorriente a nivel de la medula renal (D. P. Basile et al., 2001). Estos resultados podrían explicar la poliuria en nuestro grupo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

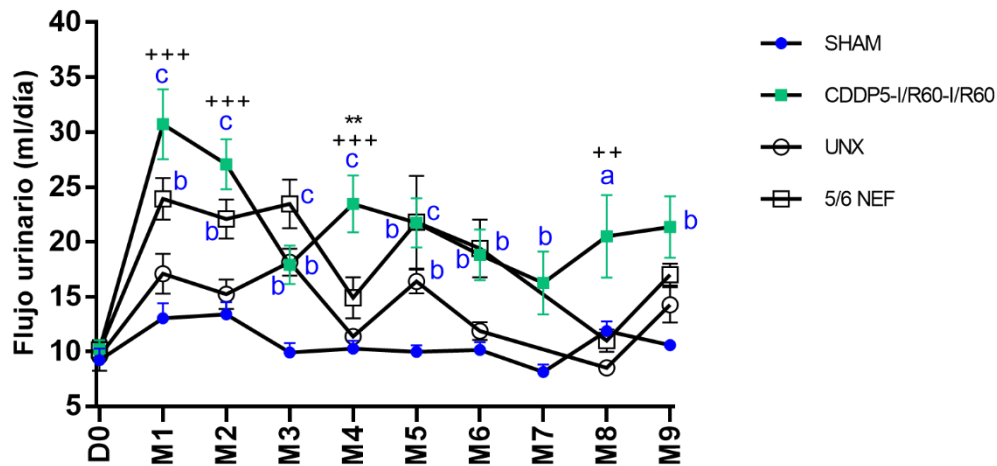


Figura 34: Evolución del flujo urinario (ml/día) a lo largo de los 9 meses (D0= comienzo experimento, M=mes) de los animales control (grupo "SHAM"), del grupo "UNX", de "5/6 NEF" y de triple daño "CDDP5-I/R60-I/R60". Los valores están expresados como media $\pm$ EEM ($^a p < 0,05$ vs SHAM; $^b p < 0,01$ vs SHAM; $^c p < 0,001$ vs SHAM; $^* p < 0,05$ vs UNX; $^{**} p < 0,01$ vs UNX; $^{***} p < 0,001$ vs UNX; $^* p < 0,05$ vs 5/6 NEF; $^{**} p < 0,01$ vs 5/6 NEF; $^{***} p < 0,001$ vs 5/6 NEF).

	SHAM	CDDP5-I/R60-I/R60	UNX	5/6 NEF
D0	(18) 9,2 $\pm$ 1	(17) 10,2 $\pm$ 0,8	(15) 9,6 $\pm$ 1,3	(19) 10,2 $\pm$ 0,9
M1	(20) 13,3 $\pm$ 1,4	(14) 30,7 $\pm$ 3,2	(11) 17,1 $\pm$ 1,8	(12) 23,9 $\pm$ 1,9
M2	(12) 13,4 $\pm$ 1,1	(14) 27,1 $\pm$ 2,3	(11) 15,2 $\pm$ 1,3	(12) 22,1 $\pm$ 1,8
M3	(11) 9,1 $\pm$ 0,9	(10) 17,9 $\pm$ 1,7	(8) 18,1 $\pm$ 1,2	(9) 23,4 $\pm$ 2,23
M4	(12) 10,3 $\pm$ 0,7	(11) 23,5 $\pm$ 2,6	(8) 11,4 $\pm$ 0,6	(9) 14,9 $\pm$ 1,9
M5	(12) 10,0 $\pm$ 0,6	(11) 21,7 $\pm$ 2,2	(8) 16,38 $\pm$ 1,1	(9) 21,78 $\pm$ 4,2
M6	(10) 10,0 $\pm$ 0,7	(11) 18,8 $\pm$ 2,3	(8) 11,9 $\pm$ 0,8	(9) 19,4 $\pm$ 2,6
M7	(7) 8,1 $\pm$ 0,7	(6) 16,25 $\pm$ 2,9		
M8	(7) 11,9 $\pm$ 0,9	(6) 20,5 $\pm$ 3,8	(4) 8,5 $\pm$ 0,7	(3) 11,0 $\pm$ 1,0
M9	(5) 10,6 $\pm$ 0,5	(6) 21,3 $\pm$ 2,8	(4) 14,25 $\pm$ 1,6	(3) 17,0 $\pm$ 1,0

Tabla 21: Valores de flujo urinario (ml/día) en los diferentes grupos experimentales. Los datos representan la media $\pm$ EEM. Al lado de cada valor se detalla entre paréntesis el número de animales utilizado (n).

2 ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES ESTRUCTURALES RENALES EN EL DESARROLLO Y PROGRESIÓN DE LA ERC

Para estudiar la relación entre frecuencia de exposición a episodios de DRA y severidad de las secuelas renales resultantes, realizamos un análisis histológico en los riñones procedentes de los grupos de diferente incidencia de DRA (CDDP5; I/R60; CDDP5-I/R60; CDDP5-I/R60-I/R60). Se analizaron como puntos temporales:

- El día 20 (D20): para caracterizar las alteraciones estructurales en un punto en el que, tras el segundo episodio de DRA, los animales presentaban ya valores normales de función renal (CrP, ClCr) y en el que todavía no se había aplicado el tercer daño.
- El segundo mes (M2): para estudiar el grado de lesión renal generado después de un tiempo alejado del efecto producido por la aplicación del tercer daño en el grupo CDDP5-I/R60-I/R60.

Se realizaron cuatro tinciones: Hematoxilina-eosina (morfología), ácido peryódico-Shiff (PAS) (borde en cepillo tubular), Tricrómico de Masson y Rojo Sirio (fibrosis).

Por otra parte, se estudió la evolución del daño renal en nuestro modelo experimental (CDDP5-I/R60-I/R60) y en el grupo de ERC progresiva (5/6 NEF), analizando los riñones obtenidos en D20, M2, M6 y M9, con tres tipos diferentes de tinciones (Hematoxilina-eosina, Tricrómico de Masson y Rojo Sirio). Se cuantificó la presencia de fibrosis en las regiones cortical, medular externa y medular interna en todos estos puntos temporales mediante la tinción del Rojo sirio.

2.1 Alteraciones estructurales subclínicas en el periodo posterior a un DRA (D20)

No se observaron alteraciones estructurales en el tejido renal en los animales controles "SHAM" (Figuras 35A, 35B, 36A, 36B, 37A, 37B, 38A, 38B).

En los animales del grupo "I/R60", donde se aplicó un solo daño por I/R60 en el riñón izquierdo, se encontró una gran diferencia en la magnitud del daño presente en los riñones izquierdos con respecto a los derechos. En los riñones izquierdos se observó la presencia de alteraciones tubulares (necrosis tubular, dilatación tubular, depósitos de material hialino o depósitos celulares, atrofia tubular, pérdida del borde en cepillo) y

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

alteraciones del intersticio (infiltrado inflamatorio, desorganización epitelial) (Figuras 35C, 36C). Asimismo, se observó la presencia de fibrosis intersticial alrededor de túbulos dañados y atróficos (Figuras 37C, 38C). Por otro lado, no se observaron alteraciones estructurales en los riñones derechos en este grupo (Figuras 35D, 36D, 37D, 38D).

El análisis de los riñones del grupo CDDP5 puso de manifiesto la presencia de alteraciones, de grado similar entre los riñones izquierdos y derechos. Las principales alteraciones encontradas en este grupo fueron desorganización epitelial, dilatación tubular y pérdida del borde cepillo, parcial en la mayoría de los túbulos, aunque ausente en otros (Figuras 35E, 35F, 36E, 36F). Se observó la presencia de fibrosis intersticial de forma focal alrededor de algunos túbulos (Figuras 37E, 37F, 38E, 38F).

El grupo de CDDP5-I/R60, presentó el mayor grado de lesiones en el riñón izquierdo, con abundante presencia de alteraciones tubulares (elevado grado de dilatación tubular y de atrofia tubular, ausencia del borde en cepillo) e intersticial (abundante infiltrado inflamatorio, desorganización epitelial y presencia de fibrosis intersticial) (Figuras 35G, 36G, 37G, 38G). También se observaron lesiones en los riñones derechos, pero en grado menor con respecto a los izquierdos (Figuras 35H, 36H, 37H, 38H).

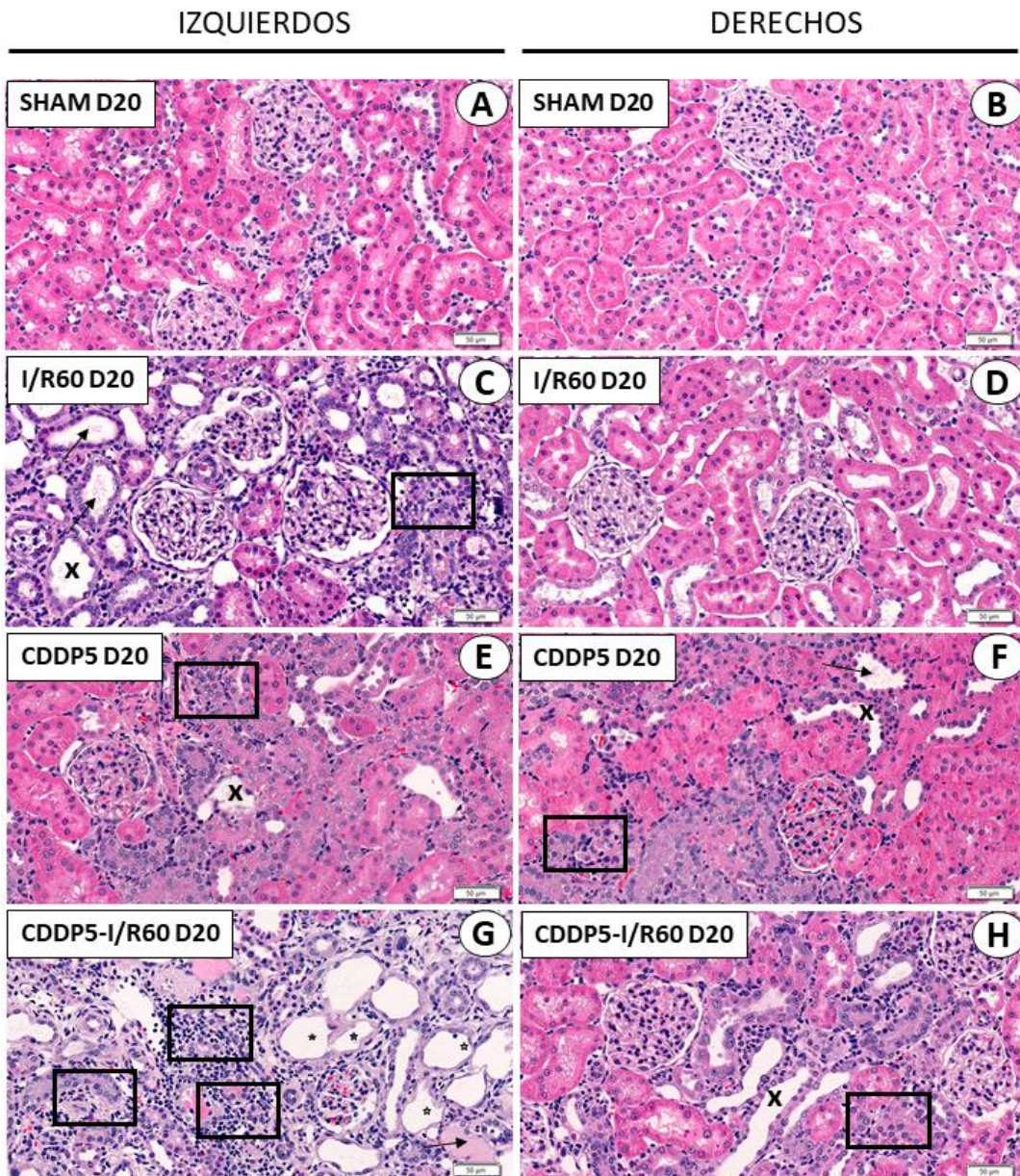


Figura 35: Evaluación de las alteraciones estructurales renales mediante tinción de Hematoxilina-eosina. Imágenes representativas (100X) de cortes histológicos de la región cortical. La barra de la esquina inferior derecha indica la escala (50 μ m). Los rectángulos destacan la desorganización epitelial y el infiltrado inflamatorio, la X la dilatación tubular, el * la necrosis tubular y las flechas los depósitos de material hialino y celulares.

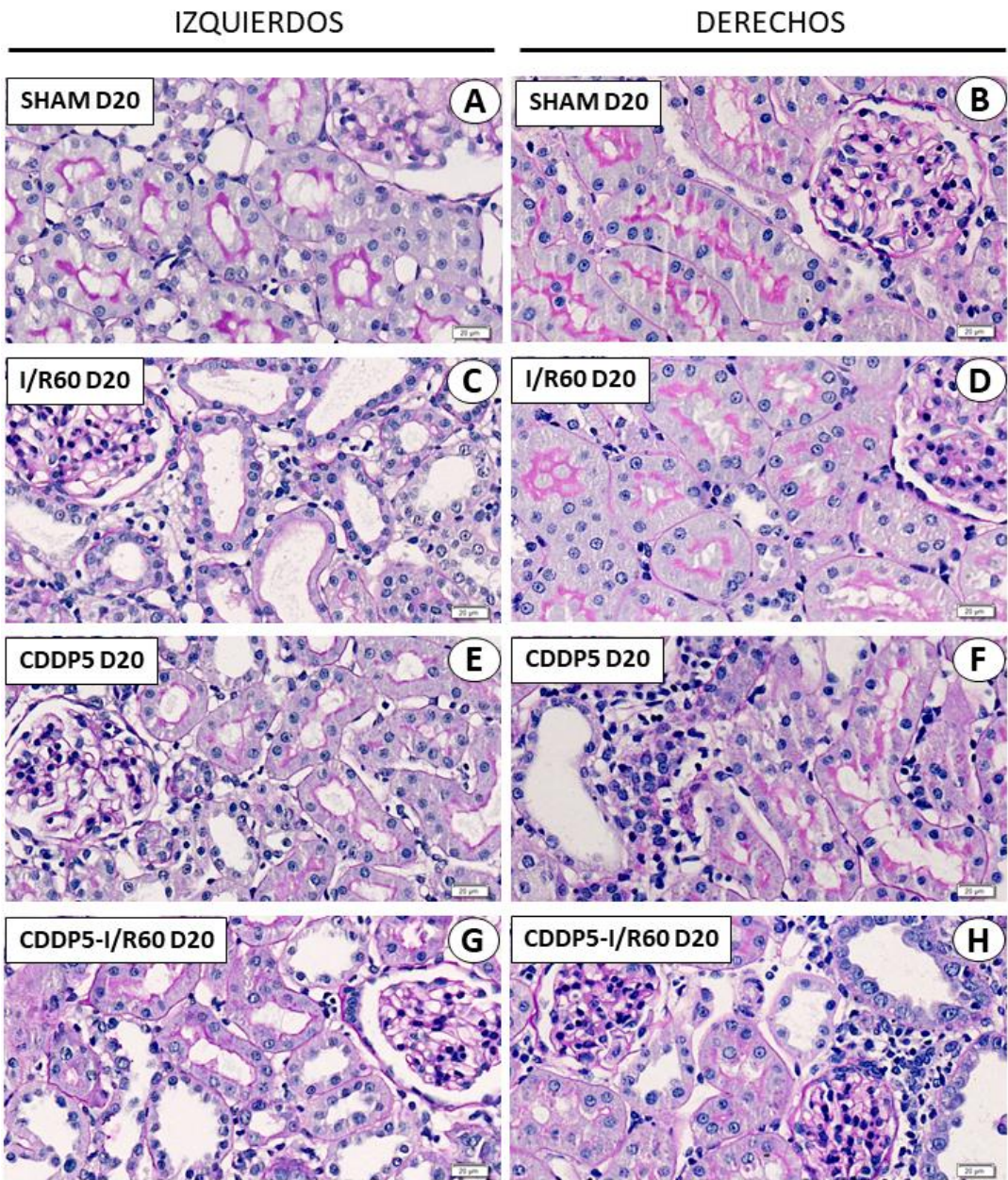


Figura 36: Evaluación del borde en cepillo mediante tinción de PAS. Imágenes representativas (200X) de cortes histológicos de la región cortical. La barra de la esquina inferior derecha indica la escala (20 μ m).

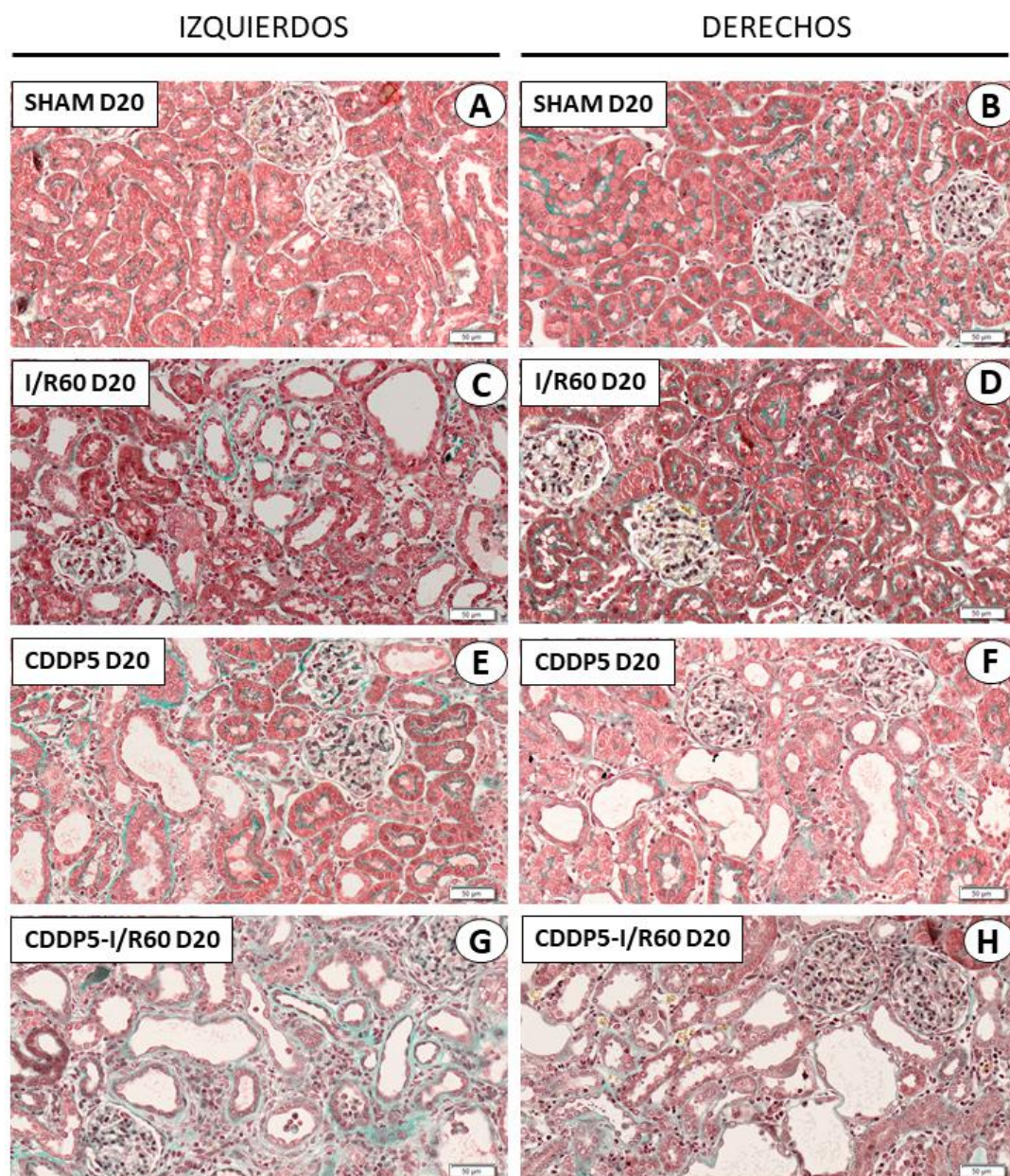


Figura 37: Evaluación de la fibrosis renal mediante tinción de Tricrómico de Masson. Imágenes representativas (100X) de cortes histológicos de la región cortical. La barra de la esquina inferior derecha indica la escala (50 μ m).

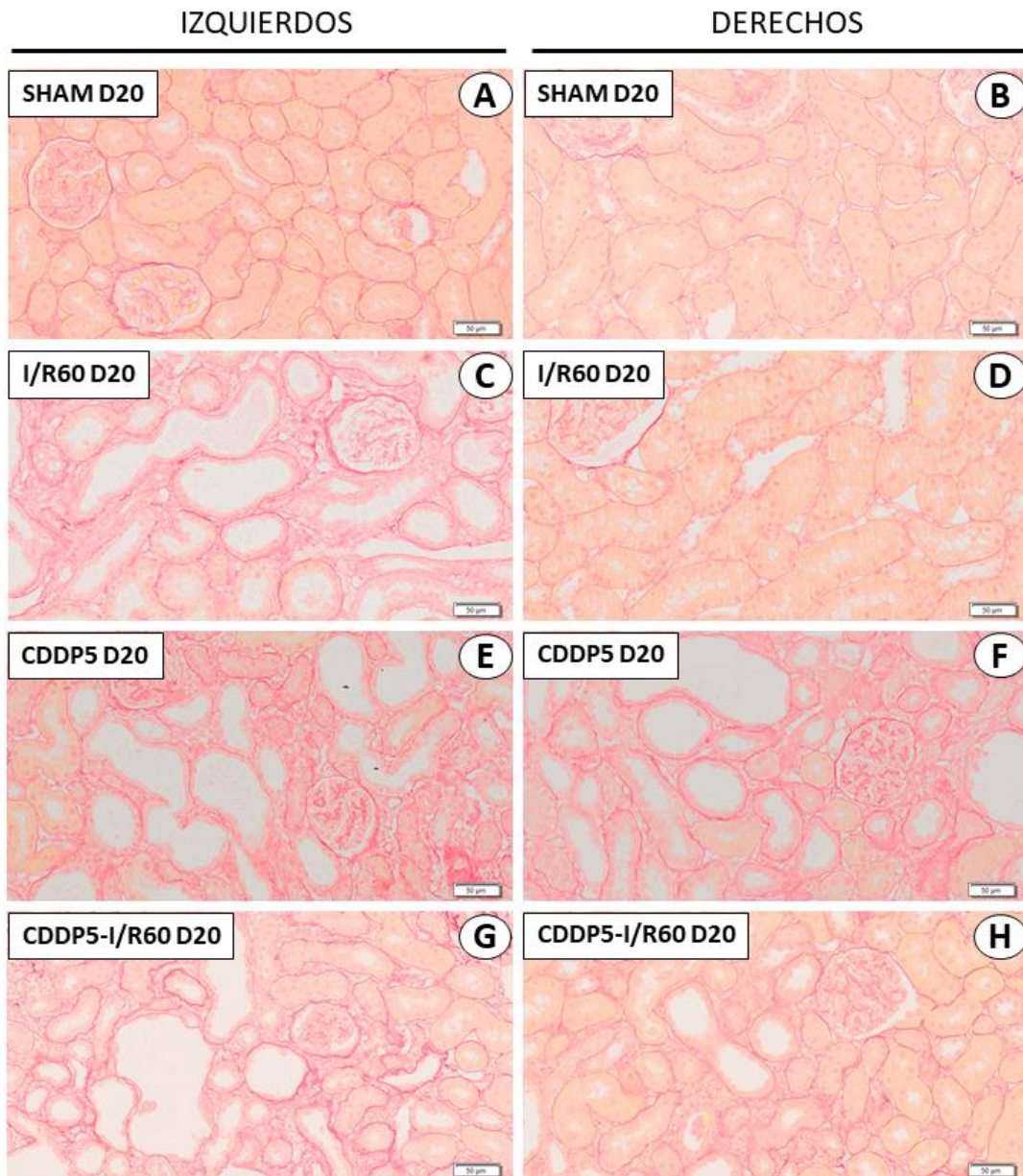


Figura 38: Evaluación de la fibrosis renal mediante tinción de Rojo Sirio. Imágenes representativas (100X) de cortes histológicos de la región cortical. La barra de la esquina inferior derecha indica la escala (50 μ m).

2.2 Alteraciones estructurales en M2

No se observaron alteraciones estructurales en los animales controles SHAM (Figuras 39A, 39B, 40A, 40B, 41A, 41B, 42A, 42B) y en los riñones derechos del grupo I/R60 (Figuras 39D, 40D, 41D, 42D).

En los riñones izquierdos del grupo I/R60 se observaron alteraciones estructurales, especialmente anomalías en algunos túbulos renales (dilatación y atrofia tubular) y alrededor de algunos túbulos, se observaron anomalías en el intersticio, como presencia crónica de infiltrado inflamatorio, desorganización epitelial y presencia de fibrosis intersticial (Figuras 39C, 41C, 42C). Se observó la recuperación del borde en cepillo en muchos túbulos (Figura 40C). En el grupo CDDP5 se observaron, de forma similar a los riñones izquierdos del grupo I/R60, alteraciones estructurales presentes de distribución focal en determinadas áreas, como alrededor de algunos túbulos renales, y caracterizadas principalmente por dilatación tubular, desorganización epitelial, infiltrado inflamatorio y fibrosis intersticial (Figuras 39E, 39F, 40E, 40F, 41E, 41F, 42E, 42F). En los grupos de doble (CDDP5-I/R60) y de triple daño (CDDP5-I/R60-I/R60), la magnitud de las lesiones fue mucho más elevado con respecto a los grupos anteriores y se relacionó con la frecuencia de inducción de los daños renales, siendo el grupo CDDP5-I/R60-I/R60 el que mostró el mayor grado de alteraciones. En este grupo, encontramos una abundante deposición de matriz extracelular intersticial, de forma muy extendida en los riñones izquierdos y derechos. Además, se observó un elevado grado de dilatación tubular en un alto porcentaje de túbulos renales y la presencia de abundante infiltrado inflamatorio (Figuras 39I, 39L, 40I, 40L, 41I, 41L, 42I, 42L).

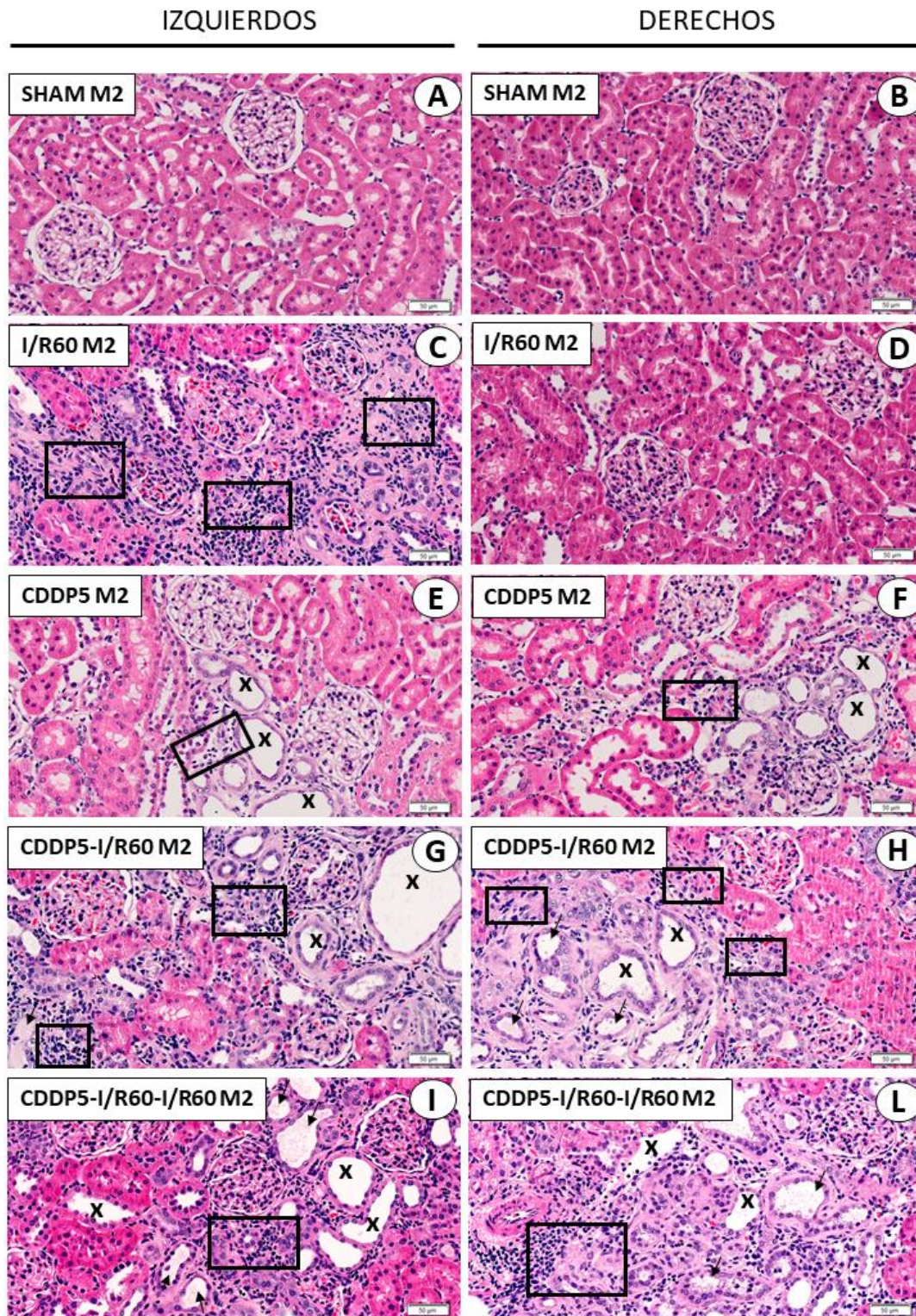


Figura 39: Evaluación de las alteraciones estructurales renales mediante tinción de Hematoxilina-eosina. Imágenes representativas (100X) de cortes histológicos de la región cortical. La barra de la esquina inferior derecha indica la escala (50 µm). Los rectángulos destacan la desorganización epitelial y el infiltrado inflamatorio, la X la dilatación tubular, el * la necrosis tubular y las flechas los depósitos de material hialino o celulares.

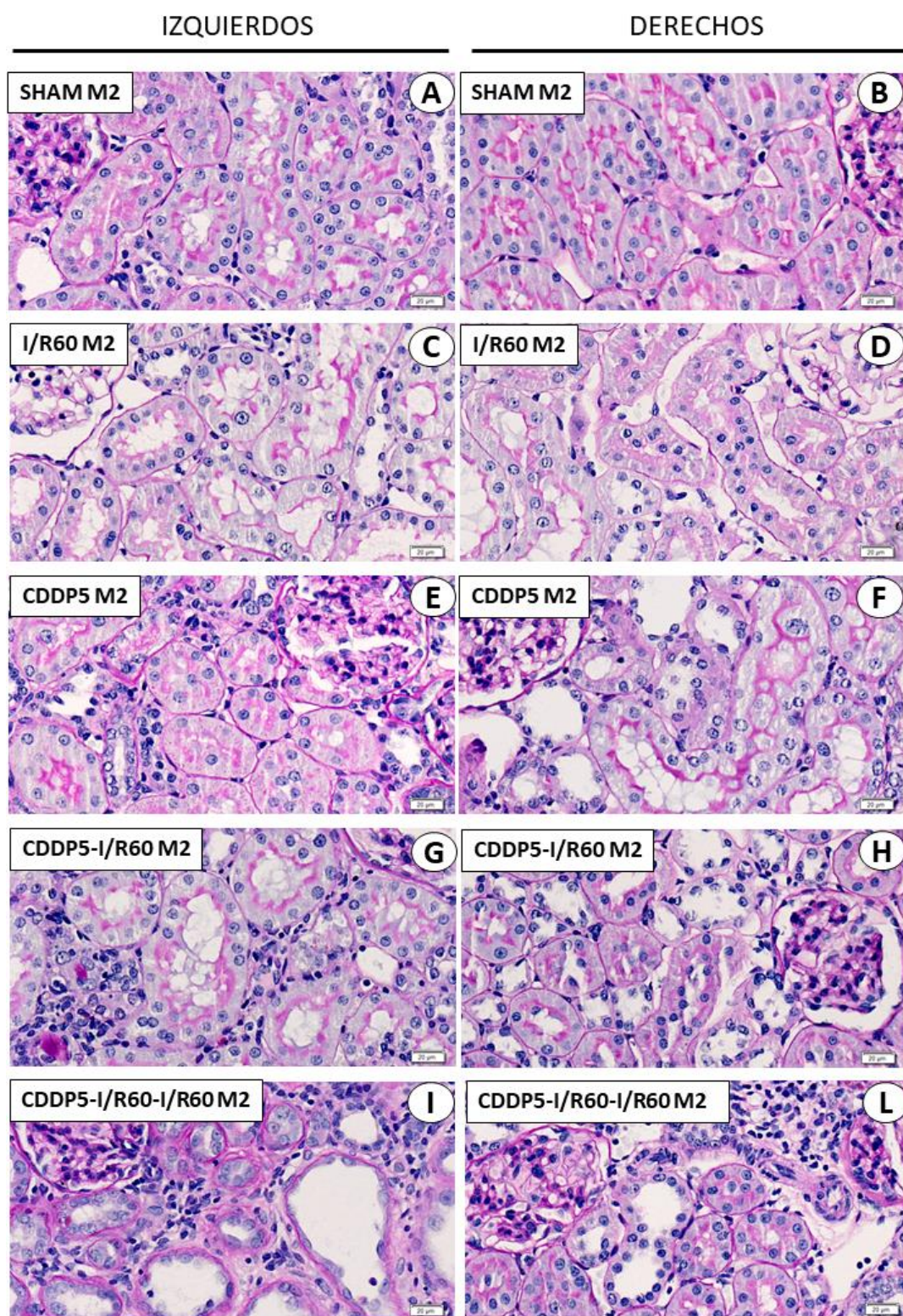


Figura 40: Evaluación del borde en cepillo mediante tinción de PAS. Imágenes representativas (200X) de cortes histológicos de la región cortical. La barra de la esquina inferior derecha indica la escala (20 μ m).

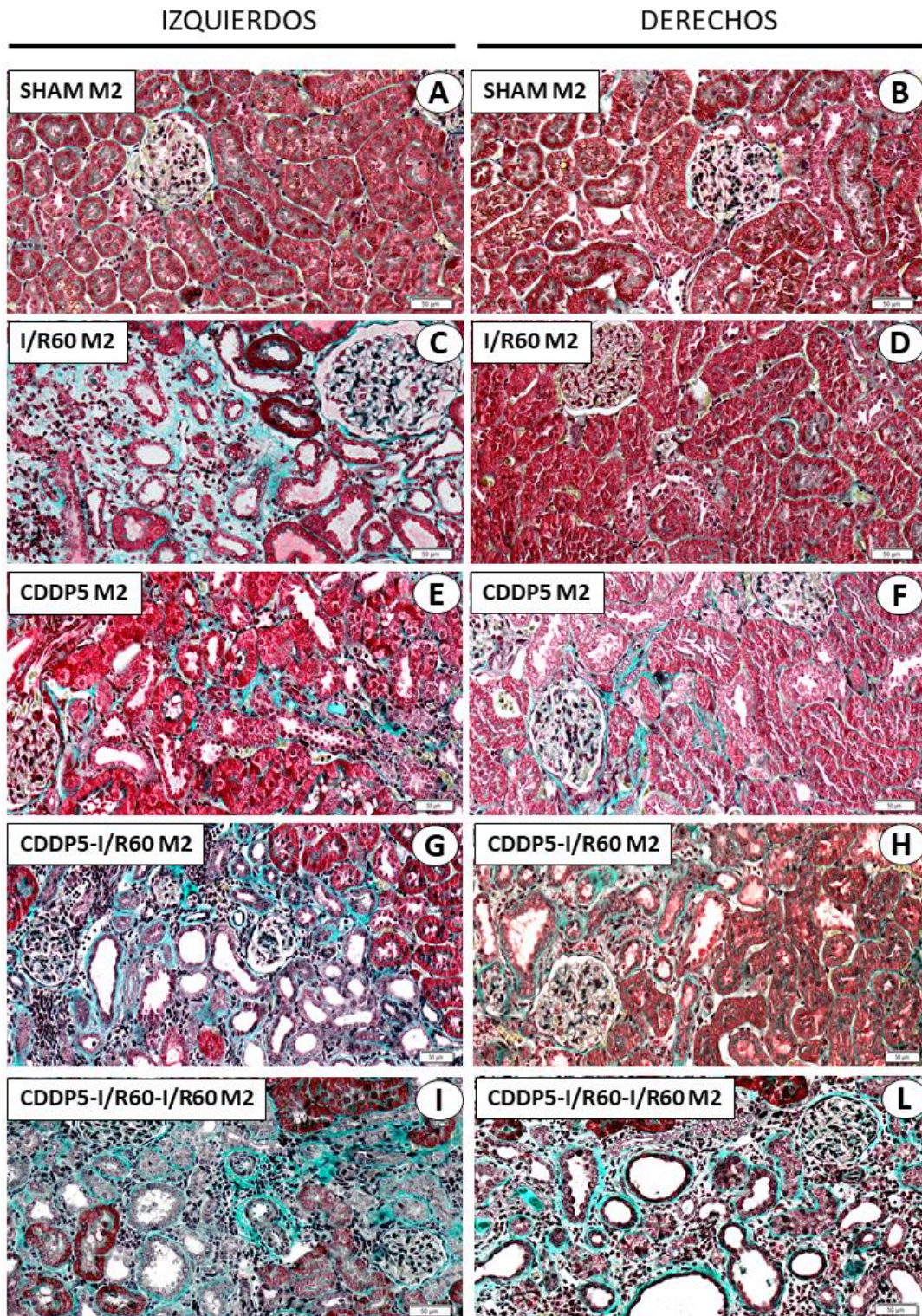


Figura 41: Evaluación de la fibrosis renal mediante tinción de Tricrómico de Masson. Imágenes representativas (100X) de cortes histológicos de la región cortical. La barra de la esquina inferior derecha indica la escala (50 µm).

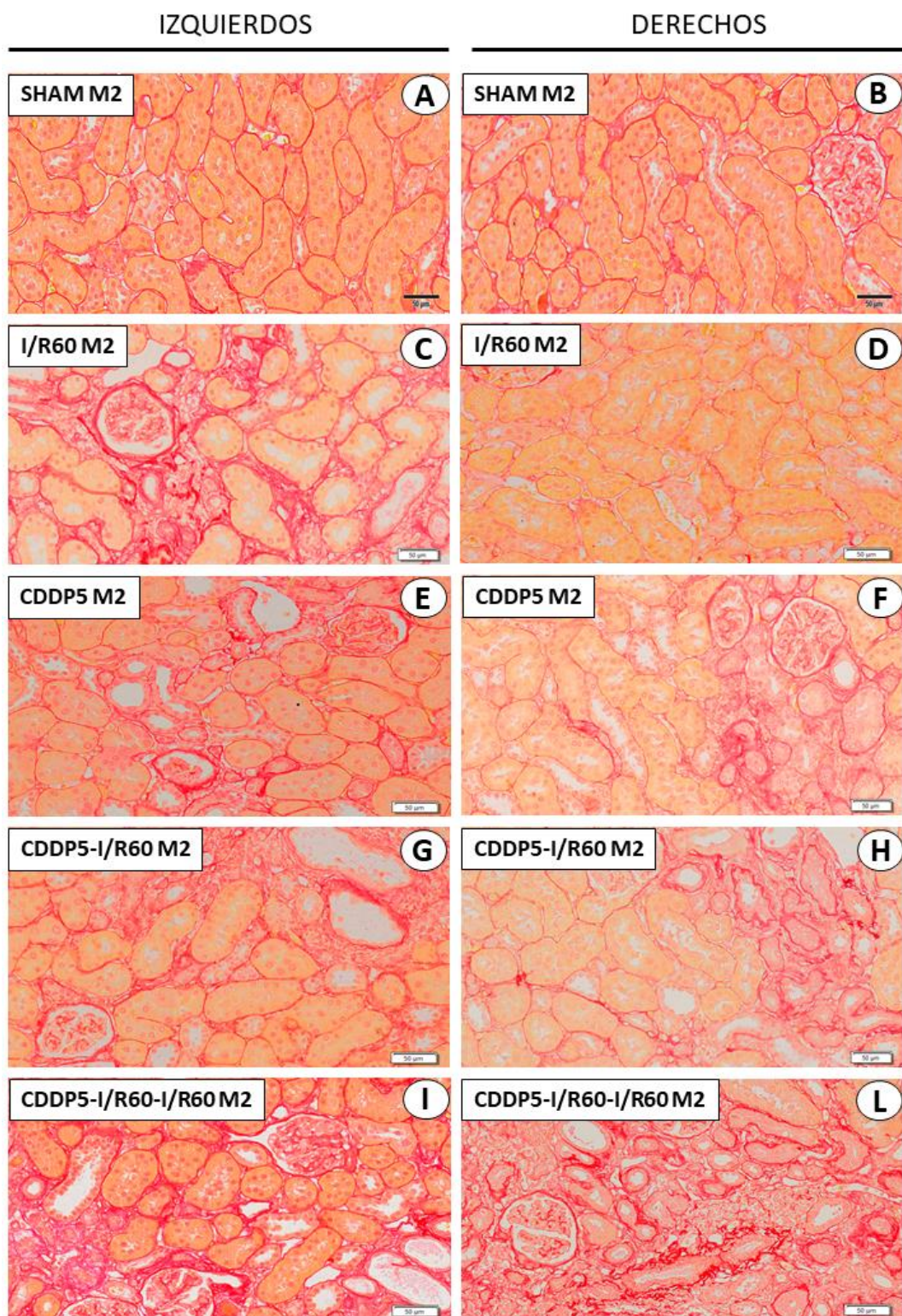


Figura 42: Evaluación de la fibrosis renal mediante tinción de Rojo Sirio. Imágenes representativas (100X) de cortes histológicos de la región cortical. La barra de la esquina inferior derecha indica la escala (50 μ m).

2.3 Cuantificación de la fibrosis en los modelos de diferente incidencia de daño

En la Figura 43 se muestran los resultados de la cuantificación de colágeno en los diferentes grupos de animales en D20 y M2 en las regiones cortical, medular externa y medular interna.

En D20 se encontró una cantidad más alta de colágeno en todos los grupos de daño (CDDP5; I/R60 (riñones izquierdos); CDDP5-I/R60) con respecto al grupo control, principalmente en las regiones medulares externa e interna. Los riñones derechos del grupo I/R60 no presentaron diferencias con respecto a los controles.

En M2, se observó un aumento consistente de fibrosis en todos los grupos de daño (I/R60 (riñones izquierdos), CDDP5, CDDP5-I/R6 y CDDP5-I/R60-I/R60) en todas las regiones, con la excepción del grupo CDDP5 en el que se observó un incremento de fibrosis principalmente en la región medular externa. Estos resultados serían compatibles con otros estudios que han demostrado como la región renal más dañada por el cisplatino es la médula externa (McDuffie et al., 2013).

El único grupo que mostró un elevado grado de fibrosis en ambos riñones fue el grupo de triple daño CDDP5-I/R60-I/R60. El grupo de doble daño mostró un mayor grado de fibrosis en los riñones izquierdos con respecto a los derechos, compatible con el modelo experimental, puesto que el segundo daño se aplicó en los riñones izquierdos. En cuanto a los grupos de único daño, mostraron un nivel de fibrosis significativamente más elevado con respecto al grupo control, pero menor que los grupos de mayor frecuencia de daño. No se observaron diferencias entre los riñones derechos del grupo I/R60 y el grupo SHAM.

Nuestros resultados muestran la fibrosis como una consecuencia de un daño renal, cuando no se ha conseguido una perfecta reparación de la estructura renal. Además, demuestran que existe una relación directa entre producción de fibrosis y frecuencia de los episodios de daño, puesto que los grupos que presentaron mayor cantidad de fibrosis fueron los grupos de triple y de doble daño. De acuerdo con estos resultados, la fibrosis renal representa una cicatriz posterior a un daño renal, que delimita las regiones donde no se ha conseguido una completa reparación. Sin embargo, cuando otro daño se sobrepone a una estructura ya previamente dañada, como ocurre en el grupo de triple daño o en los riñones izquierdo en el

grupo "CDDP5-I/R60", el proceso fibrótico se dispara provocando una excesiva producción de matriz extracelular.

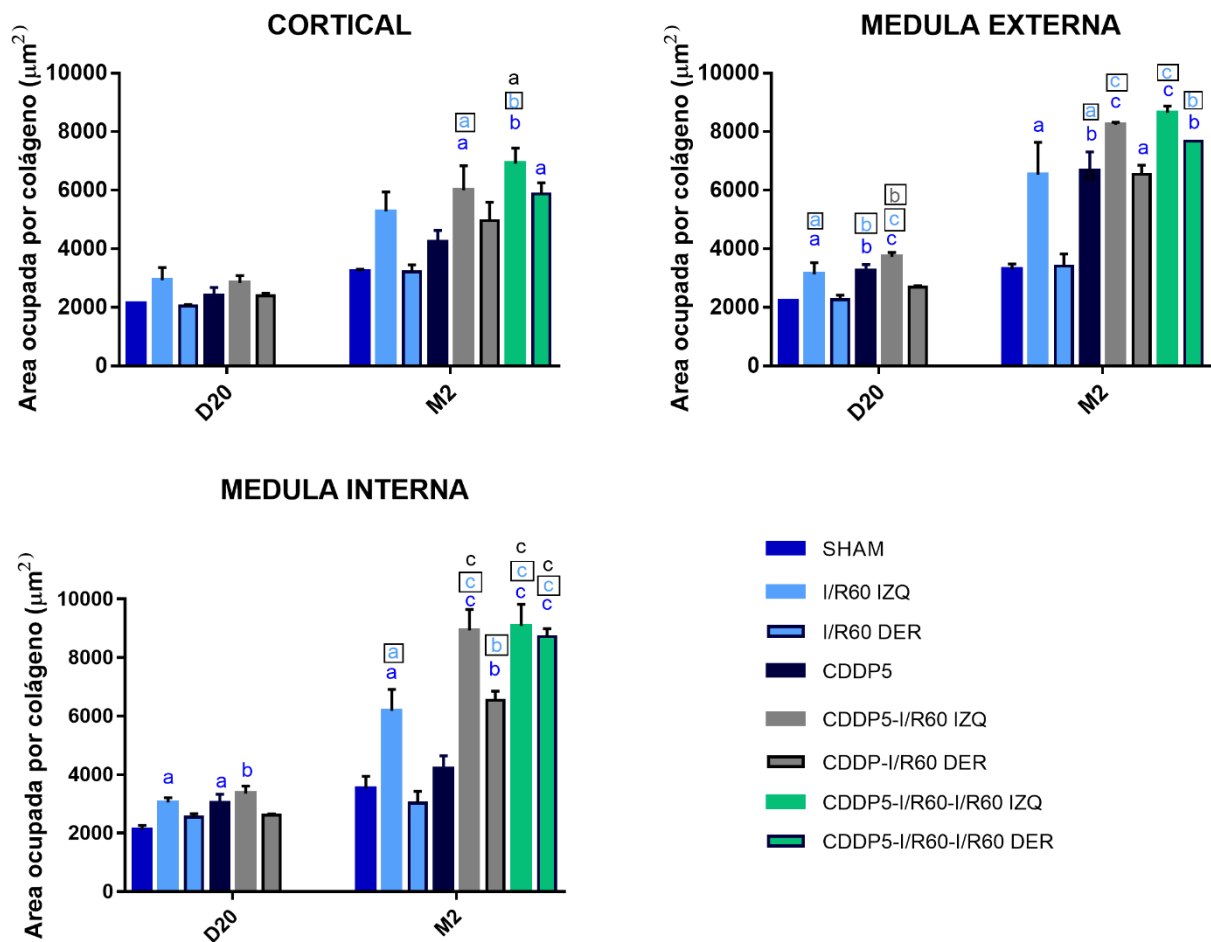


Figura 43: Cuantificación del área de fibrosis renal (μm^2). Se muestran los resultados de la cuantificación de colágeno en los diferentes puntos de estudio (D20= día 20, M2= segundo mes) en las tres regiones renales diferentes (cortical, medula externa y medula interna). Se utilizaron entre 3 y 5 animales por cada grupo, y por cada riñón se analizaron 5 imágenes de la región cortical, 5 de la región medular externa y 5 de la medular interna. En el grupo "CDDP5", se muestra la media de los valores obtenido de los riñones izquierdos y derechos ($^a p < 0,05$; $^b p < 0,01$; $^c p < 0,001$). El color de las letras a, b y c indica el grupo experimental con respecto al cual se refiere la significación. El borde negro alrededor de la letra indica que la significación se refiere al grupo I/R60 DER (riñón derecho).

2.4 Evaluación de la progresión del daño renal

En las figuras 45, 46 y 47 se muestra el análisis de la evolución del daño desde el día 20 (D20) hasta M9. En el grupo CDDP5-I/R60-I/R60 existe un elevado grado de lesiones renales ya en el segundo mes de estudio (M2). En este grupo, se observa una acumulación progresiva de colágeno y creciente fibrosis intersticial, desde D20 hasta el último punto de estudio (M9). En este punto, los riñones parecen

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

completamente fibróticos y casi no se observan zonas normales. Existe un elevadísimo grado de dilatación tubular, infiltrado inflamatorio y son muy evidentes las alteraciones a nivel glomerular, caracterizadas principalmente por glomeruloesclerosis, que varía desde un aumento marcado de la matriz mesangial hasta la completa sustitución del glomérulo por matriz fibrótica. Además, se observa en muchos glomérulos la pérdida de su arquitectura normal y un aumento de sus dimensiones.

En el grupo 5/6 NEF no se observaron alteraciones significativas en la estructura renal en D20. Sin embargo, ya desde el segundo mes de estudio, se observaron alteraciones estructurales caracterizadas principalmente por lesiones glomerulares (presencia de glomeruloesclerosis y aumento del tamaño de los glomérulos), dilatación de algunos túbulos, presencia de infiltrado inflamatorio y fibrosis intersticial, aunque es importante destacar que todavía en este punto existían muchas zonas sin alteraciones significativas. En M6, las lesiones renales se hicieron muy evidentes y extendidas en la superficie renal y se caracterizaron por un aumento marcado de fibrosis intersticial e infiltrado inflamatorio, daño tubular y lesiones glomerulares. Estas alteraciones empeoraron todavía más en M9, donde prácticamente casi no se observan regiones normales en los riñones analizados.

En la Figura 44 se muestra el resultado de la cuantificación de la fibrosis en estos puntos. Como se indicó anteriormente, en el grupo de triple daño el proceso fibrótico ya fue abundante en el segundo mes del estudio y empeoró todavía más en los siguientes meses. Sin embargo, el grupo 5/6 NEF presentó un menor grado de fibrosis en M2 y M6 con respecto al grupo de triple daño, que aumentó posteriormente llegando a niveles similares en M9.

Nuestros resultados demuestran como la producción progresiva de matriz extracelular en el tiempo representa un marco común de la ERC. En nuestro modelo se encontró una elevada cantidad de fibrosis ya en los primeros meses de estudio (M2) como consecuencia de la inducción de los tres daños renales en el primer mes del estudio, que progresó y aumentó hasta los puntos finales.

En el modelo de "5/6 NEF" también encontramos un aumento progresivo de la fibrosis. Se han descrito diferentes mecanismos involucrados en la producción de fibrosis en este modelo. La activación del sistema renina-angiotensina tiene un papel fundamental. En concreto, se ha descrito el papel de la angiotensina II en la hipertrofia glomerular [mediante la activación del receptor EGFR (del inglés, *Epithelial growth factor*

receptor), hipertensión glomerular (mediante el aumento de la vasoconstricción de la arteriola eferente), alteración de las funciones de los podocitos, pérdida de selectividad de la barrera de filtración y, por último, en la producción de fibrosis intersticial (mediante activación de su receptor AT1) (Kamiyama et al., 2013; Ruiz-Ortega et al., 2006; Zeng et al., 2016). La presencia de fibrosis en este modelo también es consecuencia de otros fenómenos, entre los cuales encontramos la inflamación intersticial (nefritis), producida principalmente por moléculas proinflamatorias transportadas por el exceso de proteínas plasmáticas filtradas por los riñones, y el aumento de la actividad secretoria de túbulos dañados que dan lugar a un entorno dominado por factores profibróticos (Fogo, 2007).

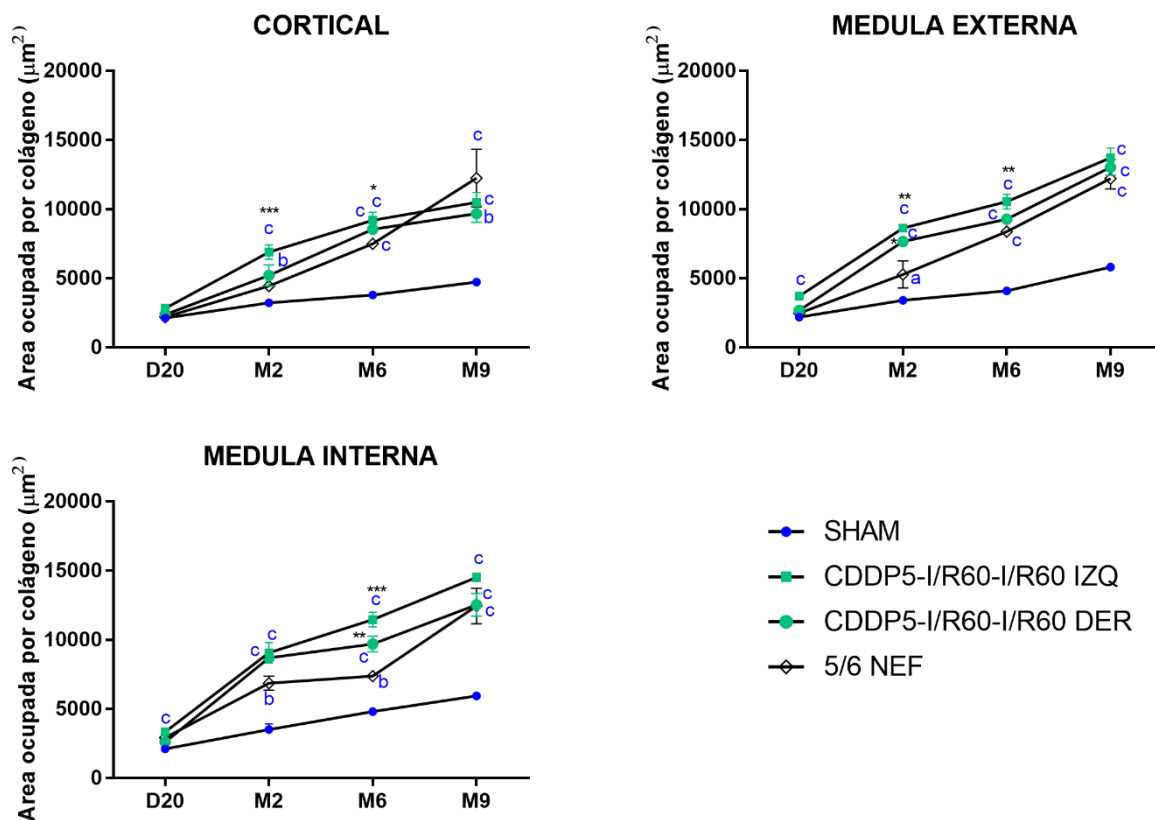


Figura 44: Cuantificación de la fibrosis renal (μm^2). Se muestran los resultados de la cuantificación de colágeno en los diferentes puntos de estudio (D20= día 20, M= mes) (^a $p < 0,05$ vs SHAM; ^b $p < 0,01$ vs SHAM; ^c $p < 0,001$ vs SHAM; * $p < 0,05$ vs 5/6 NEF; ** $p < 0,01$ vs 5/6 NEF; *** $p < 0,001$ vs 5/6 NEF).

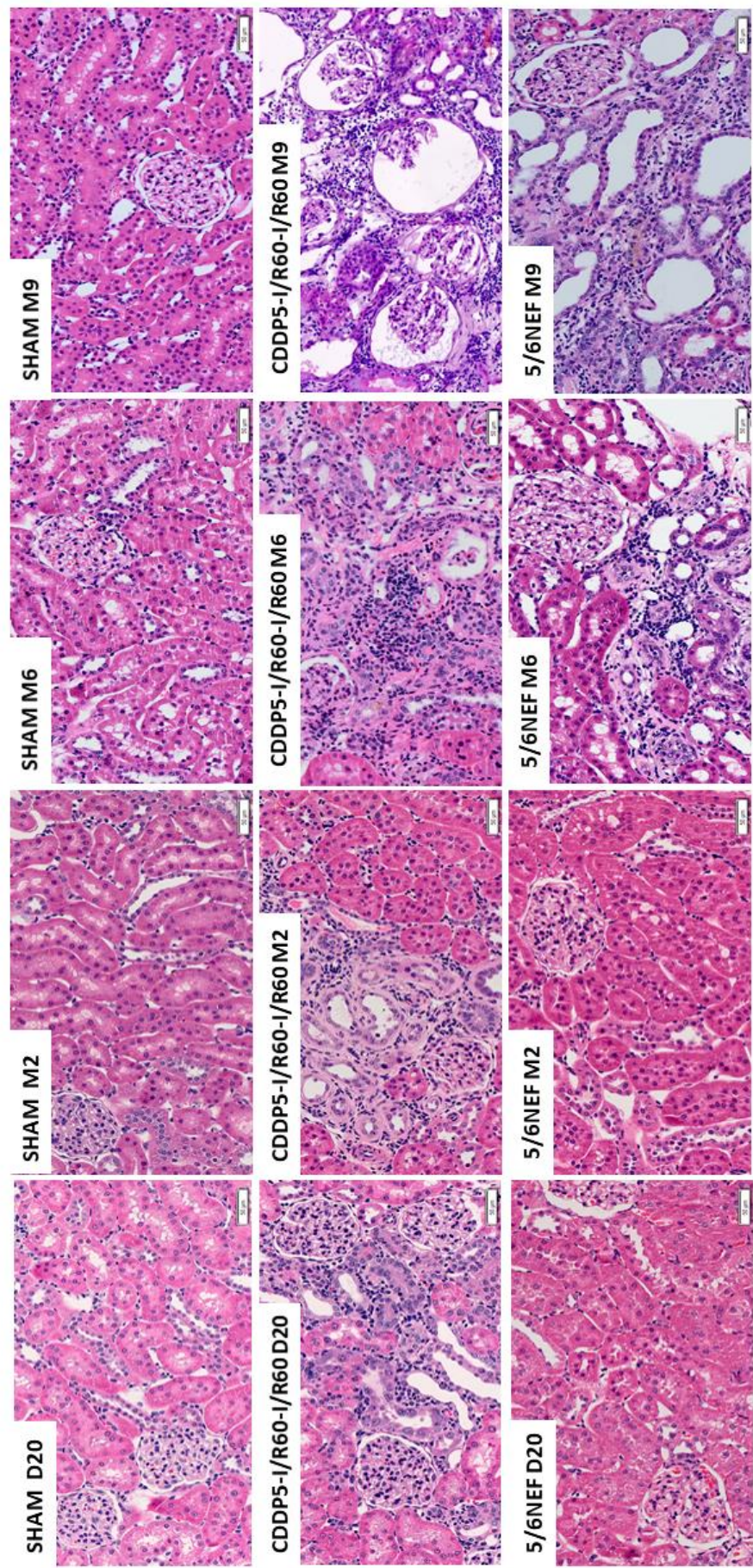


Figura 45: Estudio de la progresión de las alteraciones renales mediante tinción de Hematoxilina-eosina. Imágenes representativas (100X) de cortes histológicos de la región cortical (riñones izquierdos). Se indica la escala (50 μ m).

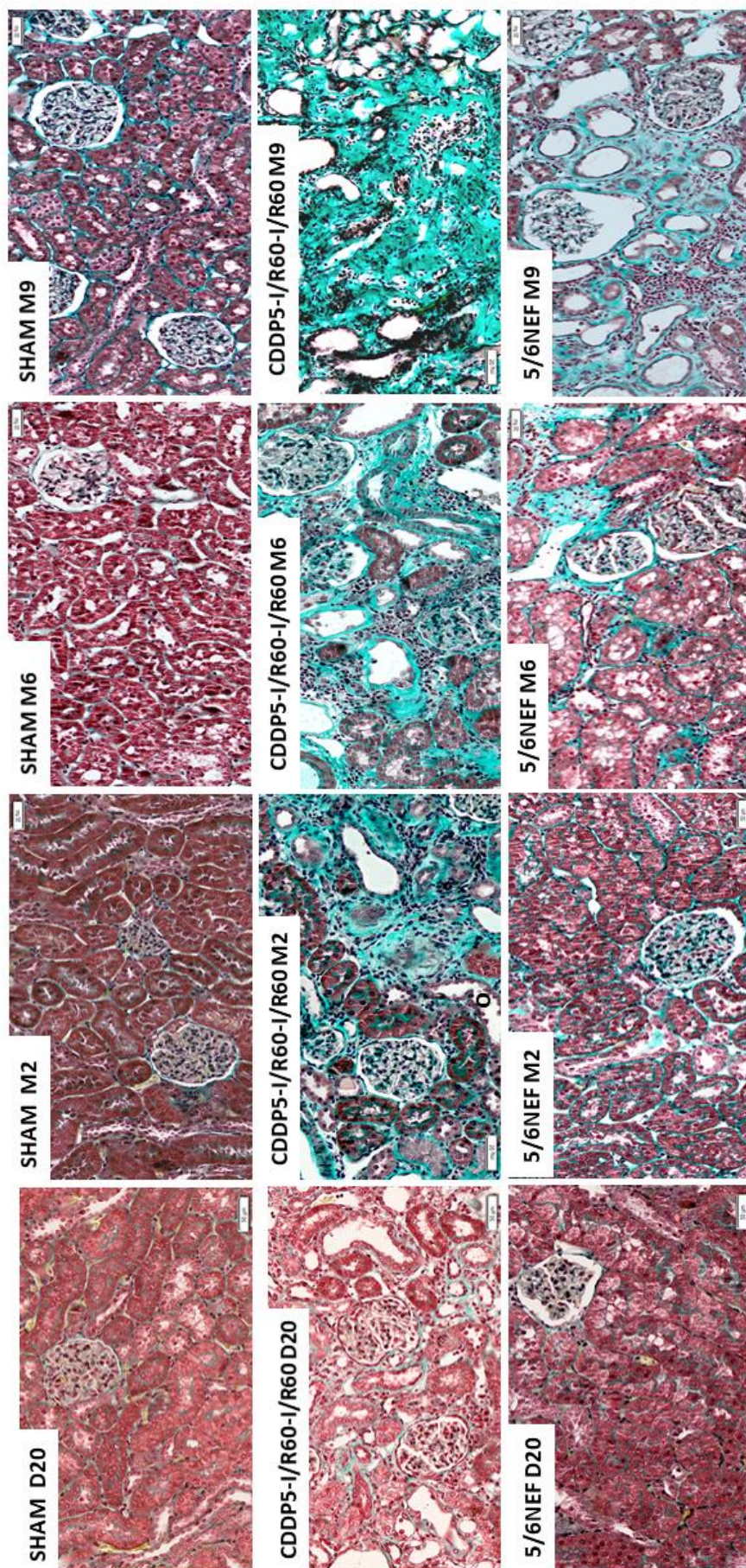


Figura 46: Estudio de la progresión de la fibrosis renal mediante tinción de Tricromico de Masson. Imágenes representativas (100X) de cortes histológicos de la región cortical (riñones izquierdos). Se indica la escala (50 µm).

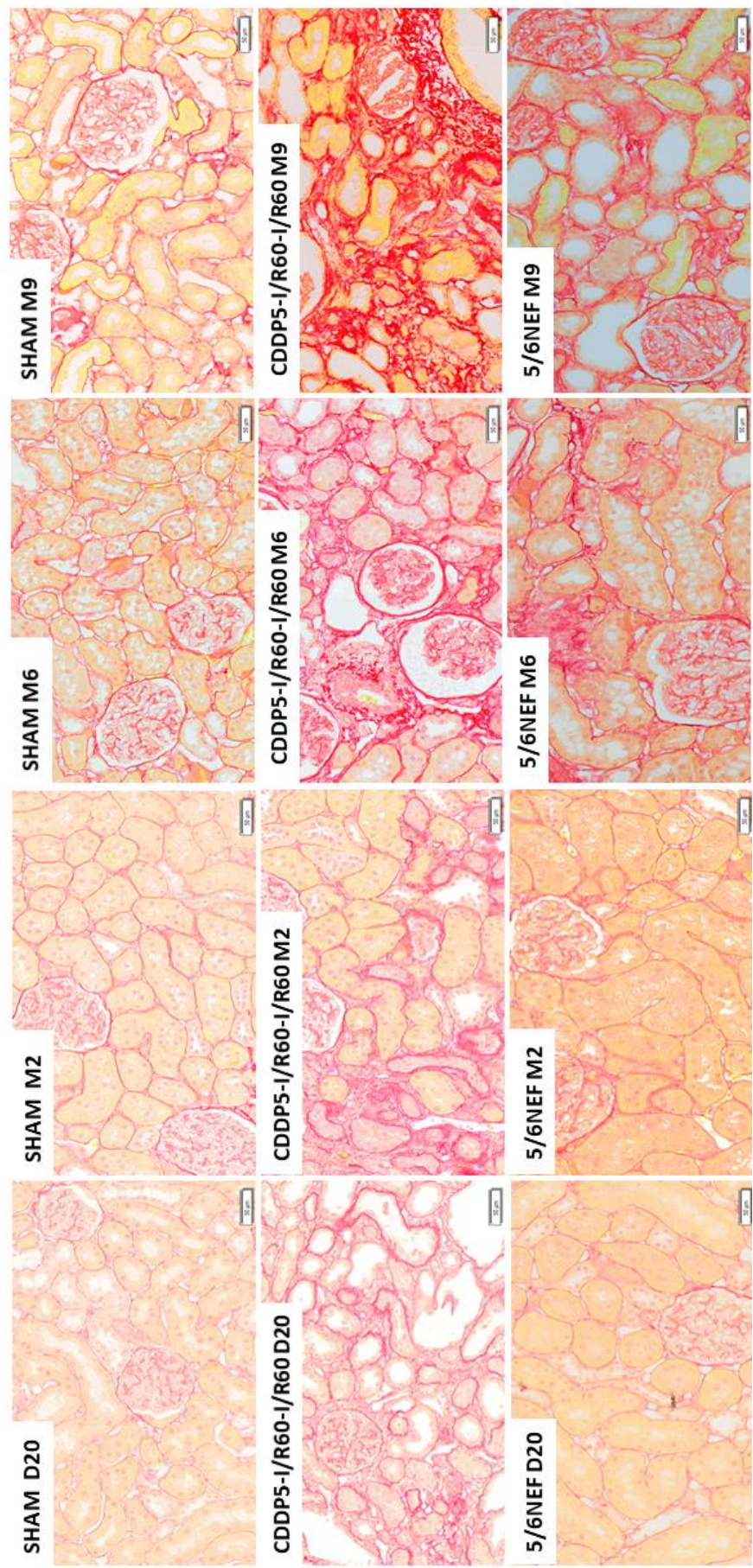


Figura 4.7: Estudio de la progresión de la fibrosis renal mediante tinción de Rojo Sirio. Imágenes representativas (100X) de cortes histológicos de la región cortical (riñones izquierdos). Se indica la escala (50 µm).

3 ESTUDIO DE BIOMARCADORES URINARIOS EN LA MONITORIZACIÓN DE LAS SECUELAS SUBCLÍNICAS DEL DRA Y DE LA PROGRESIÓN DE LA ERC

La CrP y el BUN son marcadores funcionales de filtración glomerular más que de daño renal parenquimatoso. Además, como se ha indicado anteriormente, son marcadores tardíos y poco sensibles, ya que aumentan en sangre lentamente después de un daño renal y solo cuando el daño está muy extendido (Bargnoux et al., 2018; Dixon Thomas, Seeba Zachariah, Abdelgadir Elamin Eltom, 2017; Emeigh Hart, 2005; A S Levey & Inker, 2017; Lopes & Jorge, 2013). Por esta razón, se han investigado e identificado diferentes marcadores urinarios para el diagnóstico temprano del DRA (Devarajan, 2011).

Otra área de investigación se ha focalizado en la búsqueda de marcadores urinarios de recuperación (Zoltan H. Endre, 2014; Forni et al., 2017; Srisawat et al., 2014), aunque la mayoría de ellos son marcadores de DRA, que desaparecen o se normalizan tras una completa recuperación. La detección de alteraciones estructurales subclínicas a nivel renal en pacientes que han sufrido previamente un DRA permitiría reducir en éstos el riesgo de sufrir otros episodios de DRA y de progresar a ERC (Zoltán H. Endre, 2018). Numerosos estudios han demostrado, que existe un aumento en el riesgo de sufrir otros episodios de DRA en pacientes que ya lo han sufrido con anterioridad (Macedo & Mehta, 2019). Además, la frecuencia de estos episodios se ha relacionado a su vez con el riesgo de no recuperación y de transición a ERC (Takaori et al., 2016). Por todas estas razones, resulta de fundamental importancia encontrar nuevas herramientas que permitan conocer de forma precisa el estado en el que se encuentran los riñones en cada momento y que sean más sensibles que los parámetros clínicos comúnmente utilizados.

En este trabajo se ha generado un modelo animal de múltiples daños renales, con transición a ERC, y se ha estudiado un panel de marcadores urinarios para la detección de alteraciones estructurales subclínicas renales presentes después de episodios de DRA y antes del desarrollo de la ERC. Por otro lado, se ha investigado su aplicación en el seguimiento de la enfermedad renal crónica. Se ha seleccionado el día 20 como punto para el estudio de marcadores de secuelas estructurales, puesto que en este día los parámetros funcionales (CrP y ClCr) presentaban valores normales en todos los modelos de daño renal,

habían transcurrido bastantes días (10-12 días) tras el segundo daño y todavía no se había inducido el último. Por otra parte, se ha estudiado la evolución de los niveles urinarios de estos marcadores a lo largo del tiempo en nuestro modelo y en el modelo de 5/6 NEF hasta el noveno mes del estudio.

3.1 ALBÚMINA

La albúmina es la proteína plasmática más abundante, representando más del 50% de todas las proteínas plasmáticas. Se sintetiza principalmente en el hígado y su principal función es la regulación de la presión oncótica y del volumen de sangre. Está constituida por 585 aminoácidos y presenta una estructura globular con carga negativa y un peso de 66 kDa (Quinlan et al., 2005). Muchos compuestos exógenos y endógenos, como los ácidos grasos, iones metálicos, medicamentos y metabolitos, se unen a la albúmina (Vart & Grams, 2016) y esto hace que tenga importantes implicaciones farmacológicas y toxicológicas.

En condiciones normales, solo una pequeña cantidad de albúmina se filtra, por limitaciones estéricas y por su carga negativa (Comper & Glasgow, 1995). De esta cantidad, la mayoría se reabsorbe a nivel de los túbulos renales (Lazzara & Deen, 2007; Oken et al., 1972; Tojo & Endou, 1992), mediante mecanismos de endocitosis (Christensen & Birn, 2001; Zhai et al., 2000), y solo una pequeña cantidad se excreta en la orina. Su concentración urinaria puede incrementar como consecuencia de alteraciones a nivel tubular (en la reabsorción) o glomerular (filtración) (C. T. S. Lim et al., 2014).

Niveles altos de albuminuria se han relacionado con un DRA (Dieterle et al., 2010; Oken et al., 1972) y con una peor recuperación (Neyra et al., 2016). Por otra parte, la albuminuria en concentraciones más bajas se ha descrito como marcador temprano de DRA (Wijeratna et al., 2018) y como marcador de predisposición a sufrir un DRA (Vicente-Vicente et al., 2013). La albuminuria es un parámetro muy importante también en la ERC, puesto que valores altos pueden indicar un peor pronóstico de la ERC también con valores de TFG poco alterados (Andrew S. Levey & Coresh, 2012) y su incremento a lo largo del tiempo se ha relacionado con la progresión de la ERC a ESRD (Jefferson et al., 2008; Nauta et al., 2013).

En la Figura 48 y Tabla 22 se observan los valores urinarios de albúmina medidos mediante la técnica ELISA. Los animales controles presentaron valores de albuminuria que se mantuvieron en un rango entre 0,2-0,5 mg/día durante todo el periodo de estudio. La albuminuria en D4 post cisplatino (DRA) llegó a valores

alrededor de 20 mg/día. En los grupos de I/R60 y CDDP5 no se observaron diferencias en la excreción de albúmina hasta M2. En el modelo de 5/6 NEF los valores de albuminuria empezaron a aumentar desde M1, de forma progresiva durante todo el estudio, llegando a valores de excreción diaria de 30 mg/día en M9, superiores a los que se observaron en el día de DRA causado por cisplatino. En el grupo de CDDP5-I/R60-I/R60, se observó una mayor excreción de albúmina en D20 y en M1, que se normalizó en M2 (Figura 48 B). Desde M3, los valores empezaron a subir progresivamente, de forma más lenta con respecto al grupo de 5/6 NEF, pero llegando en los puntos finales (M8-M9) a valores similares (Figura 48 A).

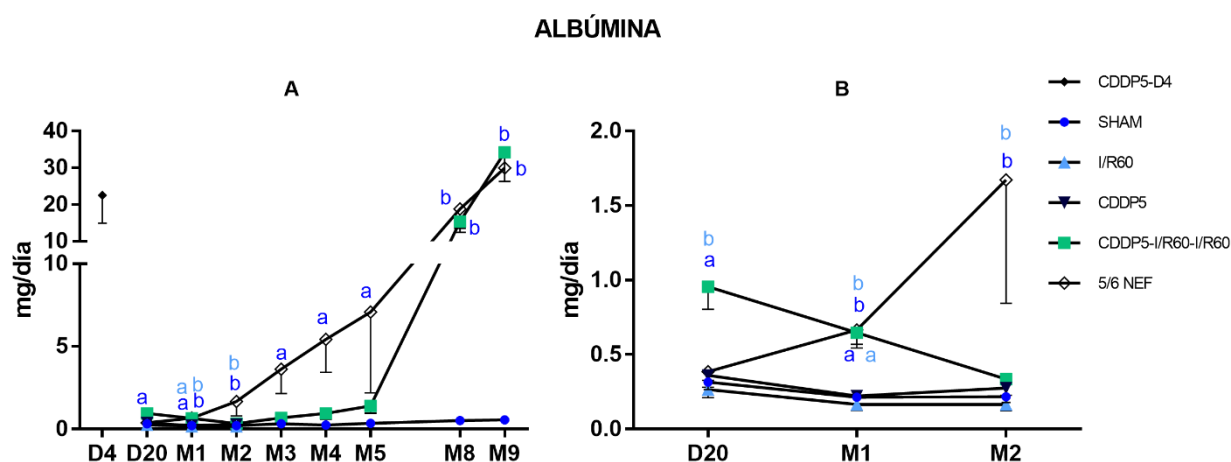


Figura 48: Análisis por ELISA de los niveles de albuminuria (mg/día) durante el periodo de estudio (D4= día 4, D20= día 20, M=mes) en los diferentes grupos experimentales: grupo "SHAM", grupos de único daño ("I/R60", "CDDP5"); grupo de triple daño "CDDP5-I/R60-I/R60" y grupo "5/6NEF". (A) Valores de albuminuria durante todo el periodo de estudio. (B) Detalle de los valores de albuminuria en D20, M1 y M2. Los valores están expresados como media $\pm$ EEM (^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$; * $p < 0,05$ vs 5/6 NEF; ** $p < 0,01$ vs 5/6 NEF; *** $p < 0,001$ vs 5/6 NEF). El color de las letras a, b y c indica el grupo experimental con respecto al cual se refiere la significación.

	SHAM	I/R60	CDDP5	CDDP5-I/R60-I/R60	5/6 NEF
D20	(6) 0,3 $\pm$ 0,05	(5) 0,3 $\pm$ 0,05	(4) 0,4 $\pm$ 0,08	(11) 1,0 $\pm$ 0,2	(4) 0,4 $\pm$ 0,06
M1	(6) 0,2 $\pm$ 0,03	(5) 0,2 $\pm$ 0,04	(5) 0,2 $\pm$ 0,02	(10) 0,6 $\pm$ 0,08	(4) 0,7 $\pm$ 0,1
M2	(3) 0,2 $\pm$ 0,04	(5) 0,2 $\pm$ 0,04	(5) 0,3 $\pm$ 0,05	(11) 0,3 $\pm$ 0,04	(5) 1,7 $\pm$ 0,9
M3	(4) 0,3 $\pm$ 0,1			(5) 0,7 $\pm$ 0,1	(4) 3,6 $\pm$ 1,5
M4	(4) 0,2 $\pm$ 0,03			(5) 1,0 $\pm$ 0,4	(4) 5,4 $\pm$ 2,0
M5	(4) 0,3 $\pm$ 0,09			(5) 1,4 $\pm$ 0,4	(4) 7,0 $\pm$ 4,9
M8	(4) 0,5 $\pm$ 0,2			(4) 15,4 $\pm$ 2,9	(3) 18,8 $\pm$ 5,3
M9	(4) 0,6 $\pm$ 0,2			(4) 34,2 $\pm$ 7,9	(3) 29,9 $\pm$ 1,0

Tabla 22: Valores en mg/día de albuminuria en los diferentes grupos experimentales. Los datos representan la media $\pm$ EEM. Al lado de cada valor se detalla entre paréntesis el número de animales utilizado (n).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las Figuras 49 y 50 se muestran los resultados obtenidos mediante *Western blot* que confirman aquellos obtenidos por la técnica ELISA.

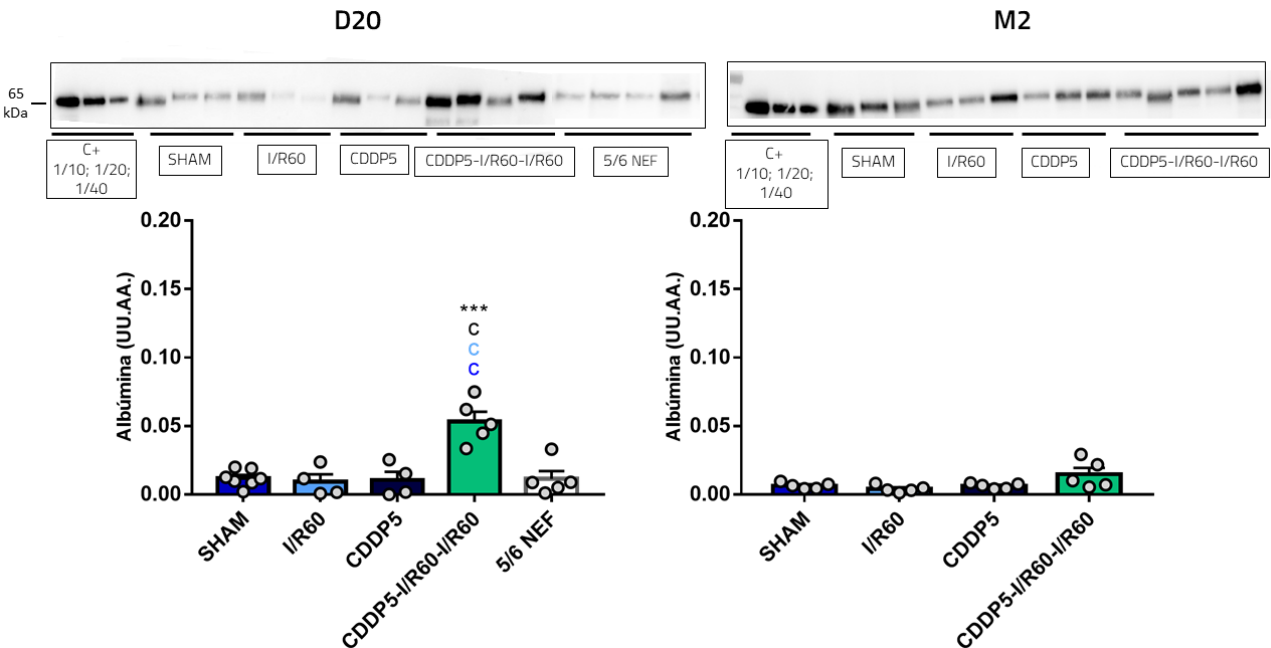


Figura 49: Análisis por *Western blot* de la albuminuria en los diferentes grupos experimentales en D20 (día 20) y M2 (mes dos). Los resultados se expresan como cantidades relativas al control positivo, donde 1 representa el 100% del control positivo (^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$; * $p < 0,05$ vs 5/6 NEF; ** $p < 0,01$ vs 5/6 NEF; *** $p < 0,001$ vs 5/6 NEF). El color de las letras a, b y c indica el grupo experimental con respecto al cual se refiere la significación.

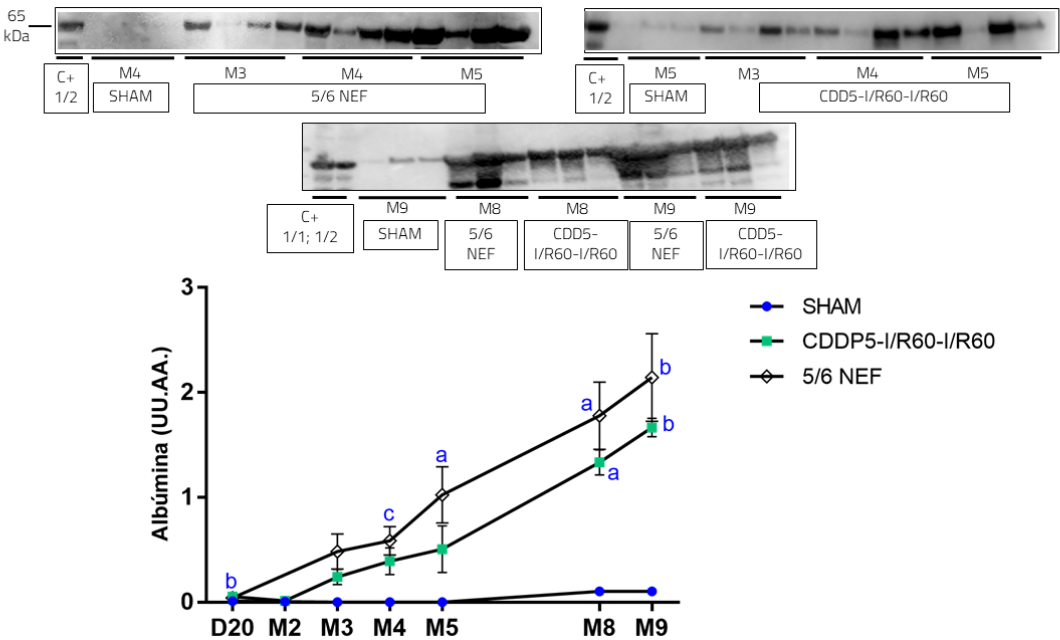


Figura 50: Análisis por *Western blot* de la evolución de la albuminuria a lo largo del estudio (D20= día 20, M= mes). Los resultados se expresan como cantidades relativas al control positivo, donde 1 representa el 100% del control positivo (^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$; * $p < 0,05$ vs 5/6 NEF; ** $p < 0,01$ vs 5/6 NEF; *** $p < 0,001$ vs 5/6 NEF). El color de las letras a, b y c indica el grupo experimental con respecto al cual se refiere la significación.

La cantidad de albúmina en D20 en el grupo de triple daño, aunque muy pequeña con respecto a la excretada en D4 y en los últimos puntos de estudio (M8 y M9), resultó significativamente más alta con respecto a todos los grupos (Figuras 48 B y 49). En la clínica, concentraciones muy pequeñas de albúmina en la orina se definen como microalbuminuria (Longo et al., 2011). El aumento progresivo de albuminuria en el modelo de 5/6 NEF (más rápido) y en nuestro modelo (más lento) indica que hubo una progresión del daño renal en ambos. En concreto, las adaptaciones funcionales posteriores a la pérdida de masa renal funcional, en ambos modelos, convergieron hacia el aumento progresivo de excreción de esta proteína en la orina. Nuestros resultados demuestran la utilidad de la albúmina como marcador de secuelas subclínicas y de progresión de la enfermedad renal.

3.2 TRANSFERRINA

La transferrina es una proteína de 79 kDa sintetizada principalmente en el hígado. Su función principal es el transporte de hierro en la sangre hacia los tejidos, ya que este resulta tóxico en su forma libre. La transferrina tiene una estructura de dos lóbulos, cada uno de ellos capaz de unirse a un ion férrico (Fe^{3+}). Su afinidad con el hierro depende del pH de su entorno, siendo muy alta para un pH de 7.4 (como el de la sangre) y disminuyendo con pH más bajos (ácidos), como el que se encuentra en algunos compartimentos intracelulares (endosomas). Tras la unión con su receptor a nivel de la membrana plasmática, el complejo transferrina-receptor es internalizado en la célula mediante el sistema de endocitosis mediado por clatrina, hasta los endosomas donde por la presencia de un pH ácido (5) libera el hierro (Gomme et al., 2005; Kawabata, 2019; Lok & Loh, 1998). Se ha descrito la transferrina como biomarcador temprano de daño renal (Vicente-Vicente et al., 2013) y como marcador de daño subclínico (Casanova et al., 2020).

En la Figura 51 y Tabla 23, se observan los valores urinarios de transferrina medidos mediante la técnica ELISA. Los animales controles presentan valores de transferrina que se mantuvieron en un rango entre 3.7-26.1 $\mu\text{g}/\text{día}$ durante todo el periodo de estudio (Tabla 23). En D4 tras la administración de cisplatino, los valores de transferrina subieron hasta 1000 $\mu\text{g}/\text{día}$. En los grupos de I/R60 y CDDP5 no se observaron diferencias en la excreción de transferrina hasta M2. En el modelo de 5/6 NEF los valores de transferrina empezaron a aumentar desde M2, con diferencias significativas desde M3, durante todo el estudio, llegando a valores de excreción diaria de 3000 $\mu\text{g}/\text{día}$, tres veces superiores al D4 post cisplatino. En el

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

grupo de triple daño, se observó una mayor excreción de transferrina en D20 y en M1, que se normalizó en M2. Desde M3, los valores empezaron a subir progresivamente, de forma más lenta con respecto al modelo de 5/6 NEF, y alcanzaron en los puntos finales (M8-M9) valores similares al 5/6 NEF. Estos resultados se confirmaron también mediante la técnica de *Western blot* (Figuras 52 y 53). La transferrina, igual que la albúmina, es un marcador útil para la detección de alteraciones renales subclínicas y para el seguimiento de la progresión de la ERC.

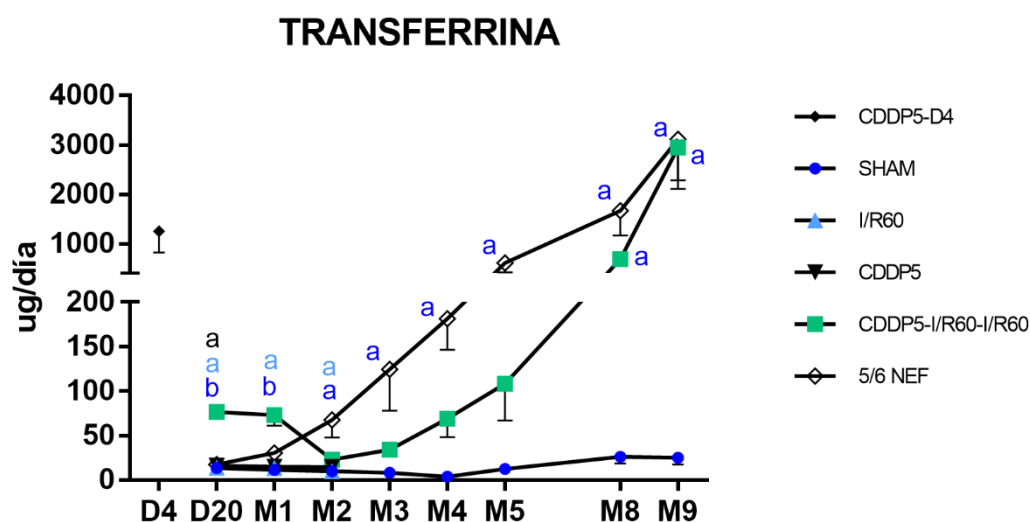


Figura 51: Análisis por ELISA de los niveles urinarios de transferrina ($\mu\text{g}/\text{día}$) durante el periodo de estudio (D4= día 4, D20= día 20, M=mes) en los diferentes grupos experimentales: grupo "SHAM", grupos de único daño ("I/R60"; "CDDP5"); grupo de triple daño "CDDP5-I/R60-I/R60" y grupo "5/6NEF". Los valores están expresados como media $\pm$ EEM (^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$; * $p < 0,05$ vs 5/6 NEF; ** $p < 0,01$ vs 5/6 NEF; *** $p < 0,001$ vs 5/6 NEF). El color de las letras a, b y c indica el grupo experimental con respecto al cual se refiere la significación.

	SHAM	I/R60	CDDP5	CDDP5-I/R60-I/R60	5/6 NEF
D20	(6) 13,7 $\pm$ 2,6	(5) 13,8 $\pm$ 1,3	(4) 16,1 $\pm$ 5,6	(9) 76,5 $\pm$ 7,2	(4) 17,5 $\pm$ 2,9
M1	(6) 11,4 $\pm$ 2,6	(5) 13,6 $\pm$ 3,1	(5) 15,1 $\pm$ 1,5	(5) 73,0 $\pm$ 11,8	(4) 30,3 $\pm$ 3,9
M2	(3) 10,0 $\pm$ 2,4	(5) 10,0 $\pm$ 3,4	(5) 14,6 $\pm$ 2,3	(11) 23,0 $\pm$ 3,4	(3) 67,5 $\pm$ 19,7
M3	(4) 8,3 $\pm$ 1,6			(5) 34,0 $\pm$ 7,4	(4) 124,6 $\pm$ 46,5
M4	(4) 3,7 $\pm$ 1,6			(4) 68,9 $\pm$ 21,2	(4) 181,6 $\pm$ 68,0
M5	(4) 12,3 $\pm$ 4,8			(4) 108,3 $\pm$ 41,4	(3) 612,8 $\pm$ 192,5
M8	(3) 26,1 $\pm$ 7,7			(6) 687,7 $\pm$ 149,7	(3) 1671 $\pm$ 501
M9	(3) 25,2 $\pm$ 7,6			(5) 2949 $\pm$ 840	(3) 3113 $\pm$ 830,8

Tabla 23: Valores en $\mu\text{g}/\text{día}$ de transferrina urinaria en los diferentes grupos experimentales. Los datos representan la media $\pm$ EEM. Al lado de cada valor se detalla entre paréntesis el número de animales utilizado (n).

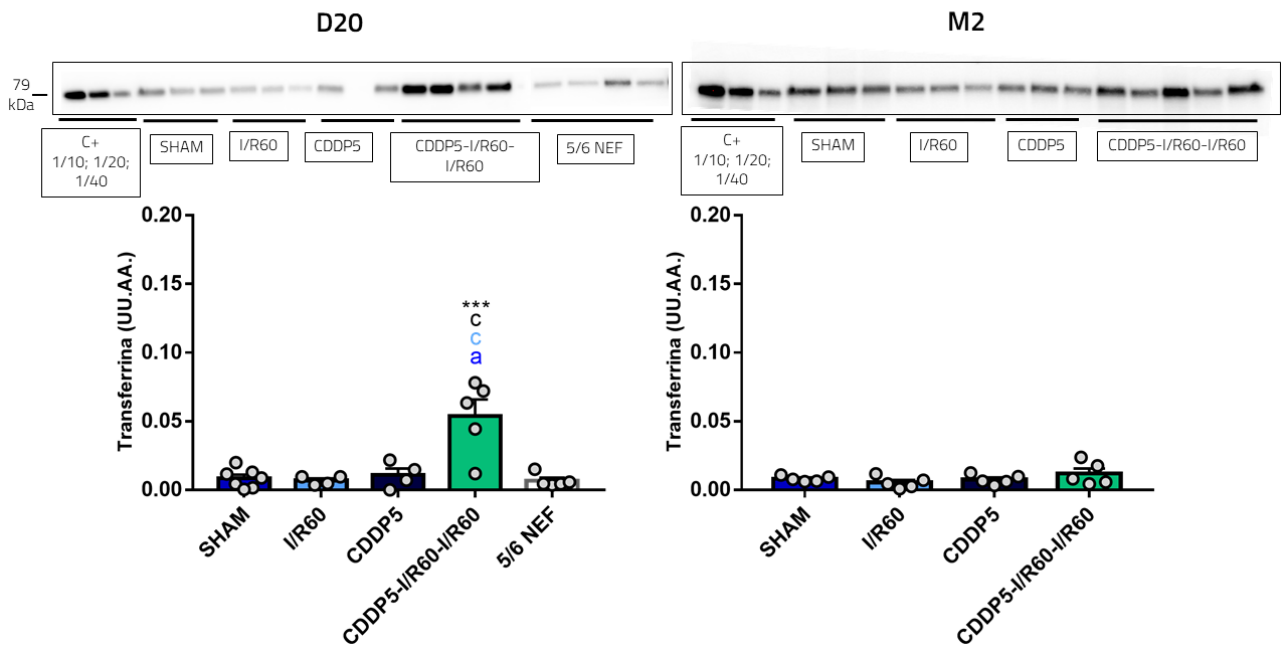


Figura 52: Análisis por Western blot de la presencia de transferrina en la orina de los diferentes grupos experimentales en D20 (día 20) y M2 (mes dos). Los resultados se expresan como cantidades relativas al control positivo, donde 1 representa el 100% del control positivo ($^a p < 0,05$; $^b p < 0,01$; $^c p < 0,001$; $^* p < 0,05$ vs 5/6 NEF; $^{**} p < 0,01$ vs 5/6 NEF; $^{***} p < 0,001$ vs 5/6 NEF). El color de las letras a, b y c indica el grupo experimental con respecto al cual se refiere la significación.

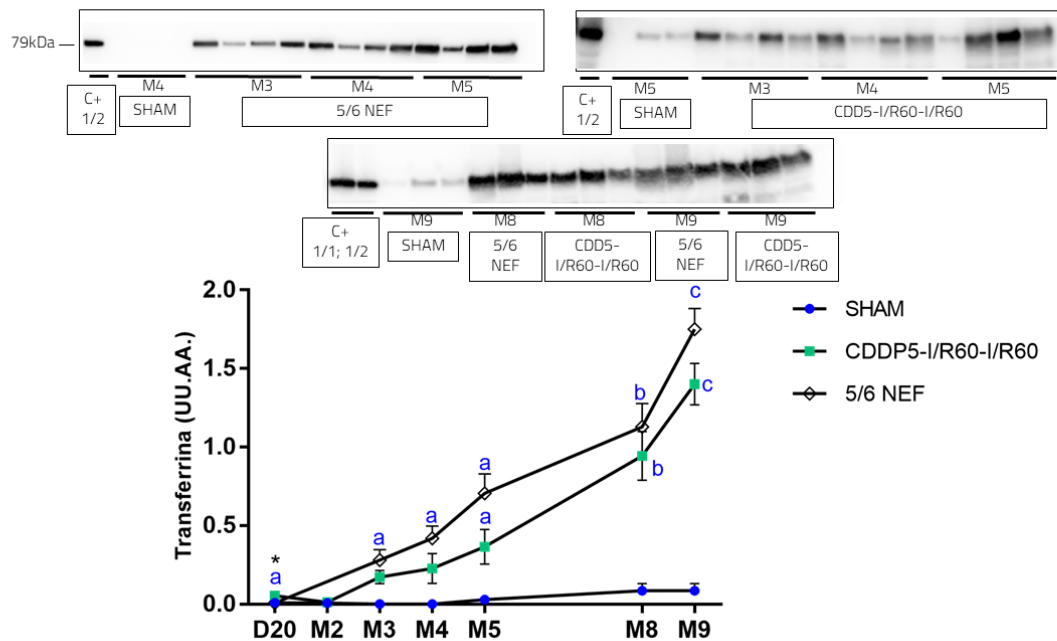


Figura 53: Análisis por Western blot de la evolución de transferrina urinaria a lo largo del estudio (D20= día 20, M= mes). Los resultados se expresan como cantidades relativas al control positivo, donde 1 representa el 100% del control positivo ($^a p < 0,05$ vs SHAM; $^b p < 0,01$ vs SHAM; $^c p < 0,001$ vs SHAM; $^* p < 0,05$ vs 5/6 NEF; $^{**} p < 0,01$ vs 5/6 NEF; $^{***} p < 0,001$ vs 5/6 NEF).

3.3 CLUSTERINA

La clusterina o apoliproteína J es una glicoproteína que fue identificada por primera vez en 1985 en el líquido seminal de carnero y fue llamada así por su actividad promotora sobre la agregación celular in vitro (del inglés, *cluster*= aglomerado) (Blaschuk et al., 1983). Es una proteína con una estructura heterodimérica de 75-80 kDa con dos cadenas de 40 kDa unidas mediante puentes disulfuro entre residuos de cisteínas, producida en varios tejidos y codificada por un gen en el cromosoma 8 (Trogakos & Gonos, 2002).

A día de hoy, no se conocen todas sus funciones. Se ha descrito su actividad en la maduración de los espermatozoides, en el transporte de lípidos, en la inhibición del complemento, en el remodelado tisular, en las interacciones célula-célula y célula sustrato, en la estabilización del plegamiento de proteínas de estrés y en la inhibición o promoción de la apoptosis. Su expresión está alterada en diferentes condiciones patológicas relacionadas con el estrés oxidativo, incluyendo enfermedades neurodegenerativas, inflamatorias y cáncer (Michel et al., 1997; Trogakos & Gonos, 2002).

Se ha descrito su potencial como biomarcador de DRA, ya que se ha observado un aumento de sus niveles urinarios tras exposiciones a agentes nefrotóxicos o a procesos de isquemia-reperfusión por un aumento en su síntesis renal (Vaidya et al., 2008). Recientes estudios han mostrado un rol potencial de la clusterina en la protección contra la glomerulopatía crónica progresiva (Rosenberg et al., 2002) y en la modulación de la fibrosis renal (Guo et al., 2016; G.-S. Jung et al., 2012, 2014). Esta última parece ser una función importante, puesto que se ha descrito una unión directa entre la clusterina y el receptor del TGF β (del inglés, *transforming growth factor beta*), un potente inductor de síntesis de matriz extracelular (Reddy et al., 1996).

En las Figuras 54 y 55 se muestran los resultados obtenidos mediante *Western blot*. En D20, la cantidad de clusterina en la orina resultó más elevada en los grupos de daño I/R60, CDDP5, CDDP5-I/R60-I/R60 con respecto al grupo control. Los valores de clusterina se mantuvieron más elevados en estos grupos hasta M2. En el grupo CDDP5-I/R60-I/R60 se observó una mayor excreción urinaria de clusterina en todo el periodo de estudio. Sin embargo, en el grupo 5/6 NEF no se observó una cantidad elevada de clusterina en la orina con la excepción de los últimos dos puntos (M8-M9), aunque cabe destacar que solo se observaron cantidades elevadas de esta proteína en 2 de los 3 animales analizados en este grupo.

El análisis de expresión génica de esta proteína en animales sacrificados en D20 (Figura 56) muestra una alteración en la producción de clusterina a nivel renal en todos los grupos de daño. La presencia de esta proteína en la orina en estos animales podría ser una consecuencia del aumento de su expresión renal.

Nuestros resultados demuestran la utilidad de este biomarcador para la detección de alteraciones renales posteriores a un DRA, puesto que su excreción parece estar alterada en todos los grupos que sufrieron un daño renal intrínseco (o por administración de un nefrotóxico o por aplicación de una isquemia reperusión) durante un tiempo prolongado tras la exposición a dicho daño. Además, sus niveles urinarios resultaron alterados tras el tercer y último daño durante varios meses, mostrando potencial como marcador de transición (progresión) a ERC.

Sin embargo, la clusterina no pareció ser un buen marcador para monitorizar la progresión de la ERC, ya que no se observó un aumento gradual de esta proteína en la orina a lo largo del estudio en ambos grupos (CDDP5-I/R60-I/R60 y 5/6 NEF).

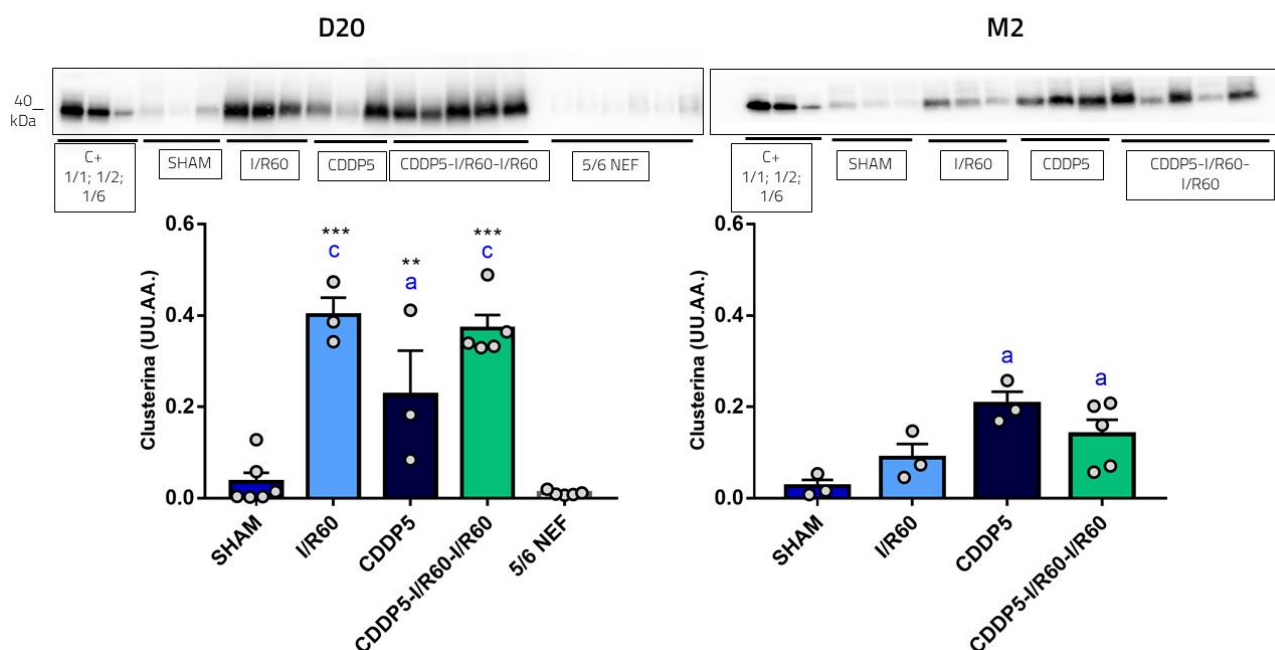


Figura 54: Análisis por Western blot de clusterina en la orina de los diferentes grupos experimentales en D20 (día 20) y M2 (mes dos). Los resultados se expresan como cantidades relativas al control positivo, donde 1 representa el 100% del control positivo (^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$; * $p < 0,05$ vs 5/6 NEF; ** $p < 0,01$ vs 5/6 NEF; *** $p < 0,001$ vs 5/6 NEF). El color de las letras a, b y c indica el grupo experimental con respecto al cual se refiere la significación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

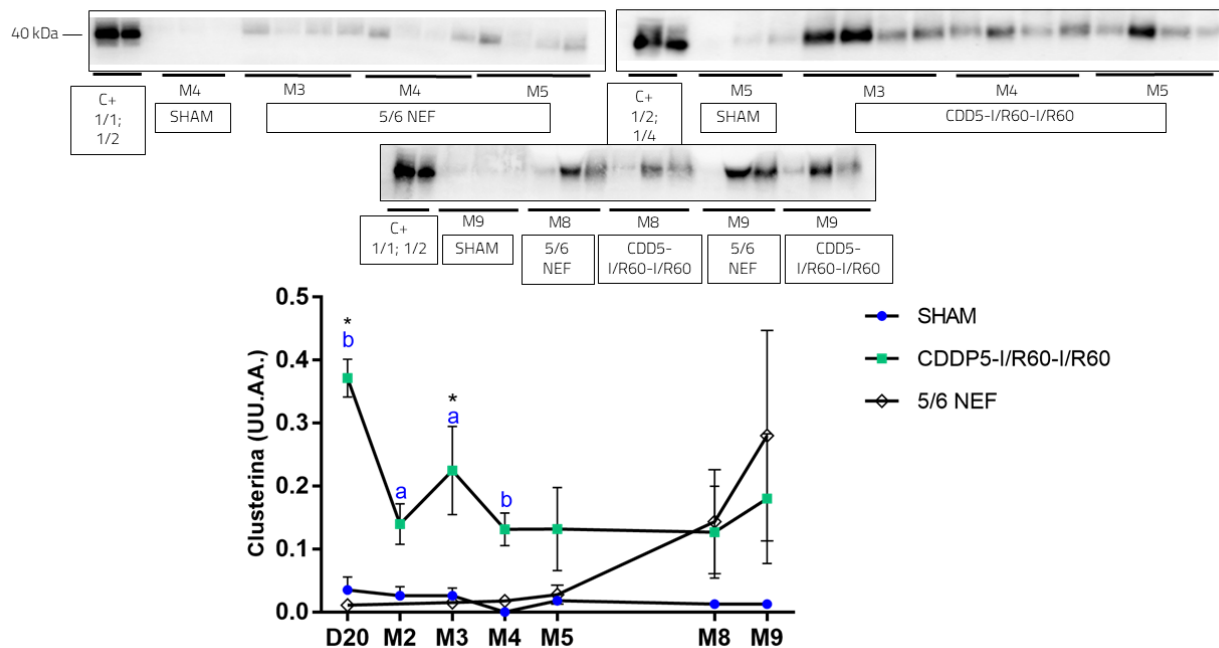


Figura 55: Análisis por Western blot de la evolución de clusterina urinaria a lo largo del estudio (D20= día 20, M= mes). Los resultados se expresan como cantidades relativas al control positivo, donde 1 representa el 100% del control positivo (^a $p < 0,05$ vs SHAM; ^b $p < 0,01$ vs SHAM; ^c $p < 0,001$ vs SHAM; ^{*} $p < 0,05$ vs 5/6 NEF; ^{**} $p < 0,01$ vs 5/6 NEF; ^{***} $p < 0,001$ vs 5/6 NEF).

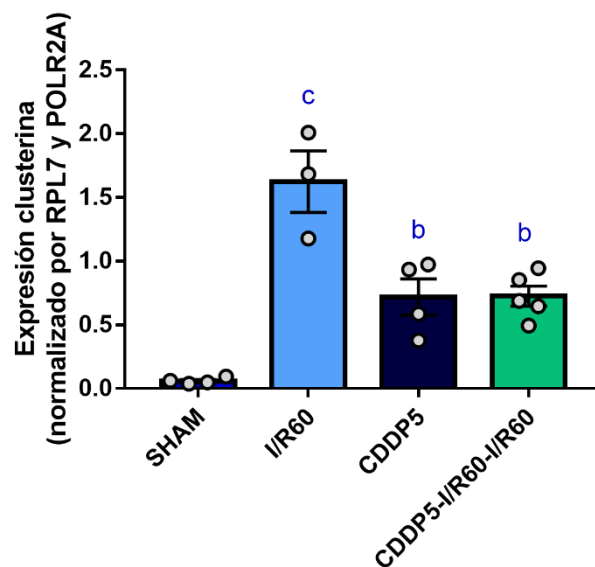


Figura 56: Análisis de la expresión génica de clusterina a nivel renal en el día 20 de estudio (D20). Resultados obtenidos del análisis de riñones izquierdos de animales controles "grupo SHAM", grupos de único daño ("I/R60"; "CDDP5") y de doble daño (hasta aquel punto temporal) "CDDP5-I/R60-I/R60" sacrificados en D20. Resultados normalizados por RPL7 y POLR2A que no presentaron diferencias en su expresión génica en estos grupos (^a $p < 0,05$ vs SHAM; ^b $p < 0,01$ vs SHAM; ^c $p < 0,001$ vs SHAM).

3.4 FETUINA-A

La fetuina-A es una glicoproteína de 52 kDa que en adultos se produce prevalentemente en los hepatocitos y se libera a la sangre. Su nombre viene de la palabra feto, ya que se han encontrado elevadas cantidades de esta proteína en la sangre fetal donde se produce por diferentes órganos. Se han descrito múltiples funciones de esta proteína, entre las cuales encontramos la inhibición de la calcificación extraósea, la implicación en la vía de señalización de la insulina mediante interacción con su receptor y en la inflamación como proteína de fase aguda (Lebreton et al., 1979; Price et al., 2002; Price & Lim, 2003; Stefan et al., 2006).

Se ha observado un incremento de esta proteína en la orina en diferentes condiciones asociadas con un daño renal, como tras un DRA nefrotóxico o isquémico (Zhou et al., 2006), en la progresión de la enfermedad renal poliquística (Piazzon et al., 2015) o en la nefropatía diabética (Inoue et al., 2013). Se ha descrito la presencia de fetuina-A en los túbulos proximales renales, donde entra mediante el sistema de endocitosis mediado por megalina y ejerce una protección contra la nefrocalcinosis (Matsui et al., 2013). En un DRA intrínseco, su incremento en la orina puede ser consecuencia, por un lado, de la reducción en su reabsorción a nivel tubular y, por otro lado, de la muerte de las células tubulares en las que está presente.

Nuestros resultados muestran que en D20, solo en el grupo CDDP5-I/R60-I/R60 se observaron cantidades de fetuina-A en la orina (Figura 57). Sus niveles urinarios se normalizaron en M2 y se mantuvieron bajos hasta M5, aunque se observó un pequeño aumento hasta este mes. En M8 y en M9, la excreción de esta proteína aumentó significativamente. En cuanto al grupo de 5/6 NEF, se observó presencia de fetuina-A en la orina desde M3, y que aumentó progresivamente hasta M8 y M9 (Figura 58). Por tanto, nuestros resultados muestran la utilidad de la fetuina-A en la detección de alteraciones estructurales subclínicas posteriores a múltiples episodios de DRA. Asimismo, los niveles de esta proteína aumentaron progresivamente a lo largo del estudio en ambos modelos de ERC, asociándose al deterioro progresivo del tejido renal observado por histología.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

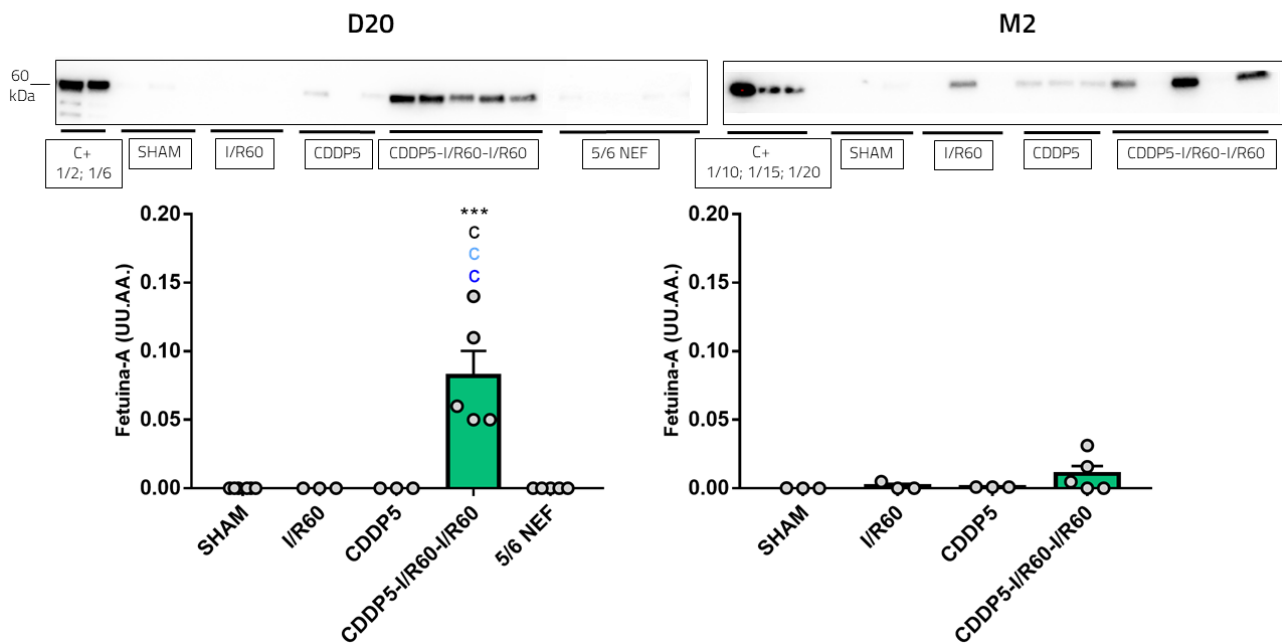


Figura 57: Análisis por Western blot de fetuina-A en la orina de los diferentes grupos experimentales en D20 (día 20) y M2 (mes dos). Los resultados se expresan como cantidades relativas al control positivo, donde 1 representa el 100% del control positivo ($^a p < 0,05$; $^b p < 0,01$; $^c p < 0,001$; $^* p < 0,05$ vs 5/6 NEF; $^{**} p < 0,01$ vs 5/6 NEF; $^{***} p < 0,001$ vs 5/6 NEF). El color de las letras a, b y c indica el grupo experimental con respecto al cual se refiere la significación.

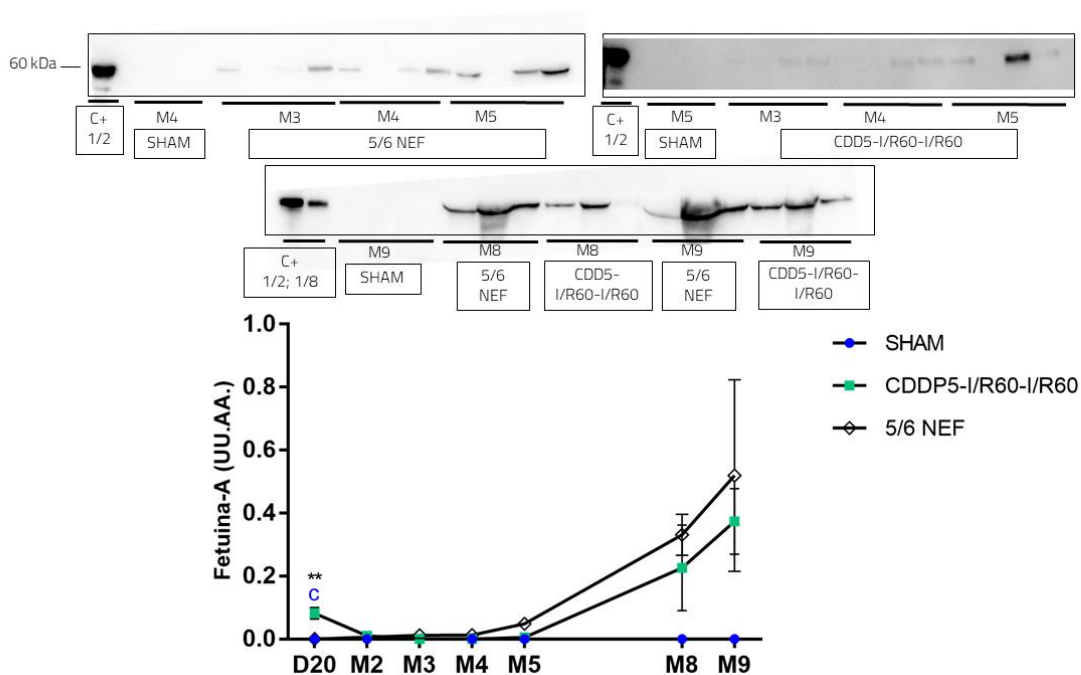


Figura 58: Análisis por Western blot de la evolución de fetuina-A urinaria a lo largo del estudio (D20= día 20, M= mes). Los resultados se expresan como cantidades relativas al control positivo, donde 1 representa el 100% del control positivo ($^a p < 0,05$ vs SHAM; $^b p < 0,01$ vs SHAM; $^c p < 0,001$ vs SHAM; $^* p < 0,05$ vs 5/6 NEF; $^{**} p < 0,01$ vs 5/6 NEF; $^{***} p < 0,001$ vs 5/6 NEF).

3.5 TCP-1-ETA

TCP-1-eta (TCP-1- η) es una chaperona molecular, miembro de las chaperoninas de la familia HSP60 que forma parte del complejo de proteína del TCP-1 (del inglés, *Tailles Complex Polypeptide*). Este complejo está constituido por dos anillos, cada uno de 8 subunidades de 59 kDa (α , β , γ , δ , ϵ , ζ , η , θ) que se unen formando una cavidad, en el interior de la cual se realiza el replegamiento de algunas proteínas que incluyen la actina y la tubulina (Liang et al., 2014). Estudios recientes de nuestro grupo han descrito la TCP-1-eta como marcador urinario de DRA en un modelo animal de nefrotoxicidad por cisplatino, cuyos niveles aumentan como consecuencia de una menor reabsorción a nivel tubular y de una mayor secreción celular (Sancho-Martínez *et al.*, 2020). Asimismo, se ha descrito un incremento de TCP-1-eta en pacientes con DRA y su aplicación en un modelo matemático para predecir la recuperación posterior a un DRA (Blanco-Gozalo et al., 2020).

En las Figuras 59 y 60 se muestran los valores de TCP-1-eta urinarios analizados mediante *Western blot*. En D20 se observó una mayor excreción de TCP-1-eta solo en el grupo CDDP5-I/R60-I/R60. Sus valores se normalizaron en M2 y se mantuvieron bajos hasta M5, cuando se elevó notablemente el TCP-1-eta urinario. En M8 y M9, se observó un aumento consistente de este biomarcador en la orina de estos animales. En grupo 5/6 NEF, no se detectó TCP-1-eta en D20, pero se observó un incremento progresivo de esta proteína en este grupo desde M3 hasta M9. El análisis de la expresión génica de este marcador en D20 no mostró diferencias en su expresión en los diferentes grupos (Figura 61).

Nuestros resultados indican que el TCP-1-eta puede utilizarse como marcador urinario para el seguimiento de pacientes en el periodo posterior a un DRA, para detectar alteraciones eventuales persistentes en los riñones, aunque de forma menos sensible que otros marcadores encontrados en este trabajo, ya que solo apareció en el grupo CDDP5-I/R60-I/R60. Además, el aumento gradual y sensible de los niveles de TCP-1-eta encontrado en el grupo de 5/6 NEF muestra su posible aplicación como marcador de progresión del daño renal.

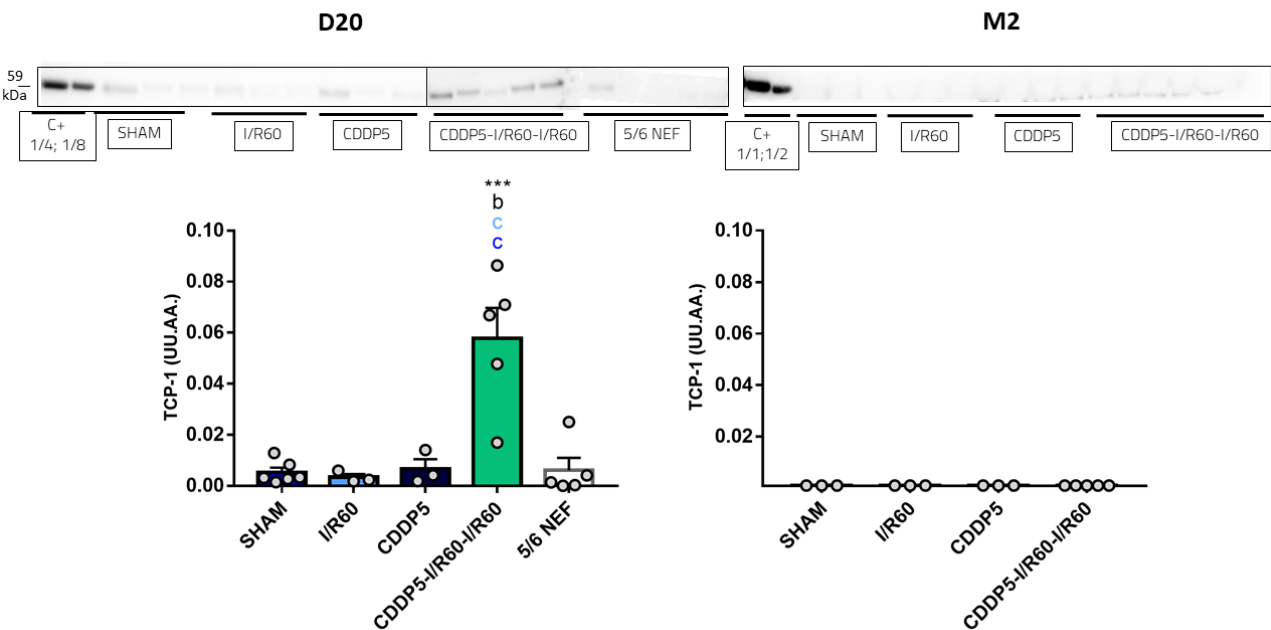


Figura 59: Análisis por Western blot de TCP-1-eta en la orina de los diferentes grupos experimentales en D20 (día 20) y M2 (mes dos). Los resultados se expresan como cantidades relativas al control positivo, donde 1 representa el 100% del control positivo ($^a p < 0,05$; $^b p < 0,01$; $^c p < 0,001$; $^* p < 0,05$ vs 5/6 NEF; $^{**} p < 0,01$ vs 5/6 NEF; $^{***} p < 0,001$ vs 5/6 NEF). El color de las letras a, b y c indica el grupo experimental con respecto al cual se refiere la significación.

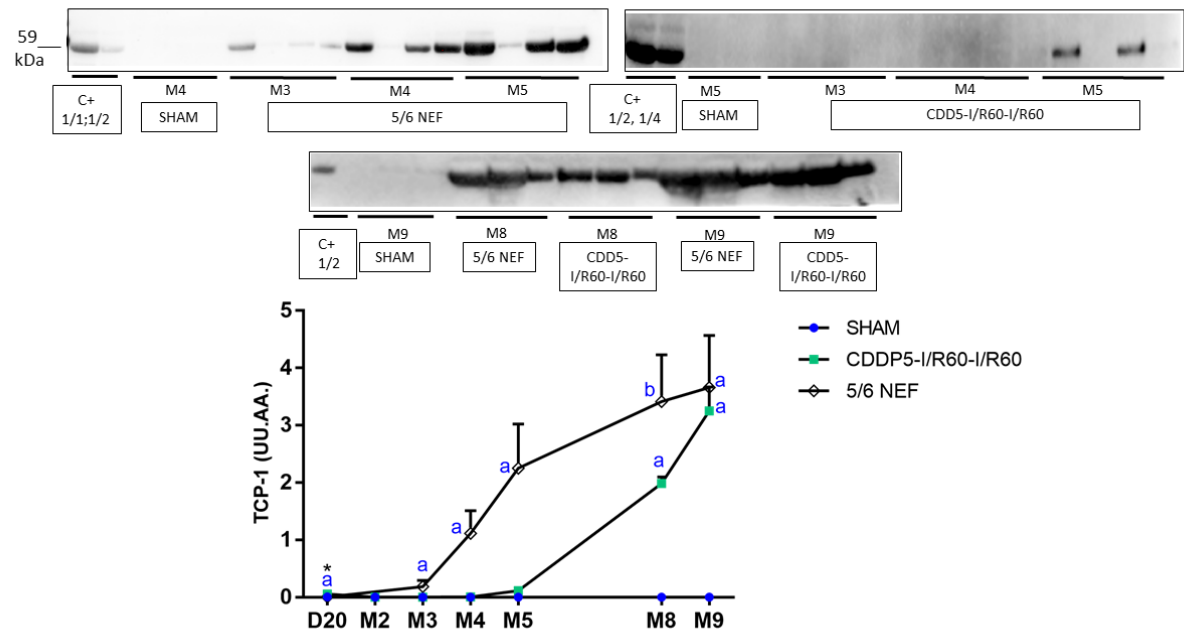


Figura 60: Análisis por Western blot de la evolución de TCP-1-eta urinario a lo largo del estudio (D20= día 20, M= mes). Los resultados se expresan como cantidades relativas al control positivo, donde 1 representa el 100% del control positivo ($^a p < 0,05$ vs SHAM; $^b p < 0,01$ vs SHAM; $^c p < 0,001$ vs SHAM; $^* p < 0,05$ vs 5/6 NEF; $^{**} p < 0,01$ vs 5/6 NEF; $^{***} p < 0,001$ vs 5/6 NEF).

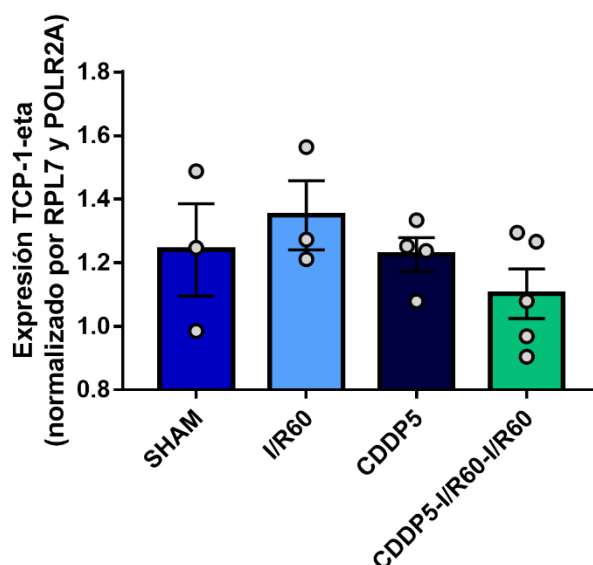


Figura 61: Análisis de la expresión génica de TCP-1 en tejido renal en el día 20 de estudio (D20). Resultados obtenidos del análisis de riñones izquierdos de animales controles "grupo SHAM", grupos de único daño ("I/R60"; "CDDP5") y de doble daño (hasta aquel punto temporal) "CDDP5-I/R60-I/R60" sacrificados en D20. Resultados normalizados por RPL7 y POLR2A que no presentaron diferencias en su expresión génica en estos grupos (^a $p < 0,05$ vs SHAM; ^b $p < 0,01$ vs SHAM; ^c $p < 0,001$ vs SHAM).

3.6 REG-III-B

RegIII-B (del inglés, *regenerating islet-derived protein III β*) es una proteína de 17 kDa, miembro de la superfamilia de lectinas dependientes de calcio, un grupo de pequeñas proteínas secretoras que están implicadas en múltiples respuestas como reactantes de fase aguda en procesos inflamatorios, factores anti-apoptóticos o de crecimiento para las células β pancreáticas y para las células epiteliales del sistema digestivo. Su nombre (Reg, del inglés *regenerating*) describe su importante función en la regeneración tisular en numerosas situaciones patológicas como la pancreatitis, el daño hepático, diabetes y cáncer (M. Zhang et al., 2019; Y.-W. Zhang et al., 2003). También se ha descrito una acción bactericida especialmente contra bacterias Gram negativas (Miki et al., 2012).

Estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio han evidenciado un incremento de RegIII-B urinario tras la administración sostenida del antibiótico nefrotóxico gentamicina en ratas y se ha relacionado con la síntesis renal de esta proteína (Ferreira et al., 2011). Por otro lado, estudios con pacientes han mostrado la utilidad de su homólogo humano (RegIII-A) como marcador urinario de DRA de diferente etiologías (Blanco-Gozalo et al., 2020). Otros estudios de nuestro laboratorio sobre la recuperación posterior a un DRA en un modelo de nefrotoxicidad del cisplatino han mostrado la utilidad de este marcador para monitorizar el proceso de reparación renal (Cuesta Apausa, 2019).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En nuestro trabajo hemos encontrado cantidades muy elevadas de RegIII-B urinario en el grupo CDDP5-I/R60 en el día 20 de estudio (Figura 62). Asimismo, se observó un ligero aumento de la excreción de esta proteína en el grupo CDDP5 y en el 5/6 NEF en este punto de estudio. Desde M2, los valores de esta proteína se normalizaron y no volvieron a aparecer a lo largo del estudio (Figura 63). En la Figura 64 se muestra el análisis de la expresión génica renal de esta proteína en los diferentes grupos experimentales. Se observó un aumento de producción de RegIII-B en todos los grupos de daño, especialmente en los riñones izquierdos (los que han sufrido directamente el daño) en el grupo I/R60.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la presencia de esta proteína en la orina podría relacionarse con un proceso de regeneración renal posterior a un DRA, aunque su ausencia en la orina no se pudo relacionar con una regeneración renal completa, puesto que no se detectaron cantidades de RegIII-B en el modelo de ERC progresiva de 5/6 NEF y tampoco en el modelo de triple daño después del segundo mes de estudio.

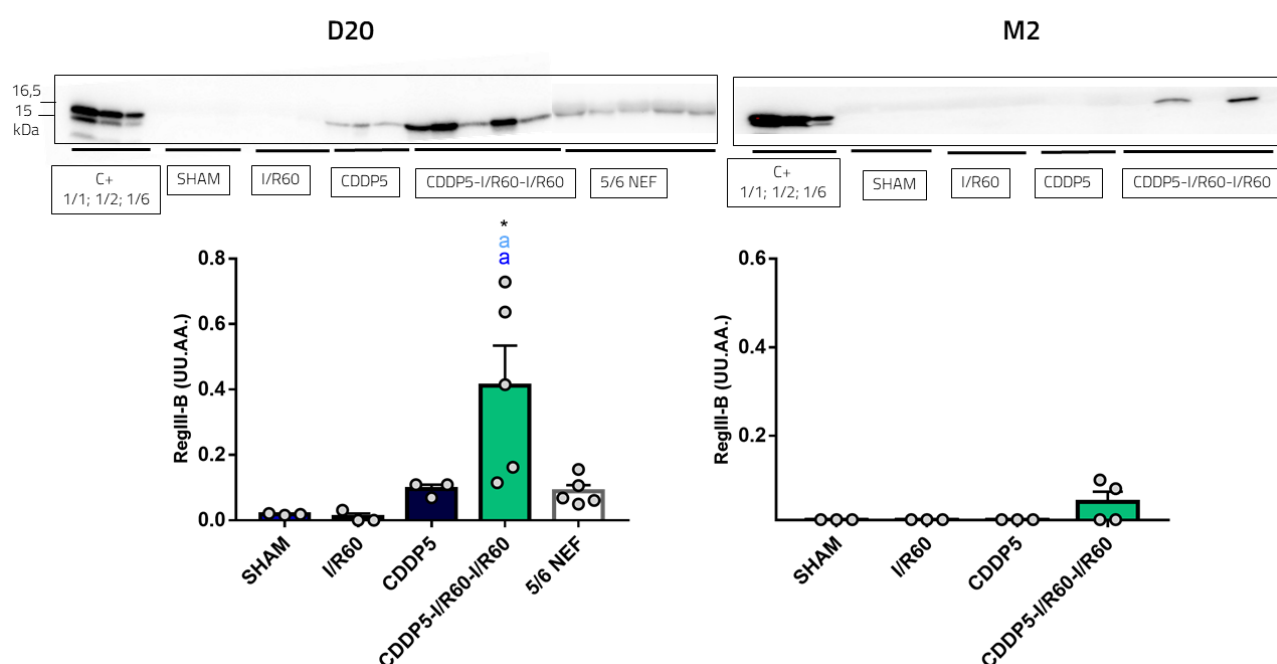


Figura 62: Análisis por Western blot de RegIII-B en la orina de los diferentes grupos experimentales en D20 (día 20) y M2 (mes dos). Los resultados se expresan como cantidades relativas al control positivo, donde 1 representa el 100% del control positivo (^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$; ^{*} $p < 0,05$ vs 5/6 NEF; ^{**} $p < 0,01$ vs 5/6 NEF; ^{***} $p < 0,001$ vs 5/6 NEF). El color de las letras a, b y c indica el grupo experimental con respecto al cual se refiere la significación.

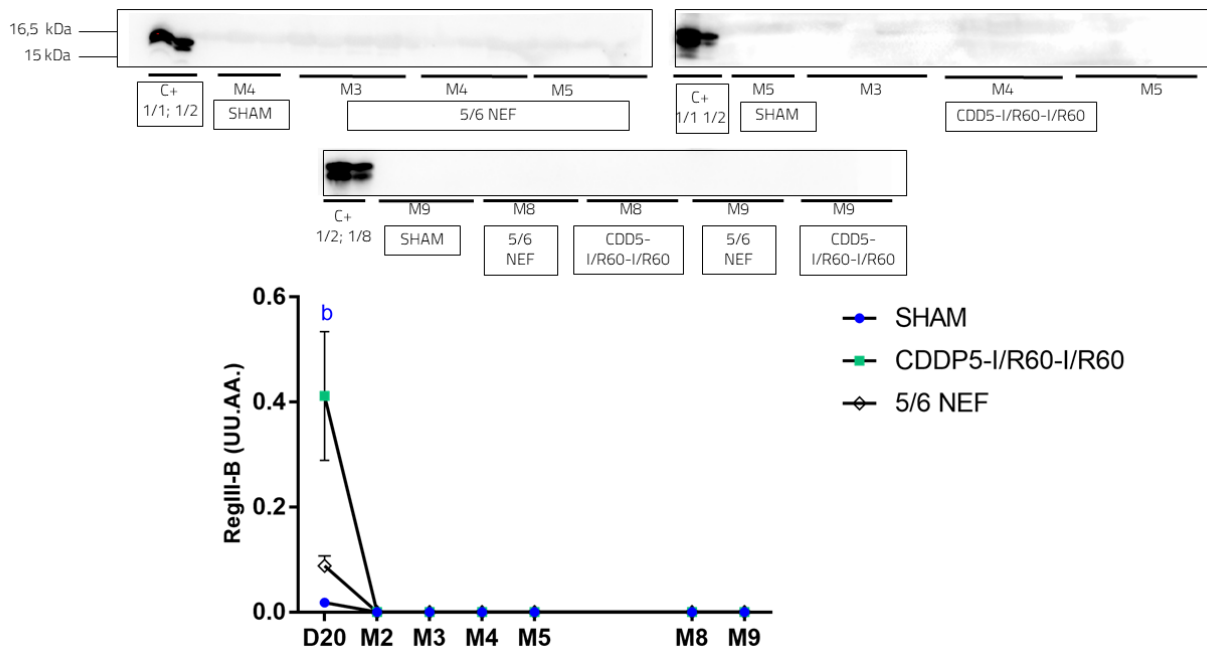


Figura 63: Análisis por Western blot de la evolución de RegIII-B urinario a lo largo del estudio (D20= día 20, M= mes). Los resultados se expresan como cantidades relativas al control positivo, donde 1 representa el 100% del control positivo ($^a p < 0,05$ vs SHAM; $^b p < 0,01$ vs SHAM; $^c p < 0,001$ vs SHAM; $^* p < 0,05$ vs 5/6 NEF; $^{**} p < 0,01$ vs 5/6 NEF; $^{***} p < 0,001$ vs 5/6 NEF).

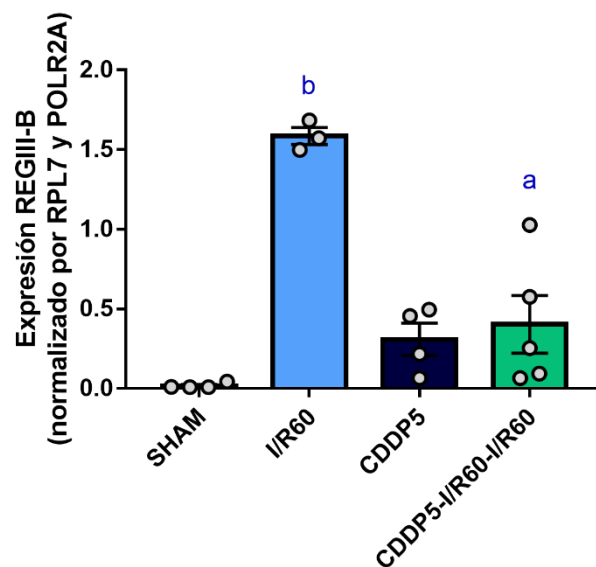


Figura 64: Análisis de la expresión génica de RegIII-B a nivel renal en el día 20 de estudio (D20). Resultados obtenidos del análisis de riñones izquierdos de animales controles "grupo SHAM", grupos de único daño ("I/R60"; "CDDP5") y de doble daño (hasta aquel punto temporal) "CDDP5-I/R60-I/R60" sacrificados en D20. Resultados normalizados por RPL7 y POLR2A que no presentaron diferencias en su expresión génica en estos grupos ($^a p < 0,05$ vs SHAM; $^b p < 0,01$ vs SHAM; $^c p < 0,001$ vs SHAM).

3.7 NGAL

La lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL, del inglés "*neutrophil gelatinase-associated lipocalin*") es una proteína de 25 kDa que pertenece a la familia de las lipocalinas, que fue originariamente aislada de los neutrófilos. Se expresa en riñón, endotelio, corazón, hígado y en diferentes poblaciones celulares del sistema inmunológico como macrófagos y células dendríticas (Buonafine, Martinez-Martinez, et al., 2018). Estudios en ratones han mostrado que en condiciones normales los hepatocitos contribuyen al 25% del nivel basal de NGAL en la sangre y hasta un 90% tras una infección sistémica (M.-J. Xu et al., 2015).

El NGAL presenta propiedades antibacterianas (Nasioudis & Witkin, 2015) y de transportador de hierro (Cairo & Recalcati, 2007; Devireddy et al., 2005; Schmidt-Ott et al., 2006) por su característica de sideróforo. Los efectos producidos por NGAL se realizan a través de dos receptores, 24P3R y megalina, dependiendo del tejido (Buonafine, Martinez-Martinez, et al., 2018). La producción renal de NGAL aumenta rápidamente en modelos animales de daño isquémico o nefrotóxico (Fuchs et al., 2012; Mishra et al., 2003; Sinha et al., 2013; Supavekin et al., 2003) y en pacientes con DRA de múltiple etiología (Kuwabara et al., 2009; Singer et al., 2011; Wagener et al., 2006)(Blanco-Gozalo et al., 2020) y, probablemente, representa un mecanismo protector activado por los riñones (Mishra et al., 2004; Mori et al., 2005; Paragas et al., 2011).

La rapidez y sensibilidad con la que aparece en la orina en DRA lo hacen, quizás, el marcador urinario de DRA más conocido y utilizado (Buonafine, Martinez-Martinez, et al., 2018). Su aumento en la orina tras un daño renal se ha asociado principalmente con una reducción en los mecanismos que regulan su reabsorción tubular, más que con una secreción renal (Sancho-Martínez, Blanco-Gozalo, et al., 2020). Los niveles de NGAL están elevados en pacientes con ERC y en modelos de ratón con ERC y se correlacionan con la gravedad de la lesión renal (Nickolas et al., 2012; Viau et al., 2010) y con su progresión (Wu et al., 2010).

Estudios en ratones han demostrado su posible implicación en favorecer la progresión de la enfermedad renal (Pawar et al., 2012; Viau et al., 2010), posiblemente mediante una actividad proinflamatoria y proliferativa por activación del receptor del factor del crecimiento epidérmico (Viau et al., 2010). También se ha demostrado una actividad profibrótica de NGAL por su unión e inactivación de la metaloproteasa 9 (MMP-9), un potente inhibidor de la síntesis de matriz extracelular (Yan et al., 2001), y por su interacción

con el receptor de los mineralocorticoides (Antoine et al., 2015; Buonafine, Martínez-Martínez, et al., 2018; Buonafine, Martínez-Martínez, et al., 2018; Ernesto et al., 2017).

En la Figura 65 se muestran los resultados obtenidos mediante la técnica de ELISA. Los valores de NGAL urinario en el grupo SHAM se mantuvieron en rango entre 5,6-9,1 $\mu\text{g}/\text{día}$ durante los 9 meses. En D20, se observaron diferencias significativas en la excreción de NGAL en todos los grupos de daño (I/R60, CDDP5; CDDP5-I/R60-I/R60; 5/6 NEF). En los grupos de único daño (I/R60, CDDP5), los valores de NGAL bajaron posteriormente en M1, normalizándose en M2. Sin embargo, se observó una excreción más elevada y sostenida en el tiempo de esta proteína en el grupo de triple daño y en el grupo de 5/6 NEF durante todo el estudio.

El análisis de la expresión génica en D20 (Figura 66) mostró un aumento de su síntesis renal, compatible con el aumento observado por otros estudios en modelos de DRA nefrotóxico o isquémicos, como se ha comentado anteriormente. Nuestros resultados demuestran la utilidad de NGAL como marcador de daño renal para la monitorización del periodo posterior a un DRA, puesto que su excreción urinaria resultó marcadamente aumentada en todos los grupos que habían sufrido algún tipo de daño renal, incluido el grupo de 5/6 NEF. Además, la excreción sostenida en el tiempo de esta proteína en la orina, como ocurre en el modelo de triple daño y en el de 5/6 NEF, podría relacionarse con la no recuperación posterior al daño renal y al establecimiento de una ERC.

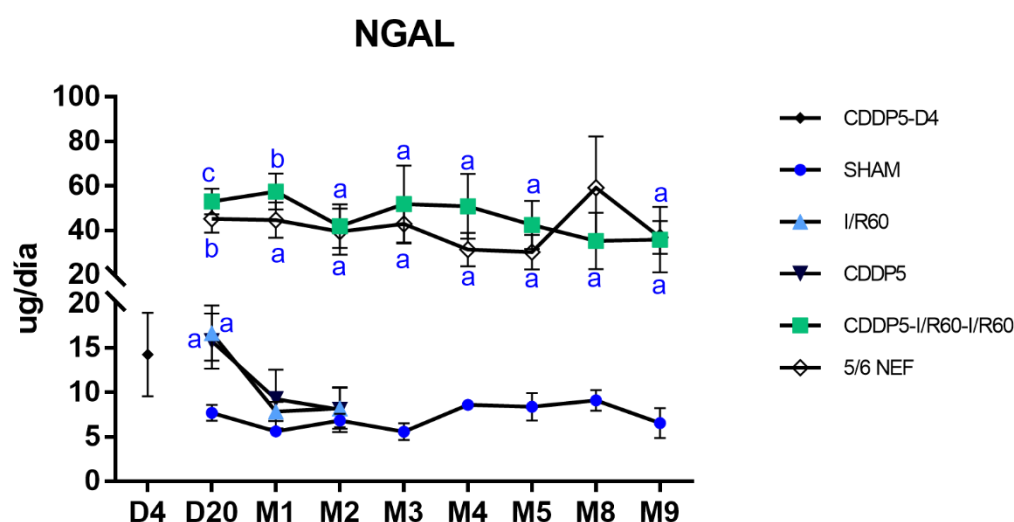


Figura 65: Análisis por ELISA de los niveles urinarios de NGAL ($\mu\text{g}/\text{día}$) durante el periodo de estudio (D4= día 4, D20= día 20, M=mes) en los diferentes grupos experimentales: grupo "SHAM", grupos de único daño ("I/R60", "CDDP5"); grupo de triple daño "CDDP5-I/R60-I/R60"

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

y grupo "5/6NEF". Los valores están expresados como media $\pm$ EEM (^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$; * $p < 0,05$ vs 5/6 NEF; ** $p < 0,01$ vs 5/6 NEF; *** $p < 0,001$ vs 5/6 NEF). El color de las letras a, b y c indica el grupo experimental con respecto al cual se refiere la significación.

	SHAM	I/R60	CDDP5	CDDP5-I/R60-I/R60	5/6 NEF
D20	(9) 7,7 $\pm$ 0,9	(5) 16,7 $\pm$ 3,1	(4) 15,8 $\pm$ 3,1	(5) 53,0 $\pm$ 5,8	(5) 45,2 $\pm$ 6,2
M1	(10) 5,6 $\pm$ 0,64	(5) 7,9 $\pm$ 1,1	(5) 9,2 $\pm$ 3,3	(4) 89,1 $\pm$ 32,2	(5) 44,6 $\pm$ 8,0
M2	(9) 6,8 $\pm$ 0,8	(4) 8,2 $\pm$ 2,3	(5) 8,1 $\pm$ 2,6	(5) 41,8 $\pm$ 9,8	(5) 39,5 $\pm$ 10,4
M3	(4) 5,6 $\pm$ 0,9			(4) 51,7 $\pm$ 17,4	(4) 42,9 $\pm$ 8,9
M4	(4) 8,6 $\pm$ 0,24			(4) 50,8 $\pm$ 14,6	(3) 31,3 $\pm$ 7,5
M5	(4) 8,4 $\pm$ 1,6			(5) 42,4 $\pm$ 10,8	(3) 30,1 $\pm$ 7,8
M8	(4) 9,1 $\pm$ 1,1			(5) 35,3 $\pm$ 12,7	(3) 59,1 $\pm$ 23,1
M9	(4) 6,6 $\pm$ 1,7			(5) 35,7 $\pm$ 14,8	(3) 36,8 $\pm$ 7,3

Tabla 24: Valores en $\mu\text{g}/\text{día}$ de NGAL en los diferentes grupos experimentales. Los datos representan la media $\pm$ EEM. Al lado de cada valor se detalla entre paréntesis el número de animales utilizado (n).

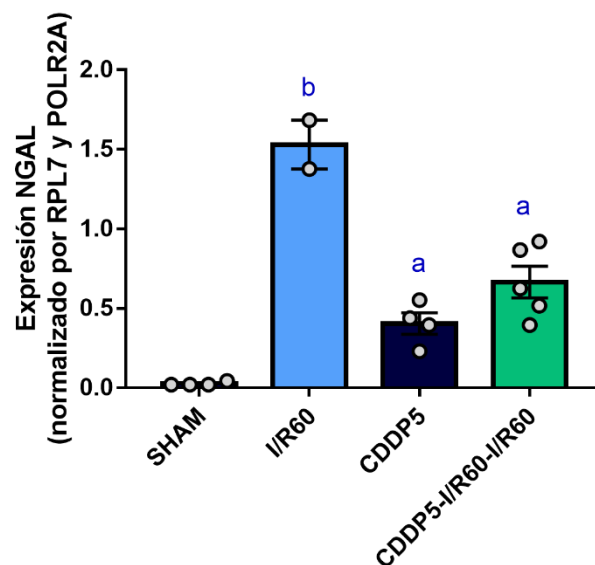


Figura 66: Análisis de la expresión génica de NGAL en tejido renal en el día 20 de estudio (D20). Resultados obtenidos del análisis de riñones izquierdos de animales controles "grupo SHAM", grupos de único daño ("I/R60"; "CDDP5") y de doble daño (hasta aquel punto temporal) "CDDP5-I/R60-I/R60" sacrificados en D20. Resultados normalizados por RPL7 y POLR2A que no presentaron diferencias en su expresión génica en estos grupos (^a $p < 0,05$ vs SHAM; ^b $p < 0,01$ vs SHAM; ^c $p < 0,001$ vs SHAM).

3.8 KIM-1

KIM-1 (del inglés, *kidney injury molecule-1*) es una glicoproteína de membrana tipo 1 que en su forma madura pesa 104 kDa. La porción que aparece en la orina, sin embargo, es solo la porción extracelular de

90 kDa que es liberada tras un corte proteolítico mediado por metaloproteasas (Waanders et al., 2010). En un riñón sano, KIM-1 casi no se puede detectar, pero sí se ha observado su inducción en modelos animales isquémicos (T Ichimura et al., 1998; Vaidya et al., 2006), nefrotóxicos (Takaharu Ichimura et al., 2004) y en otras enfermedades renales (P.-C. Xu et al., 2011).

KIM-1 se ha observado también en biopsias renales de pacientes con necrosis tubular aguda causada por isquemias o tóxicos (Han et al., 2002; Vaidya et al., 2008), en células tubulares adyacentes a células tumorales renales (Han et al., 2005) y se ha relacionado su expresión renal con la presencia de daño intersticial, inflamación, fenotipo tubular dediferenciado y con la cantidad excretada en la orina (M. M. van Timmeren et al., 2007).

KIM-1 confiere a las células epiteliales la capacidad de reconocer y fagocitar células muertas que están presentes en el riñón tras el daño, impidiendo y limitando la obstrucción del lumen tubular. Sin embargo, todavía no se conoce la función de la porción urinaria de KIM-1 y las implicaciones de su presencia a largo plazo en pacientes con ERC (Bonventre, 2009). Recientes estudios han mostrado que KIM-1 puede utilizarse como marcador de progresión en la nefropatía por IgA (Peters et al., 2011; P.-C. Xu et al., 2011) y en la enfermedad renal poliquística (B. R. Griffin et al., 2020). Un importante estudio con ratones transgénicos que expresaban KIM-1 desde el nacimiento, mostró que también en ausencia de cualquier daño renal, la presencia crónica de KIM-1 lleva a la aparición espontánea y progresiva de fibrosis renal en los primeros meses de vida (Humphreys et al., 2013).

Nuestros resultados muestran que en los animales controles los niveles urinarios de KIM-1 se mantuvieron en un rango entre 110-150 ng/día durante todo el periodo de estudio (Figura 67, Tabla 25). En D4, los valores de KIM-1 llegaron hasta un promedio de 1600 ng/día. En D20, se observaron diferencias altamente significativas en la excreción de KIM-1 en los grupos de CDDP5, I/R60 y CDDP5-I/R60-I/R60, con respecto a los controles. En los grupos de único daño (CDDP5; I/R60), los valores de KIM-1 bajaron en M1, hasta normalizarse en M2. Sin embargo, en el grupo CDDP5-I/R60-I/R60, después del tercer daño los valores de KIM-1 aumentaron en M1 y, posteriormente, bajaron en M2, aunque presentando diferencias significativas con respecto al control. En M3 y M4, los valores se mantuvieron ligeramente más elevados con respecto

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

al grupo control, pero sin significación estadística. En los últimos dos meses (M8 y M9), se observaron diferencias significativas en la presencia de KIM-1 en la orina de estos animales.

En el modelo de 5/6 NEF, los valores de KIM-1 se mantuvieron sin diferencias significativas durante todo el estudio, aunque presentando valores más altos en M8 y M9. Estos resultados demuestran la utilidad de KIM-1 como marcador de secuelas posterior a un daño renal intrínseco causado por un agente nefrotóxico o por una isquemia-reperfusión. En concreto, los niveles de estos marcadores en D20 resultaron muy elevados en todos los grupos de daño (CDDP5; I/R60; CDDP5-I/R60-I/R60), aunque hubieran transcurrido 20 días tras el primer daño y 10-12 días tras el segundo daño. El aumento de KIM-1 en M1 posterior al tercer daño en el grupo CDDP5-I/R60-I/R60 refuerza esta hipótesis.

En la Figura 68, se muestra el estudio de la expresión génica de KIM-1 en riñones izquierdos de animales de los diferentes grupos de daño sacrificados en D20. En este día, existe un aumento en la producción renal de KIM-1 en todos los grupos de daño, compatible con sus niveles urinarios. No obstante, la KIM-1 no resultó ser un buen marcador para la progresión de la ERC en nuestro modelo y en el modelo de 5/6 NEF, ya que sus niveles urinarios no aumentaron de forma progresiva en ninguno de los dos modelos, aunque resultaron más altos en M8 y M9 en ambos grupos con respecto al control.

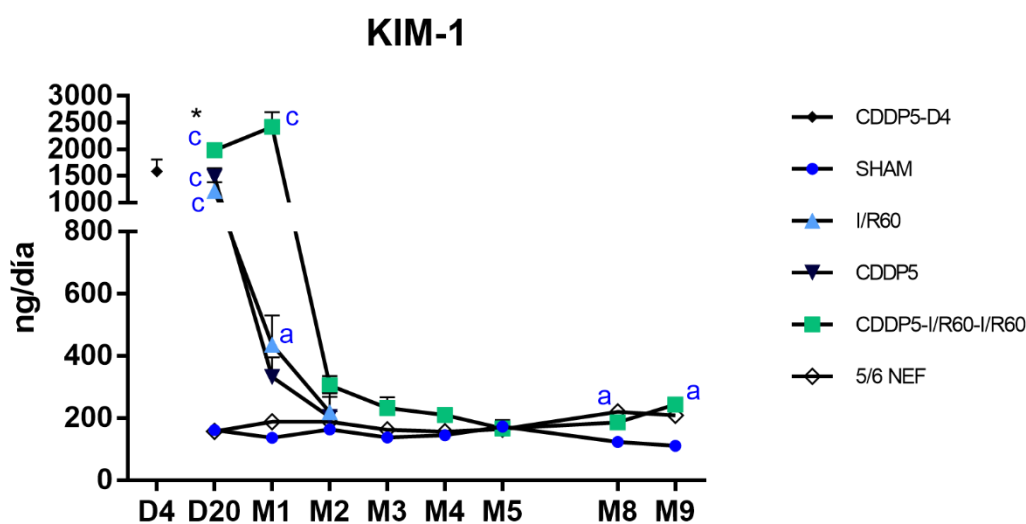


Figura 67: Análisis por ELISA de los niveles urinarios de KIM-1 (ng/día) durante el periodo de estudio (D4= día 4, D20= día 20, M=mes) en los diferentes grupos experimentales: grupo "SHAM", grupos de único daño ("I/R60"; "CDDP5"), grupo de triple daño "CDDP5-I/R60-I/R60" y grupo "5/6NEF". Los valores están expresados como media $\pm$ EEM (^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$; * $p < 0,05$ vs 5/6 NEF; ** $p < 0,01$ vs 5/6 NEF; *** $p < 0,001$ vs 5/6 NEF). El color de las letras a, b y c indica el grupo experimental con respecto al cual se refiere la significación.

	SHAM	I/R60	CDDP5	CDDP5-I/R60-I/R60	5/6 NEF
D20	(8) 146,6 ±11,3	(4) 1219±163,0	(3) 1481±163,2	(5) 1980±130,7	(5) 157,3±20,3
M1	(9) 136,8 ±5,2	(5) 436,3 ±93,9	(4) 332,6±63,8	(5) 2418±279,2	(5) 188,1±16,2
M2	(9) 162,9±12,0	(5) 218,5±49,7	(5) 203,4±76,7	(5) 305,7±30,6	(4) 157,6±19,9
M3	(4) 137,8±24,8			(5) 232,4 ±35,7	(4) 162,0±15,4
M4	(4) 144,5±18,1			(5) 209,7 ±21,5	(4) 155,5±3,8
M5	(4) 172,6±9,0			(5) 166,4±14,6	(5) 164,1±29,4
M8	(4) 122,6±13,7			(5) 186,3±18,3	(3) 220,3±5,0
M9	(4) 110,6±13,0			(5) 243,2±23,3	(3) 208,9±20,8

Tabla 25: Valores en ng/día de KIM-1 urinario en los diferentes grupos experimentales. Los datos representan la media ± EEM. Al lado de cada valor se detalla entre paréntesis el número de animales utilizado (n).

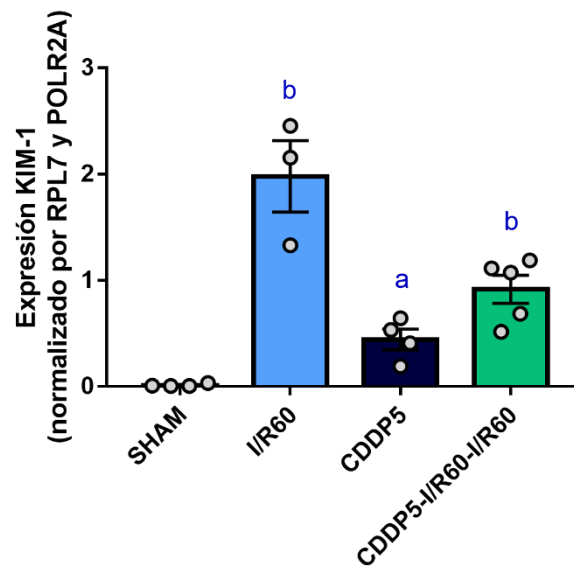


Figura 68: Análisis de la expresión génica de KIM-1 a nivel renal en el día 20 de estudio (D20). Resultados obtenidos del análisis de riñones izquierdos de animales controles "grupo SHAM", grupos de único daño ("I/R60"; "CDDP5") y de doble daño (hasta aquel punto temporal) "CDDP5-I/R60-I/R60" sacrificados en D20. Resultados normalizados por RPL7 y POLR2A que no presentaron diferencias en su expresión génica en estos grupos (^a $p < 0,05$ vs SHAM; ^b $p < 0,01$ vs SHAM; ^c $p < 0,001$ vs SHAM).

3.9 GM2AP

GM2AP (del inglés, *GM2 activator protein*) es una proteína de 18-24 kDa cofactor de la enzima lisosomal β -hexosaminidasa implicada en la reacción de conversión del gangliósido GM2 a GM3 (Meier et al., 1991). Se ha descrito también una función como transportadora de glicolípidos para facilitar sus endocitosis y

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

degradación a nivel lisosomal (Rigat et al., 1997). Alrededor de un tercio del GM2AP producido en las células se secreta y puede captarse nuevamente mediante mecanismos de endocitosis.

Los únicos estudios que existen sobre su aplicación como marcador urinario de DRA han sido realizados por nuestro grupo de investigación (Blanco-Gozalo et al., 2020; Quiros et al., 2010). En estos estudios, se muestra la utilidad de la GM2AP como marcador de daño subclínico en un modelo de nefrotoxicidad por gentamicina (Quiros et al., 2010) y como marcador de recuperación de DRA en pacientes (Blanco-Gozalo et al., 2020). Su incremento en la orina se debe probablemente a una alteración en la reabsorción tubular, mediada por un mecanismo de endocitosis mediado a su vez por clatrina (Quiros et al., 2010). Por último, un reciente estudio ha descrito su posible aplicación como marcador urinario en el cáncer de pulmón (Potprommanee et al., 2015).

En D20, el único grupo en el que se detectó la banda de 24 kDa fue el grupo CDDP5-I/R60-I/R60 (Figura 69). Se encontraron, además, diferencias significativas en la cantidad de GM2AP (banda 22 kDa) en los grupos CDDP5-I/R60-I/R60 y 5/6 NEF con respecto al grupo SHAM. En M2 (Figura 70), no se encontraron diferencias significativas en la excreción de GM2AP (banda 22 kDa) y, desde este punto, solo se detectó la banda de 22 kDa. Desde M3 hasta M9, se observaron diferencias en la excreción de GM2AP en el grupo 5/6 NEF (significativas solo en M5) con respecto al grupo control. Sin embargo, solo se observaron pequeñas diferencias en la excreción de GM2AP en el grupo CDDP5-I/R60-I/R60 en M8 y M9 sin significación estadística (Figura 71).

El análisis por qPCR de la expresión renal de esta proteína mostró un aumento significativo en la producción de esta proteína exclusivamente en el grupo que había sufrido dos daños hasta aquel momento (grupo "CDDP5-I/R60-I/R60") (Figura 72). Nuestros resultados ponen de manifiesto la posible aplicación de GM2AP como biomarcador de secuelas estructurales renales posteriores a un DRA. Sin embargo, GM2AP no parece ser un buen marcador de ERC y, sobre todo, de progresión del daño renal, puesto que su concentración no mostró un incremento progresivo en el tiempo y solo se detectaron pequeñas diferencias con respecto al grupo control.

D20

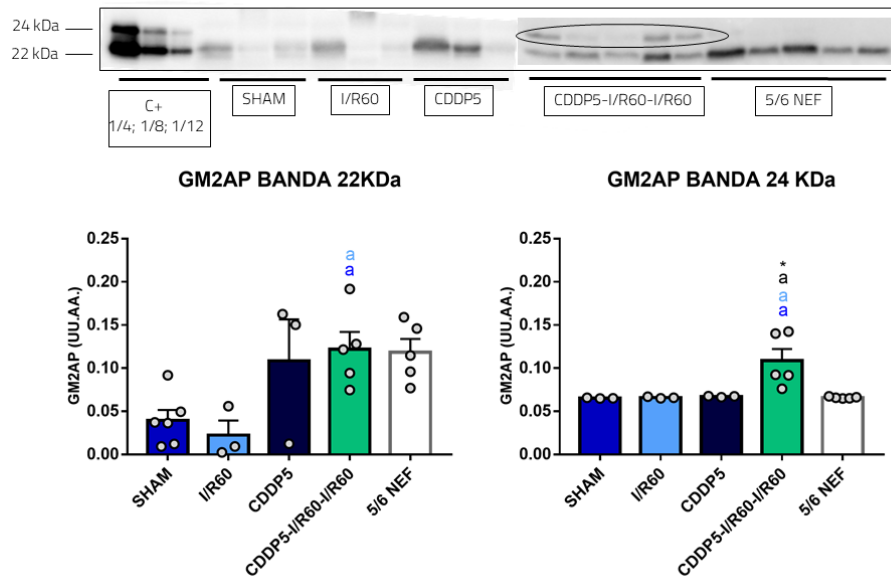


Figura 69: Análisis por Western blot de GM2AP en la orina de los diferentes grupos experimentales en D20 (día 20). Los resultados se expresan como cantidades relativas al control positivo, donde 1 representa el 100% del control positivo (^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$; ^{*} $p < 0,05$ vs 5/6 NEF; ^{**} $p < 0,01$ vs 5/6 NEF; ^{***} $p < 0,001$ vs 5/6 NEF). El color de las letras a, b y c indica el grupo experimental con respecto al cual se refiere la significación.

M2

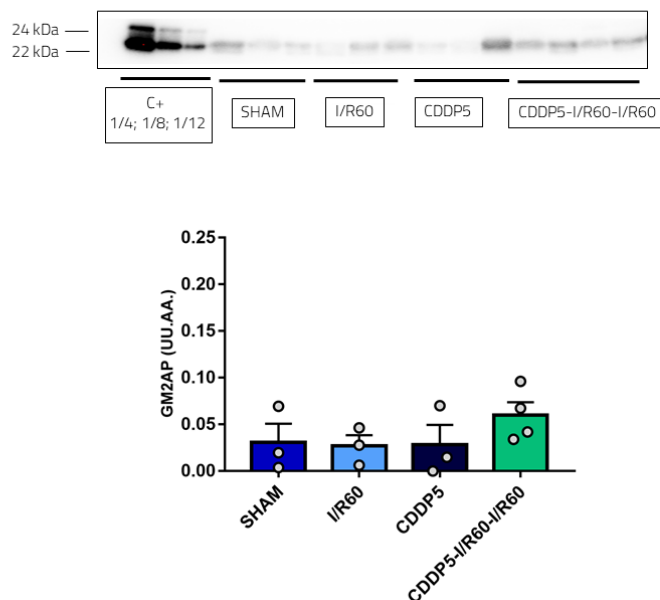


Figura 70: Análisis por Western blot de GM2AP en la orina de los diferentes grupos experimentales en M2 (mes 2). Los resultados se expresan como cantidades relativas al control positivo, donde 1 representa el 100% del control positivo (^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$). El color de las letras a, b y c indica el grupo experimental con respecto al cual se refiere la significación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

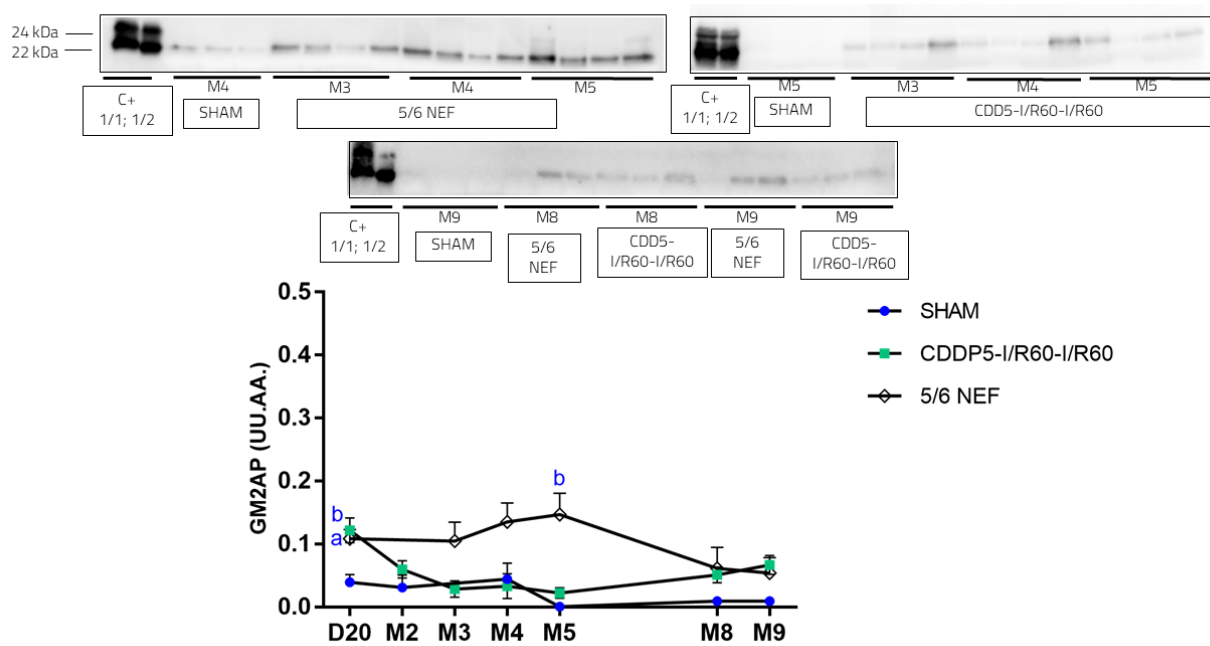


Figura 71: Análisis por Western blot de la evolución de GM2AP urinario a lo largo del estudio (D20= día 20, M= mes). Los resultados se expresan como cantidades relativas al control positivo, donde 1 representa el 100% del control positivo (^a $p < 0,05$ vs SHAM; ^b $p < 0,01$ vs SHAM; ^c $p < 0,001$ vs SHAM; ^{*} $p < 0,05$ vs 5/6 NEF; ^{**} $p < 0,01$ vs 5/6 NEF; ^{***} $p < 0,001$ vs 5/6 NEF).

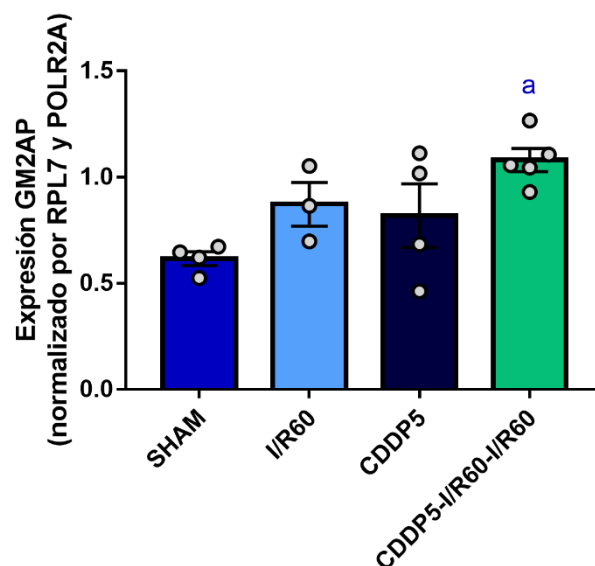


Figura 72: Análisis de la expresión génica de GM2AP en tejido renal en el día 20 de estudio (D20). Resultados obtenidos del análisis de riñones izquierdos de animales controles "grupo SHAM", grupos de único daño ("I/R60"; "CDDP5") y de doble daño (hasta aquel punto temporal) "CDDP5-I/R60-I/R60" sacrificados en D20. Resultados normalizados por RPL7 y POLR2A que no presentaron diferencias en su expresión génica en estos grupos (^a $p < 0,05$ vs SHAM; ^b $p < 0,01$ vs SHAM; ^c $p < 0,001$ vs SHAM).

3.10 TIMP-2 e IGFBP-7

TIMP-2 (del inglés, *tissue inhibitor of metalloproteinases*) e IGFBP-7 (del inglés, *insuline-like factor binding protein-7*) son dos marcadores de DRA descubiertos recientemente. Ambas proteínas detienen el ciclo celular en la fase G1, un mecanismo común en caso de DRA (Kashani et al., 2013). Recientemente, se ha desarrollado una prueba llamada "NephroCheck" que ha sido aprobada por la FDA (del inglés, *Food and Drug Administration*) para ser comercializada y se basa en medir el producto de la concentración de ambas proteínas en la orina, para identificar pacientes con elevado riesgo de desarrollar un DRA o para establecer su recuperación (Dewitte et al., 2015; Fan et al., 2019; Kashani et al., 2013; Meersch et al., 2014).

En la Figura 73 y Tabla 24 se observan los valores urinarios de IGFBP-7. En los animales del grupo control, no se detectó una cantidad relevante de IGFBP-7 urinario durante todo el periodo de estudio. En D4, tras la administración de cisplatino, los valores de IGFBP-7 subieron hasta ≈ 20 ng/día. En los grupos de I/R60 y CDDP5, no se observaron diferencias en la excreción de IGFBP-7 con respecto al control en el periodo de estudio. Sin embargo, se observaron diferencias altamente significativas en la excreción de IGFBP-7 en el grupo de CDDP5-I/R60-I/R60 en D20 y en M1 que sucesivamente bajaron en M2 y se mantuvieron sin diferencias significativas durante todo el estudio, aunque se observó un aumento en M8 y M9. En el modelo 5/6 NEF, los valores de IGFBP-7 se mantuvieron sin diferencias significativas durante todo el estudio.

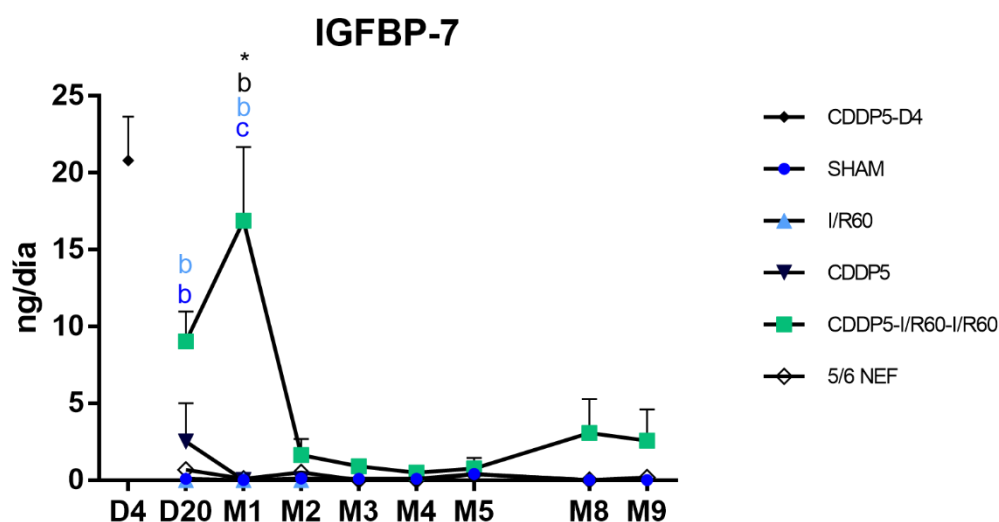


Figura 73: Análisis por ELISA de los niveles urinarios de IGFBP-7 (ng/día) durante el periodo de estudio (D4= día 4, D20= día 20, M=mes) en los diferentes grupos experimentales: grupo "SHAM", grupos de único daño ("I/R60"; "CDDP5"), grupo de triple daño "CDDP5-I/R60-I/R60" y grupo "5/6NEF". Los valores están expresados como media $\pm$ EEM ($^a p < 0,05$; $^b p < 0,01$; $^c p < 0,001$; $^* p < 0,05$ vs 5/6 NEF; $^{**} p < 0,01$ vs 5/6 NEF; $^{***} p < 0,001$ vs 5/6 NEF). El color de las letras a, b y c indica el grupo experimental con respecto al cual se refiere la significación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

	SHAM	I/R60	CDDP5	CDDP5-I/R60-I/R60	5-6 NEF
D20	(7) 0,09±0,09	(5) 0,0±0,0	(4) 2,51±2,51	(5) 9,0±1,95	(4) 0,7±0,25
M1	(8) 0,0±0,0	(5) 0,0±0,0	(5) 0,0±0,0	(5) 16,89±4,8	(5) 0,09±0,09
M2	(5) 0,0±0,0	(5) 0,0±0,0	(5) 0,0±0,0	(5) 1,63±1,04	(4) 0,5±0,33
M3	(6) 0,19±0,13			(5) 0,9±0,5	(4) 0,0±0,0
M4	(4) 0,09±0,09			(5) 0,50±0,36	(4) 0,0±0,0
M5	(4) 0,4±0,27			(5) 0,77±0,7	(4) 0,39±0,23
M8	(3) 0,0±0,0			(5) 3,1±2,2	(3) 0,0±0,0
M9	(3) 0,0±0,0			(5) 2,6±2,0	(3) 0,18±0,18

Tabla 26: Valores en ng/día de IGFBP-7 urinario en los diferentes grupos experimentales. Los datos representan la media ± EEM. Al lado de cada valor se detalla entre paréntesis el número de animales utilizado (n).

Los valores de TIMP-2 urinario (Figura 74) en D20 resultan aumentados en los grupos de único daño (CDDP5; I/R60) y CDDP5-I/R60-I/R60 con respecto a los controles y al grupo 5/6 NEF. Posteriormente, la concentración de TIMP-2 urinario en los grupos CDDP5 y I/R60 bajó progresivamente hasta M2, aunque presentando valores más altos con respecto a los controles. En el grupo de triple daño, los valores de TIMP-2 aumentaron en M1, tras la aplicación del tercer daño, y luego bajaron en M2 manteniéndose en niveles constantemente más elevados con respecto al grupo control hasta M9. En el grupo 5/6 NEF, los niveles de TIMP-2 aumentaron gradualmente desde M1 hasta M9.

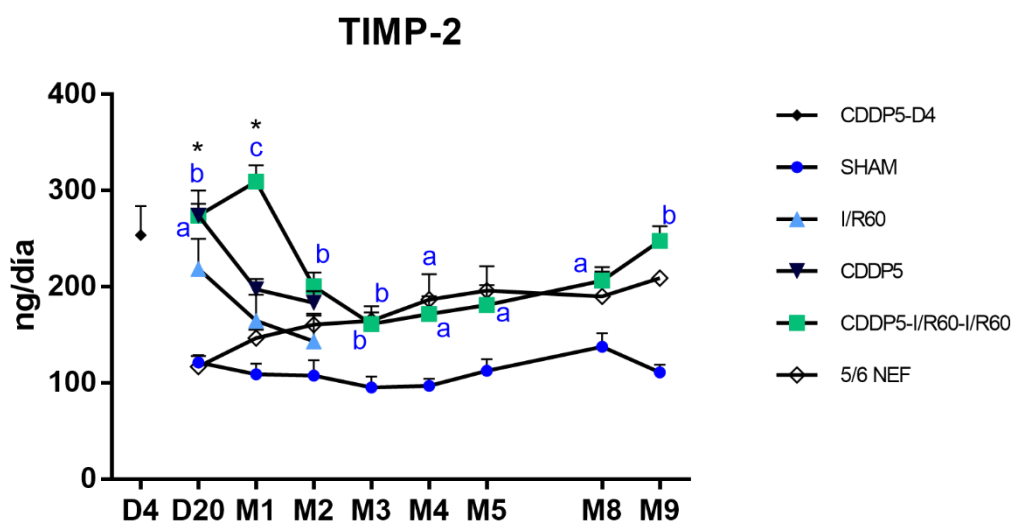


Figura 74: Análisis por ELISA de los niveles urinarios de TIMP-2 (ng/día) durante el periodo de estudio (D4= día 4, D20= día 20, M=mes) en los diferentes grupos experimentales: grupo "SHAM", grupos de único daño ("I/R60"; "CDDP5"), grupo de triple daño "CDDP5-I/R60-I/R60" y grupo "5/6NEF". Los valores están expresados como media ± EEM (^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$; * $p < 0,05$ vs 5/6 NEF; ** $p < 0,01$ vs 5/6 NEF; *** $p < 0,001$ vs 5/6 NEF). El color de las letras a, b y c indica el grupo experimental con respecto al cual se refiere la significación.

	SHAM	I/R60	CDDP5	CDDP5-I/R60-I/R60	5/6 NEF
D20	(8) 121,2±7,5	(5)218,6±31,1	(4) 273,8±12,42	(12) 273,9±26,06	(5) 116,8±11,0
M1	(9) 108,9±11,1	(5)164,5±27,1	(5) 197,3±10,8	(11) 309,3 ±17,3	(4) 146,6±8,7
M2	(9) 107,5±15,9	(5)143,3±28,9	(5) 183,2±12,0	(12) 200,3±14,57	(5) 160,6±9,4
M3	(5) 95,16±11,26			(6) 161,3±12,3	(5) 164,3±15,3
M4	(5) 97,0±7,6			(6) 171,6±18,3	(5) 186,6±26,5
M5	(4) 112,5±11,9			(5) 180,7±20,9	(4) 195,8±25,4
M8	(3) 137,6±14,24			(5)206,1 ±14,0	(3) 189,8±25,6
M9	(4)110,8 ±8,1			(5) 247,6±15,5	(3) 208,9±3,9

Tabla 27: Valores en ng/día de TIMP-2 urinario en los diferentes grupos experimentales. Los datos representan la media ± EEM. Al lado de cada valor se detalla entre paréntesis el número de animales utilizado (n).

Estos resultados muestran la utilidad de IGFBP-7 y de TIMP-2 como marcadores de secuelas renales tras un DRA. La TIMP-2 parece ser un marcador más sensible en detectar el daño con respecto a IGFBP-7, ya que desde D20 hasta M2 resultó más elevado en todos los grupos de DRA y se mantuvo alterado en los grupos de triple daño y de 5/6NEF durante todo el estudio. La mayor sensibilidad de TIMP-2 con respecto a IGFBP-7 encontrada en este trabajo podría también deberse a una diferencia de sensibilidad en el Kit de ELISA utilizado. De la misma manera que NGAL y clusterina, sus niveles permanecieron alterados tras el último daño, asociándose con el establecimiento de la ERC en estos animales.

En la Figura 75 se observan los resultados del análisis de la expresión génica de IGFBP-7 y TIMP-2 en D20 en los diferentes grupos de daño renal. No se observó ninguna diferencia en la expresión génica de IGFBP-7 con respecto al grupo SHAM y solo se observaron muy pequeñas diferencias en la expresión de TIMP-2 en los grupos de CDDP5, I/R60, y CDDP5-I/R60-I/R60 (pequeñas en comparación con el aumento que se observó en otros marcadores como NGAL, KIM-1, etc.). Estos resultados serían compatibles con los estudios de Johnson y Zager, que en modelos de DRA no observaron ningún aumento de la expresión génica y atribuyeron el aumento en la orina a la menor reabsorción tubular y a la pérdida de las células tubulares dañadas (A. C. M. Johnson & Zager, 2018).

Por otro lado, es importante destacar que el aumento de la expresión génica de una proteína a nivel renal tampoco indicaría de forma segura que represente la causa del aumento de su concentración en la orina (como ocurre por ejemplo con el marcador NGAL (Sancho-Martínez, Blanco-Gozalo, et al., 2020). En

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

conclusión, nuestros resultados demuestran la utilidad de TIMP-2 y IGFBP-7 como marcadores de secuelas posteriores a un daño renal y para la monitorización del periodo posterior a un DRA.

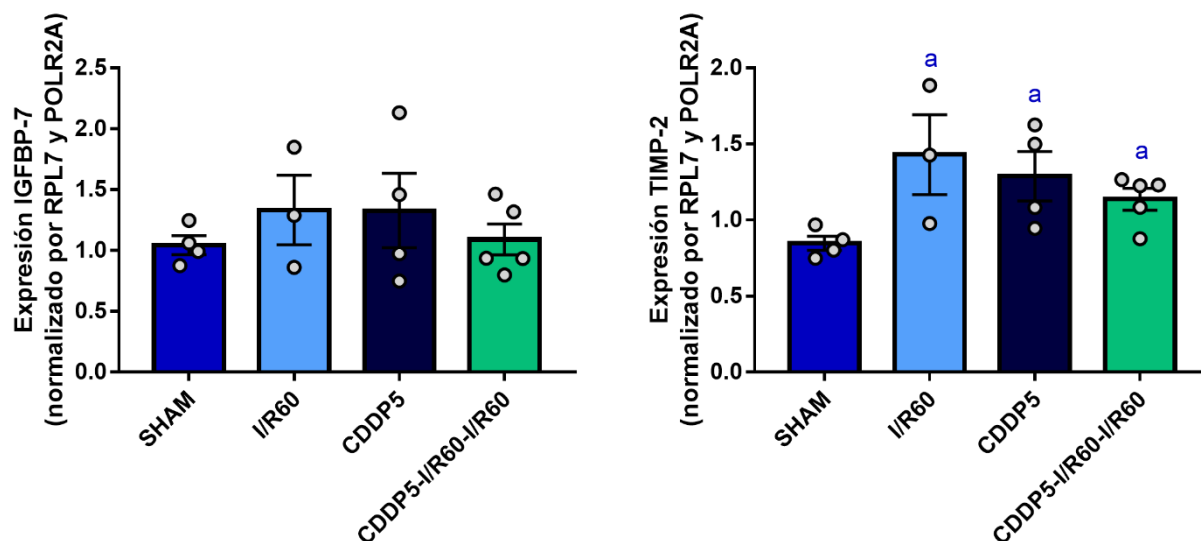


Figura 75: Análisis de la expresión génica de IGFBP-7 y TIMP-2 en tejido renal en el día 20 de estudio (D20). Resultados obtenidos del análisis de riñones izquierdos de animales controles "grupo SHAM", grupos de único daño ("I/R60"; "CDDP5") y de doble daño (hasta este punto temporal) "CDDP5-I/R60-I/R60" sacrificados en D20. Resultados normalizados por RPL7 y POLR2A que no presentaron diferencias en su expresión génica en estos grupos (^a $p < 0,05$ vs SHAM; ^b $p < 0,01$ vs SHAM; ^c $p < 0,001$ vs SHAM).

3.11 RBP4

RBP4 (del inglés, *retinol binding protein*) es una proteína de 21 kDa, sintetizada en el hígado y responsable del transporte de vitamina A desde el hígado hasta los otros órganos (Vaidya et al., 2008). Se ha descrito su utilidad como marcador urinario de DRA (Bonventre et al., 2010; Vaidya et al., 2008), de recuperación del DRA (Gonzalez-Calero et al., 2016) y de progresión de ERC (Tsai et al., 2020). Un aumento de sus niveles urinarios es una consecuencia directa de la existencia de un daño tubular más que glomerular, ya que en condiciones normales esta proteína se filtra libremente en los glomérulos y más del 99% es reabsorbida por los túbulos renales (Norden et al., 2014).

En los animales controles, los valores se mantuvieron entre 1 y 1,7 ng/día durante todo el estudio (Figura 76 y Tabla 28). En D4, los niveles subieron vertiginosamente hasta ≈ 30 ng/día. No se observaron diferencias en la concentración de RBP4 en los grupos de CDD5 y I/R60 en D20, M1 y M2. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en la excreción de RBP4 en D20 y en M1 en el grupo de triple daño

hasta M2, cuando los valores resultaron similares a los controles. Desde M2 hasta M5 no se mostraron diferencias. No obstante, se observó un aumento en los valores de RBP4 en los puntos finales del estudio. En el grupo de 5/6 NEF, los valores de RBP4 se mantuvieron sin diferencias relevantes con respecto al grupo control hasta M5, y de forma análoga al grupo de triple daño, resultaron significativamente más altos en M8 y M9.

Nuestros resultados demuestran la utilidad de RBP4 para detectar alteraciones a nivel renal, aunque con menor sensibilidad con respecto a otros marcadores mencionados en este trabajo, ya que los niveles de RBP4 resultaron normales en los grupos CDDP5 e I/R60. La ausencia de alteraciones en los niveles urinarios de RBP4 hasta M5, podría indicar que la función tubular en estos animales (y los mecanismos de reabsorción) todavía consigue realizar su función, hasta un determinado punto, en el que el nivel de daño es lo suficientemente grande para generar aumentos en sus niveles. En nuestro estudio, RBP4 no parece ser un marcador temprano de progresión de ERC.

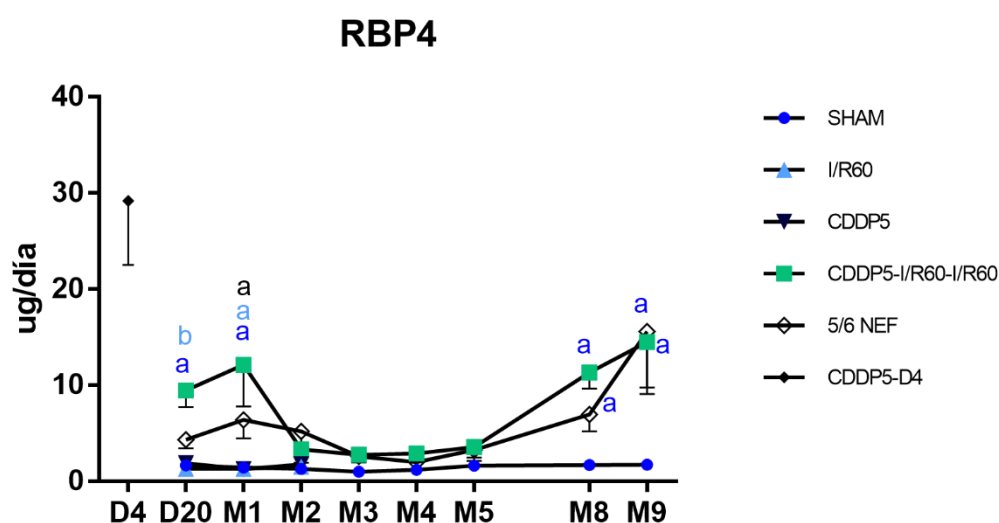


Figura 76: Análisis por ELISA de los niveles urinarios de RBP4 (ug/día) durante el periodo de estudio (D4= día 4, D20= día 20, M=mes) en los diferentes grupos experimentales: grupo "SHAM", grupos de único daño ("I/R60"; "CDDP5"), grupo de triple daño "CDDP5-I/R60-I/R60" y grupo "5/6NEF". Los valores están expresados como media $\pm$ EEM (^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$; * $p < 0,05$ vs 5/6 NEF; ** $p < 0,01$ vs 5/6 NEF; *** $p < 0,001$ vs 5/6 NEF). El color de las letras a, b y c indica el grupo experimental con respecto al cual se refiere la significación.

	SHAM	I/R60	CDDP5	CDDP5-I/R60-I/R60	5-6 NEF
D20	(5) 1,6 $\pm$ 0,2	(5) 1,3 $\pm$ 0,3	(4) 1,9 $\pm$ 0,5	(6) 9,4 $\pm$ 1,7	(5) 4,3 $\pm$ 0,9
M1	(5) 1,4 $\pm$ 0,2	(5) 1,3 $\pm$ 0,3	(5) 1,2 $\pm$ 0,3	(6) 12,1 $\pm$ 4,3	(4) 6,4 $\pm$ 1,9
M2	(5) 1,3 $\pm$ 0,2	(5) 1,5 $\pm$ 0,3	(5) 1,7 $\pm$ 0,6	(6) 3,3 $\pm$ 1,4	(4) 4,8 $\pm$ 1,3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

M3	(5) 1,0±0,1	(6) 2,8±0,8	(4) 2,6±0,3
M4	(5) 1,2±0,1	(6) 2,9±0,8	(4) 2,0±0,4
M5	(4) 1,6±0,1	(4) 3,5±1,1	(3) 3,2±1,1
M8	(4) 1,7 ±0,3	(4) 11,3±1,7	(3) 6,9±1,8
M9	(4) 1,7±0,3	(3) 14,5±4,7	(3) 15,6±6,5

Tabla 28: Valores en ug/día de RBP4 urinario en los diferentes grupos experimentales. Los datos representan la media ± EEM. Al lado de cada valor se detalla entre paréntesis el número de animales utilizado (n).



**DISCUSIÓN
FINAL**

DISCUSIÓN FINAL

Los resultados obtenidos en este trabajo ponen de manifiesto la importante conexión entre el DRA y la ERC y la utilidad potencial del análisis de biomarcadores urinarios para la prevención de la ERC y su seguimiento.

En los últimos años, el periodo posterior a un DRA ha suscitado gran interés, ya que numerosos estudios observacionales han mostrado que en este periodo existe un aumento en el riesgo de re-hospitalización por otro DRA y de progresión a ERC, independientemente de otros factores de riesgo como la hipertensión y la edad (Chawla et al., 2014; Fiorentino et al., 2018; K. D. Liu et al., 2019; Macedo & Mehta, 2019; Sawhney et al., 2017). La prevención de la ERC resulta de importancia crucial, ya que su progresión tiene un fuerte impacto socioeconómico y se relaciona con eventos adversos como enfermedades cardiovasculares, desarrollo de ESRD y aumento de mortalidad (Chen et al., 2019).

En este trabajo, se ha relacionado la incidencia del DRA con un peor pronóstico y con el desarrollo de ERC. Para ello, se ha generado un modelo animal en el que la transición a ERC se verificó tras la inducción de tres DRA espaciados temporalmente. Antes del último daño, los animales presentaron una función renal aparentemente normal según los parámetros clínicos, habiendo recuperado dos veces sus valores normales de CrP y CICr tras la aplicación de los dos primeros daños. Sin embargo, la excreción de diferentes biomarcadores urinarios se asoció a la presencia de secuelas, imposibles de detectar mediante la CrP y el CICr. El análisis histológico evidenció la presencia de alteraciones estructurales, tales como infiltración de células inflamatorias, necrosis, depósito de material hialino en el lumen tubular, desorganización epitelial, pérdida del borde en cepillo y dilatación tubular.

Tras un DRA se ponen en marcha unos mecanismos de reparación que, dependiendo de la intensidad del daño, consiguen reparar total o parcialmente la estructura renal (Chawla et al., 2017; J. A. Kellum et al., 2017; MacEdo & Mehta, 2016). En el caso en que el daño sea recuperable, los procesos de reparación tardan un tiempo pese a la normalización previa de la CrP y del CICr (Cuesta Apausa, 2019). Esto se debe a que estos parámetros solo se alteran cuando el daño estructural es muy grande y a que los riñones son capaces de aumentar su funcionalidad y de enmascarar la presencia de daño mediante su reserva funcional

(De Nicola et al., 1994; Ronco & Rosner, 2012; Sharma et al., 2014). Las anomalías estructurales renales presentes durante esta fase contribuyen a generar un mayor riesgo de sufrir otro episodio de DRA y a que los mecanismos de reparación sean menos eficaces, incrementando de esta manera el riesgo de no recuperación y de transición a ERC (K. D. Liu et al., 2019; Macedo & Mehta, 2019).

Nuestro modelo experimental reproduce una situación semejante donde el desarrollo de la ERC se produjo tras la exposición a un daño en un momento en el que existían alteraciones subclínicas. En estas condiciones, el balance entre el daño y la reparación ante el mismo apuntó hacia el primero, dando lugar a su cronificación y al establecimiento de una ERC caracterizada por la alteración irreversible en todos los parámetros funcionales (CrP, urea, ClCr, proteinuria).

El estudio de biomarcadores urinarios cuatro días antes de la inducción del último daño (D20), permitió la identificación de una huella de biomarcadores (KIM-1, NGAL, fetuina-A, TCP-1-eta, TIMP-2, IGFBP-7, RBP4, RegIII-B y GM2AP) (Figura 77) que, en conjunto, se asoció a la recuperación deficiente del DRA y al posterior desarrollo de ERC en estos animales. Entre estos marcadores, algunos (clusterina, KIM-1, NGAL, TIMP-2) mostraron mayor sensibilidad en la detección del daño subclínico, ya que su excreción aumentó también en los grupos de animales de un solo daño (CDDP5, I/R60), en los que el análisis histológico mostró la presencia de alteraciones más leves con respecto al grupo de doble daño.

Nuestros resultados ponen de manifiesto cómo la utilización de biomarcadores urinarios para el seguimiento del periodo posterior a un DRA podría constituir una herramienta de gran importancia clínica, que podría limitar los riesgos de un diagnóstico incorrecto de recuperación. En estos pacientes, la excreción sostenida de estos marcadores se asociaría a una recuperación incompleta y a un mayor riesgo de progresión a ERC. La interpretación de la huella de biomarcadores excretados mediante un algoritmo informático permitiría calcular este riesgo e implementar medidas preventivas, como evitar la administración de medicamentos u otros compuestos nefrotóxicos o intervenciones quirúrgicas con riesgo de isquemia renal.

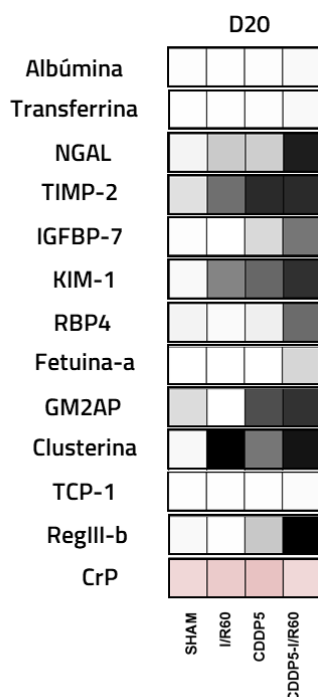


Figura 77: Biomarcadores urinarios de secuelas subclínicas posteriores al DRA. Se muestra un rango de valores de excreción de los marcadores (color blanco = mínima cantidad excretada, color negro = máxima cantidad excretada) en los animales controles "SHAM", en los grupos de un solo daño ("CDDP5"; "I/R60") y de doble daño ("CDDP5-I/R60") en el día 20 (D20). El rango de valores de excreción mínimo y máximo de los marcadores urinarios se ha calculado en todos los grupos experimentales en función de la excreción mínima y máxima que presentó cada marcador desde el día 20 hasta el noveno mes de estudio (grupos: "SHAM", "I/R60", "CDDP5", "CDDP5-I/R60", "CDDP5-I/R60-I/R60", "5/6 NEF"). En la parte inferior del panel se representa la creatinina plasmática (CrP) en una escala entre 0,36 mg/dl (color blanco) y 1,5 mg/dl (color rojo).

Otros resultados relevantes que se han encontrado en el presente trabajo corresponden a la evolución de la fibrosis y a su relación con la progresión de la ERC. En el modelo de 5/6 NEF observamos un deterioro funcional progresivo en términos de CrP, CICr y proteinuria desde el tercer mes de estudio acompañado por un aumento gradual de fibrosis renal. Estos resultados están de acuerdo con otros estudios que han descrito los mecanismos implicados en ambos procesos. Entre estos, encontramos la hipertrofia glomerular compensatoria y la hipertensión en los capilares glomerulares (Fogo, 2007; Hostetter et al., 1981; Ma & Fogo, 2003; Modlinger et al., 2004; Shimamura & Morrison, 1975; Yoshida et al., 1989), la activación del sistema renina-angiotensina, la nefritis intersticial crónica producida por el aumento de filtración de proteínas unidas a moléculas proinflamatorias y el aumento de secreción de factores proinflamatorios por parte de los túbulos dañados (Kamiyama et al., 2013; Ruiz-Ortega et al., 2006; Zeng et al., 2016) (Fogo, 2007). Además, este modelo es un modelo de hipertensión (Gava et al., 2012; K. A.

Griffin et al., 2004) y la hipertensión se considera uno de los factores claves en la progresión de la enfermedad renal (Ku et al., 2019).

Por otro lado, en el modelo de triple daño encontramos diferencias importantes con respecto al modelo anterior. El análisis histológico realizado aproximadamente un mes después del último DRA (es decir, en M2) puso de manifiesto la existencia de un grado ya muy alto y generalizado de fibrosis renal que, además, siguió aumentando y siempre se mantuvo superior al del grupo de 5/6 NEF hasta el sexto mes de estudio. Asimismo, también en este grupo observamos una acumulación progresiva hasta el noveno y último punto de estudio, en el que la mayoría del tejido renal había sido reemplazado por matriz extracelular, y casi no existían regiones normales.

Un resultado un tanto sorprendente fue que la gran cantidad de fibrosis y degeneración tisular renal ya presente desde el segundo mes en el grupo "CDDP5-I/R60-I/R60" no se asoció a un temprano deterioro funcional, como ocurrió en el modelo de 5/6 NEF ya que los parámetros funcionales se mantuvieron prácticamente estables durante un largo periodo de tiempo (entre el segundo y el sexto mes). Estos resultados podrían deberse a la existencia de un mayor grado de reserva funcional renal y de nefronas activas en nuestro modelo con respecto al modelo de 5/6 NEF.

Los modelos animales de fibrosis renal utilizados en la actualidad están basados principalmente en la administración de sustancias químicas tóxicas de forma repetida (Fu et al., 2018; Landau et al., 2019; B. J. Lim et al., 2014; Nogueira et al., 2017; H.-C. Yang et al., 2010) o en manipulaciones quirúrgicas, como el modelo de obstrucción ureteral unilateral (UUO, del inglés *Unilateral Ureteral Obstruction*), los modelos de isquemia- reperusión (isquemias bilaterales o unilaterales seguidas por nefrectomía al cabo de un tiempo) (Guan et al., 2019; Le Clef et al., 2016; Polichnowski et al., 2020) y el de reducción de 5/6 de masa renal (B. J. Lim et al., 2014; Tan et al., 2019; H.-C. Yang et al., 2010). A diferencia de otros modelos, el que hemos desarrollado nosotros reproduce el desarrollo de enfermedad renal crónica (filtración permanentemente disminuida) y fibrosis progresiva, a partir de la concatenación de diferentes daños renales agudos. Así, nuestro modelo reproduce unas condiciones más semejantes a la clínica y presenta unas características ideales para ser empleado en futuras investigaciones relacionadas con este proceso como por ejemplo

DISCUSIÓN FINAL

para la búsqueda de nuevos tratamientos para limitar su progresión y de biomarcadores urinarios relacionados.

Otros resultados importantes encontrados en este trabajo se refieren al estudio de los biomarcadores urinarios de secuelas renales en la monitorización de la ERC. En la Figura 78, se resume la evolución en el tiempo de los diferentes biomarcadores urinarios en los dos modelos de ERC estudiados en este trabajo ("CDDP5-I/R60-I/R60" y "5/6 NEF"). Los marcadores presentaron unas trayectorias diferentes entre sí que podría relacionarse con diferentes procesos fisiopatológicos.

De forma general, podemos agrupar el comportamiento de los biomarcadores urinarios en tres categorías:

- Marcadores que mostraron un aumento progresivo en el tiempo en ambos modelos: entre estos encontramos la albúmina, la transferrina, TIMP-2, TCP-1 y RBP-4, fetuina-A, TCP-1-eta. Todos estos marcadores presentaron un aumento de su excreción que se asoció a la progresión de la ERC, aunque mostrando trayectorias diferentes entre sí (algunos aumentaron antes, otros más tarde).
- Marcadores que aparecieron crónicamente alterados en ambos modelos: entre éstos encontramos principalmente NGAL, TIMP-2 y GM2AP (este último en menor grado). Su excreción se asoció a la presencia de alteraciones crónicas y permanentes en ambos modelos de ERC.
- Marcadores de secuelas agudas: entre éstos encontramos KIM-1, RegIII-B y IGFBP-7. Los tres marcadores se normalizaron después del segundo mes de estudio y se mantuvieron inalterados hasta el final. Estos marcadores estuvieron ausentes en el modelo de 5/6 NEF y podrían asociarse a procesos relacionados con la necrosis tubular aguda causada por agentes nefrotóxicos o isquémicos o con la fase de regeneración posterior al DRA.

La clusterina no está incluida en estas tres categorías ya que resultó crónicamente alterada solo en el modelo de triple daño mientras que en el grupo de 5/6 NEF apareció más tardíamente y aumentó progresivamente hasta el final.

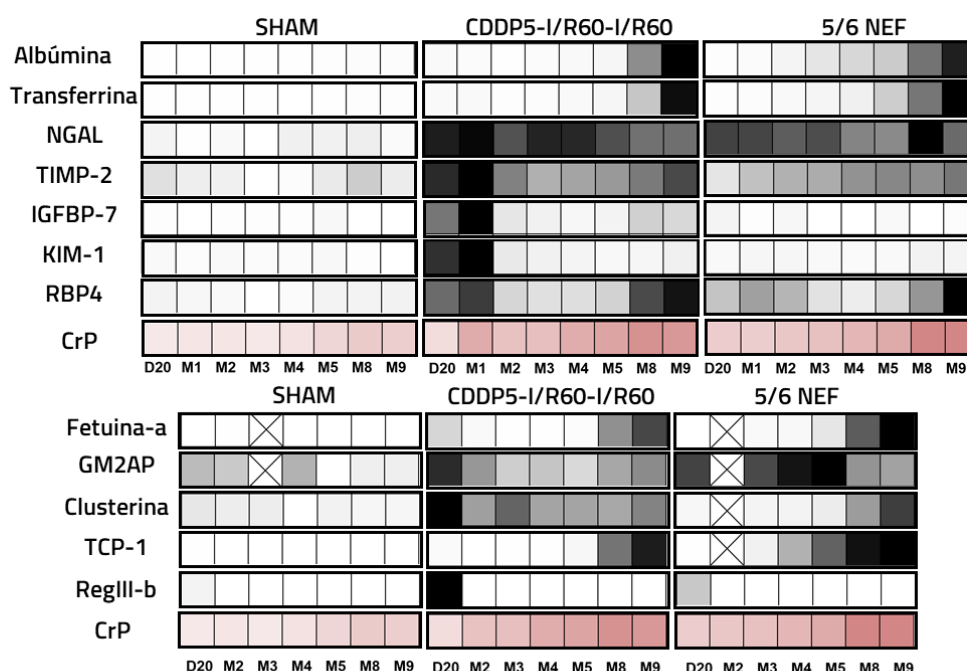


Figura 78: Evolución en el tiempo de los diferentes biomarcadores. Se muestra el rango de valores de excreción de los marcadores (color blanco = mínima cantidad excretada, color negro = máxima cantidad excretada) en los animales controles "SHAM", en el grupo de triple daño ("CDDP5-I/R60-I/R60") y en el grupo de 5/6 de reducción de masa renal ("5/6 NEF"). El rango de valores de excreción mínimo y máximo de los marcadores urinarios se ha calculado en todos los grupos experimentales en función de la excreción mínima y máxima que presentó cada marcador desde el día 20 hasta el noveno mes de estudio (grupos: "SHAM", "I/R60", "CDDP5", "CDDP5-I/R60", "CDDP5-I/R60-I/R60", "5/6 NEF"). En la parte inferior del panel se representa la creatinina plasmática (CrP) en una escala entre 0,36 mg/dl (color blanco) y 1,5 mg/dl (color rojo). La X indica la ausencia de datos.

El enfoque utilizado en este trabajo mediante la caracterización de los dos modelos de ERC desde el punto de vista funcional (CrP, ClCr, urea, proteinuria), histológico y mediante el análisis de la excreción de diferentes biomarcadores urinarios también ha puesto de manifiesto otros aspectos interesantes. En primer lugar, el grado de deterioro progresivo del tejido renal observado por histología en ambos modelos (pérdida de nefronas, aumento de glomeruloesclerosis y de atrofia tubular, aumento de fibrosis) ha evidenciado las limitaciones importantes de los parámetros funcionales en su monitorización y sobre todo en la estimación de la cantidad de daño presente. Por un lado, no observamos un marcado deterioro del ClCr en el modelo de triple daño. Por otra parte, aunque la CrP aumentó ligeramente y de forma gradual desde el segundo mes de estudio en ambos modelos, sus valores absolutos pasaron de un promedio de 0,6 mg/dl (en ambos grupos) a un promedio de 0,8 mg/dl y 0,9 mg/dl en los grupos de triple daño y de 5/6

DISCUSIÓN FINAL

NEF respectivamente que no proporcionan una estimación realista de la cantidad de daño presente en estos riñones (los valores de CrP normales en ratas pueden variar de 0,3 hasta 0,7 mg/dl).

Nuestro estudio también ha identificado algunos marcadores (albúmina, transferrina, fetuin-A, TCP-1-eta) cuya evolución mostró una tendencia semejante a la del deterioro progresivo renal observado por histología. La excreción de estos marcadores aumentó a lo largo del estudio y llegó a presentar en los meses finales unos valores muy superiores a los encontrados en los meses anteriores, incluidos los valores que se asociaron a las secuelas subclínicas (día 20) y los valores del primer mes (es decir, seis días tras la aplicación del último daño). En cuanto a la albuminuria y la transferrina urinaria, sus valores aumentaron desde el comienzo del estudio (es decir, en el día 20) en el grupo de 5/6 NEF y desde el segundo mes en el grupo de triple daño y llegaron, en algunos casos a valores más de 100 veces superior a los normales, proporcionando una estimación más realista de la cantidad de daño presente en este punto respecto a la proporcionada por CrP y ClCr.

La albuminuria es un parámetro utilizado en la clínica junto a la CrP en la monitorización de la ERC (Alicic et al., 2017; Kelly et al., 2019; Andrew S Levey et al., 2020; Tsuprykov et al., 2016). En condiciones normales una cantidad significativa de albúmina se filtra a través de la barrera de filtración glomerular, pero la inmensa mayoría se reabsorbe en el túbulo renal (Lazzara & Deen, 2007; Tojo & Endou, 1992). Algunos autores han asociado el aumento progresivo de albuminuria con un daño glomerular progresivo y con la pérdida de selectividad en la barrera de filtración glomerular (Fogo, 2007). Otros autores sugieren que el aumento de la albuminuria en las fases más tempranas de la progresión es más una consecuencia de las alteraciones tubulares y de los mecanismos de reabsorción tubular que de una pérdida de selectividad en la barrera de filtración glomerular (López-Novoa et al., 2011; Thomas et al., 2005; Thomson et al., 2004).

La evolución de los marcadores de progresión observada en ambos modelos podría deberse, por un lado, a una pérdida progresiva de selectividad en la barrera de filtración glomerular a la que, por otra parte, podría sumarse (simultáneamente o en momentos diferentes) el efecto producido por una disfunción tubular. Por otra parte, la evolución en el tiempo observada en los otros marcadores urinarios podría informar sobre fenómenos patológicos distintos. Por ejemplo, el marcador NGAL presentó una evolución algo sorprendente. Sus niveles aparecieron crónicamente alterados y se mantuvieron constante en ambos

modelos (CDDP5-I/R60-I/R60 y 5/6 NEF) sin mostrar un aumento en los puntos finales. Teniendo en cuenta que el principal mecanismo descrito a la base del aumento de NGAL en la orina es la disminución en la reabsorción tubular (Sancho-Martínez, Blanco-Gozalo, et al., 2020), sorprende no observar un aumento de este marcador en el tiempo.

Este resultado podría indicar que los niveles urinarios de NGAL podrían asociarse a fenómenos de disfunción tubular diferentes. Así, distintos fenómenos patológicos actualmente englobados en el término ambiguo de “daño tubular” podrían diferenciarse mediante marcadores específicos. Este mayor grado de especificidad diagnóstica podría tener un impacto clínico en el futuro, ya que permitiría asociar fenómenos más precisos a la evolución de la enfermedad y al pronóstico.

Por ello, será necesario realizar nuevos estudios para profundizar en los mecanismos fisiopatológicos responsables de la evolución de la excreción urinaria mostrada por los biomarcadores urinarios identificados en este estudio. En definitiva, en este trabajo se ha generado un modelo experimental de transición de DRA a ERC que ha relacionado la incidencia de exposición a episodios de DRA con un peor pronóstico de recuperación y con el desarrollo de ERC. Este modelo podrá ser empleado para diferentes propósitos como estudios de prevención de la ERC o con procesos relacionados con la fibrosis renal. En perspectiva, el análisis inteligente de la huella de marcadores urinarios podría permitir monitorizar las secuelas subclínicas del DRA, el riesgo de progresión a ERC y la evolución de la enfermedad con mayor precisión. Para esto último, es necesario seguir avanzando en el conocimiento del significado fisiopatológico de la excreción de cada uno de los marcadores urinarios.



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- Hemos generado un modelo animal de ERC provocada por episodios repetidos de DRA, que reproduce la conexión etiopatológica entre ambos síndromes demostrada por los estudios epidemiológicos. Este modelo servirá para investigar los mecanismos fisiopatológicos de la progresión de la enfermedad renal aguda a la crónica, y desarrollar métodos diagnósticos y tratamientos preventivos.
- Existe una huella de marcadores urinarios formada por los niveles de albúmina, clusterina, transferrina, KIM-1, NGAL, fetuina-A, TCP-1-eta, TIMP-2, IGFBP-7, RBP4, RegIII-B y GM2AP que, en conjunto, se asocia a una recuperación deficiente del DRA y a mayor riesgo de desarrollo de ERC en la rata.
- Asimismo, la permanencia de niveles urinarios elevados de NGAL, TIMP-2, y clusterina se asocia a la cronificación del daño renal causada por episodios repetidos de DRA.

CONCLUSIONS

- We have generated an animal model of CKD caused by repeated episodes of AKI, which reproduces the etiopathological connection between both syndromes demonstrated by epidemiological studies. This model might be useful to investigate the pathophysiological mechanisms of the progression of acute to chronic kidney disease, and to develop diagnostic methods and preventive treatments.
- A urinary marker fingerprint formed by the levels of albumin, clusterin, transferrin, KIM-1, NGAL, fetuin-A, TCP-1-eta, TIMP-2, IGFBP-7, RBP4, RegIII-B and GM2AP that, in the whole, is associated with poor recovery from AKI and with an increased risk of developing CKD in rats.
- Likewise, the permanence of elevated urinary levels of NGAL, TIMP-2 and clusterin is associated with the chronification of renal damage caused by repeated episodes of AKI.

SUMMARY



SUMMARY

SUMMARY

INTRODUCTION

Acute kidney injury (AKI) is a complex syndrome defined by a rapid increase in serum creatinine (sCr), decrease in urine output, or both (Ronco et al., 2019). AKI represents a global health problem that is independently associated with a high risk of mortality as well as with a high expenditure in healthcare systems (Coca et al., 2009; Fortrie et al., 2019). AKI incidence is growing annually worldwide (Malhotra et al., 2019; Xue et al., 2006), probably due to an increase in risk factors for AKI such as advanced age, diabetes mellitus, hypertension, etc. (Chawla et al., 2014; Siew & Davenport, 2015). AKI complicates more than 20% of acute care hospital admissions (Malhotra et al., 2019; Susantitaphong et al., 2013) and up to 50% of admissions to the intensive care unit (ICU) (Hoste et al., 2015).

In critically ill patients (4–6% of AKI patients), renal replacement therapy (RRT) is required and mortality in these patients can reach 60–70% (Brochard et al., 2010; Uchino, 2006; Uchino et al., 2005). Of those patients with AKI who receive RRT and survive, 5–30% require longer term dialysis (Susantitaphong et al., 2005). Even patients who do not require dialysis are at risk of several other poor outcomes in the long term. Patients discharged after AKI are at risk of rehospitalization for a new AKI episode (K. D. Liu et al., 2019) and each episode increases the risk of progressive deterioration of renal function (Macedo & Mehta, 2019).

Several studies have shown that AKI leads to development of chronic kidney disease (CKD), the progression of existing CKD, an increased long-term risk of end-stage renal disease, and excess mortality (Chawla & Kimmel, 2012; Coca et al., 2012). The link between AKI and CKD is underlined by the fact that the risk for CKD in patients who have suffered a previous AKI is increased, regardless of the presence of other risk factors, such as diabetes and hypertension, and is also directly related to the severity and frequency of AKI episodes (Chawla et al., 2014). Other adverse outcomes associated with AKI include cardiovascular disease (Odutayo et al., 2017), stroke (Hansen et al., 2013) and sepsis (Fortrie et al., 2019; Lai et al., 2013).

The current functional parameters used by clinicians for determining AKI and renal recovery are sCr concentrations and urine output. However, sCr is considered a suboptimal glomerular filtration rate (GFR)

SUMMARY

marker because its value can vary independently of kidney function (Edelstein, 2008). In addition, changes in sCr lack sensitivity for AKI in a healthy person and offer poor insight into the renal structure. Indeed, changes are observed only when the GFR decreases by more than 50%. The rise in sCr is a late sign of alteration in glomerular filtration that has been occurring for hours or days (Bellomo et al., 2012; Zoltán H. Endre, 2018; Ronco et al., 2012).

Likewise, a decrease of sCr to normal range or baseline level after an AKI episode does not necessarily reflect complete renal functional recovery or complete reconstitution of normal kidney structure (Humphreys et al., 2016). Therefore, new biomarkers are needed not only to aid in early diagnosis but also to serve in several other purposes, such as predicting recovery or progression to CKD.

HYPOTESIS AND AIMS

We hypothesized that the generation of a new in vivo experimental model of transition from AKI to CKD would allow, on the one hand, to search for new urinary markers in the phases prior to the development of CKD that could be used to monitor patients with previous AKI and reduce their risk of developing CKD. On the other hand, we hypothesized that this model would be useful to study the initial period of CKD development to monitor its progression and evolution.

Therefore, in this work, we propose the following objectives:

- 1) To generate an in vivo experimental model of transition from AKI to progressive CKD by applying repeated episodes of AKI.
- 2) To identify urinary biomarkers capable of monitoring the period after AKI and to follow the progression of CKD.

METHODOLOGY

Male Wistar rats (240–260 g) were used in accordance with the Principles of the Declaration of Helsinki and the European Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Directive 2010/63/UE) and Spanish national and regional regulations (Law 32/2007/Spain, RD 1201/2005 and RD 53/2013). All procedures were approved by the Bioethics Committee for Animal Care and Use of the University of Salamanca. Animals were maintained under controlled environmental conditions, fed on standard chow and allowed to drink water *ad libitum*.

Animal experimental model 1:

Animals were divided into 5 experimental groups: Control group: SHAM operated rats, saline solution i.p.; “CDDP5” group: 5 mg/kg cisplatin i.p.; “I/R60” group: 60-minute renal ischemia reperfusion on the left kidney; “CDDP5-I/R60” group: 5 mg/kg cisplatin i.p. and after renal function normalization, 60-minute ischemia-reperfusion (I/R60); “CDDP5-I/R60-I/R60” group: 5 mg/kg cisplatin i.p., after renal function normalization, 60-minute ischemia-reperfusion (I/R60) on the left kidney, and 2 weeks later 60-minute ischemia-reperfusion (I/R60) on the right kidney. Blood and urine were collected at: day 0 (basal); day 4 (AKI development); day R (8–10 after cisplatin administration, that corresponds to normalization of renal function and left kidney I/R60 induction); day R+1 (1 day after ischemia); day 20 (D20), at 1 month (M1) and after 2 months (M2). Animals were sacrificed at D20 and M2.

Animal experimental model 2:

Animals were subdivided into 4 experimental groups: Control group: SHAM operated rats, saline solution, i.p.; “CDDP5-I/R60-I/R60” group: 5 mg/kg cisplatin i.p., after renal function normalization, 60-minute ischemia-reperfusion (I/R60) on the left kidney, and 2 weeks later 60-minute ischemia-reperfusion (I/R60) on the right kidney; “5/6 NEF” group: 5/6 renal mass reduction; “UNX” group: unilateral nephrectomy. Blood and urine were collected at: day 0 (basal); day 4 (AKI development); day R (8–10 after cisplatin administration, that corresponds to normalization of renal function and left kidney I/R60 induction); day R+1 (1 day after ischemia); D20 and monthly thereafter for 9 months (M2–M9). Animals were sacrificed at three time points: D20, M2, M6 and M9.

SUMMARY

Sample collection

At selected time points, urine and plasma samples were collected to evaluate renal function. For urine collection, rats were individually allocated in metabolic cages. 24-hour urine was collected, centrifuged, and stored at -80°C . Blood was drawn from the tail vein and centrifuged, and plasma was stored at -80°C . Immediately before sacrifice, kidneys were perfused by the aorta with saline solution and dissected. One half was frozen in liquid nitrogen and subsequently kept at -80°C . The other half was fixed in buffered 3.7% p-formaldehyde for histological studies.

Renal function studies

Plasma and urinary creatinine, blood urea nitrogen (BUN), and proteinuria were determined with commercial kits based on colorimetric methods. GFR was estimated by the creatinine clearance (ClCr), using the formula: $\text{ClCr} = \text{uCr} \times \text{UF} / \text{sCr}$, where UF stands for urine flow.

Biomarker analysis

Urinary biomarkers were analysed at D20 (12 days after the second damage and 20 days after the first one) and monthly thereafter by Western blot and ELISA.

Histological studies

Paraformaldehyde-fixed kidney samples were immersed in paraffin, cut into 5 μm -thick slices and stained with haematoxylin and eosin (HE), Masson's Trichrome, Periodic acid-Schiff (PAS) and Sirius Red (SR). Whole-kidney images were obtained with photographs taken using the DotSlide virtual microscopy technique (Olympus BX51, Olympus Iberia, Barcelona, Spain). Images were analysed with the Olyvia Software (Olympus Iberia).

Fibrosis quantification

Quantification of fibrosis was performed using 10X images obtained by Olyvia Software from three different kidney sections stained with SR (the cortex, the outer and the inner medulla). Fibrosis area on these images was quantified using Image J program.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 7 software (San Diego, CA, USA). Data normal distribution was evaluated with the Shapiro-Wilk normality test. Data is shown as the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). One-way ANOVA with Bonferroni's test (for data with normal distribution) or Dunn's test (for data with non-normal distribution) was performed to compare experimental groups; Spearman correlations were used to analyse the ability of biomarkers to predict renal damage. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS AND DISCUSSION

To study the connection between frequency of AKI episodes and the development of CKD, we generated a new in vivo experimental model of successive episodes of AKI.

Male Wistar rats were subjected to three AKI-inducing renal interventions. The first AKI episode was induced by treating animals with 5 mg/kg of cisplatin (CDDP5). Cisplatin is an antineoplastic drug widely used in the treatment of several solid tumours (Ho et al., 2016), which presents a dose-dependent nephrotoxicity as the main adverse effect. When renal function had recovered (day R), a 60-minute unilateral ischemia-reperfusion (I/R60) was performed on the left kidney. Ischemic damage was chosen since it can occur frequently after surgical interventions that involve significant blood loss (Kolh, 2009), and unilateral for multiple reasons, as a reduction in mortality risk, with better survival in rats for long-term studies (Le Clef et al., 2016). The third and last renal damage was carried out 2 weeks later and consisted of a unilateral I/R60 on the right kidney.

We compared our experimental model over 2 months with other models of different frequency of damage. Specifically, we used two experimental groups of a single damage that was either induced by injection of cisplatin (5mg/kg) ("CDDP5" group), or by unilateral I/R60 on the left kidney ("I/R60") and, finally, a group of double damage by combining the previous two models ("CDDP5-I/R60" group). A long study (for 9 months) was also carried out to analyse the long-term consequences generated by the multiple damages, and this in vivo model was compared with another known model of progressive CKD, the 5/6 nephrectomy

SUMMARY

model ("5/6 NEF" group). A group of nephrectomised rats ("UNX" group) and "SHAM" rats were used as controls.

RENAL FUNCTION CHARACTERIZATION

Cisplatin treatment (5 mg/kg, i.p.) induced significant increases in sCr (Figure 1A), BUN (Figure 1C), proteinuria (Figure 1G) and a decrease in ClCr (Figure 1E) after 4 days (D4); these parameters returned to baseline values about 4-6 days after D4 (day R). On this day, a 60-minute ischemia-reperfusion (I/R60) was performed on the left kidney. The day after (R+1), we observed an increase in sCr and BUN, to a lesser degree than that observed on day 4 (Figures 1A, 1C), probably due to functional compensation of the contralateral kidney. On D20, no functional alterations were observed, except for BUN. After the third and last renal damage, by the induction of a I/R60 on the right kidney, the only group that showed alterations in all parameters, which were maintained at a stable level for 8 months, was the "CDDP5-I/R60-I/R60" group (Figures 1B, 1D, 1F). In addition, this group showed a progressive increase in proteinuria in the last 2 months of the study (M8 and M9) (Figure 1H). In the "5/6 NEF" group, we observed a progressive deterioration of renal function, characterized by an increase in sCr, BUN and proteinuria, and a decrease in ClCr, during the period of study. The nephrectomy group ("UNX" group) maintained ClCr values of around 75% of that observed in the SHAM group, for the entire period of study (Figure 1F).

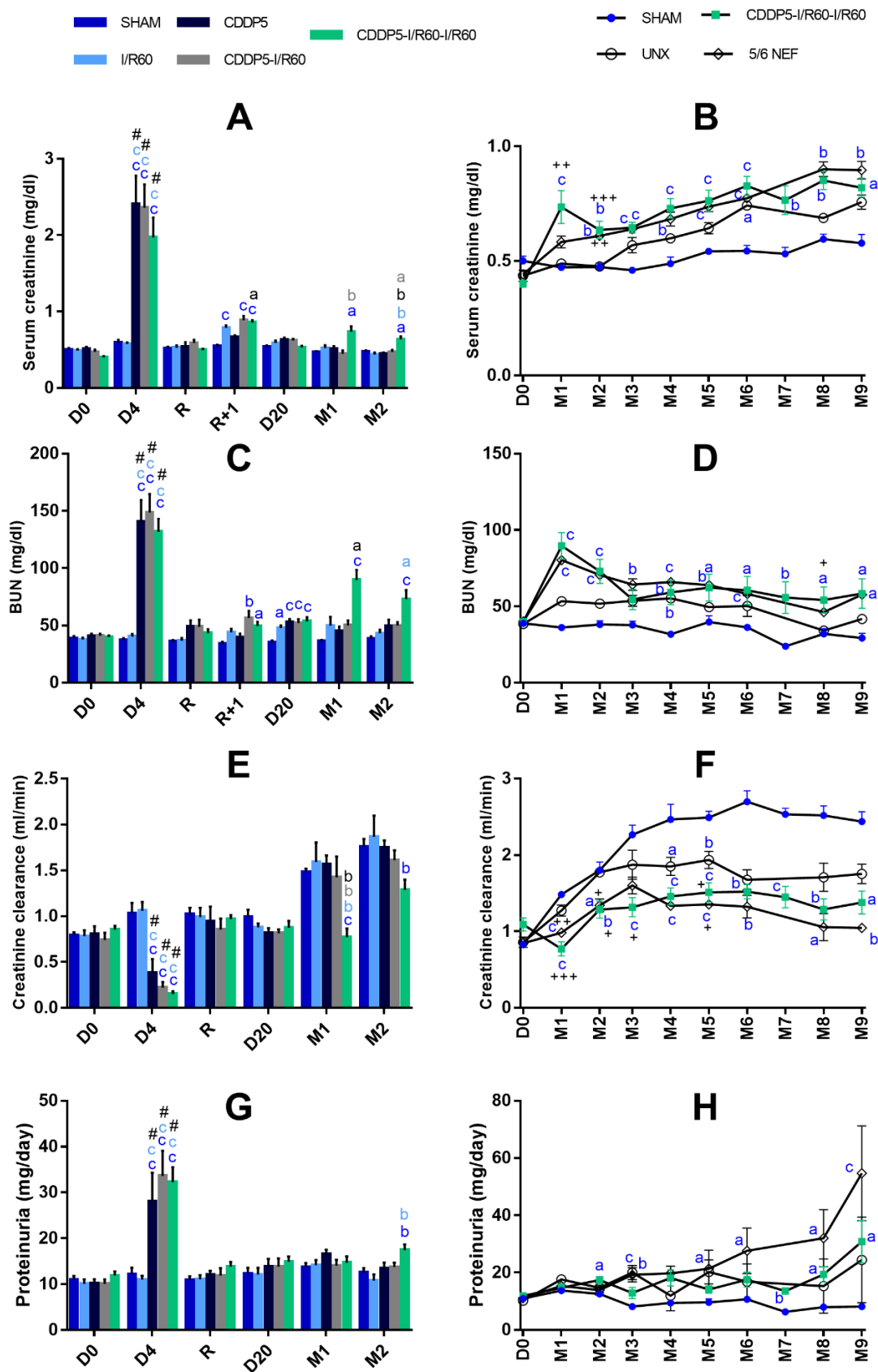


Figure 1: Assessment of renal function. D0=beginning of the experiment, D=day, R=renal function recovery day, M=month. Values are mean $\pm$ SEM. $aP < 0.05$; $bP < 0.01$; $cP < 0.001$ (the colour of the letters a, b and c indicates the experimental group with respect to which the significance refers), $+p < 0.05$ vs UNX; $++p < 0.01$ vs UNX; $+++p < 0.001$ vs UNX; $*p < 0.05$ vs 5/6 NEF; $**p < 0.01$ vs 5/6 NEF; $***p < 0.001$ vs 5/6 NEF.

SUMMARY

HISTOLOGICAL EVALUATION

We performed histological analysis of kidneys from "CDDP5", "I/R60", "CDDP5- I/R60" and "CDDP5-I/R60-I/R60" groups at the following time points:

- On Day 20 (D20): after the first two renal insults, when animals presented normal renal function (assessed by sCr, ClCr) and before inducing the third damage.
- After 2 months (M2): to study the degree of chronic kidney alterations generated after a large period.

Four histological stains were performed: Haematoxylin-Eosin, Periodic Acid-Shiff (PAS), Masson's Trichrome and Sirius Red.

Furthermore, we studied the progression of renal damage in our experimental model ("CDDP5-I/ R60-I/R60" group) and in the group of progressive CKD ("5/6 NEF" group), analysing tissue samples obtained at D20, M2, M6 and M9.

The presence of fibrosis in the cortex and outer and inner medulla regions was quantified at all these time points using Sirius Red staining.

Subclinical alterations after AKI

No structural alterations were observed in the SHAM group (Figures 2A, 2B, 3A, 3B, 4A, 4B). In the "I/R60" group, we found a significant difference between the degree of tissue damage present in the left kidneys compared to the right ones. In the left kidneys, we observed alterations in renal tubules (cast formation, tubular necrosis, tubular dilatation, and loss of brush border) and interstitial alterations (inflammatory infiltrate, epithelial disorganization) (Figures 2C, 3C). Likewise, the presence of interstitial fibrosis was observed around damaged and atrophic tubules (Figures 4C). On the other hand, no structural alterations were observed in the right kidneys in this group (Figures 2D, 3D, 4D).

The "CDDP5" group showed a similar degree of structural alterations in both left and right kidneys. The main alterations found in this group were epithelial disorganization, tubular dilation, and partial or absent loss of the brush border membrane (Figures 2E, 3F, 4E). Interstitial fibrosis was observed focally around some tubules (Figures 4E, 4F).

The “CDDP5-I/R60” group presented the highest degree of tissue lesions in the left kidneys, with a high degree of alterations at the tubular (tubular dilation and tubular atrophy, absence of brush border) and interstitial level (abundant inflammatory infiltrate, epithelial disorganization, and presence of interstitial fibrosis) (Figures 2G, 3G, 4G). Lesions were also observed in the right kidneys, but to a lesser degree compared to the left ones (Figures 2H, 3H, 4H).

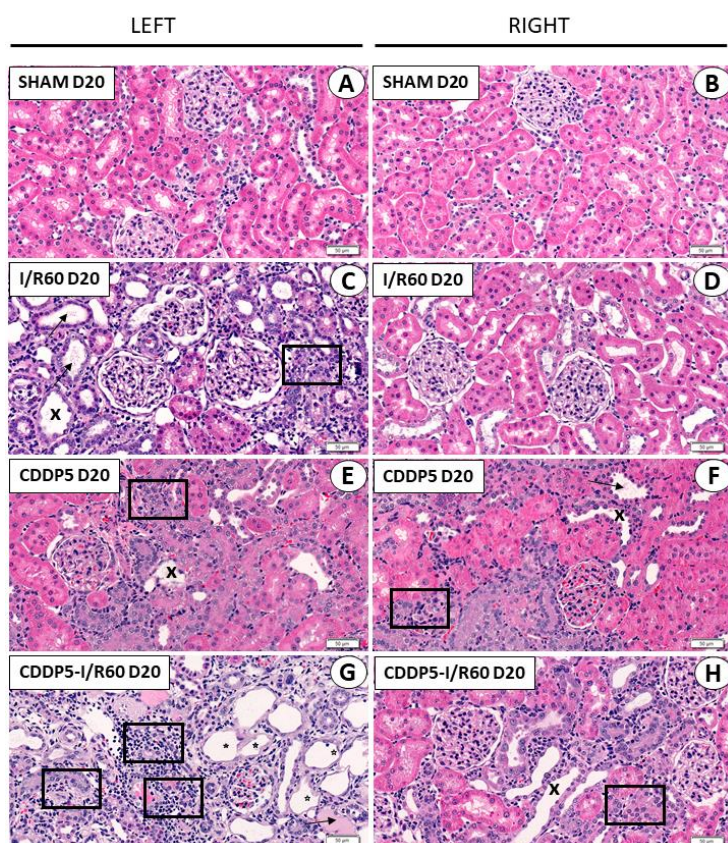


Figure 2: Evaluation of renal structural alterations by Haematoxylin-eosin staining. Representative images (100X) of histological sections of the cortical region. Scale: 50 μm. The rectangles highlight the epithelial disorganization and the inflammatory infiltrate, the X the tubular dilation, the * the tubular necrosis and the arrows tubular casts.

SUMMARY

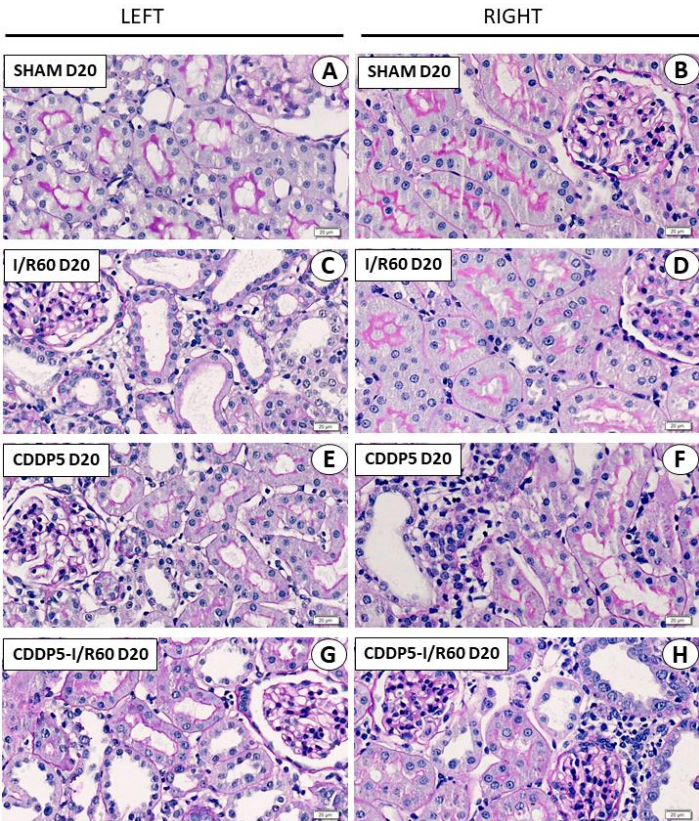


Figure 3: Brush border evaluation by PAS staining. Representative images (200X) of histological sections of the cortical region. Scale: 20 μm.

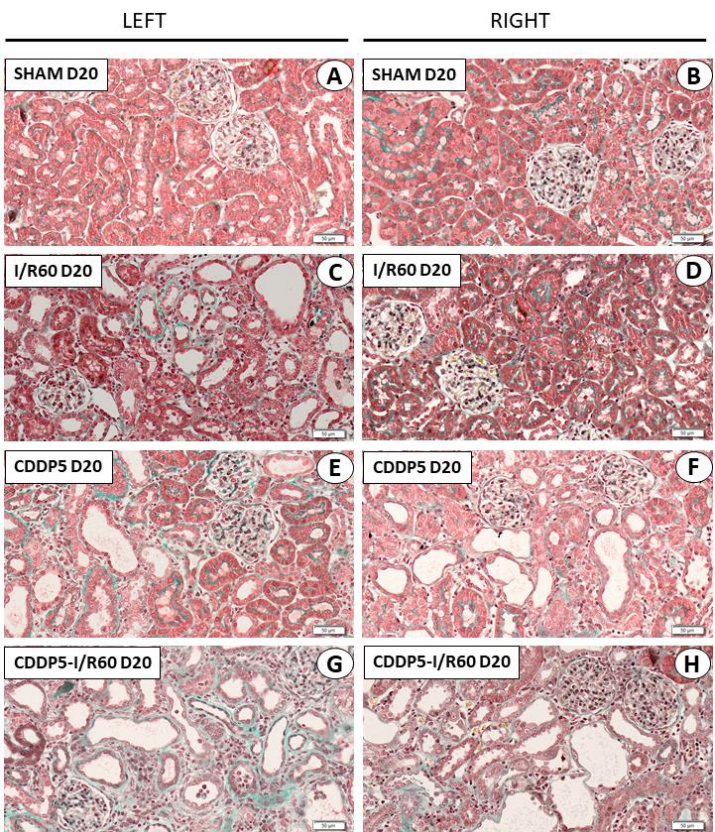


Figure 4: Evaluation of renal fibrosis by Masson's Trichrome staining. Representative images (100X) of histological sections of the cortical region. Scale: 50 μm.

Chronic alterations after AKI

No structural alterations were observed in the control group (Figures 5A, 5B, 6A, 6B, 7A, 7B) and in the right kidneys of the "I/R60" group (Figures 5D, 6D, 7D). In the "I/R60" group, structural alterations were observed in the left kidneys, especially tubular dilatation, presence of chronic inflammatory infiltrate, epithelial disorganization, and interstitial fibrosis (Figures 5C, 7C). Brush border repair was observed in many tubules (Figure 6C).

In the "CDDP5" group, just like in the "I/R60" group, structural alterations were observed with focal distribution in certain areas, such as around some renal tubules, and characterized mainly by tubular dilation, epithelial disorganization, inflammatory infiltrate, and interstitial fibrosis (Figures 5E, 5F, 6E, 6F, 7E, 7F). In the double ("CDDP5-I/R60") and triple ("CDDP5-I/R60-I/R60") renal damage groups, the degree of damage was much higher compared to the previous ones and was related to the frequency of the AKI episodes, with the "CDDP5-I/R60-I/R60" group being the one that showed the highest histological damage. In this group, we found an abundant deposition of interstitial extracellular matrix, very widespread in the left and right kidneys. In addition, a high degree of tubular dilation was observed in a high percentage of tubules accompanied by the presence of abundant inflammatory infiltrate (Figures 5I, 5L, 6I, 6L, 7I, 7L).

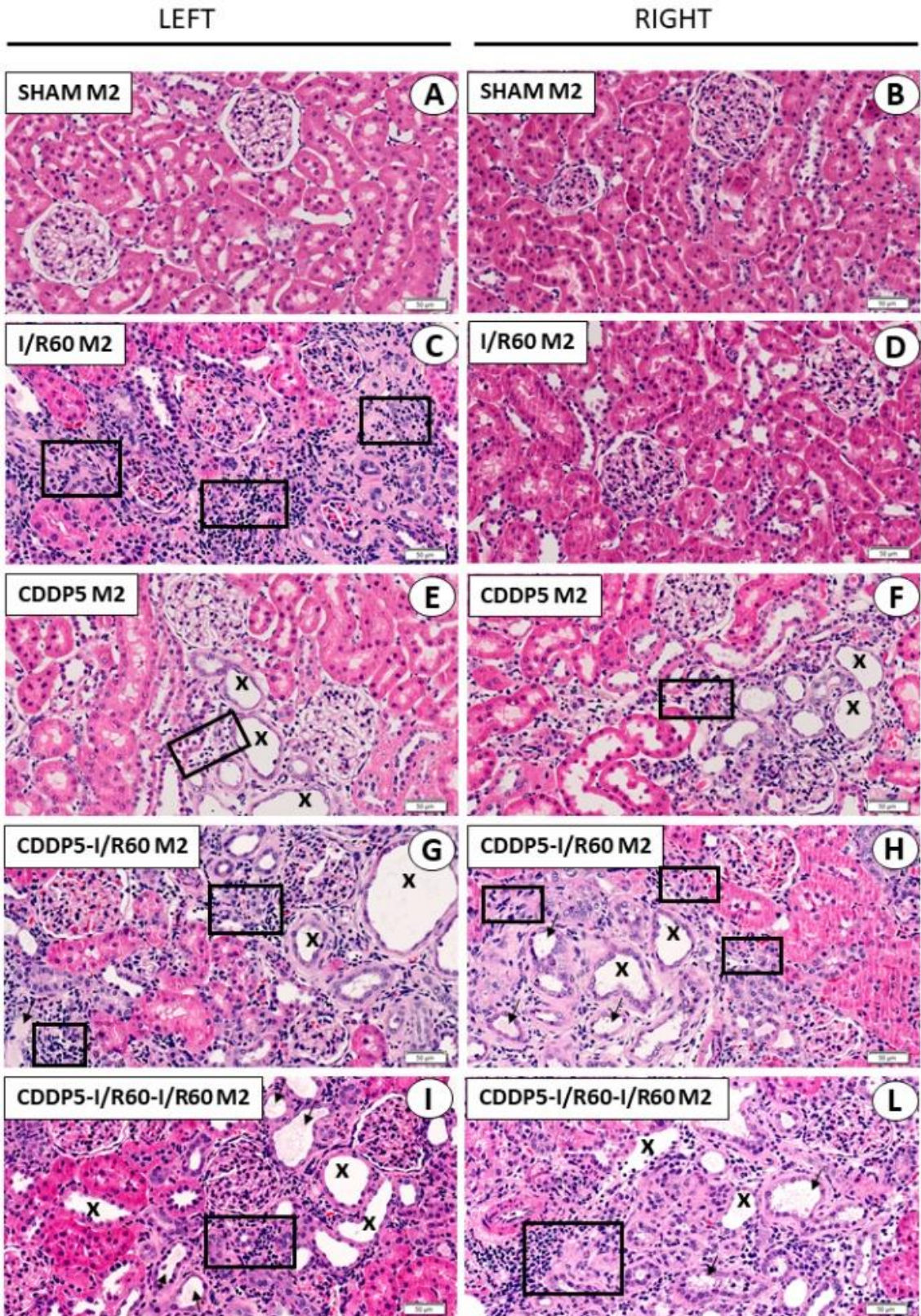


Figure 5: Evaluation of renal structural alterations by Haematoxylin-eosin staining. Representative images (100X) of histological sections of the cortical region. Scale: 50 μm. The rectangles highlight the epithelial disorganization and the inflammatory infiltrate, the X the tubular dilation, the * the tubular necrosis and the arrows tubular casts.

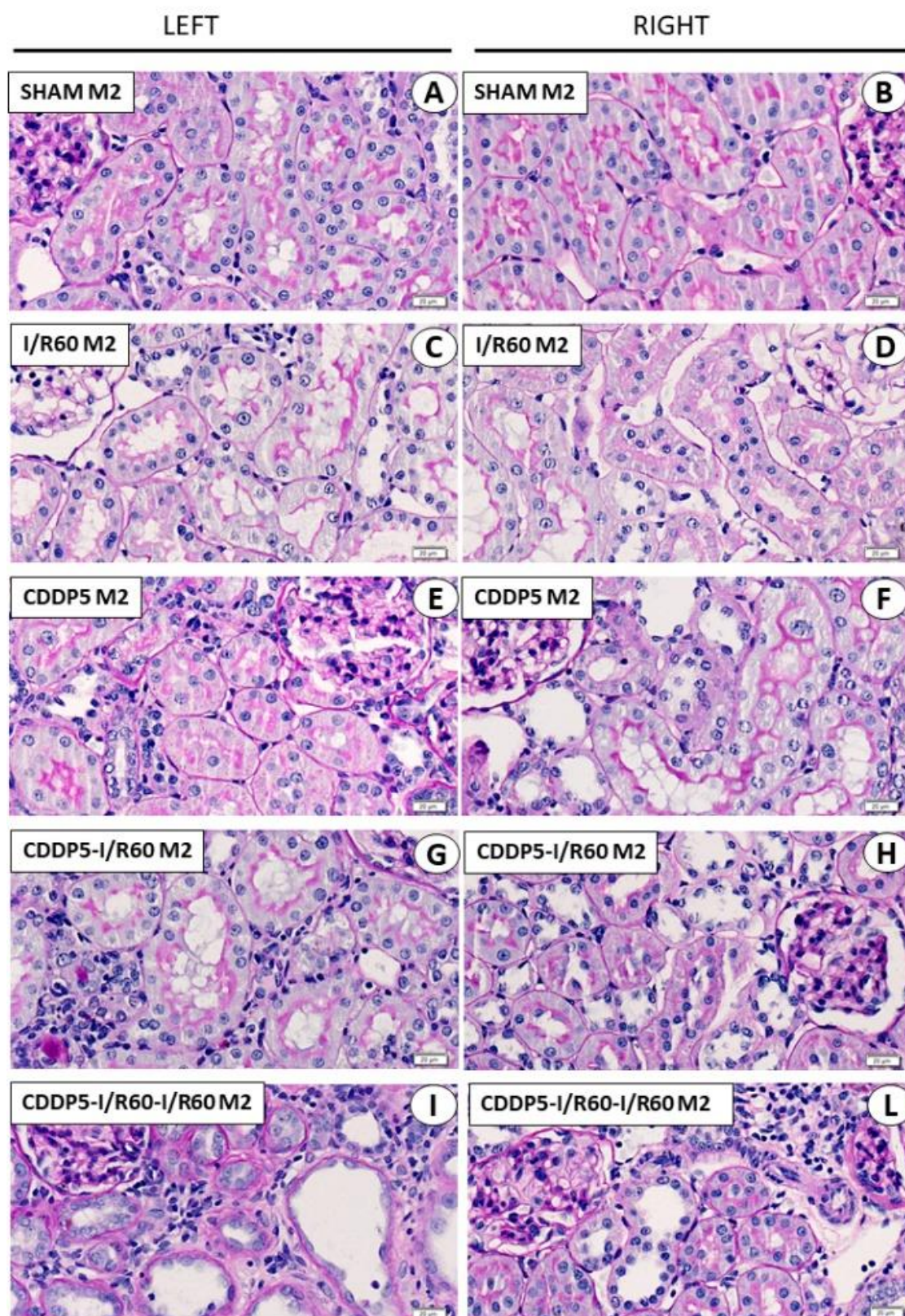


Figure 6: Brush border evaluation by PAS staining. Representative images (200X) of histological sections of the cortical region. Scale: 20 μ m.

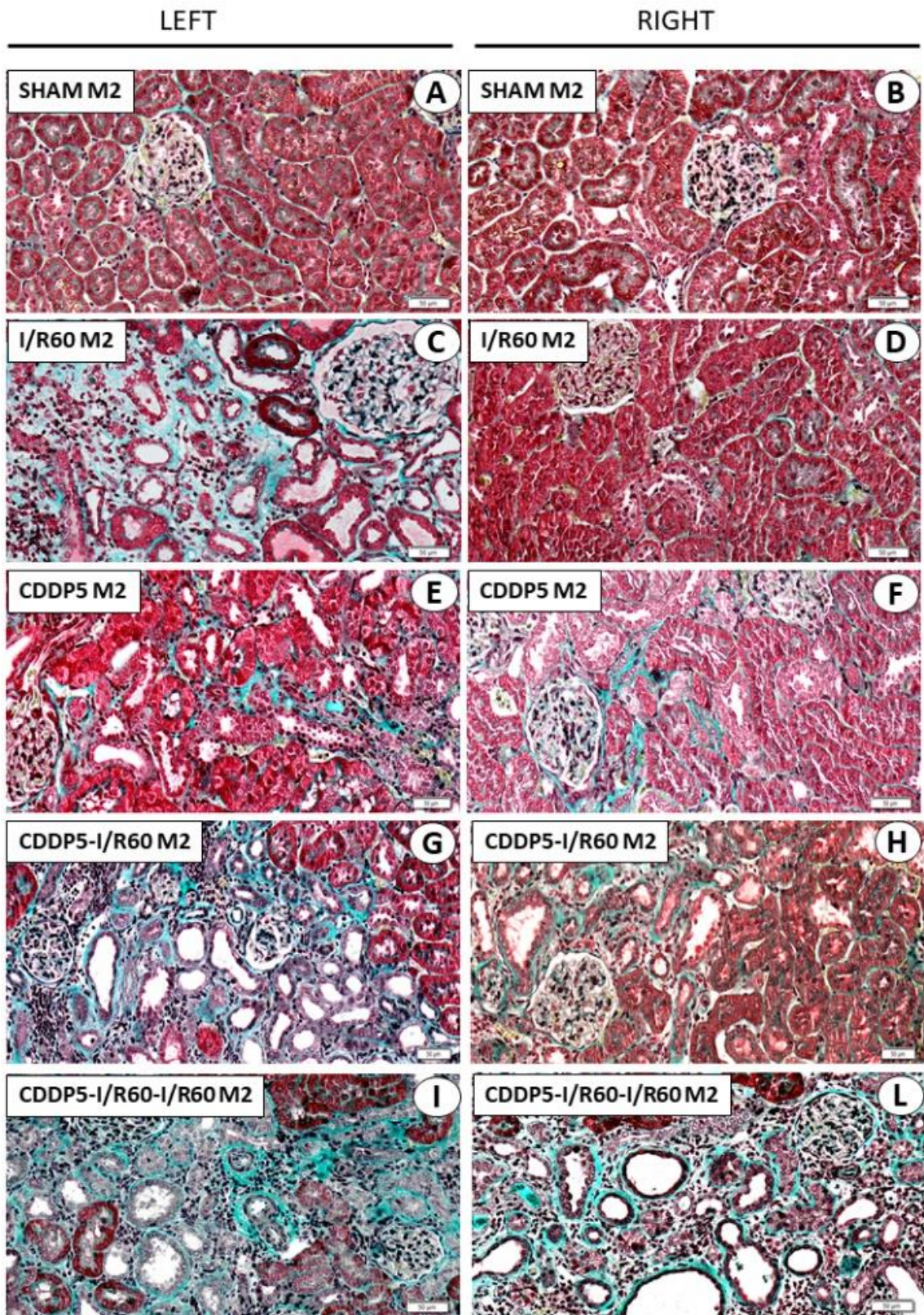


Figure 7: Evaluation of renal fibrosis by Masson's Trichrome stain. Representative images (100X) of histological sections of the cortical region. Scale: 50 μ m.

Renal damage progression

Figures 8 and 9 show the analysis of tissue damage from D20 to M9. In the triple damage group "CDDP5-I/R60-I/R60", we observed a high degree of injury at M2. In this group, a progressive accumulation of collagen and interstitial fibrosis is observed, from D20 to M9. At this stage, kidneys appear completely fibrotic, and normal areas are rarely seen. We detected a very high degree of tubular dilatation, inflammatory infiltrate, and glomerular damage, which varies from a marked increase in the mesangial matrix to the complete replacement of glomeruli by fibrotic matrix.

In the "5/6 NEF" group, no significant alterations in renal structure were observed at D20. However, from M2, we observed structural alterations characterized mainly by glomerular lesions (presence of glomerulosclerosis and glomerular enlargement), dilatation of some tubules, presence of inflammatory infiltrate and interstitial fibrosis, although it is important to highlight that, at this point, many renal areas were still present without significant alterations. At M6, renal lesions became very evident and widespread on the renal surface and were characterized by a marked increase in interstitial fibrosis and inflammatory infiltrate, tubular damage and glomerular lesions. These alterations worsened even more at M9, where almost no normal regions were observed in the analysed kidneys.

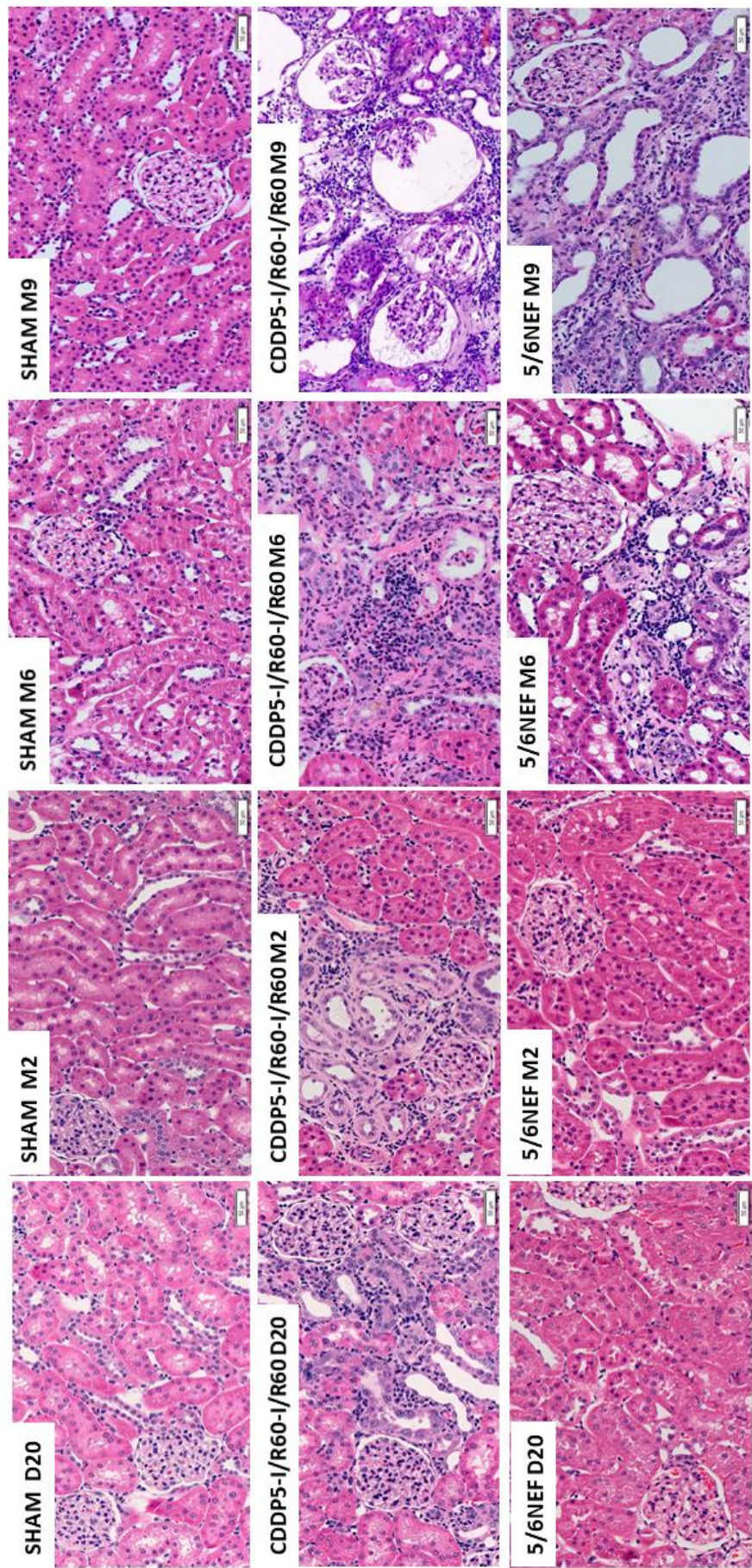


Figure 8: Evaluation of the progression of kidney alterations using Haematoxylin-eosin staining. Representative images (100X) of histological sections of the cortical region (left kidneys). Scale: 50 µm.

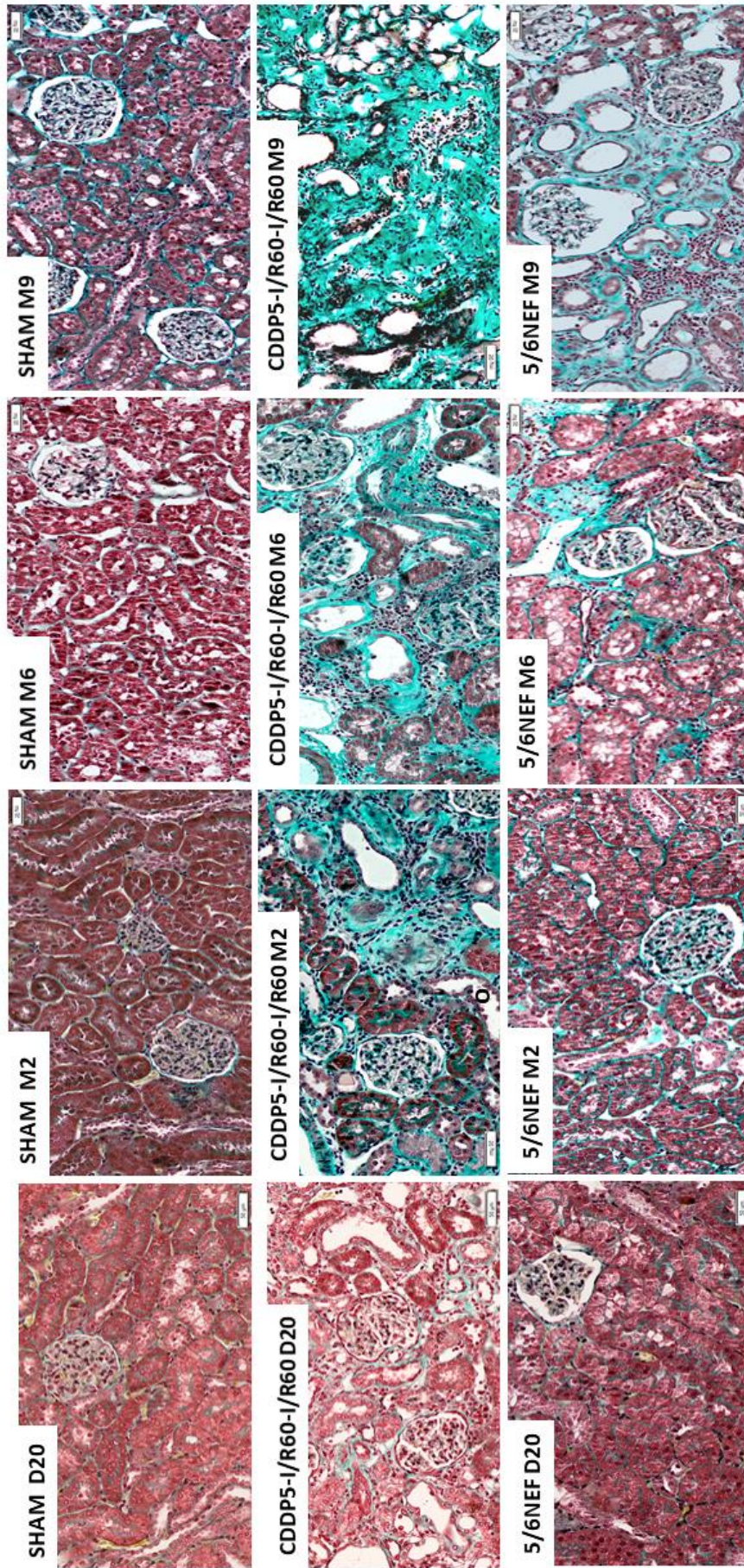


Figure 9 Evaluation of the progression of renal fibrosis using Masson's Trichrome staining. Representative images of the cortical region (left kidneys). Scale: 50 µm.

Fibrosis quantification

Figure 10A shows the quantification of total collagen in the groups of different frequency of damage at D20 and M2. At D20 a higher amount of collagen was found in all the groups of damage ("CDDP5"; "I/R60" (in the left kidneys); "CDDP5-I/R60") compared to controls, mainly in renal medulla. Right kidneys belonging to the "I/R60" group did not show differences compared to controls. At M2, a consistent increase in fibrosis was observed in all the damage groups ("I/R60" (left kidneys), "CDDP5", "CDDP5-I/R60" and "CDDP5-I/R60-I/R60") in all regions, except for the "CDDP5" group in which fibrosis was observed mainly in the outer medulla. The only group that showed a high degree of fibrosis in both kidneys was the triple damage group "CDDP5-I /R60-I/R60". By contrast, we observed a higher amount of fibrosis in the left kidneys than in the right ones in the double damage group. Regarding the groups of single damage, they showed a significantly higher level of fibrosis compared to controls, but lower than the groups of higher frequency of damage. No differences were observed between the right kidneys in the "I/R60" group and those of the controls.

Figure 10B shows the quantification of fibrosis in the groups analysed during 9 months. As indicated above, in the triple damage group the degree of fibrosis was already significant at M2 and worsened even more in the following months. However, the "5/6 NEF" group presented a lower degree of fibrosis at M2 compared to the triple damage group, which subsequently increased over time, as a consequence of adaptive processes after the reduction of renal mass.

On one hand, our results show that fibrosis is a direct consequence of the insults that appear when a perfect repair of the renal structure has not been achieved. Furthermore, we observed that there is a direct relationship between fibrosis accumulation and frequency of damage, since the experimental groups that showed the highest degree of fibrosis were the triple and the double damage groups. According to these results, renal fibrosis represents a scar, which delimits the regions where complete repair has not been achieved. However, when another damage is superimposed on a previously damaged structure, as occurred in the groups of multiple damage, the fibrotic process is exacerbated, causing excessive extracellular matrix production over time. On the other hand, our results show that fibrosis represents a

common process in progressive renal diseases, since it appeared in both models of progressive CKD (the “5/6 NEF” and “CDDP5-I/R60-I/R60” groups).

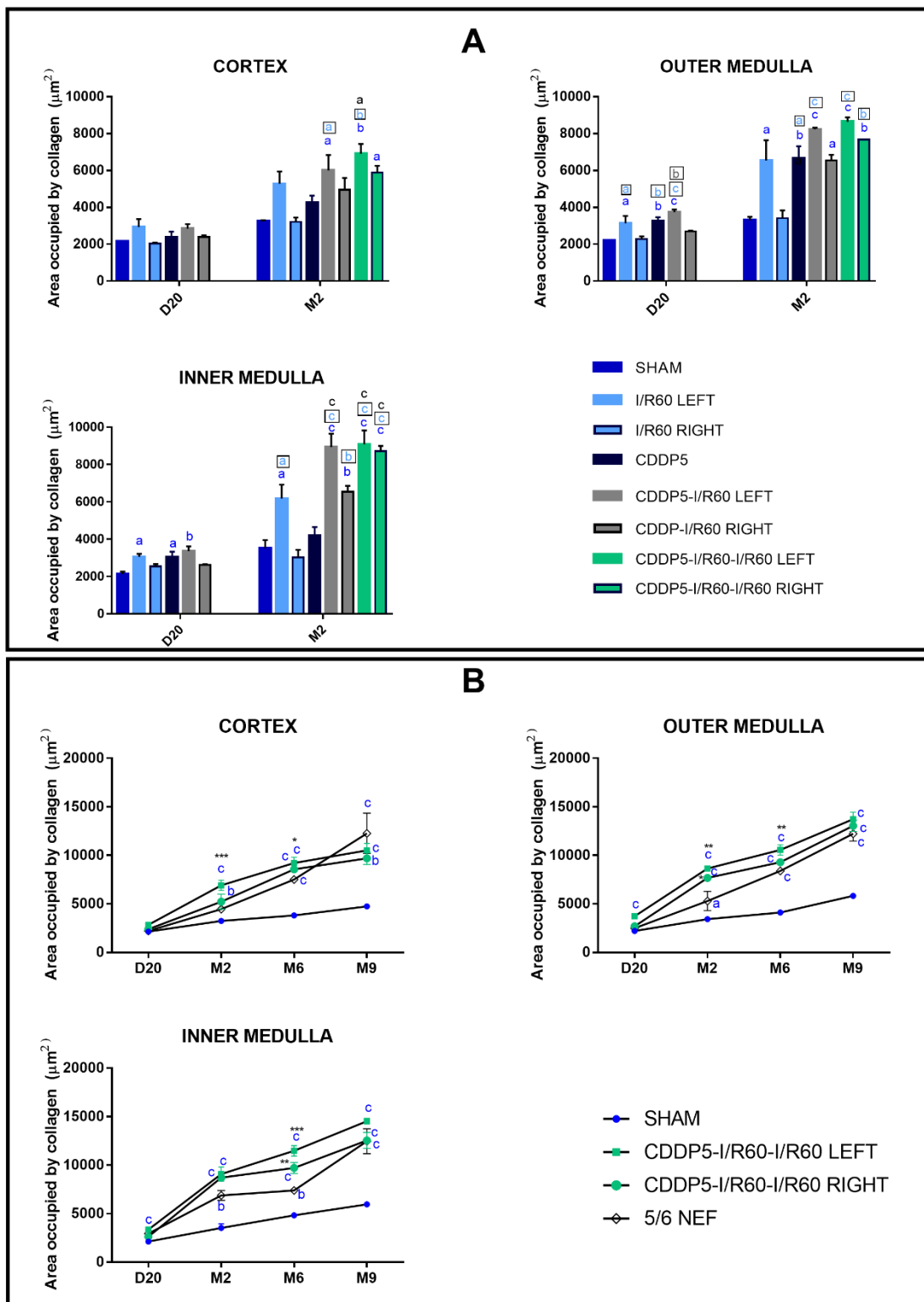


Figure 10: Quantification of renal fibrosis (μm^2). The results of the collagen quantification are shown at the different time points (D= day 20, M= month) in the three different renal regions (cortex, outer and inner medulla). Between 3 and 5 animals were used for each group, and 5 images of the cortex, 5 of the outer medulla and 5 of the inner medulla were analysed in each kidney. ^a $P < 0,05$; ^b $P < 0,01$; ^c $P < 0,001$

SUMMARY

(the colour of the letters a, b and c indicates the experimental group with respect to which the significance refers), * $p < 0,05$ vs 5/6 NEF; ** $p < 0,01$ vs 5/6 NEF; *** $p < 0,001$ vs 5/6 NEF.

URINARY BIOMARKERS FOR THE DETECTION OF SUBCLINICAL SEQUELAE OF AKI AND FOR MONITORING PROGRESSION TO CKD

ALBUMIN AND TRANSFERRIN

Albumin and transferrin are both plasma proteins synthesized in the liver (Kawabata, 2019; Quinlan et al., 2005). Figure 11 shows the urinary values of albumin and transferrin measured by ELISA. Control animals presented albuminuria and urine transferrin excretion that remained stable throughout the study. At D4, after cisplatin administration, the excretion of both proteins increased significantly. In the "I/R60" and "CDDP5" groups, no differences were observed up to M2. In the "5/6 NEF" group, albuminuria values began to increase from M1, progressively throughout the study, reaching at M9, a daily excretion higher than that observed on the day of maximum damage caused by cisplatin (D4).

In the "CDDP5-I/R60-I/R60" group, a greater excretion of both proteins was observed at D20 and M1, which was normalized at M2 (Figure 47B). From M3, urinary values began to increase progressively, more slowly with respect to the "5/6 NEF" group but reaching similar values at the end points (M8-M9) (Figure 47A). Our results show the usefulness of urinary albumin and transferrin as biomarkers for the detection of subclinical renal sequelae after AKI and for monitoring CKD progression.

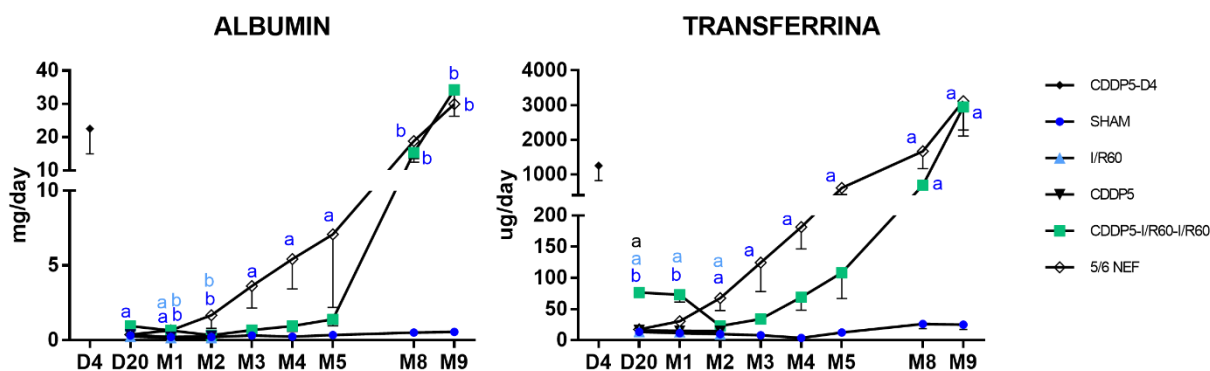


Figure 11: ELISA analysis of albuminuria levels (mg/day) and urinary transferrin excretion (ug/day) during the study period (D=day, M=month) in the different experimental groups: 'SHAM' group, single damage groups ('I/R60'; 'CDDP5'); triple damage group 'CDDP5-I/R60-I/R60' and '5/6 NEF' group. Values are expressed as mean $\pm$ SEM. ^a $P < 0,05$; ^b $P < 0,01$; ^c $P < 0,001$ (the colour of the letters a, b and c indicates the experimental group with respect to which the significance refers), * $p < 0,05$ vs 5/6 NEF; ** $p < 0,01$ vs 5/6 NEF; *** $p < 0,001$ vs 5/6 NEF.

RBP4

RBP4 (retinol binding protein 7) is a 21 Kda protein, synthesized in the liver and responsible for the transport of vitamin A from the liver to other organs (Vaidya et al., 2008). Its usefulness as a urinary marker for AKI (Bonventre et al., 2010; Vaidya et al., 2008), and renal recovery after AKI (Gonzalez-Calero et al., 2016) has been described.

Figure 12 shows urinary RBP4 concentration values measured by ELISA. In the control group, urinary RBP4 concentration remained between 1.0 and 1.7 ng/day throughout the study. At D4, levels raised to approximately 30 ng/ day. No difference in RBP4 concentration was observed in the "CDD5" and "I/R60" groups at D20, M1 and M2. However, significant differences were found in RBP4 excretion at D20 and M1 in the triple damage group up to M2, when the values were similar to those of controls. From M2 to M5, no differences were observed. However, an increase in RBP4 values was observed at the end points of the study (M8, M9). In the "5/6 NEF" group, the RBP4 values remained without differences compared to controls until M5, and similarly to the triple damage group, they were significantly higher at M8 and M9.

Our results demonstrate the usefulness of RBP4 to detect renal subclinical alterations, although with less sensitivity compared to other markers mentioned in this work, since its level was normal in the "CDDP5" and "I/R60" groups.

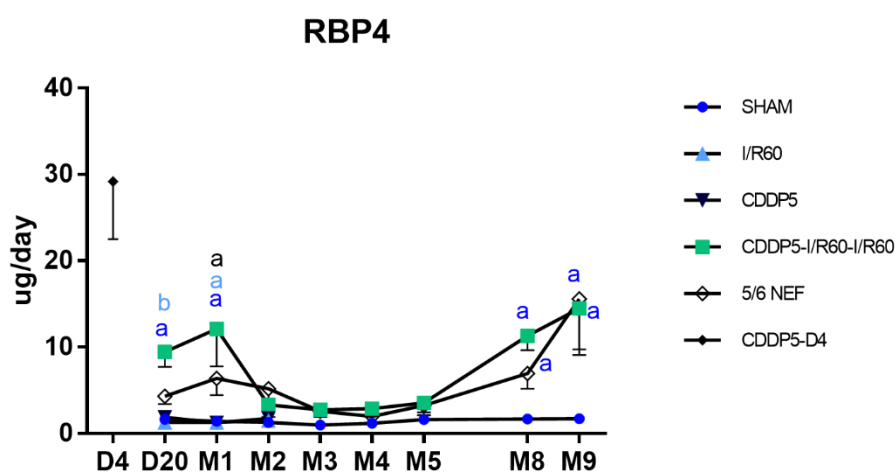


Figure 12: ELISA analysis of urinary levels of RBP4 (ng/day) during the study period (D= day, M=month) in the different experimental groups: 'SHAM' group, single damage groups ('I/R60'; 'CDDP5'); triple damage group 'CDDP5-I/R60-I/R60' and '5/6 NEF' group. Values are expressed as mean $\pm$ SEM. ^a $P < 0,05$; ^b $P < 0,01$; ^c $P < 0,001$ (the colour of the letters a, b and c indicates the experimental group with respect to which the significance refers), * $p < 0,05$ vs 5/6 NEF; ** $p < 0,01$ vs 5/6 NEF; *** $p < 0,001$ vs 5/6 NEF.

SUMMARY

TIMP-2 AND IGFBP-7

TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinases) and IGFBP-7 (insulin-like factor binding protein-7) are two recently discovered AKI markers. Both proteins stop the cell cycle in the G1 phase, a common mechanism in AKI (Kashani et al., 2013).

Figure 13 shows urinary IGFBP-7 values. In the control group, no relevant amount of urinary IGFBP-7 was detected during the study. At D4, IGFBP-7 values increased to approximately 20 ng/day. In the "I/R60" and "CDDP5" groups, no differences were observed in the excretion of IGFBP-7 compared to controls for all of the study. However, highly significant differences were observed in the excretion of IGFBP-7 in the "CDDP5-I/R60-I/R60" group at D20 and M1 that successively decreased at M2 and remained without significant differences throughout the study, although an increase was observed at M8 and M9. In the "5/6 NEF" model, IGFBP-7 values remained without significant differences throughout the study.

Urinary TIMP-2 values (Figure 13) at D20 were increased in the single damage groups ("CDDP5"; "I/R60") and the "CDDP5-I/R60-I/R60" group compared to controls. Subsequently, the urinary TIMP-2 concentration in the "CDDP5" and "I/R60" groups progressively decreased up to M2, although showing differences compared to controls. In the triple damage group, TIMP-2 values increased at M1, after the application of the third damage, and then decreased at M2, remaining at constantly higher levels compared to controls until M9. In the "5/6 NEF" group, TIMP-2 levels were elevated compared to controls from M1, although with statistical significance from M3 to M9.

These results show the usefulness of IGFBP-7 and TIMP-2 as markers of renal sequelae after AKI. TIMP-2 seems to be a more sensitive marker in detecting damage than IGFBP-7, since from D20 to M2 it was higher in all AKI groups and remained altered in the triple damage and in the "5/6 NEF" group throughout the study. The higher sensitivity of TIMP-2 than IGFBP-7 found in this work could also be due to a difference in sensitivity in the ELISA Kit used.

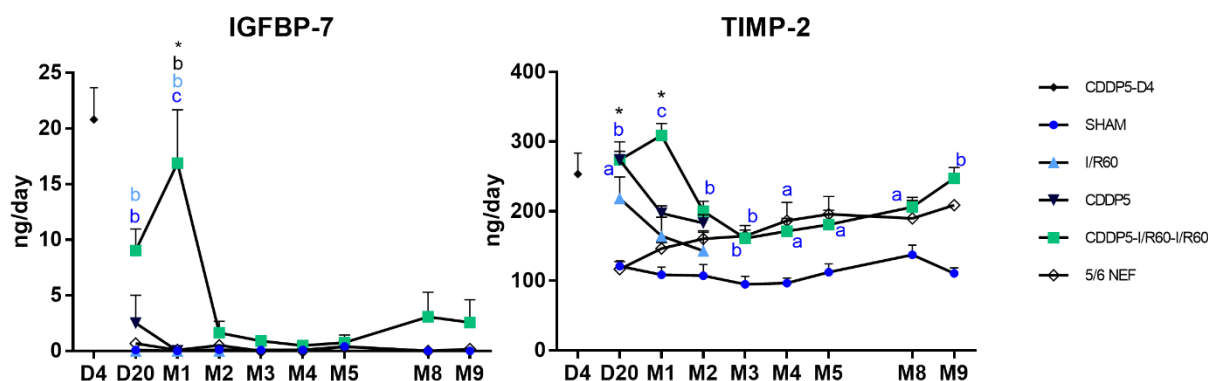


Figure 13: ELISA analysis of urinary levels of IGFBP7 (ng/day) and TIMP-2 (ng/day) during the study period (D = day, M=month) in the different experimental groups: 'SHAM' group, single damage groups ('I/R60'; 'CDDP5'); triple damage group 'CDDP5-I/R60-I/R60' and '5/6 NEF' group. Values are expressed as mean $\pm$ SEM. ^a $P < 0,05$; ^b $P < 0,01$; ^c $P < 0,001$ (the colour of the letters a, b and c indicates the experimental group with respect to which the significance refers), * $p < 0,05$ vs 5/6 NEF; ** $p < 0,01$ vs 5/6 NEF; *** $p < 0,001$ vs 5/6 NEF.

KIM-1 AND NGAL

KIM-1 and NGAL are the most known urinary markers of kidney damage. KIM-1 (kidney injury molecule-1) is a type 1 membrane glycoprotein that in its mature form weighs 104 KDa. The portion that appears in the urine, however, is only the 90 KDa extracellular portion that is released after a proteolytic cleavage mediated by metalloproteases (Waanders et al., 2010). NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin) is a 25 KDa protein belonging to the lipocalin family, which was originally isolated from neutrophils. It is expressed in the kidneys, endothelium, heart, liver and in different cell populations of the immune system, such as macrophages and dendritic cells (Buonafine, Martinez-Martinez, et al., 2018).

Our results show that urinary excretion of KIM-1 and NGAL in the SHAM group remained stable throughout the study period (figure 14). On the day of maximum damage (D4), both proteins (especially KIM-1) increased their urinary excretion. At D20, highly significant differences were observed in NGAL and KIM-1 excretion in the 'CDDP5', 'I/R60' and 'CDDP5-I/R60-I/R60' groups, with respect to the controls. In the single damage groups (CDDP5; I/R60), urinary concentration decreased at M1, until normalized at M2. In the 'CDDP5-I/R60-I/R60' group, after the third damage, KIM-1 values increased at M1 and later decreased at M2, although presenting significant differences with respect to the controls, and remained slightly higher than the control group, but without statistical significance for all of the study.

SUMMARY

Urinary NGAL excretion in the "CDDP5-I/R60-I/R60" and "5/6 NEF" groups was significantly increased compared to control group since D20, for all of the study. However, KIM-1 excretion in the "5/6 NEF" group did not show significant differences compared to controls throughout the study, although presenting higher values at M8 and M9.

These results demonstrate the usefulness of KIM-1 and NGAL as markers of renal sequelae after intrinsic kidney damage caused by a nephrotoxic agent or by ischemia-reperfusion. Specifically, the levels of these markers at D20 were very high in all the damage groups ("CDDP5"; "I/R60"; "CDDP5-I/R60-I/R60"), although 20 days had passed after the first damage and 10-12 days after the second damage. NGAL showed potential also as a marker of chronic functional alterations, as we found a sustained excretion of this protein in the urine over time in the triple damage model and in the 5/6 NEF model. However, KIM-1 was not a good marker for CKD in our model and in the 5/6 NEF model, since urinary levels did not increase progressively in both models, although they were higher at M8 and M9 in both groups with respect to controls.

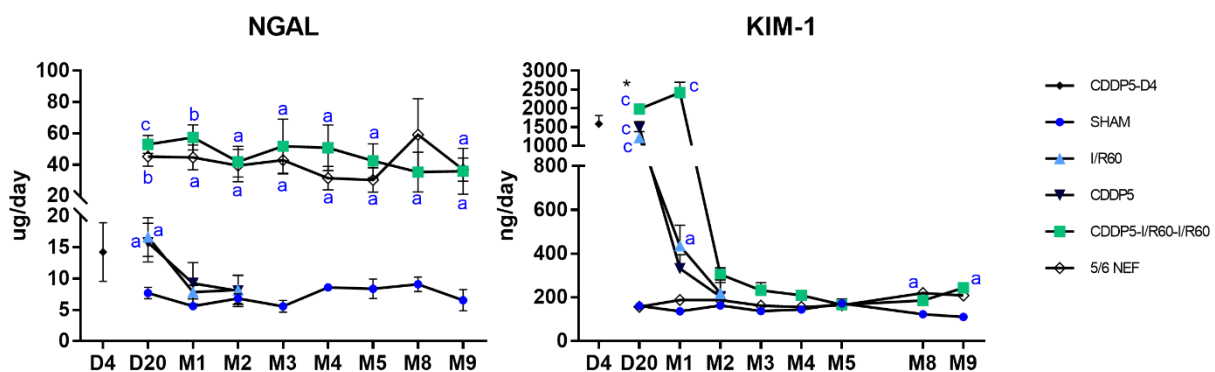


Figure 14 ELISA analysis of urinary levels of NGAL (ug/day) and KIM-1 (ng/day) during the study period (D= day, M=month) in the different experimental groups: 'SHAM' group, single damage groups ('I/R60'; 'CDDP5'); triple damage group 'CDDP5-I/R60-I/R60' and '5/6NEF' group. Values are expressed as mean $\pm$ SEM. ^a $P < 0,05$; ^b $P < 0,01$; ^c $P < 0,001$ (the colour of the letters a, b and c indicates the experimental group with respect to which the significance refers), * $p < 0,05$ vs 5/6 NEF; ** $p < 0,01$ vs 5/6 NEF; *** $p < 0,001$ vs 5/6 NEF.

TCP-1 AND FETUIN-A

TCP-1-eta (TCP-1- η) is a molecular chaperone, a member of the HSP60 family chaperonins that is part of the TCP-1 protein complex (Tailles Complex Polypeptide) (Liang et al., 2014). Fetuin-A is a 52 Kda

glycoprotein that is predominantly produced in hepatocytes and released into the blood in adults (Vaidya et al., 2008). Figures 15 and 16 show the urinary TCP-1 and fetuin-A values analyzed by Western blot. At D20, a greater excretion of both proteins was observed only in the "CDDP5-I/R60-I/R60" group. Their values normalized at M2 and remained low until M5. At M8 and M9, a consistent increase of each biomarker was observed in the urine of these animals. Regarding the "5/6 NEF" group, TCP-1 was not detected at D20, but a progressive increase of this protein was observed in this group from M3 to M9. Urine Fetuin-A was detected from M3, and it progressively increased to M8 and M9.

Our results indicate that TCP-1 and fetuin-A can be used as a urinary marker for the follow-up of patients in the period after AKI, to detect eventual persistent alterations in the kidneys, although in a less sensitive way than other markers found in this study, since they only appeared in the "CDDP5-I/R60-I/R60" group. Furthermore, the gradual and sensitive increase in TCP-1 levels found in the "5/6 NEF" group shows its possible application as a marker of progression of kidney damage.

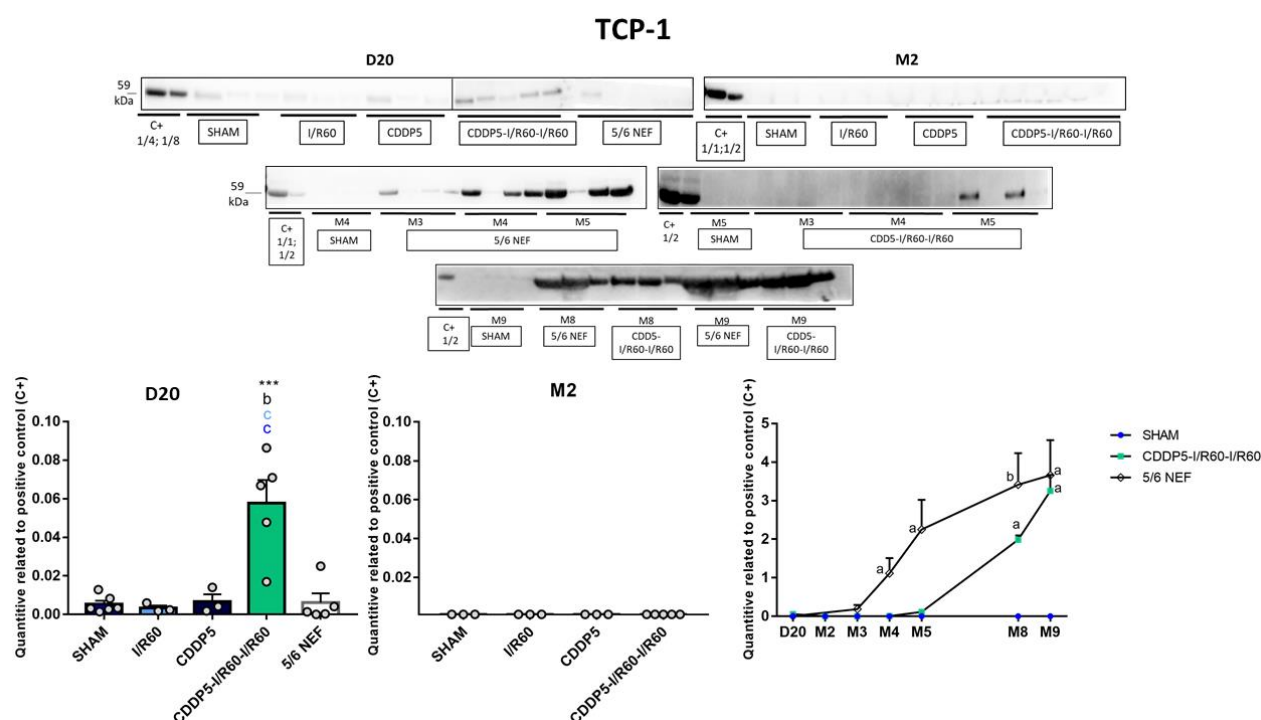


Figure 15 Western blot analysis of TCP-1 during the study period (D4= day 4, D20 = day 20, M=month) in the different experimental groups: "SHAM" group, single damage groups ("I/R60"; "CDDP5"); triple damage group "CDDP5-I/R60-I/R60" and "5/6NEF" group. Values are expressed as mean of the quantity related to positive control $\pm$ SEM. ^a $P < 0,05$; ^b $P < 0,01$; ^c $P < 0,001$ (the colour of the letters a, b and c indicates the experimental group with respect to which the significance refers), ^{*} $p < 0,05$ vs 5/6 NEF; ^{**} $p < 0,01$ vs 5/6 NEF; ^{***} $p < 0,001$ vs 5/6 NEF.

SUMMARY

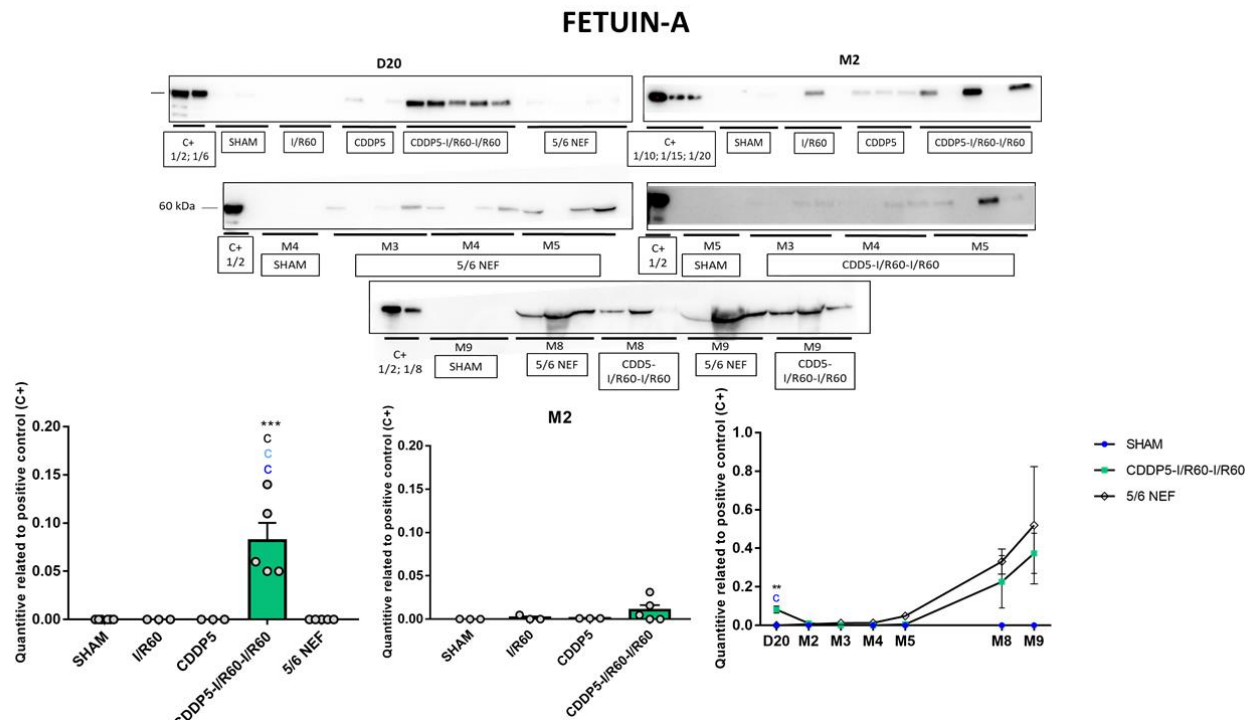


Figure 16: Western blot analysis of fetuin-a during the study (D= day, M=month) in the different experimental groups: 'SHAM' group, single damage groups ('I/R60'; 'CDDP5'); triple damage group 'CDDP5-I/R60-I/R60' and '5/6NEF' group. Values are expressed as mean of the quantity related to positive control $\pm$ SEM. ^a $P < 0,05$; ^b $P < 0,01$; ^c $P < 0,001$ (the colour of the letters a, b and c indicates the experimental group with respect to which the significance refers), ^{*} $p < 0,05$ vs 5/6 NEF; ^{**} $p < 0,01$ vs 5/6 NEF; ^{***} $p < 0,001$ vs 5/6 NEF.

CLUSTERIN

Clusterin or apolipoprotein J is a glycoprotein that was first identified in 1985 in sheep's seminal fluid and that took its name for its promoter activity on in vitro cell aggregation (Blaschuk et al., 1983).

Figure 17 shows that at D20, clusterin urinary excretion was higher in the damage groups "I/R60", "CDDP5", "CDDP5-I/R60-I/R60" with respect to control groups. Clusterin excretion remained elevated in these groups until M2. In the "CDDP5-I/R60-I/R60" group, a greater urinary excretion of clusterin was observed throughout the study. However, in the "5/6 NEF" group, no significant excretion of clusterin was observed, except for the last two months (M8-M9), although it should be noted that high amounts of this protein were only observed in two-thirds of the animals analysed in this group.

Our results demonstrate the usefulness of this biomarker for the detection of structural alterations after AKI, since its excretion seems to be altered in all groups that suffered intrinsic kidney damage (either by administration of a nephrotoxic drug or by induction of ischemia reperfusion) for a long time after exposure

to such damage. However, clusterin did not seem to be an effective marker of CKD progression, since a consistent increase in this protein was not observed in the urine throughout the study in the "CDDP5-I/R60-I/R60" and "5/6 NEF" groups.

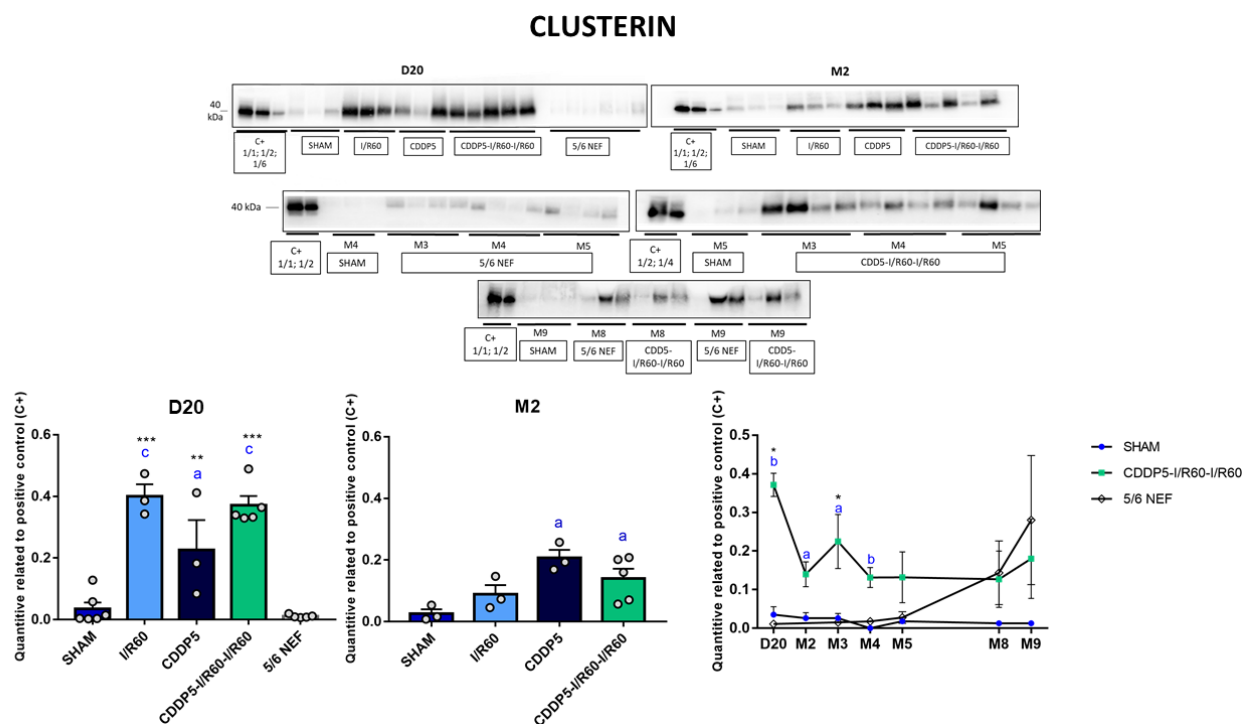


Figure 17: Western blot analysis of clusterin during the study (D4= day 4, D20 = day 20, M=month) in the different experimental groups: "SHAM" group, single damage groups ("I/R60"; "CDDP5"); triple damage group "CDDP5-I/R60-I/R60" and "5/6NEF" group. Values are expressed as mean of the quantity related to positive control $\pm$ SEM. ^a $P < 0,05$; ^b $P < 0,01$; ^c $P < 0,001$ (the colour of the letters a, b and c indicates the experimental group with respect to which the significance refers), ^{*} $p < 0,05$ vs 5/6 NEF; ^{**} $p < 0,01$ vs 5/6 NEF; ^{***} $p < 0,001$ vs 5/6 NEF.

REGIII-B and GM2AP

RegIII-b (regenerating islet-derived protein III β) is a 17 KDa protein, member of the superfamily of calcium-dependent lectins, involved in tissue regeneration in numerous pathological situations such as pancreatitis, liver damage, diabetes and cancer (M. Zhang et al., 2019; Y.-W. Zhang et al., 2003). GM2AP (GM2 activator protein) is an 18–24 KDa cofactor protein of the lysosomal enzyme β -hexosaminidase involved in the conversion reaction of ganglioside GM2 to GM3 (Meier et al., 1991).

In this study, high amounts of urinary RegIII-b and GM2AP were found in the "CDDP5-I/R60-I/R60" group at D20 (Figures 18 and 19). From M2, the excretion of urinary regIIIb and GM2AP was similar to that of the

SUMMARY

controls throughout the study. From M3 to M9, differences in GM2AP excretion were observed in the "5/6 NEF" group (statistically significant only in M5) compared to controls.

Our study shows that the presence of REGIII-B in the urine could be related to a renal regeneration process after AKI, although its absence in the urine could not be related to a complete renal regeneration, since it was not detected in the groups of progressive CKD ("5/6 NEF" and CDDP5-I/R60-I/R60) after M2. GM2AP seems to be a putative biomarker of renal structural sequelae after AKI. However, GM2AP did not seem to be an effective marker of CKD and, above all, of progression of kidney damage, since its excretion did not progressively increase over time and only small differences were detected with respect to the control group.

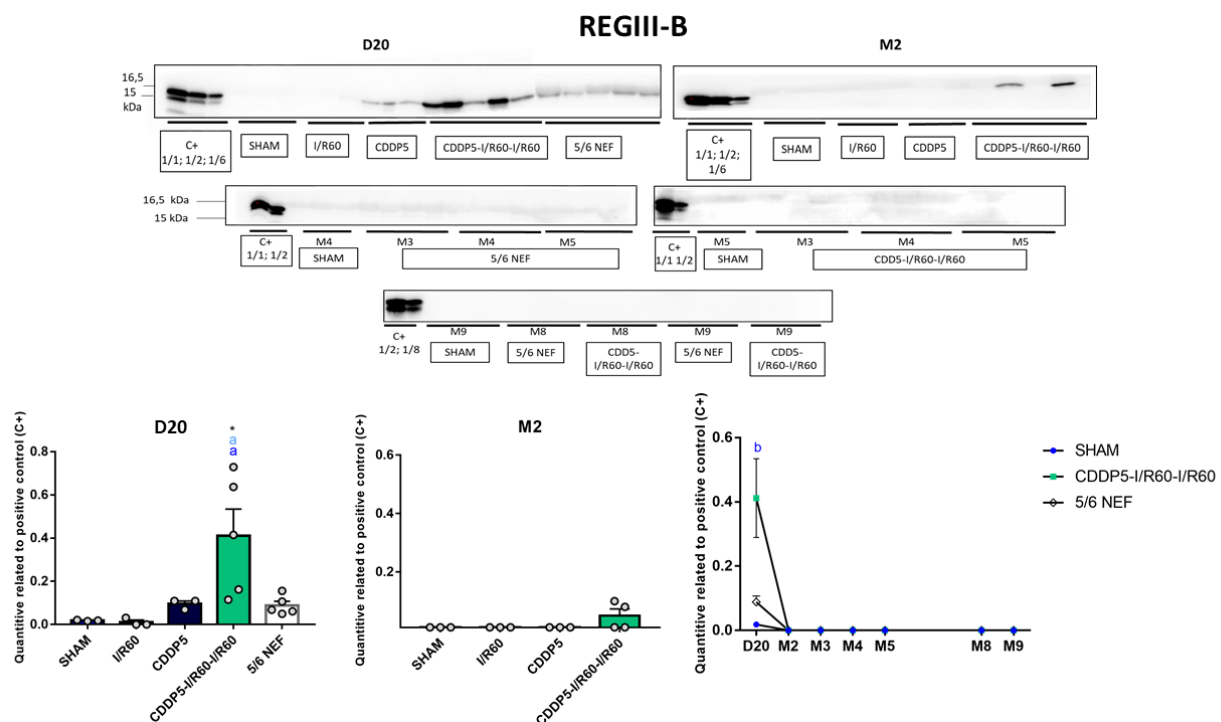


Figure 18: Western blot analysis of RegIII-B during the study (D4= day 4, D20 = day 20, M=month) in the different experimental groups: 'SHAM' group, single damage groups ('I/R60'; 'CDDP5'); triple damage group 'CDDP5-I/R60-I/R60' and '5/6NEF' group. Values are expressed as mean of the quantity related to positive control $\pm$ SEM. ^a $P < 0,05$; ^b $P < 0,01$; ^c $P < 0,001$ (the colour of the letters a, b and c indicates the experimental group with respect to which the significance refers), ^{*} $p < 0,05$ vs 5/6 NEF; ^{**} $p < 0,01$ vs 5/6 NEF; ^{***} $p < 0,001$ vs 5/6 NEF.

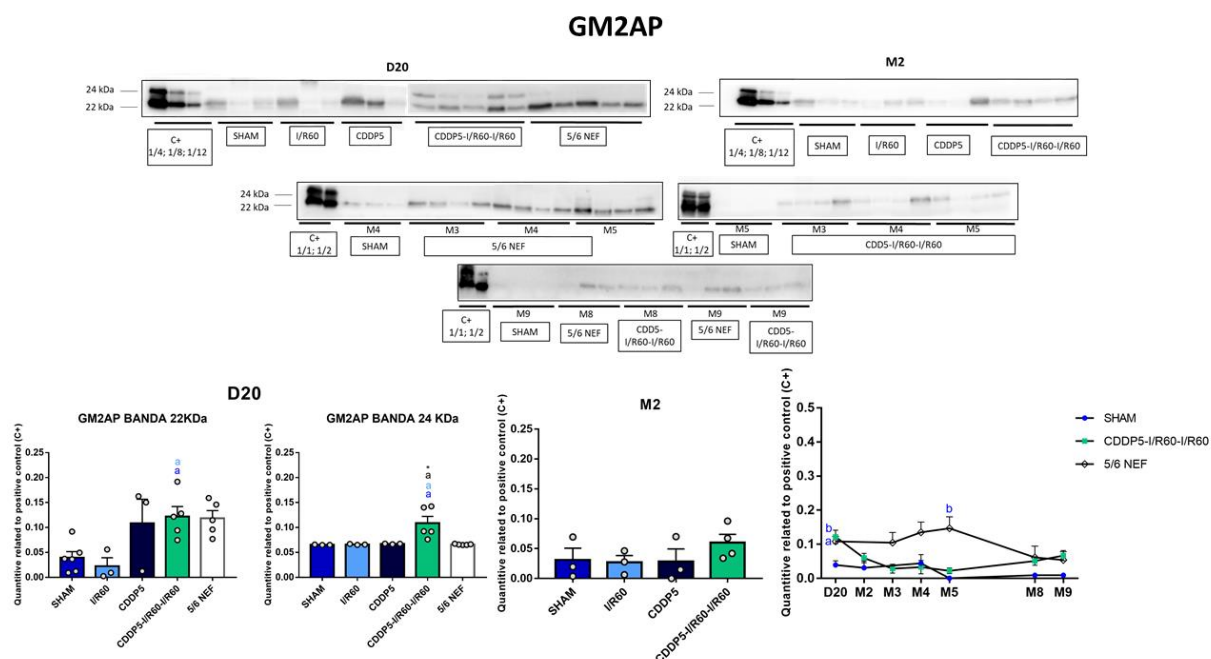
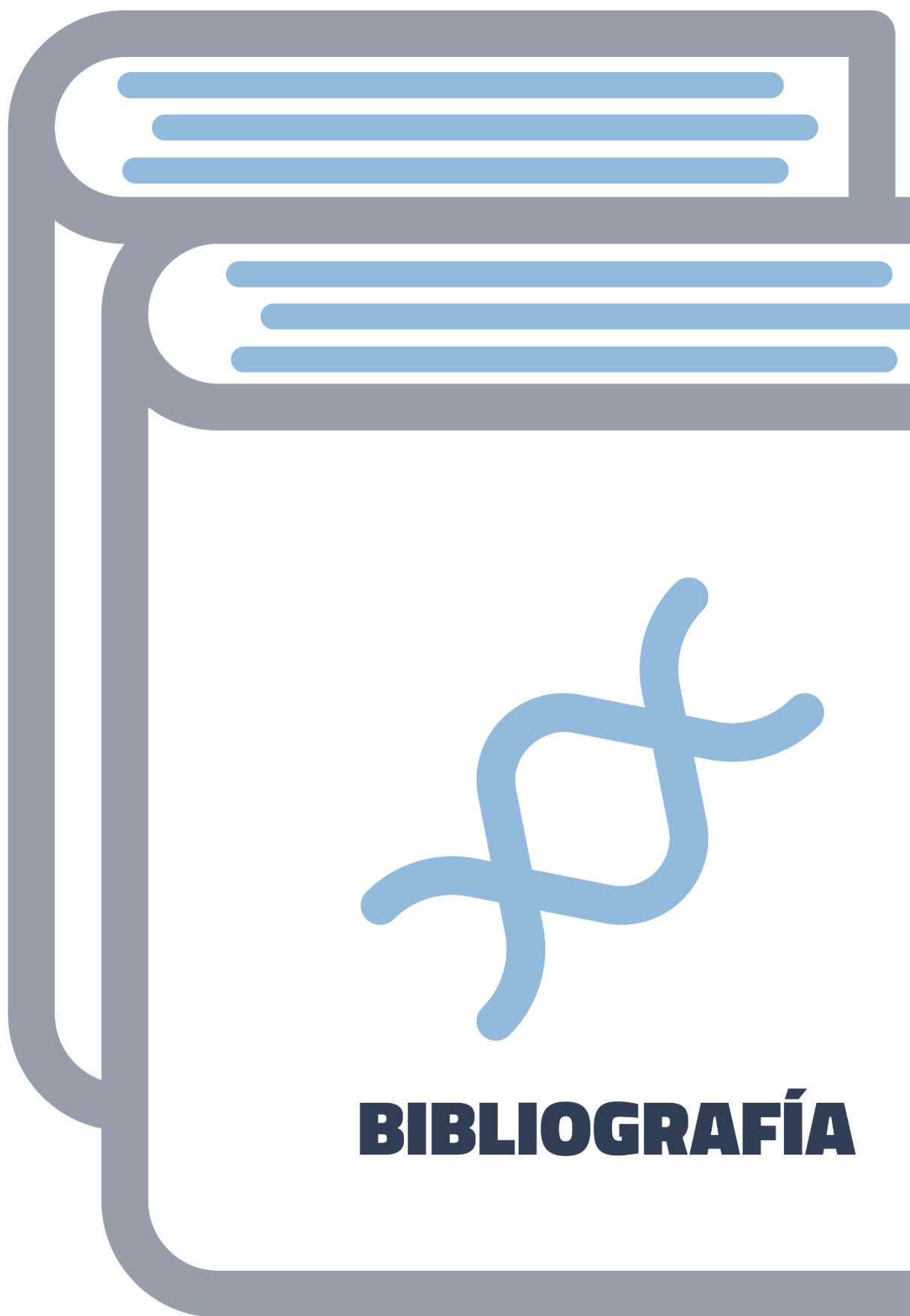


Figure 19: Western blot analysis of GM2AP during the study (D4= day 4, D20 = day 20, M=month) in the different experimental groups: 'SHAM' group, single damage groups ('I/R60'; 'CDDP5'); triple damage group 'CDDP5-I/R60-I/R60' and '5/6NEF' group. Values are expressed as mean of the quantity related to positive control $\pm$ SEM. ^a $P < 0,05$; ^b $P < 0,01$; ^c $P < 0,001$ (the colour of the letters a, b and c indicates the experimental group with respect to which the significance refers), * $p < 0,05$ vs 5/6 NEF; ** $p < 0,01$ vs 5/6 NEF; *** $p < 0,001$ vs 5/6 NEF.

CONCLUSIONS

- We have generated an animal model of CKD caused by repeated episodes of AKI, which reproduces the etiopathological connection between both syndromes demonstrated by epidemiological studies. This model might be useful to investigate the pathophysiological mechanisms of the progression of acute to chronic kidney disease, and to develop diagnostic methods and preventive treatments.
- A urinary marker fingerprint formed by the levels of albumin, clusterin, transferrin, KIM-1, NGAL, fetuin-A, TCP-1-eta, TIMP-2, IGFBP-7, RBP4, RegIII-B and GM2AP that, in the whole, is associated with poor recovery from AKI and with an increased risk of developing CKD in rats.
- Likewise, the permanence of elevated urinary levels of NGAL, TIMP-2 and clusterin is associated with the chronification of renal damage caused by repeated episodes of AKI.



BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Afsar, B., Afsar, R. E., Dagel, T., Kaya, E., Erus, S., Ortiz, A., Covic, A., & Kanbay, M. (2018). Capillary rarefaction from the kidney point of view. *Clinical Kidney Journal*, 11(3), 295–301.
- AHC Research Services - University of Minnesota. (2020). *Anesthesia Guidelines: Rats*. <https://www.researchservices.umn.edu/services-name/research-animal-resources/research-support/guidelines/anesthesia-rats>
- Aldigier, J. C., Kanjanbuch, T., Ma, L. J., Brown, N. J., & Fogo, A. B. (2005). Regression of existing glomerulosclerosis by inhibition of aldosterone. *Journal of the American Society of Nephrology*, 16(11), 3306–3314. <https://doi.org/10.1681/ASN.2004090804>
- Alicic, R. Z., Rooney, M. T., & Tuttle, K. R. (2017). Diabetic Kidney Disease: Challenges, Progress, and Possibilities. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, 12(12), 2032–2045. <https://doi.org/10.2215/CJN.11491116>
- Alobaidi, R., Basu, R. K., Goldstein, S. L., & Bagshaw, S. M. (2015). Sepsis-Associated Acute Kidney Injury. *Seminars in Nephrology*, 35(1), 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2015.01.002>
- Anders, H. J., & Ryu, M. (2011). Renal microenvironments and macrophage phenotypes determine progression or resolution of renal inflammation and fibrosis. *Kidney International*, 80(9), 915–925. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.217>
- Angelotti, M. L., Ronconi, E., Ballerini, L., Peired, A., Mazzinghi, B., Sagrinati, C., Parente, E., Gacci, M., Carini, M., Rotondi, M., Fogo, A. B., Lazzeri, E., Lasagni, L., & Romagnani, P. (2012). Characterization of renal progenitors committed toward tubular lineage and their regenerative potential in renal tubular injury. *Stem Cells*, 30(8), 1714–1725. <https://doi.org/10.1002/stem.1130>
- Antoine, T., Ernesto, M.-M., Cristian, A., Céline, L., Soumaya, E. M., Thorsten, B., W., M. T., Renaud, F., Nicolette, F., Patrick, R., Faiez, Z., Natalia, L.-A., & Frédéric, J. (2015). Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin, a Novel Mineralocorticoid Biotarget, Mediates Vascular Profibrotic Effects of Mineralocorticoids. *Hypertension*, 66(1), 158–166.

BIBLIOGRAFÍA

<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05431>

Apausa Cuesta, C. (2019). *Biomarcadores urinarios para la identificación de las secuelas subclínicas del daño renal agudo y de su recuperación* [Tesis doctoral].

Azuma, H., Nadeau, K., Takada, M., Mackenzie, H. S., & Tilney, N. L. (1997). Cellular and molecular predictors of chronic renal dysfunction after initial ischemia/reperfusion injury of a single kidney. *Transplantation*, 64(2), 190–197. <https://doi.org/10.1097/00007890-199707270-00002>

Bargnoux, A.-S., Kuster, N., Cavalier, E., Piéroni, L., Souweine, J.-S., Delanaye, P., & Cristol, J.-P. (2018). Serum creatinine: advantages and pitfalls. *Journal of Laboratory and Precision Medicine*, 3, 71–71. <https://doi.org/10.21037/jlpm.2018.08.01>

Basile, D. P., Donohoe, D., Roethe, K., & Osborn, J. L. (2001). Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 281, F887–889. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00050.2001>

Basile, David P., Anderson, M. D., & Sutton, T. A. (2012). Pathophysiology of acute kidney injury. *Comprehensive Physiology*, 2(2), 1303–1353. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110041>

Basile, David P., Bonventre, J. V., Mehta, R., Nangaku, M., Unwin, R., Rosner, M. H., Kellum, J. A., Ronco, C., & Work, X. (2016). Progression after AKI : Understanding Maladaptive Repair Processes to Predict and Identify Therapeutic Treatments. *Journal of the American Society of Nephrology*, 27(3), 687–697. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1681/ASN.2015030309>

Baum, N., Dichoso, C. C., & Carlton, C. E. (1975). Blood urea nitrogen and serum creatinine. Physiology and interpretations. *Urology*, 5(5), 583–588. [https://doi.org/10.1016/0090-4295\(75\)90105-3](https://doi.org/10.1016/0090-4295(75)90105-3)

Beck, K., & Brodsky, B. (1998). Supercoiled protein motifs: The collagen triple-helix and the α -helical coiled coil. *Journal of Structural Biology*, 122(1–2), 17–29. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1998.3965>

Beker, B. M., Corleto, M. G., Fieiras, C., & Musso, C. G. (2018). Novel acute kidney injury biomarkers: their characteristics, utility and concerns. In *International Urology and Nephrology* (Vol. 50, Issue 4, pp. 705–713). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s11255-017-1781-x>

- Bellomo, R., Kellum, J. A., & Ronco, C. (2012). Acute kidney injury. *The Lancet*, 380(9843), 756–766. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61454-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61454-2)
- Bellomo, R., Ronco, C., Kellum, J. A., Mehta, R. L., Palevsky, P., & Workgroup, A. (2004). Acute renal failure – definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Critical Care*, 8(4), R204. <https://doi.org/10.1186/cc2872>
- Berger, K., Bangen, J.-M., Hammerich, L., Liedtke, C., Floege, J., Smeets, B., & Moeller, M. J. (2014). Origin of regenerating tubular cells after acute kidney injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(4), 1533–1538. <https://doi.org/10.1073/pnas.1316177111>
- Berger, K., & Moeller, M. J. (2014). Mechanisms of epithelial repair and regeneration after acute kidney injury. *Seminars in Nephrology*, 34(4), 394–403. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2014.06.006>
- Bidani, A. K., & Griffin, K. A. (2004). Pathophysiology of Hypertensive Renal Damage. *Hypertension*, 44(5), 595–601. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000145180.38707.84>
- Blanco-Gozalo, V., Casanova, A. G., Sancho-Martínez, S. M., Prieto, M., Quiros, Y., Morales, A. I., Martínez-Salgado, C., Agüeros-Blanco, C., Benito-Hernández, A., Ramos-Barron, M. A., Gómez-Alamillo, C., Arias, M., & López-Hernández, F. J. (2020). Combined use of GM2AP and TCP1-eta urinary levels predicts recovery from intrinsic acute kidney injury. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68398-0>
- Blaschuk, O., Burdzy, K., & Fritz, I. B. (1983). Purification and characterization of a cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid. *The Journal of Biological Chemistry*, 258(12), 7714–7720.
- Bonventre, J. V. (2009). Kidney injury molecule-1 (KIM-1): A urinary biomarker and much more. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 24(11), 3265–3268. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfp010>
- Bonventre, J. V., Vaidya, V. S., Schmodder, R., Feig, P., & Dieterle, F. (2010). Next-generation biomarkers for detecting kidney toxicity. *Nature Biotechnology*, 28(5), 436–440. <https://doi.org/10.1038/nbt0510->

- Brenner, B. M., Lawler, E. V., & Mackenzie, H. S. (1996). The hyperfiltration theory: A paradigm shift in nephrology. *Kidney International*, 49(6), 1774–1777. <https://doi.org/10.1038/ki.1996.265>
- Brochard, L., Abroug, F., Brenner, M., Broccard, A. F., Danner, R. L., Ferrer, M., Laghi, F., Magder, S., Papazian, L., Pelosi, P., & Polderman, K. H. (2010). An official ATS/ERS/ESICM/SCCM/SRLF statement: Prevention and management of acute renal failure in the ICU patient: An international consensus conference in intensive care medicine. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 181(10), 1128–1155. <https://doi.org/10.1164/rccm.200711-1664ST>
- Bucaloiu, I. D., Kirchner, H. L., Norfolk, E. R., Hartle, J. E., & Perkins, R. M. (2012). Increased risk of death and de novo chronic kidney disease following reversible acute kidney injury. *Kidney International*, 81(5), 477–485. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.405>
- Buonafine, M., Martínez-Martínez, E., Amador, C., Gravez, B., Ibarrola, J., Fernández-Celis, A., El Moghrabi, S., Rossignol, P., López-Andrés, N., & Jaisser, F. (2018). Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin from immune cells is mandatory for aldosterone-induced cardiac remodeling and inflammation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 115, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2017.12.011>
- Buonafine, M., Martinez-Martinez, E., & Jaisser, F. (2018). More than a simple biomarker: the role of NGAL in cardiovascular and renal diseases. *Clinical Science (London, England: 1979)*, 132(9), 909–923. <https://doi.org/10.1042/CS20171592>
- Cairo, G., & Recalcati, S. (2007). Iron-regulatory proteins: Molecular biology and pathophysiological implications. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 9(33), 1–13. <https://doi.org/10.1017/S1462399407000531>
- Calvi, E. N. C., Nahas, F. X., Barbosa, M. V., Calil, J. A., Ihara, S. S. M., Silva, M. de S., de Franco, M. F., & Ferreira, L. M. (2012). Modelo experimental para o estudo de fibras de colágeno no músculo esquelético. *Acta Cirurgica Brasileira*, 27(10), 681–686. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502012001000003>
- Casanova, A. G., Vicente-Vicente, L., Hernández-Sánchez, M. T., Prieto, M., Rihueté, M. I., Ramis, L. M., del

- Barco, E., Cruz, J. J., Ortiz, A., Cruz-González, I., Martínez-Salgado, C., Pescador, M., López-Hernández, F. J., & Morales, A. I. (2020). Urinary transferrin pre-emptively identifies the risk of renal damage posed by subclinical tubular alterations. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 121. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109684>
- Chang-Panesso, M., & Humphreys, B. D. (2017). Cellular plasticity in kidney injury and repair. *Nature Reviews Nephrology*, 13(1), 39–46. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2016.169>
- Chawla, L. S., Bellomo, R., Bihorac, A., Goldstein, S. L., Siew, E. D., Bagshaw, S. M., Bittleman, D., Cruz, D., Endre, Z., Fitzgerald, R. L., Forni, L., Kane-Gill, S. L., Hoste, E., Koyner, J., Liu, K. D., MacEdo, E., Mehta, R., Murray, P., Nadim, M., ... Kellum, J. A. (2017). Acute kidney disease and renal recovery: Consensus report of the Acute Disease Quality Initiative (ADQI) 16 Workgroup. *Nature Reviews Nephrology*, 13(4), 241–257. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.2>
- Chawla, L. S., Eggers, P. W., Star, R. A., & Kimmel, P. L. (2014). Acute kidney injury and chronic kidney disease as interconnected syndromes. *New England Journal of Medicine*, 371(1), 58–66. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1214243>
- Chawla, L. S., & Kimmel, P. L. (2012). Acute kidney injury and chronic kidney disease: An integrated clinical syndrome. *Kidney International*, 82(5), 516–524. <https://doi.org/10.1038/ki.2012.208>
- Chen, T. K., Knicely, D. H., & Grams, M. E. (2019). Chronic Kidney Disease Diagnosis and Management: A Review. *JAMA*, 322(13), 1294–1304. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.14745>
- Chertow, G. M., Burdick, E., Honour, M., Bonventre, J. V., & Bates, D. W. (2005). Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 16(11), 3365–3370. <https://doi.org/10.1681/ASN.2004090740>
- Choudhury, D., & Ahmed, Z. (2006). Drug-associated renal dysfunction and injury. *Nature Clinical Practice Nephrology*, 2(2), 80–91. <https://doi.org/10.1038/ncpneph0076>
- Christensen, E. I., & Birn, H. (2001). Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 280(4), F562–73.

BIBLIOGRAFÍA

<https://doi.org/10.1152/ajprenal.2001.280.4.F562>

- Coca, S. G. (2017). Outcomes and renal function trajectory after acute kidney injury: the narrow road to perdition. *Kidney International*, 92(2), 288–291. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.03.044>
- Coca, S. G., Singanamala, S., & Parikh, C. R. (2012). Chronic kidney disease after acute kidney injury: A systematic review and meta-analysis. In *Kidney International* (Vol. 81, Issue 5, pp. 442–448). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.379>
- Coca, S. G., Yusuf, B., Shlipak, M. G., Garg, A. X., & Parikh, C. R. (2009). Long-term Risk of Mortality and Other Adverse Outcomes After Acute Kidney Injury: A Systematic Review and Meta-analysis. *American Journal of Kidney Diseases*, 53(6), 961–973. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2008.11.034>
- Cockcroft, D. W., & Gault, M. H. (1976). Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron*, 16(1), 31–41. <https://doi.org/10.1159/000180580>
- Coelho, S., Cabral, G., Lopes, J. A., & Jacinto, A. (2018). Renal regeneration after acute kidney injury. *Nephrology*, 23(9), 805–814. <https://doi.org/10.1111/nep.13256>
- Comper, W. D., & Glasgow, E. F. (1995). Charge selectivity in kidney ultrafiltration. *Kidney International*, 47(5), 1242–1251. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/ki.1995.178>
- Corley, R. B. (2005). *A guide to methods in the Biomedical sciences* (1 era). Springer.
- Couser, W. G., Remuzzi, G., Mendis, S., & Tonelli, M. (2011). The contribution of chronic kidney disease to the global burden of major noncommunicable diseases. *Kidney International*, 80(12), 1258–1270. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.368>
- Dasari, S., & Tchounwou, P. B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 740, 364–378. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>
- De Matteis, M. A., Staiano, L., Emma, F., & Devuyst, O. (2017). The 5-phosphatase OCRL in Lowe syndrome and Dent disease 2. *Nature Reviews Nephrology*, 13(8), 455–470. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.83>

- De Nicola, L., Peterson, O. W., Obagi, S., Kaiser, J. A., Wilson, C. B., & Gabbai, F. B. (1994). Renal functional reserve in experimental chronic glomerulonephritis. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 9(10), 1383–1389. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.ndt.a092660>
- De Rosa, S., Samoni, S., & Ronco, C. (2016). Creatinine-based definitions: From baseline creatinine to serum creatinine adjustment in intensive care. *Critical Care*, 20(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1218-4>
- Decramer, S., de Peredo, A. G., Breuil, B., Mischak, H., Monsarrat, B., Bascands, J. L., & Schanstra, J. P. (2008). Urine in clinical proteomics. *Molecular and Cellular Proteomics*, 7(10), 1850–1862. <https://doi.org/10.1074/mcp.R800001-MCP200>
- Delbridge, M. S., Shrestha, B. M., Raftery, A. T., El Nahas, A. M., & Haylor, J. L. (2007). The Effect of Body Temperature in a Rat Model of Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *Transplantation Proceedings*, 39(10), 2983–2985. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2007.04.028>
- Devarajan, P. (2011). Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. *Current Opinion in Pediatrics*, 23(2), 194–200. <https://doi.org/10.1097/MOP.0b013e328343f4dd>
- Devarajan, P., & Jefferies, J. L. (2016). Progression of chronic kidney disease after acute kidney injury. *Progress in Pediatric Cardiology*, 41, 33–40. <https://doi.org/10.1016/J.PPEDCARD.2015.12.006>
- Devireddy, L. R., Gazin, C., Zhu, X., & Green, M. R. (2005). A cell-surface receptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and iron uptake. *Cell*, 123(7), 1293–1305. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.027>
- Dewitte, A., Joannès-Boyau, O., Sidobre, C., Fleureau, C., Bats, M. L., Derache, P., Leuillet, S., Ripoche, J., Combe, C., & Ouattara, A. (2015). Kinetic eGFR and novel AKI biomarkers to predict renal recovery. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 10(11), 1900–1910. <https://doi.org/10.2215/CJN.12651214>
- Dieterle, F., Sistare, F., Goodsaid, F., Papaluca, M., Ozer, J. S., Webb, C. P., Baer, W., Senagore, A., Schipper, M. J., Vonderscher, J., Sultana, S., Gerhold, D. L., Phillips, J. A., Maurer, G., Carl, K., Laurie, D., Harpur, E.,

BIBLIOGRAFÍA

- Sonee, M., Ennulat, D., ... Mattes, W. (2010). Renal biomarker qualification submission: A dialog between the FDA-EMEA and Predictive Safety Testing Consortium. *Nature Biotechnology*, 28(5), 455–462. <https://doi.org/10.1038/nbt.1625>
- Dirkes, S. M. (2016). Acute kidney injury vs acute renal failure. *Critical Care Nurse*, 36(6), 75–76. <https://doi.org/10.4037/ccn2016170>
- Dixon Thomas, Seeba Zachariah, Abdelgadir Elamin Eltom, A. L. O. (2017). Limitations of serum creatinine as a marker of renal function. *Scholars Academic Journal of Pharmacy*, 6(5), 168–170. <https://doi.org/10.21276/sajp>
- Duffield, J. S. (2014). Cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 124, Issue 6, pp. 2299–2306). American Society for Clinical Investigation. <https://doi.org/10.1172/JCI72267>
- Duffield, J. S., Park, K. M., Hsiao, L.-L. L., Kelley, V. R., Scadden, D. T., Ichimura, T., & Bonventre, J. V. (2005). Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells. *Journal of Clinical Investigation*, 115(7), 1743–1755. <https://doi.org/10.1172/JCI22593>
- Edelstein, C. L. (2008). Biomarkers of Acute Kidney Injury. *Advances in Chronic Kidney Disease*, 15(3), 222–234. <https://doi.org/10.1053/j.ackd.2008.04.003>
- El Nahas, A. M., & Bello, A. K. (2005). Chronic kidney disease: the global challenge. *The Lancet*, 365(9456), 331–340. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)17789-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)17789-7)
- Emeigh Hart, S. G. (2005). Assessment of renal injury in vivo. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 52(1), 30–45. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2005.04.006>
- Endre, Zoltán H. (2018). Assessing Renal Recovery after Acute Kidney Injury: Can Biomarkers Help? *Nephron*, 140(2), 86–89. <https://doi.org/10.1159/000492290>
- Endre, Zoltan H. (2014). Recovery from acute kidney injury: The role of biomarkers. *Nephron - Clinical Practice*, 127(1–4), 101–105. <https://doi.org/10.1159/000363678>

- Engvall, E., & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), 871–874. [https://doi.org/10.1016/0019-2791\(71\)90454-X](https://doi.org/10.1016/0019-2791(71)90454-X)
- Ernesto, M.-M., Mathieu, B., Ines, B., Jaime, I., Amaya, F.-C., Peter, K., Patrick, R., Nicolas, G., Paul, M., Natalia, L.-A., Antoine, O.-P., & Frédéric, J. (2017). Aldosterone Target NGAL (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin) Is Involved in Cardiac Remodeling After Myocardial Infarction Through NFκB Pathway. *Hypertension*, 70(6), 1148–1156. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09791>
- Fan, W., Ankawi, G., Zhang, J., Digvijay, K., Giavarina, D., Yin, Y., & Ronco, C. (2019). Current understanding and future directions in the application of TIMP-2 and IGFBP7 in AKI clinical practice. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 57(5), 567–576. <https://doi.org/10.1515/cclm-2018-0776>
- Feinfeld, D. A., & Danovitch, G. M. (1987). Factors Affecting Urine volume in Chronic Renal Failure. *American Journal of Kidney Diseases*, 10(3), 231–235. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0272-6386\(87\)80179-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0272-6386(87)80179-8)
- Ferenbach, D. A., & Bonventre, J. V. (2015). Mechanisms of maladaptive repair after AKI leading to accelerated kidney ageing and CKD. *Nature Reviews Nephrology*, 11(5), 264–276. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2015.3>
- Ferreira, L., Quiros, Y., Sancho-Martínez, S. M., García-Sánchez, O., Raposo, C., López-Novoa, J. M., González-Buitrago, J. M., & López-Hernández, F. J. (2011). Urinary levels of regenerating islet-derived protein III β and gelsolin differentiate gentamicin from cisplatin-induced acute kidney injury in rats. *Kidney International*, 79(5), 518–528. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.439>
- Fiorentino, M., Grandaliano, G., Gesualdo, L., & Castellano, G. (2018). Acute Kidney Injury to Chronic Kidney Disease Transition. *Contributions to Nephrology*, 193, 45–54. <https://doi.org/10.1159/000484962>
- Fioretto, P., Steffes, M. W., Sutherland, D. E. R., Goetz, F. C., & Mauer, M. (1998). Reversal of Lesions of Diabetic Nephropathy after Pancreas Transplantation. *New England Journal of Medicine*, 339(2), 69–75. <https://doi.org/10.1056/NEJM199807093390202>

BIBLIOGRAFÍA

- Fogo, A. B. (2007). Mechanisms of progression of chronic kidney disease. *Pediatric Nephrology*, 22(12), 2011–2022. <https://doi.org/10.1007/s00467-007-0524-0>
- Forni, L. G., Darmon, M., Ostermann, M., Oudemans-van Straaten, H. M., Pettilä, V., Prowle, J. R., Schetz, M., & Joannidis, M. (2017). Renal recovery after acute kidney injury. *Intensive Care Medicine*, 43(6), 855–866. <https://doi.org/10.1007/s00134-017-4809-x>
- Fortrie, G., De Geus, H. R. H., & Betjes, M. G. H. (2019). The aftermath of acute kidney injury: A narrative review of long-term mortality and renal function. *Critical Care*, 23(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s13054-019-2314-z>
- Fu, Y., Tang, C., Cai, J., Chen, G., Zhang, D., & Dong, Z. (2018). Rodent models of AKI-CKD transition. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 315(4), F1098–F1106. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00199.2018>
- Fuchs, T. C., Frick, K., Emde, B., Czasch, S., von Landenberg, F., & Hewitt, P. (2012). Evaluation of novel acute urinary rat kidney toxicity biomarker for subacute toxicity studies in preclinical trials. *Toxicologic Pathology*, 40(7), 1031–1048. <https://doi.org/10.1177/0192623312444618>
- Fukuda, M., Motokawa, M., Miyagi, S., Sengo, K., Muramatsu, W., Kato, N., Usami, T., Yoshida, A., & Kimura, G. (2006). Polynocturia in chronic kidney disease is related to natriuresis rather than to water diuresis. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 21(8), 2172–2177. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfl165>
- Gava, A. L., Freitas, F. P., Balarini, C. M., Vasquez, E. C., & Meyrelles, S. S. (2012). Effects of 5/6 nephrectomy on renal function and blood pressure in mice. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*, 4(3), 167–173. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23071874>
- Göcze, I., Wiesner, C., Schlitt, H. J., & Bergler, T. (2017). Renal recovery. *Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology*, 31(3), 403–414. <https://doi.org/10.1016/j.bpa.2017.08.006>
- Goldstein, S. L., Chawla, L., Ronco, C., & Kellum, J. A. (2014). Renal recovery. *Critical Care (London, England)*, 18(1), 301. <https://doi.org/10.1186/cc13180>
- Gomme, P. T., McCann, K. B., & Bertolini, J. (2005). Transferrin: structure, function and potential therapeutic

- actions. *Drug Discovery Today*, 10(4), 267–273. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(04\)03333-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1359-6446(04)03333-1)
- Gonca, E. (2015). Comparison of thiopental and ketamine+xylazine anesthesia in ischemia/reperfusion-induced arrhythmias in rats. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 45(6), 1413–1420. <https://doi.org/10.3906/sag-1403-25>
- Gonzalez-Calero, L., Martin-Lorenzo, M., Ramos-Barron, A., Ruiz-Criado, J., Maroto, A. S., Ortiz, A., Gomez-Alamillo, C., Arias, M., Vivanco, F., & Alvarez-Llamas, G. (2016). Urinary Kininogen-1 and Retinol binding protein-4 respond to Acute Kidney Injury: predictors of patient prognosis? *Scientific Reports*, 6, 19667. <https://doi.org/10.1038/srep19667>
- Gorriz, J. L., & Martinez-Castelao, A. (2012). Proteinuria: Detection and role in native renal disease progression. *Transplantation Reviews*, 26(1), 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.trre.2011.10.002>
- Griffin, B. R., You, Z., Noureddine, L., Gitomer, B., Perrenoud, L., Wang, W., Chonchol, M., & Jalal, D. (2020). KIM-1 and Kidney Disease Progression in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: HALT-PKD Results. *American Journal of Nephrology*, 51(6), 473–479. <https://doi.org/10.1159/000508051>
- Griffin, K. A. (2017). Hypertensive Kidney Injury and the Progression of Chronic Kidney Disease. *Hypertension*, 70(4), 687–694. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.08314>
- Griffin, K. A., & Bidani, A. K. (2006). Progression of Renal Disease: Renoprotective Specificity of Renin-Angiotensin System Blockade. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 1(5), 1054 LP – 1065. <https://doi.org/10.2215/CJN.02231205>
- Griffin, K. A., Picken, M. M., & Bidani, A. K. (2004). Blood pressure lability and glomerulosclerosis after normotensive 5/6 renal mass reduction in the rat. *Kidney International*, 65(1), 209–218. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00356.x>
- Guan, Y., Nakano, D., Zhang, Y., Li, L., Tian, Y., & Nishiyama, A. (2019). A mouse model of renal fibrosis to overcome the technical variability in ischaemia/reperfusion injury among operators. *Scientific Reports*, 9(1), 10435. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46994-z>

BIBLIOGRAFÍA

- Guo, J., Guan, Q., Liu, X., Wang, H., Gleave, M. E., Nguan, C. Y. C., & Du, C. (2016). Relationship of clusterin with renal inflammation and fibrosis after the recovery phase of ischemia-reperfusion injury. *BMC Nephrology*, 17(1), 133. <https://doi.org/10.1186/s12882-016-0348-x>
- Hadi, A. M., Mouchaers, K. T. B., Schaliij, I., Grunberg, K., Meijer, G. A., Vonk-Noordegraaf, A., Van Der Laarse, W. J., & Beliën, J. A. M. (2011). Rapid quantification of myocardial fibrosis: A new macro-based automated analysis. *Cellular Oncology*, 34(4), 343–354. <https://doi.org/10.1007/s13402-011-0035-7>
- Han, W. K., Alinani, A., Wu, C.-L., Michaelson, D., Loda, M., McGovern, F. J., Thadhani, R., & Bonventre, J. V. (2005). Human kidney injury molecule-1 is a tissue and urinary tumor marker of renal cell carcinoma. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 16(4), 1126–1134. <https://doi.org/10.1681/ASN.2004070530>
- Han, W. K., Bailly, V., Abichandani, R., Thadhani, R., & Bonventre, J. V. (2002). Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): A novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney International*, 62(1), 237–244. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2002.00433.x>
- Hanif, M. O., & Ramphul, K. (2018). Renal Tubular Necrosis, Acute. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Hansen, M. K., Gammelager, H., Mikkelsen, M. M., Hjortdal, V. E., Layton, J. B., Johnsen, S. P., & Christiansen, C. F. (2013). Post-operative acute kidney injury and five-year risk of death, myocardial infarction, and stroke among elective cardiac surgical patients: A cohort study. *Critical Care*, 17(6), R292. <https://doi.org/10.1186/cc13158>
- Hansson, J., Hultenby, K., Cramnert, C., Pontén, F., Jansson, H., Lindgren, D., Axelson, H., & Johansson, M. E. (2014). Evidence for a morphologically distinct and functionally robust cell type in the proximal tubules of human kidney. *Human Pathology*, 45(2), 382–393. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2013.10.003>
- Hersey-Benner, C., & Mayer, J. (2012). Creatinine. *Clinical Veterinary Advisor: Birds and Exotic Pets*, 615–615. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-3969-3.00357-7>

- Heung, M., Steffick, D. E., Zivin, K., Gillespie, B. W., Banerjee, T., Hsu, C. Y., Powe, N. R., Pavkov, M. E., Williams, D. E., Saran, R., & Shahinian, V. B. (2016). Acute Kidney Injury Recovery Pattern and Subsequent Risk of CKD: An Analysis of Veterans Health Administration Data. *American Journal of Kidney Diseases*, 67(5), 742–752. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2015.10.019>
- Ho, G. Y., Woodward, N., & Coward, J. I. G. (2016). Cisplatin versus carboplatin: Comparative review of therapeutic management in solid malignancies. In *Critical Reviews in Oncology/Hematology* (Vol. 102, pp. 37–46). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.03.014>
- Hoste, E. A. J., Bagshaw, S. M., Bellomo, R., Cely, C. M., Colman, R., Cruz, D. N., Edipidis, K., Forni, L. G., Gomersall, C. D., Govil, D., Honoré, P. M., Joannes-Boyau, O., Joannidis, M., Korhonen, A. M., Lavrentieva, A., Mehta, R. L., Palevsky, P., Roessler, E., Ronco, C., ... Kellum, J. A. (2015). Epidemiology of acute kidney injury in critically ill patients: the multinational AKI-EPI study. *Intensive Care Medicine*, 41(8), 1411–1423. <https://doi.org/10.1007/s00134-015-3934-7>
- Hoste, E. A. J., Kellum, J. A., Selby, N. M., Zarbock, A., Palevsky, P. M., Bagshaw, S. M., Goldstein, S. L., Cerdá, J., & Chawla, L. S. (2018). Global epidemiology and outcomes of acute kidney injury. In *Nature Reviews Nephrology* (Vol. 14, Issue 10, pp. 607–625). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41581-018-0052-0>
- Hosten, A. O. (1990). *BUN and Creatinine*. (H. K. Walker, W. D. Hall, & J. W. Hurst (eds.)).
- Hostetter, T. H., Olson, J. L., Rennke, H. G., Venkatachalam, M. A., & Brenner, B. M. (1981). Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. *The American Journal of Physiology*, 241(1), F85–93. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1981.241.1.F85>
- Hostetter, T. H., Olson, J. L., Rennke, H. G., Venkatachalam, M. A., & Brenner, B. M. (2001). Hyperfiltration in remnant nephrons: A potentially adverse response to renal ablation. In *Journal of the American Society of Nephrology* (Vol. 12, Issue 6, pp. 1315–1325). American Physiological Society Bethesda, MD . <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1981.241.1.f85>
- Huls, M., Russel, F. G. M., & Masereeuw, R. (2008). Insights into the role of bone marrow-derived stem cells in renal repair. *Kidney and Blood Pressure Research*, 31(2), 104–110.

BIBLIOGRAFÍA

<https://doi.org/10.1159/000121387>

- Humphreys, B. D., Cantaluppi, V., Portilla, D., Singbartl, K., Yang, L., Rosner, M. H., Kellum, J. A., & Ronco, C. (2016). Targeting Endogenous Repair Pathways after AKI. *J Am Soc Nephrol*, 27, 990–998. <https://doi.org/10.1681/ASN.2015030286>
- Humphreys, B. D., Czerniak, S., DiRocco, D. P., Hasnain, W., Cheema, R., & Bonventre, J. V. (2011). Repair of injured proximal tubule does not involve specialized progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(22), 9226–9231. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100629108>
- Humphreys, B. D., Xu, F., Sabbisetti, V., Grgic, I., Naini, S. M., Wang, N., Chen, G., Xiao, S., Patel, D., Henderson, J. M., Ichimura, T., Mou, S., Soeung, S., McMahon, A. P., Kuchroo, V. K., & Bonventre, J. V. (2013). Chronic epithelial kidney injury molecule-1 expression causes murine kidney fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*, 123(9), 4023–4035. <https://doi.org/10.1172/JCI45361>
- Ichimura, T., Bonventre, J. V., Bailly, V., Wei, H., Hession, C. A., Cate, R. L., & Sanicola, M. (1998). Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(7), 4135–4142.
- Ichimura, Takaharu, Hung, C. C., Yang, S. A., Stevens, J. L., & Bonventre, J. V. (2004). Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 286(3), F552–63. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00285.2002>
- Inker, L. A., Levey, A. S., Pandya, K., Stoycheff, N., Okparavero, A., & Greene, T. (2014). Early change in proteinuria as a surrogate end point for kidney disease progression: An individual patient meta-analysis. *American Journal of Kidney Diseases*, 64(1), 74–85. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2014.02.020>
- Inoue, K., Wada, J., Eguchi, J., Nakatsuka, A., Teshigawara, S., Murakami, K., Ogawa, D., Terami, T., Katayama, A., Tone, A., Iseda, I., Hida, K., Yamada, M., Ogawa, T., & Makino, H. (2013). Urinary fetuin-A is a novel marker for diabetic nephropathy in type 2 diabetes identified by lectin microarray. *PloS One*, 8(10),

e77118. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077118>

- Ishani, A., Xue, J. L., Himmelfarb, J., Eggers, P. W., Kimmel, P. L., Molitoris, B. A., & Collins, A. J. (2009). Acute kidney injury increases risk of ESRD among elderly. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(1), 223–228. <https://doi.org/10.1681/ASN.2007080837>
- Jefferson, J. A., Shankland, S. J., & Pichler, R. H. (2008). Proteinuria in diabetic kidney disease: a mechanistic viewpoint. *Kidney International*, 74(1), 22–36. <https://doi.org/10.1038/ki.2008.128>
- Jeong, J. S., Kim, D., Kim, K. Y., Ryu, S., Han, S., Shin, B. S., Kim, G. S., Gwak, M. S., & Ko, J. S. (2017). Ischemic Preconditioning Produces Comparable Protection Against Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury Under Isoflurane and Sevoflurane Anesthesia in Rats. *Transplantation Proceedings*, 49(9), 2188–2193. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2017.07.002>
- Johnson, A. C. M., & Zager, R. A. (2018). Mechanisms underlying increased TIMP2 and IGFBP7 urinary excretion in experimental AKI. *Journal of the American Society of Nephrology*, 29(8), 2157–2167. <https://doi.org/10.1681/ASN.2018030265>
- Johnson, R. P., Fleming, A. M., Burrows, C. J., & White, H. S. (2014). Effect of an electrolyte cation on detecting DNA damage with the latch constriction of α -hemolysin. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 5(21), 3781–3786. <https://doi.org/10.1021/jz502030e>
- Jun, J. Il, & Lau, L. F. (2018). Resolution of organ fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*, 128(1), 97–107. <https://doi.org/10.1172/JCI93563>
- Jung, D., Biggs, H., Erikson, J., & Ledyard, P. U. (1975). New Colorimetric reaction for end-point, continuous-flow, and kinetic measurement of urea. *Clinical Chemistry*, 21(8), 1136–1140.
- Jung, G.-S., Jeon, J.-H., Jung, Y.-A., Choi, Y.-K., Kim, H.-S., Kim, J.-G., Park, K.-G., Kim, M.-K., & Lee, I.-K. (2014). Clusterin/apolipoprotein J attenuates angiotensin II-induced renal fibrosis. *PloS One*, 9(8), e105635. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105635>
- Jung, G.-S., Kim, M.-K., Jung, Y.-A., Kim, H.-S., Park, I.-S., Min, B.-H., Lee, K.-U., Kim, J.-G., Park, K.-G., & Lee, I.-K. (2012). Clusterin attenuates the development of renal fibrosis. *Journal of the American Society of*

BIBLIOGRAFÍA

- Nephrology: JASN*, 23(1), 73–85. <https://doi.org/10.1681/ASN.2011010048>
- Kale, S., Karihaloo, A., Clark, P. R., Kashgarian, M., Krause, D. S., & Cantley, L. G. (2003). Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule. *Journal of Clinical Investigation*, 112(1), 42–49. <https://doi.org/10.1172/JCI17856>
- Kamiyama, M., Urushihara, M., Morikawa, T., Konishi, Y., Imanishi, M., Nishiyama, A., & Kobori, H. (2013). Oxidative Stress/Angiotensinogen/Renin-Angiotensin System Axis in Patients with Diabetic Nephropathy. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 14, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/ijms141123045>
- Kang, H. M., Huang, S., Reidy, K., Han, S. H., Chinga, F., & Susztak, K. (2016). Sox9-Positive Progenitor Cells Play a Key Role in Renal Tubule Epithelial Regeneration in Mice. *Cell Reports*, 14(4), 861–871. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.12.071>
- Karin, M., & Clevers, H. (2016). Reparative inflammation takes charge of tissue regeneration. *Nature*, 529(7586), 307–315. <https://doi.org/10.1038/nature17039>
- Kashani, K., Al-Khafaji, A., Ardiles, T., Artigas, A., Bagshaw, S. M., Bell, M., Bihorac, A., Birkhahn, R., Cely, C. M., Chawla, L. S., Davison, D. L., Feldkamp, T., Forni, L. G., Gong, M. N., Gunnerson, K. J., Haase, M., Hackett, J., Honore, P. M., Hoste, E. A. J., ... Kellum, J. A. (2013). Discovery and validation of cell cycle arrest biomarkers in human acute kidney injury. *Critical Care*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/cc12503>
- Kashani, K., & Kellum, J. A. (2015). Novel biomarkers indicating repair or progression after acute kidney injury. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 24(1), 21–27. <https://doi.org/10.1097/MNH.0000000000000090>
- Kawabata, H. (2019). Transferrin and transferrin receptors update. *Free Radical Biology and Medicine*, 133, 46–54. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.037>
- Kellum, J. A., Lameire, N., Aspelin, P., Barsoum, R. S., Burdmann, E. A., Goldstein, S. L., Herzog, C. A., Joannidis, M., Kribben, A., Levey, A. S., MacLeod, A. M., Mehta, R. L., Murray, P. T., Naicker, S., Opal, S. M., Schaefer, F., Schetz, M., & Uchino, S. (2012). Kidney disease: Improving global outcomes (KDIGO) acute kidney

- injury work group. KDIGO clinical practice guideline for acute kidney injury. *Kidney International Supplements*, 2(1), 1–138. <https://doi.org/10.1038/kisup.2012.1>
- Kellum, J. A., Levin, N., Bouman, C., & Lameire, N. (2002). Developing a consensus classification system for acute renal failure. *Current Opinion in Critical Care*, 8(6), 509–514. <https://doi.org/10.1097/00075198-200212000-00005>
- Kellum, J. A., Sileanu, F. E., Bihorac, A., Hoste, E. A. J., & Chawla, L. S. (2017). Recovery after acute kidney injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 195(6), 784–791. <https://doi.org/10.1164/rccm.201604-0799OC>
- Kellum, J. a, Lameire, N., Aspelin, P., Barsoum, R. S., Burdmann, E. a, Goldstein, S. L., Herzog, C. a, Joannidis, M., Kribben, A., Levey, A. S., MacLeod, A. M., Mehta, R. L., Murray, P. T., Naicker, S., Opal, S. M., Schaefer, F., Schetz, M., & Uchino, S. (2012). KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney International Supplements*, 2(1), 1–138. <https://doi.org/10.1038/kisup.2012.7>
- Kelly, M. S., Lewis, J., Huntsberry, A. M., Dea, L., & Portillo, I. (2019). Efficacy and renal outcomes of SGLT2 inhibitors in patients with type 2 diabetes and chronic kidney disease. *Postgraduate Medicine*, 131(1), 31–42. <https://doi.org/10.1080/00325481.2019.1549459>
- Ko, G. J., Grigoryev, D. N., Linfert, D., Jang, H. R., Watkins, T., Cheadle, C., Racusen, L., & Rabb, H. (2010). Transcriptional analysis of kidneys during repair from AKI reveals possible roles for NGAL and KIM-1 as biomarkers of AKI-to-CKD transition. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 298(6). <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00619.2009>
- Koide, T. (2007). Designed triple-helical peptides as tools for collagen biochemistry and matrix engineering. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 362(1484), 1281–1291. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2115>
- Kolh, P. (2009). Renal insufficiency after cardiac surgery: a challenging clinical problem. *European Heart Journal*, 30(15), 1824–1827. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehp282>
- Koza, Y. (2014). Acute kidney injury: Current concepts and new insights. *Journal of Injury and Violence*

BIBLIOGRAFÍA

- Research*, 8(1), 58–62. <https://doi.org/10.5249/jivr.v8i1.610>
- Kramann, R., Kusaba, T., & Humphreys, B. D. (2015). Who regenerates the kidney tubule? In *Nephrology Dialysis Transplantation* (Vol. 30, Issue 6, pp. 903–910). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfu281>
- Krawczyk, K. (2018). *Role of tubular scattered cells of the kidney in disease and regeneration* [Tesis doctoral]. Universidad de Lund.
- Ku, E., Lee, B. J., Wei, J., & Weir, M. R. (2019). Hypertension in CKD: Core Curriculum 2019. *American Journal of Kidney Diseases: The Official Journal of the National Kidney Foundation*, 74(1), 120–131. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2018.12.044>
- Kumar, S. (2018). Cellular and molecular pathways of renal repair after acute kidney injury. *Kidney International*, 93(1), 27–40. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.07.030>
- Kumar, S., Liu, J., Pang, P., Krautzberger, A. M., Reginensi, A., Akiyama, H., Schedl, A., Humphreys, B. D., & McMahon, A. P. (2015). Sox9 Activation Highlights a Cellular Pathway of Renal Repair in the Acutely Injured Mammalian Kidney. *Cell Reports*, 12(8), 1325–1338. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.034>
- Kurien, B. T., Everds, N. E., & Scofield, R. H. (2004). Experimental animal urine collection: A review. In *Laboratory Animals* (Vol. 38, Issue 4, pp. 333–361). SAGE PublicationsSage UK: London, England. <https://doi.org/10.1258/0023677041958945>
- Kurzhausen, J. T., Dellepiane, S., Cantaluppi, V., & Rabb, H. (2020). AKI: an increasingly recognized risk factor for CKD development and progression. *Journal of Nephrology*, 33(6), 1171–1187. <https://doi.org/10.1007/s40620-020-00793-2>
- Kusaba, T., & Humphreys, B. D. (2014). Controversies on the origin of proliferating epithelial cells after kidney injury. *Pediatric Nephrology*, 29(4), 673–679. <https://doi.org/10.1007/s00467-013-2669-3>
- Kusaba, T., Lalli, M., Kramann, R., Kobayashi, A., & Humphreys, B. D. (2014). Differentiated kidney epithelial cells repair injured proximal tubule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*

of America, 111(4), 1527–1532. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310653110>

Kuwabara, T., Mori, K., Mukoyama, M., Kasahara, M., Yokoi, H., Saito, Y., Yoshioka, T., Ogawa, Y., Imamaki, H., Kusakabe, T., Ebihara, K., Omata, M., Satoh, N., Sugawara, A., Barasch, J., & Nakao, K. (2009). Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels reflect damage to glomeruli, proximal tubules, and distal nephrons. *Kidney International*, 75(3), 285–294. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/ki.2008.499>

Lai, T. S., Wang, C. Y., Pan, S. C., Huang, T. M., Lin, M. C., Lai, C. F., Wu, C. H., Wu, V. C., Chien, K. L., Ko, W. J., Chen, Y. M., Shiao, C. C., Yang, W. S., Wang, W. J., Chen, L., Wu, P. C., Tsai, P. R., Yeh, Y. C., Hu, F. C., & Wu, K. D. (2013). Risk of developing severe sepsis after acute kidney injury: A population-based cohort study. *Critical Care*, 17(5), R231. <https://doi.org/10.1186/cc13054>

Lameire, N. (2005). The Pathophysiology of Acute Renal Failure. *Critical Care Clinics*, 21(2), 197–210. <https://doi.org/10.1016/J.CCC.2005.01.001>

Landau, S. I., Guo, X., Velazquez, H., Torres, R., Olson, E., Garcia-Milian, R., Moeckel, G. W., Desir, G. V., & Safirstein, R. (2019). Regulated necrosis and failed repair in cisplatin-induced chronic kidney disease. *Kidney International*, 95(4), 797–814. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2018.11.042>

Lazzara, M. J., & Deen, W. M. (2007). Model of albumin reabsorption in the proximal tubule. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 292(1), F430–F439. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00010.2006>

Le Clef, N., Verhulst, A., D’Haese, P. C., & Vervaeke, B. A. (2016). Unilateral renal ischemia-reperfusion as a robust model for acute to chronic kidney injury in mice. *PLoS ONE*, 11(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152153>

Lebreton, J. P., Joisel, F., Raoult, J. P., Lannuzel, B., Rogez, J. P., & Humbert, G. (1979). Serum concentration of human alpha 2 HS glycoprotein during the inflammatory process: evidence that alpha 2 HS glycoprotein is a negative acute-phase reactant. *The Journal of Clinical Investigation*, 64(4), 1118–1129. <https://doi.org/10.1172/JCI109551>

Lee, H. T., Ota-Setlik, A., Fu, Y., Nasr, S. H., & Emala, C. W. (2004). Differential protective effects of volatile

BIBLIOGRAFÍA

- anesthetics against renal ischemia-reperfusion injury in vivo. *Anesthesiology*, 101(6), 1313–1324.
<https://doi.org/10.1097/00000542-200412000-00011>
- Lee, S., Huen, S., Nishio, H., Nishio, S., Lee, H. K., Choi, B. S., Ruhrberg, C., & Cantley, L. G. (2011). Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair. *Journal of the American Society of Nephrology*, 22(2), 317–326. <https://doi.org/10.1681/ASN.2009060615>
- Levey, A. S., & Inker, L. A. (2017). Assessment of Glomerular Filtration Rate in Health and Disease: A State of the Art Review. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 102(3), 405–419.
<https://doi.org/10.1002/cpt.729>
- Levey, A. S. (1990). Measurement of renal function in chronic renal disease. *Kidney International*, 38(1), 167–184. <https://doi.org/10.1038/ki.1990.182>
- Levey, A. S., & Inker, L. A. (2017). Assessment of Glomerular Filtration Rate in Health and Disease: A State of the Art Review. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 102(3), 405–419.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cpt.729>
- Levey, Andrew S., & Coresh, J. (2012). Chronic kidney disease. *The Lancet*, 379(9811), 165–180.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60178-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60178-5)
- Levey, Andrew S., Greene, T., Beck, G. J., Caggiula, A. W., Kusek, J. W., Hunsicker, L. G., & Klahr, S. (1999). Dietary protein restriction and the progression of chronic renal disease: What have all of the results of the MDRD study shown? *Journal of the American Society of Nephrology*, 10(11), 2426–2439.
- Levey, Andrew S., Gansevoort, R. T., Coresh, J., Inker, L. A., Heerspink, H. L., Grams, M. E., Greene, T., Tighiouart, H., Matsushita, K., Ballew, S. H., Sang, Y., Vonesh, E., Ying, J., Manley, T., de Zeeuw, D., Eckardt, K.-U., Levin, A., Perkovic, V., Zhang, L., & Willis, K. (2020). Change in Albuminuria and GFR as End Points for Clinical Trials in Early Stages of CKD: A Scientific Workshop Sponsored by the National Kidney Foundation in Collaboration With the US Food and Drug Administration and European Medicines Agency. *American Journal of Kidney Diseases: The Official Journal of the National Kidney Foundation*, 75(1), 84–104. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2019.06.009>

- Liang, X., Shen, W., Sun, H., Prakash, T. P., & Crooke, S. T. (2014). TCP1 complex proteins interact with phosphorothioate oligonucleotides and can co-localize in oligonucleotide-induced nuclear bodies in mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, 42(12), 7819–7832. <https://doi.org/10.1093/nar/gku484>
- Lieberthal, W., & Nigam, S. K. (1998). Acute renal failure. I. Relative importance of proximal vs. distal tubular injury. In *American Journal of Physiology - Renal Physiology* (Vol. 275, Issue 5, pp. F623-631). Am J Physiol. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1998.275.5.f623>
- Lim, B. J., Yang, H.-C., & Fogo, A. B. (2014). Animal models of regression/progression of kidney disease. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 11, 45–51. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2014.06.003>
- Lim, C. T. S., Tan, H. K., & Lau, Y. K. (2014). The significance of tubular and glomerular proteinuria in critically ill patients with severe acute kidney injury. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 30(6), 1186–1190. <https://doi.org/10.12669/pjms.306.5684>
- Lindgren, D., Boström, A. K., Nilsson, K., Hansson, J., Sjölund, J., Möller, C., Jirström, K., Nilsson, E., Landberg, G., Axelson, H., & Johansson, M. E. (2011). Isolation and characterization of progenitor-like cells from human renal proximal tubules. *American Journal of Pathology*, 178(2), 828–837. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.10.026>
- Liu, K. D., Yang, J., Tan, T. C., Glidden, D. V., Zheng, S., Pravoverov, L., Hsu, C. yuan, & Go, A. S. (2019). Risk Factors for Recurrent Acute Kidney Injury in a Large Population-Based Cohort. *American Journal of Kidney Diseases*, 73(2), 163–173. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2018.08.008>
- Liu, P., Feng, Y., Wang, Y., & Zhou, Y. (2014). Therapeutic action of bone marrow-derived stem cells against acute kidney injury. In *Life Sciences* (Vol. 115, Issue 1, pp. 1–7). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.08.025>
- Liu, Y. (2011). Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nature Reviews Nephrology*, 7(12), 684–696. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2011.149>
- Lok, C. N., & Loh, T. T. (1998). Regulation of Transferrin Function and Expression: Review and Update.

BIBLIOGRAFÍA

- Neurosignals*, 7(3), 157–178. <https://doi.org/10.1159/000014542>
- Lombardi, D., Becherucci, F., & Romagnani, P. (2016). How much can the tubule regenerate and who does it? An open question. In *Nephrology Dialysis Transplantation* (Vol. 31, Issue 8, pp. 1243–1250). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfv262>
- Longo, D., Fauci, A., Kasper, D., Hauser, S., Jameson, J., & Loscalz, J. (2011). *Harrisons principles of internal medicine* (18th ed.). McGraw-Hill Professional.
- Lopes, J. A., & Jorge, S. (2013). The RIFLE and AKIN classifications for acute kidney injury: A critical and comprehensive review. *Clinical Kidney Journal*, 6(1), 8–14. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfs160>
- López-Novoa, J. M., Rodríguez-Peña, A. B., Ortiz, A., Martínez-Salgado, C., & López Hernández, F. J. (2011). Etiopathology of chronic tubular, glomerular and renovascular nephropathies: clinical implications. *Journal of Translational Medicine*, 9, 13. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-13>
- Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., Shibuya, K., Aboyans, V., Abraham, J., Adair, T., Aggarwal, R., Ahn, S. Y., AlMazroa, M. A., Alvarado, M., Anderson, H. R., Anderson, L. M., Andrews, K. G., Atkinson, C., Baddour, L. M., Barker-Collo, S., Bartels, D. H., ... Murray, C. J. L. (2012). Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*, 380(9859), 2095–2128. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61728-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61728-0)
- Lv, W., Booz, G. W., Wang, Y., Fan, F., & Roman, R. J. (2018). Inflammation and renal fibrosis: Recent developments on key signaling molecules as potential therapeutic targets. *European Journal of Pharmacology*, 820(September 2017), 65–76. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.12.016>
- Ma, L.-J., & Fogo, A. B. (2003). Model of robust induction of glomerulosclerosis in mice: importance of genetic background. *Kidney International*, 64(1), 350–355. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00058.x>
- Macedo, E., Bouchard, J., & Mehta, R. L. (2008). Renal recovery following acute kidney injury. *Current Opinion in Critical Care*, 14(6), 660–665. <https://doi.org/10.1097/MCC.0b013e328317ee6e>

- Macedo, E., & Mehta, R. L. (2019). Recurrent Acute Kidney Injury: Can We Differentiate From Nonrecovery and CKD Progression? *American Journal of Kidney Diseases*, 73(2), 150–152. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2018.10.002>
- MacEdo, E., & Mehta, R. L. (2016). Renal recovery after acute kidney injury. *Contributions to Nephrology*, 187, 24–35. <https://doi.org/10.1159/000443289>
- Makris, K., & Spanou, L. (2016). Acute Kidney Injury: Definition, Pathophysiology and Clinical Phenotypes. *The Clinical Biochemist. Reviews*, 37(2), 85–98. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28303073>
- Malhotra, R., Bouchard, J., & Mehta, R. L. (2019). Community- and Hospital-Acquired Acute Kidney Injury. In *Critical Care Nephrology: Third Edition* (Third Edit). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44942-7.00012-1>
- Mårtensson, J., Martling, C. R., & Bell, M. (2012). Novel biomarkers of acute kidney injury and failure: Clinical applicability. In *British Journal of Anaesthesia* (Vol. 109, Issue 6, pp. 843–850). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/bja/aes357>
- Martín Zúñiga, J., & Orellana Muriana, J. M. (2016). *Ciencia y tecnología en experimentación y protección animal* (1st ed.).
- Masseroli, M., O'Valle, F., Andújar, M., Ramírez, C., Gómez-Morales, M., de Dios Luna, J., Aguilar, M., Aguilar, D., Rodríguez-Puyol, M., & Del Moral, R. G. (1998). Design and validation of a new image analysis method for automatic quantification of interstitial fibrosis and glomerular morphometry. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 78(5), 511–522.
- Matsui, I., Hamano, T., Mikami, S., Inoue, K., Shimomura, A., Nagasawa, Y., Michigami, T., Ohnishi, T., Fujii, N., Nakano, C., Kusunoki, Y., Kitamura, H., Iwatani, H., Takabatake, Y., Kaimori, J., Matsuba, G., Okoshi, K., Kimura-Suda, H., Tsubakihara, Y., ... Isaka, Y. (2013). Retention of fetuin-A in renal tubular lumen protects the kidney from nephrocalcinosis in rats. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 304(6), F751–F760. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00329.2012>
- Mayersohn, M., Conrad, K., & Achari, R. (1983). The influence of a cooked meat meal on creatinine plasma

BIBLIOGRAFÍA

- concentration and creatinine clearance. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 15(2), 227–230. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1983.tb01490.x>
- McDuffie, J. E., Ma, J. Y., Sablad, M., Sonee, M., Varacallo, L., Loudon, C., Guy, A., Vegas, J., Liu, X., La, D., & Snook, S. (2013). Time Course of Renal Proximal Tubule Injury, Reversal, and Related Biomarker Changes in Rats Following Cisplatin Administration. *International Journal of Toxicology*, 32(4), 251–260. <https://doi.org/10.1177/1091581813493013>
- McMahon, G. M., & Waikar, S. S. (2013). Biomarkers in Nephrology: Core Curriculum 2013. *American Journal of Kidney Diseases*, 62(1), 165–178. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2012.12.022>
- McWilliam, A., & Macnab, R. (2009). Laboratory tests of renal function. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, 10(6), 296–299. <https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2009.03.004>
- Meersch, M., Schmidt, C., Van Aken, H., Martens, S., Rossaint, J., Singbartl, K., Görlich, D., Kellum, J. A., & Zarbock, A. (2014). Urinary TIMP-2 and IGFBP7 as Early Biomarkers of Acute Kidney Injury and Renal Recovery following Cardiac Surgery. *PLoS ONE*, 9(3), e93460. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093460>
- Mehta, R. L., Bouchard, J., Soroko, S. B., Ikizler, T. A., Paganini, E. P., Chertow, G. M., & Himmelfarb, J. (2011). Sepsis as a cause and consequence of acute kidney injury: Program to Improve Care in Acute Renal Disease. *Intensive Care Medicine*, 37(2), 241–248. <https://doi.org/10.1007/s00134-010-2089-9>
- Mehta, R. L., Burdmann, E. A., Cerdá, J., Feehally, J., Finkelstein, F., García-García, G., Godin, M., Jha, V., Lameire, N. H., Levin, N. W., Lewington, A., Lombardi, R., Macedo, E., Rocco, M., Aronoff-Spencer, E., Tonelli, M., Zhang, J., & Remuzzi, G. (2016). Recognition and management of acute kidney injury in the International Society of Nephrology Oby25 Global Snapshot: A multinational cross-sectional study. *The Lancet*, 387(10032), 2017–2025. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30240-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30240-9)
- Mehta, R. L., Kellum, J. A., Shah, S. V., Molitoris, B. A., Ronco, C., Warnock, D. G., Levin, A., & Acute Kidney Injury Network. (2007). Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Critical Care*, 11(2), R31. <https://doi.org/10.1186/cc5713>

- Meier, E. M., Schwarzmann, G., Fürst, W., & Sandhoff, K. (1991). The human GM2 activator protein. A substrate specific cofactor of beta-hexosaminidase A. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(3), 1879–1887.
- Meyer, T. W., Anderson, S., Rennke, H. G., & Brenner, B. M. (1987). Reversing glomerular hypertension stabilizes established glomerular injury. *Kidney International*, 31(3), 752–759. <https://doi.org/10.1038/ki.1987.62>
- Meyer, T. W., Lawrence, W. E., & Brenner, B. M. (1983). Dietary protein and the progression of renal disease. *Kidney International*, 24(SUPPL. 16).
- Mian, A. N., & Schwartz, G. J. (2011). Tests of Kidney Function in Children. In *Pediatric Critical Care* (pp. 998–1008). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-07307-3.10069-2>
- Michel, D., Chatelain, G., North, S., & Brun, G. (1997). Stress-induced transcription of the clusterin/apol gene. *The Biochemical Journal*, 328 (Pt 1(Pt 1), 45–50. <https://doi.org/10.1042/bj3280045>
- Miki, T., Holst, O., & Hardt, W.-D. (2012). The Bactericidal Activity of the C-type Lectin RegIII against Gram-negative Bacteria involves Binding to Lipid A *. *Journal of Biological Chemistry*, 287(41), 34844–34855. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.399998>
- Miller, R. P., Tadagavadi, R. K., Ramesh, G., & Reeves, W. B. (2010). Mechanisms of Cisplatin nephrotoxicity. *Toxins*, 2(11), 2490–2518. <https://doi.org/10.3390/toxins2112490>
- Mishra, J., Ma, Q., Prada, A., Mitsnefes, M., Zahedi, K., Yang, J., Barasch, J., & Devarajan, P. (2003). Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 14(10), 2534–2543. <https://doi.org/10.1097/01.asn.0000088027.54400.c6>
- Mishra, J., Mori, K., Ma, Q., Kelly, C., Yang, J., Mitsnefes, M., Barasch, J., & Devarajan, P. (2004). Amelioration of ischemic acute renal injury by neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 15(12), 3073–3082. <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000145013.44578.45>

BIBLIOGRAFÍA

- Modlinger, P. S., Wilcox, C. S., & Aslam, S. (2004). Nitric oxide, oxidative stress, and progression of chronic renal failure. *Seminars in Nephrology*, 24(4), 354–365. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2004.04.007>
- Molitch, M. E., Rodman, E., Hirsch, C. A., & Dubinsky, E. (1980). Spurious serum creatinine elevations in ketoacidosis. *Annals of Internal Medicine*, 93(2), 280–281. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-93-2-280>
- Molitoris, B. A., & Reilly, E. (2017). Quantifying glomerular filtration Rates in Acute Kidney Injury: a Requirement for Translational Success. *Seminars in Nephrology*, 36(1), 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2016.01.008>Quantifying
- Mori, K., Lee, H. T., Rapoport, D., Drexler, I. R., Foster, K., Yang, J., Schmidt-Ott, K. M., Chen, X., Jau, Y. L., Weiss, S., Mishra, J., Cheema, F. H., Markowitz, G., Suganami, T., Sawai, K., Mukoyama, M., Kunis, C., D'Agati, V., Devarajan, P., & Barasch, J. (2005). Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *Journal of Clinical Investigation*, 115(3), 610–621. <https://doi.org/10.1172/JCI23056>
- Morigi, M., Introna, M., Imberti, B., Corna, D., Abbate, M., Rota, C., Rottoli, D., Benigni, A., Perico, N., Zoja, C., Rambaldi, A., Remuzzi, A., & Remuzzi, G. (2008). Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Accelerate Recovery of Acute Renal Injury and Prolong Survival in Mice. *Stem Cells*, 26(8), 2075–2082. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0795>
- Nash, K., Hafeez, A., & Hou, S. (2002). Hospital-acquired renal insufficiency. *American Journal of Kidney Diseases*, 39(5), 930–936. <https://doi.org/10.1053/ajkd.2002.32766>
- Nasioudis, D., & Witkin, S. S. (2015). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin and innate immune responses to bacterial infections. *Medical Microbiology and Immunology*, 204(4), 471–479. <https://doi.org/10.1007/s00430-015-0394-1>
- Nath, K. A., Croatt, A. J., & Hostetter, T. H. (1990). Oxygen consumption and oxidant stress in surviving nephrons. *The American Journal of Physiology*, 258(5 Pt 2), F1354–62. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1990.258.5.F1354>

- Nauta, F. L., Scheven, L., Meijer, E., van Oeveren, W., de Jong, P. E., Bakker, S. J. L., & Gansevoort, R. T. (2013). Glomerular and Tubular Damage Markers in Individuals with Progressive Albuminuria. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 8(7), 1106–1114. <https://doi.org/10.2215/CJN.04510512>
- Negi, S., Koreeda, D., Kobayashi, S., Yano, T., Tatsuta, K., Mima, T., Shigematsu, T., & Ohya, M. (2018). Acute kidney injury: Epidemiology, outcomes, complications, and therapeutic strategies. *Seminars in Dialysis*, 31(5), 519–527. <https://doi.org/10.1111/sdi.12705>
- Neyra, J. A., Li, X., Yessayan, L., Adams-Huet, B., Yee, J., & Toto, R. D. (2016). Dipstick albuminuria and acute kidney injury recovery in critically ill septic patients. *Nephrology*, 21(6), 512–518. <https://doi.org/10.1111/nep.12637>
- Nguyen, M. T., & Devarajan, P. (2008). Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. *Pediatric Nephrology*, 23(12), 2151–2157. <https://doi.org/10.1007/s00467-007-0470-x>
- Nickolas, T. L., Forster, C. S., Sise, M. E., Barasch, N., Valle, D. S.-D., Viltard, M., Buchen, C., Kupferman, S., Carnevali, M. L., Bennett, M., Mattei, S., Bovino, A., Argentiero, L., Magnano, A., Devarajan, P., Mori, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Allegri, L., & Barasch, J. (2012). NGAL (Lcn2) monomer is associated with tubulointerstitial damage in chronic kidney disease. *Kidney International*, 82(6), 718–722. <https://doi.org/10.1038/ki.2012.195>
- Nogueira, A., Pires, M. J., & Oliveira, P. A. (2017). Pathophysiological Mechanisms of Renal Fibrosis: A Review of Animal Models and Therapeutic Strategies. *In Vivo (Athens, Greece)*, 31(1), 1–22. <https://doi.org/10.21873/invivo.11019>
- Norden, A. G. W., Lapsley, M., & Unwin, R. J. (2014). *Chapter Three - Urine Retinol-Binding Protein 4: A Functional Biomarker of the Proximal Renal Tubule* (G. S. B. T.-A. in C. C. Makowski (ed.); Vol. 63, pp. 85–122). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800094-6.00003-0>
- Odutayo, A., Wong, C. X., Farkouh, M., Altman, D. G., Hopewell, S., Emdin, C. A., & Hunn, B. H. (2017). AKI and long-term risk for cardiovascular events and mortality. *Journal of the American Society of Nephrology*, 28(1), 377–387. <https://doi.org/10.1681/ASN.2016010105>

BIBLIOGRAFÍA

- Oken, D. E., Cotes, S. C., & Mende, C. W. (1972). Micropuncture study of tubular transport of albumin in rats with aminonucleoside nephrosis. *Kidney International*, 1(1), 3–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/ki.1972.2>
- Ozkok, A., & Edelstein, C. L. (2014). Pathophysiology of Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/967826>
- Paragas, N., Qiu, A., Zhang, Q., Samstein, B., Deng, S. X., Schmidt-Ott, K. M., Viltard, M., Yu, W., Forster, C. S., Gong, G., Liu, Y., Kulkarni, R., Mori, K., Kalandadze, A., Ratner, A. J., Devarajan, P., Landry, D. W., D'Agati, V., Lin, C. S., & Barasch, J. (2011). The Ngal reporter mouse detects the response of the kidney to injury in real time. *Nature Medicine*, 17(2), 216–223. <https://doi.org/10.1038/nm.2290>
- Pawar, R. D., Pitashny, M., Gindea, S., Tieng, A. T., Levine, B., Goilav, B., Campbell, S. R., Xia, Y., Qing, X., Thomas, D. B., Herlitz, L., Berger, T., Mak, T. W., & Putterman, C. (2012). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is instrumental in the pathogenesis of antibody-mediated nephritis in mice. *Arthritis & Rheumatism*, 64(5), 1620–1631. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/art.33485>
- Pazhayattil, G. S., & Shirali, A. C. (2014). Drug-induced impairment of renal function. *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease*, 7, 457–468. <https://doi.org/10.2147/IJNRD.S39747>
- Peters, H. P. E., Waanders, F., Meijer, E., van den Brand, J., Steenbergen, E. J., van Goor, H., & Wetzels, J. F. M. (2011). High urinary excretion of kidney injury molecule-1 is an independent predictor of end-stage renal disease in patients with IgA nephropathy. *Nephrology, Dialysis, Transplantation : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 26(11), 3581–3588. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfr135>
- Phan, V., Brophy, P. D., & Fleming, G. M. (2008). Acute Renal Failure: Prevention, Causes, and Investigation. In *Comprehensive Pediatric Nephrology* (pp. 607–627). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-04883-5.50045-3>
- Piazzon, N., Bernet, F., Guihard, L., Leonhard, W. N., Urfer, S., Firsov, D., Chehade, H., Vogt, B., Piergiovanni, S., Peters, D. J. M., Bonny, O., & Constam, D. B. (2015). Urine Fetuin-A is a biomarker of autosomal dominant polycystic kidney disease progression. *Journal of Translational Medicine*, 13(1), 103.

<https://doi.org/10.1186/s12967-015-0463-7>

- Polichnowski, A. J., Griffin, K. A., Licea-Vargas, H., Lan, R., Picken, M. M., Long, J., Williamson, G. A., Rosenberger, C., Mathia, S., Venkatachalam, M. A., & Bidani, A. K. (2020). Pathophysiology of unilateral ischemia-reperfusion injury: Importance of renal counterbalance and implications for the AKI-CKD transition. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 318(5), F1086–F1099. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00590.2019>
- Potprommanee, L., Ma, H.-T., Shank, L., Juan, Y.-H., Liao, W.-Y., Chen, S.-T., & Yu, C.-J. (2015). GM2-activator protein: a new biomarker for lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 10(1), 102–109. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000357>
- Potter, D., Jarrah, A., Sakai, T., Harrah, J., & Holliday, M. A. (1969). Character of Function and Size in Kidney During Normal Growth of Rats. *Pediatric Research*, 3(1), 51–59. <https://doi.org/10.1203/00006450-196901000-00007>
- Price, P. A., & Lim, J. E. (2003). The Inhibition of Calcium Phosphate Precipitation by Fetuin Is Accompanied by the Formation of a Fetuin-Mineral Complex*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(24), 22144–22152. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.M300744200>
- Price, P. A., Thomas, G. R., Pardini, A. W., Figueira, W. F., Caputo, J. M., & Williamson, M. K. (2002). Discovery of a High Molecular Weight Complex of Calcium, Phosphate, Fetuin, and Matrix γ -Carboxyglutamic Acid Protein in the Serum of Etidronate-treated Rats*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(6), 3926–3934. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.M106366200>
- Quinlan, G. J., Martin, G. S., & Evans, T. W. (2005). Albumin: Biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology*, 41(6), 1211–1219. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/hep.20720>
- Quiros, Y., Ferreira, L., Sancho-Martínez, S. M., González-Buitrago, J. M., López-Novoa, J. M., & López-Hernández, F. J. (2010). Sub-nephrotoxic doses of gentamicin predispose animals to developing acute kidney injury and to excrete ganglioside M2 activator protein. *Kidney International*, 78(10), 1006–1015. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.267>

BIBLIOGRAFÍA

- Reddy, K. B., Karode, M. C., Harmony, A. K., & Howe, P. H. (1996). Interaction of transforming growth factor beta receptors with apolipoprotein J/clusterin. *Biochemistry*, 35(1), 309–314. <https://doi.org/10.1021/bi951880a>
- Remuzzi, G., Benigni, A., & Remuzzi, A. (2006). Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(2), 288–296. <https://doi.org/10.1172/JCI27699>
- Remuzzi, G., & Horton, R. (2013). Acute renal failure : an unacceptable death sentence globally. *The Lancet*, 382(9910), 2041–2042. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62193-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62193-5)
- Rigat, B., Wang, W., Leung, A., & Mahuran, D. J. (1997). Two mechanisms for the recapture of extracellular G(M2) activator protein: Evidence for a major secretory form of the protein. *Biochemistry*, 36(27), 8325–8331. <https://doi.org/10.1021/bi970571c>
- Rivosecchi, R. M., Kellum, J. A., Dasta, J. F., Armahizer, M. J., Bolesta, S., Buckley, M. S., Dzierba, A. L., Frazee, E. N., Johnson, H. J., Kim, C., Murugan, R., Smithburger, P. L., Wong, A., & Kane Gill, S. L. (2016). Drug Class Combination–Associated Acute Kidney Injury. *Annals of Pharmacotherapy*, 50(11). <https://doi.org/10.1177/1060028016657839>
- Robert, S., & Zarowitz, B. J. (1991). Is There a Reliable Index of Glomerular Filtration Rate in Critically Ill Patients? *DICP*, 25(2), 169–178. <https://doi.org/10.1177/106002809102500212>
- Romagnani, P. (2013). Of mice and men: the riddle of tubular regeneration. *The Journal of Pathology*, 229(5), 641–644. <https://doi.org/10.1002/path.4162>
- Ronco, C., Bellomo, R., & Kellum, J. A. (2019). Acute kidney injury. *The Lancet*, 394(10212), 1949–1964. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32563-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32563-2)
- Ronco, C., Kellum, J. A., & Haase, M. (2012). Subclinical AKI is still AKI. *Critical Care*, 16(3), 2010–2013. <https://doi.org/10.1186/cc11240>
- Ronco, C., & Rosner, M. H. (2012). Acute kidney injury and residual renal function. *Critical Care*, 16(4), 144. <https://doi.org/10.1186/cc11426>

- Ronconi, E., Sagrinati, C., Angelotti, M. L., Lazzeri, E., Mazzinghi, B., Ballerini, L., Parente, E., Becherucci, F., Gacci, M., Carini, M., Maggi, E., Serio, M., Vannelli, G. B., Lasagni, L., Romagnani, S., & Romagnani, P. (2009). Regeneration of glomerular podocytes by human renal progenitors. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(2), 322–332. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008070709>
- Rosen, S., & Stillman, I. E. (2008). Acute tubular necrosis is a syndrome of physiologic and pathologic dissociation. *Journal of the American Society of Nephrology*, 19(5), 871–875. <https://doi.org/10.1681/ASN.2007080913>
- Rosenberg, M. E., Gorton, R., Finkel, D., Chmielewski, D., Barrie, A., Witte, D. P., Zhu, G., Bissler, J. J., Harmony, J. A. K., & Aronow, B. J. (2002). Apolipoprotein J/clusterin prevents a progressive glomerulopathy of aging. *Molecular and Cellular Biology*, 22(6), 1893–1902. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.6.1893-1902.2002>
- Ruiz-Ortega, M., Rupérez, M., Esteban, V., Rodríguez-Vita, J., Sánchez-López, E., Carvajal, G., & Egido, J. (2006). Angiotensin II: a key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 21(1), 16–20. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfi265>
- S. Peerapornratana, Carlos L. Manrique-Caballero, H. Gómez, J. A. K. (2019). Acute kidney injury from sepsis: current concepts, epidemiology, pathophysiology, prevention and treatment. *Kidney Int.*, 96(5), 1083–1099. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Sagrinati, C., Netti, G. S., Mazzinghi, B., Lazzeri, E., Liotta, F., Frosali, F., Ronconi, E., Meini, C., Gacci, M., Squecco, R., Carini, M., Gesualdo, L., Francini, F., Maggi, E., Annunziato, F., Lasagni, L., Serio, M., Romagnani, S., & Romagnani, P. (2006). Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17(9), 2443–2456. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006010089>
- Sánchez-González, P. D., López-Hernández, F. J., López-Novoa, J. M., & Morales, A. I. (2011). An integrative view of the pathophysiological events leading to cisplatin nephrotoxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, 41(10), 803–821. <https://doi.org/10.3109/10408444.2011.602662>
- Sancho-Martínez, S. M., Blanco-Gozalo, V., Quiros, Y., Prieto-García, L., Montero-Gómez, M. J., Docherty, N.

BIBLIOGRAFÍA

- G., Martínez-Salgado, C., Morales, A. I., López-Novoa, J. M., & López-Hernández, F. J. (2020). Impaired Tubular Reabsorption Is the Main Mechanism Explaining Increases in Urinary NGAL Excretion Following Acute Kidney Injury in Rats. *Toxicological Sciences*, 175(1), 75–86. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfaa029>
- Sancho-Martínez, S. M., Sánchez-Juanes, F., Blanco-Gozalo, V., Fontecha-Barriuso, M., Prieto-García, L., Fuentes-Calvo, I., González-Buitrago, J. M., Morales, A. I., Martínez-Salgado, C., Ramos-Barron, M. A., Gómez-Alamillo, C., Arias, M., López-Novoa, J. M., & López-Hernández, F. J. (2020). Urinary TCP1-eta: A Cortical Damage Marker for the Pathophysiological Diagnosis and Prognosis of Acute Kidney Injury. *Toxicological Sciences*, 174(1), 3–15. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz242>
- Saran, R., Robinson, B., Abbott, K. C., Agodoa, L. Y. C., Albertus, P., Ayanian, J., Balkrishnan, R., Bragg-Gresham, J., Cao, J., Chen, J. L. T., Cope, E., Dharmarajan, S., Dietrich, X., Eckard, A., Eggers, P. W., Gaber, C., Gillen, D., Gipson, D., Gu, H., ... Shahinian, V. (2017). US Renal Data System 2016 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. *American Journal of Kidney Diseases*, 69(3), A7–A8. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2016.12.004>
- Sato, Y., & Yanagita, M. (2018). Immune cells and inflammation in AKI to CKD progression. In *American Journal of Physiology - Renal Physiology* (Vol. 315, Issue 6, pp. F1501–F1512). American Physiological Society. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00195.2018>
- Sawhney, S., Marks, A., Fluck, N., Levin, A., McLernon, D., Prescott, G., & Black, C. (2017). Post-discharge kidney function is associated with subsequent ten-year renal progression risk among survivors of acute kidney injury. *Kidney International*, 92(2), 440–452. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.02.019>
- Schmidt-Ott, K. M., Mori, K., Jau, Y. L., Kalandadze, A., Cohen, D. J., Devarajan, P., & Barasch, J. (2007). Dual action of neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(2), 407–413. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006080882>
- Schmidt-Ott, K. M., Mori, K., Kalandadze, A., Li, J.-Y., Paragas, N., Nicholas, T., Devarajan, P., & Barasch, J. (2006). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin-mediated iron traffic in kidney epithelia. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 15(4), 442–449.

<https://doi.org/10.1097/01.mnh.0000232886.81142.58>

Schreuder, M. F. (2018). Life with one kidney. *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)*, 33(4), 595–604.

<https://doi.org/10.1007/s00467-017-3686-4>

Seo, M. S., Park, M. Y., Choi, S. J., Jeon, J. S., Noh, H., Kim, J. K., Han, D. C., Hwang, S. D., Jin, S. Y., & Kwon, S. H. (2013). Effect of treatment on urinary kidney injury molecule-1 in IgA nephropathy. *BMC Nephrology*, 14(1), 139. <https://doi.org/10.1186/1471-2369-14-139>

Sharma, A., Mucino, M. J. M. J., & Ronco, C. (2014). Renal functional reserve and renal recovery after acute kidney injury. *Nephron - Clinical Practice*, 127(1–4), 94–100. <https://doi.org/10.1159/000363721>

Shimamura, T., & Morrison, A. B. (1975). A progressive glomerulosclerosis occurring in partial five-sixths nephrectomized rats. *The American Journal of Pathology*, 79(1), 95–106.

Siew, E. D., & Davenport, A. (2015). The growth of acute kidney injury: A rising tide or just closer attention to detail? In *Kidney International* (Vol. 87, Issue 1, pp. 46–61). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ki.2014.293>

Singer, E., Elger, A., Elitok, S., Kettritz, R., Nickolas, T. L., Barasch, J., Luft, F. C., & Schmidt-Ott, K. M. (2011). Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin distinguishes pre-renal from intrinsic renal failure and predicts outcomes. *Kidney International*, 80(4), 405–414. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/ki.2011.41>

Singh, P., & Okusa, M. D. (2011). The role of tubuloglomerular feedback in the pathogenesis of acute kidney injury. *Contributions to Nephrology*, 174, 12–21. <https://doi.org/10.1159/000329229>

Sinha, V., Vence, L. M., & Salahudeen, A. K. (2013). Urinary tubular protein-based biomarkers in the rodent model of cisplatin nephrotoxicity: A comparative analysis of serum creatinine, renal histology, and urinary KIM-1, NGAL, and NAG in the initiation, maintenance, and recovery phases of acute kidney inj. *Journal of Investigative Medicine*, 61(3), 564–568. <https://doi.org/10.2310/JIM.0b013e31828233a8>

Smeets, B., Boor, P., Dijkman, H., Sharma, S. V., Jirak, P., Mooren, F., Berger, K., Bornemann, J., Gelman, I. H., Floege, J., van der Vlag, J., Wetzels, J. F. F. M., & Moeller, M. J. (2013). Proximal tubular cells contain a

BIBLIOGRAFÍA

- phenotypically distinct, scattered cell population involved in tubular regeneration. *The Journal of Pathology*, 229(5), 645–659. <https://doi.org/10.1002/path.4125>
- Srisawat, N., Murugan, R., & Kellum, J. A. (2014). Repair or progression after AKI: A role for biomarkers? *Nephron - Clinical Practice*, 127(1–4), 185–189. <https://doi.org/10.1159/000363254>
- Srisawat, N., Murugan, R., Lee, M., Kong, L., Carter, M., Angus, D. C., Kellum, J. A., & Genetic and Inflammatory Markers of Sepsis (GenIMS) Study Investigators. (2011). Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin predicts recovery from acute kidney injury following community-acquired pneumonia. *Kidney International*, 80(5), 545–552. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.160>
- Srisawat, N., Wen, X., Lee, M., Kong, L., Elder, M., Carter, M., Unruh, M., Finkel, K., Vijayan, A., Ramkumar, M., Paganini, E., Singbartl, K., Palevsky, P. M., & Kellum, J. A. (2011). Urinary biomarkers and renal recovery in critically ill patients with renal support. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 6(8), 1815–1823. <https://doi.org/10.2215/CJN.11261210>
- Stefan, N., Hennige, A. M., Staiger, H., Machann, J., Schick, F., Kröber, S. M., Machicao, F., Fritsche, A., & Häring, H.-U. (2006). $\alpha 2$ -Heremans-Schmid Glycoprotein/ Fetuin-A Is Associated With Insulin Resistance and Fat Accumulation in the Liver in Humans. *Diabetes Care*, 29(4), 853–857. <https://doi.org/10.2337/diacare.29.04.06.dc05-1938>
- Stevens, L. A., Coresh, J., Greene, T., & Levey, A. S. (2006). Assessing Kidney Function — Measured and Estimated Glomerular Filtration Rate. *New England Journal of Medicine*, 354(23), 2473–2483. <https://doi.org/10.1056/NEJMra054415>
- Stevens, L. A., & Levey, A. S. (2009). Measured GFR as a confirmatory test for estimated GFR. In *Journal of the American Society of Nephrology* (Vol. 20, Issue 11, pp. 2305–2313). J Am Soc Nephrol. <https://doi.org/10.1681/ASN.2009020171>
- Supavekin, S., Zhang, W., Kucherlapati, R., Kaskel, F. J., Moore, L. C., & Devarajan, P. (2003). Differential gene expression following early renal ischemia/reperfusion. *Kidney International*, 63(5), 1714–1724. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00928.x>

- Susantitaphong, P., Cruz, D. N., Cerda, J., Abulfaraj, M., Alqahtani, F., Koulouridis, I., Jaber, B. L., & Acute Kidney Injury Advisory Group of the American Society of Nephrology. (2013). World incidence of AKI: a meta-analysis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, 8(9), 1482–1493. <https://doi.org/10.2215/CJN.00710113>
- Susantitaphong, P., Cruz, D. N., Cerda, J., Abulfaraj, M., Alqahtani, F., Koulouridis, I., Jaber, B. L., Acute Kidney Injury Advisory Group of the American Society of Nephrology, Tillyard, A., Keays, R., & Soni, N. (2005). The diagnosis of acute renal failure in intensive care: Mongrel or pedigree? *Anaesthesia*, 60(9), 903–914. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2044.2005.04278.x>
- Syal, K., Banerjee, D., & Srinivasan, A. (2013). Creatinine estimation and interference. In *Indian Journal of Clinical Biochemistry* (Vol. 28, Issue 2, pp. 210–211). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12291-013-0299-y>
- Takaori, K., Nakamura, J., Yamamoto, S., Nakata, H., Sato, Y., Takase, M., Nameta, M., Yamamoto, T., Economides, A. N., Kohno, K., Haga, H., Sharma, K., & Yanagita, M. (2016). Severity and frequency of proximal tubule injury determines renal prognosis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 27(8), 2393–2406. <https://doi.org/10.1681/ASN.2015060647>
- Takaori, K., & Yanagita, M. (2016). Insights into the Mechanisms of the Acute Kidney Injury-to-Chronic Kidney Disease Continuum. *Nephron*, 134(3), 172–176. <https://doi.org/10.1159/000448081>
- Tan, R.-Z., Zhong, X., Li, J.-C., Zhang, Y.-W., Yan, Y., Liao, Y., Wen, D., Diao, H., Wang, L., & Shen, H.-C. (2019). An optimized 5/6 nephrectomy mouse model based on unilateral kidney ligation and its application in renal fibrosis research. *Renal Failure*, 41(1), 555–566. <https://doi.org/10.1080/0886022X.2019.1627220>
- Tanaka, S., Tanaka, T., & Nangaku, M. (2014). Hypoxia as a key player in the AKI-to-CKD transition. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 307(11), F1187–95. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00425.2014>
- Tang, K. W. A., Toh, Q. C., & Teo, B. W. (2015). Normalisation of urinary biomarkers to creatinine for clinical practice and research – When and why. *Singapore Medical Journal*, 56(1), 7–10.

BIBLIOGRAFÍA

<https://doi.org/10.11622/smedj.2015003>

- Thomas, M. C., Burns, W. C., & Cooper, M. E. (2005). Tubular changes in early diabetic nephropathy. *Advances in Chronic Kidney Disease*, 12(2), 177–186. <https://doi.org/10.1053/j.ackd.2005.01.008>
- Thomson, S. C., Vallon, V., & Blantz, R. C. (2004). Kidney function in early diabetes: the tubular hypothesis of glomerular filtration. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 286(1), F8–F15. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00208.2003>
- Tojo, A., & Endou, H. (1992). Intrarenal handling of proteins in rats using fractional micropuncture technique. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 263(4), F601–F606. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1992.263.4.F601>
- Toth, L. A. (1951). The kidney—structure and function in health and disease. By Homer W. Smith. 1951. xxii + 1049 pages, illustrated. \$12.50. Oxford University Press, New York. *The Anatomical Record*, 111(2), 271–272. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ar.1091110210>
- Traynor, J., Mactier, R., Geddes, C. C., & Fox, J. G. (2006). How to measure renal function in clinical practice. *British Medical Journal*, 333(7571), 733–737. <https://doi.org/10.1136/bmj.38975.390370.7C>
- Trougakos, I. P., & Gonos, E. S. (2002). Clusterin/apolipoprotein J in human aging and cancer. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34(11), 1430–1448. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(02\)00041-9](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(02)00041-9)
- Tsai, Y.-L., Liu, C.-W., Huang, S.-F., Yang, Y.-Y., Lin, M.-W., Huang, C.-C., Li, T.-H., Huang, Y.-H., Hou, M.-C., & Lin, H.-C. (2020). Urinary fatty acid and retinol binding protein-4 predict CKD progression in severe NAFLD patients with hypertension: 4-year study with clinical and experimental approaches. *Medicine*, 99(2), e18626–e18626. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000018626>
- Tsuprykov, O., Ando, R., Reichetzedder, C., von Websky, K., Antonenko, V., Sharkovska, Y., Chaykovska, L., Rahnenführer, J., Hasan, A. A., Tammen, H., Alter, M., Klein, T., Ueda, S., Yamagishi, S.-I., Okuda, S., & Hoher, B. (2016). The dipeptidyl peptidase inhibitor linagliptin and the angiotensin II receptor blocker telmisartan show renal benefit by different pathways in rats with 5/6 nephrectomy. *Kidney*

- International*, 89(5), 1049–1061. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.01.016>
- Uchino, S. (2006). The epidemiology of acute renal failure in the world. *Current Opinion in Critical Care*, 12(6), 538–543. <https://doi.org/10.1097/01.ccx.0000247448.94252.5a>
- Uchino, S., Kellum, J. A., Bellomo, R., Doig, G. S., Morimatsu, H., Morgera, S., Schetz, M., Tan, I., Bouman, C., Macedo, E., Gibney, N., Tolwani, A., & Ronco, C. (2005). Acute renal failure in critically ill patients: A multinational, multicenter study. *Journal of the American Medical Association*, 294(7), 813–818. <https://doi.org/10.1001/jama.294.7.813>
- Urbschat, A., Obermüller, N., & Haferkamp, A. (2011). Biomarkers of kidney injury. *Biomarkers*, 16(sup1), S22–S30. <https://doi.org/10.3109/1354750X.2011.587129>
- Vaidya, V. S., Ferguson, M. A., & Bonventre, J. V. (2008). Biomarkers of Acute Kidney Injury. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 48(1), 463–493. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.48.1.13006.094615>
- Vaidya, V. S., Ramirez, V., Ichimura, T., Bobadilla, N. A., & Bonventre, J. V. (2006). Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 290(2), F517–F529. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00291.2005>
- van Timmeren, M. M., van den Heuvel, M. C., Bailly, V., Bakker, S. J. L., van Goor, H., & Stegeman, C. A. (2007). Tubular kidney injury molecule-1 (KIM-1) in human renal disease. *Journal of Pathology*, 212(2), 209–217. <https://doi.org/10.1002/path.2175>
- van Timmeren, Mirjan M., Vaidya, V. S., van Ree, R. M., Oterdoom, L. H., de Vries, A. P. J., Gans, R. O. B., van Goor, H., Stegeman, C. A., Bonventre, J. V., & Bakker, S. J. L. (2007). High Urinary Excretion of Kidney Injury Molecule-1 Is an Independent Predictor of Graft Loss in Renal Transplant Recipients. *Transplantation*, 84(12), 1625–1630. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000295982.78039.ef>
- Vart, P., & Grams, M. E. (2016). Measuring and Assessing Kidney Function. *Seminars in Nephrology*, 36(4), 262–272. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2016.05.003>

BIBLIOGRAFÍA

- Venkatachalam, M A. (1978). Ischemic damage and repair in the rat proximal tubule. *Kidney Int.*, 14, 31–49.
- Venkatachalam, Manjeri A., Griffin, K. A., Lan, R., Geng, H., Saikumar, P., & Bidani, A. K. (2010). Acute kidney injury: A springboard for progression in chronic kidney disease. In *American Journal of Physiology - Renal Physiology* (Vol. 298, Issue 5). American Physiological Society Bethesda, MD. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00017.2010>
- Venkatachalam, Manjeri A., Weinberg, J. M., Kriz, W., & Bidani, A. K. (2015). Failed tubule recovery, AKI-CKD transition, and kidney disease progression. *Journal of the American Society of Nephrology*, 26(8), 1765–1776. <https://doi.org/10.1681/ASN.2015010006>
- Viau, A., Karoui, K. El, Laouari, D., Burtin, M., Nguyen, C., Mori, K., Pillebout, E., Berger, T., Mak, T. W., Knebelmann, B., Friedlander, G., Barasch, J., & Terzi, F. (2010). Lipocalin 2 is essential for chronic kidney disease progression in mice and humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(11), 4065–4076. <https://doi.org/10.1172/JCI42004>
- Vicente-Vicente, L., Ferreira, L., González-Buitrago, J. M., López-Hernández, F. J., López-Novoa, J. M., & Morales, A. I. (2013). Increased urinary excretion of albumin, hemopexin, transferrin and VDBP correlates with chronic sensitization to gentamicin nephrotoxicity in rats. *Toxicology*, 304, 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.12.006>
- Waanders, F., van Timmeren, M. M., Stegeman, C. A., Bakker, S. J. L., & van Goor, H. (2010). Kidney injury molecule-1 in renal disease. *The Journal of Pathology*, 220(1), 7–16. <https://doi.org/10.1002/path.2642>
- Wagener, G., Jan, M., Kim, M., Mori, K., Barasch, J. M., Sladen, R. N., & Lee, H. T. (2006). Association between Increases in Urinary Neutrophil Gelatinase–associated Lipocalin and Acute Renal Dysfunction after Adult Cardiac Surgery. *Anesthesiology*, 105(3), 485–491. <https://doi.org/10.1097/00000542-200609000-00011>
- Waikar, S. S., Sabbiseti, V. S., & Bonventre, J. V. (2010). Normalization of urinary biomarkers to creatinine during changes in glomerular filtration rate. *Kidney International*, 78(5), 486–494. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.165>

- Wang, Y., Xing, Q.-Q., Tu, J.-K., Tang, W.-B., Yuan, X.-N., Xie, Y.-Y., Wang, W., Peng, Z.-Z., Huang, L., Xu, H., Qin, J., Xiao, X.-C., Tao, L.-J., & Yuan, Q.-J. (2019). Involvement of hydrogen sulfide in the progression of renal fibrosis. *Chinese Medical Journal*, 132(23), 2872–2880. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000537>
- Wijerathna, T. M., Mohamed, F., Dissanayaka, D., Gawarammana, I., Palangasinghe, C., Shihana, F., Endre, Z., Shahmy, S., & Buckley, N. A. (2018). Albuminuria and other renal damage biomarkers detect acute kidney injury soon after acute ingestion of oxalic acid and potassium permanganate. *Toxicology Letters*, 299, 182–190. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.10.002>
- Williamson, L., & New, D. (2014). How the use of creatine supplements can elevate serum creatinine in the absence of underlying kidney pathology. *BMJ Case Reports*, 2014. <https://doi.org/10.1136/bcr-2014-204754>
- Wu, Y., Su, T., Yang, L., Zhu, S.-N., & Li, X.-M. (2010). Urinary Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin: A Potential Biomarker for Predicting Rapid Progression of Drug-Induced Chronic Tubulointerstitial Nephritis. *The American Journal of the Medical Sciences*, 339(6), 537–542. <https://doi.org/10.1097/MAJ.0b013e3181dd0cb1>
- Xiong, L., Zheng, Y., Wu, M., Hou, L., Zhu, Z., Zhang, X., & Lu, Z. (2003). Preconditioning with isoflurane produces dose-dependent neuroprotection via activation of adenosine triphosphate-regulated potassium channels after focal cerebral ischemia in rats. *Anesthesia and Analgesia*, 96(1), 233–237. <https://doi.org/10.1097/00000539-200301000-00047>
- Xu, M.-J., Feng, D., Wu, H., Wang, H., Chan, Y., Kolls, J., Borregaard, N., Porse, B., Berger, T., Mak, T. W., Cowland, J. B., Kong, X., & Gao, B. (2015). Liver is the major source of elevated serum lipocalin-2 levels after bacterial infection or partial hepatectomy: a critical role for IL-6/STAT3. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 61(2), 692–702. <https://doi.org/10.1002/hep.27447>
- Xu, P.-C., Zhang, J.-J., Chen, M., Lv, J.-C., Liu, G., Zou, W.-Z., Zhang, H., & Zhao, M.-H. (2011). Urinary kidney injury molecule-1 in patients with IgA nephropathy is closely associated with disease severity. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 26(10), 3229–3236. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfr023>

BIBLIOGRAFÍA

- Xue, J. L., Daniels, F., Star, R. A., Kimmel, P. L., Eggers, P. W., Molitoris, B. A., Himmelfarb, J., & Collins, A. J. (2006). Incidence and mortality of acute renal failure in Medicare beneficiaries, 1992 to 2001. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17(4), 1135–1142. <https://doi.org/10.1681/ASN.2005060668>
- Yan, L., Borregaard, N., Kjeldsen, L., & Moses, M. A. (2001). The High Molecular Weight Urinary Matrix Metalloproteinase (MMP) Activity Is a Complex of Gelatinase B/MMP-9 and Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin (NGAL): MODULATION OF MMP-9 ACTIVITY BY NGAL *. *Journal of Biological Chemistry*, 276(40), 37258–37265. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106089200>
- Yang, H.-C., Zuo, Y., & Fogo, A. B. (2010). Models of chronic kidney disease. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 7(1), 13–19. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2010.08.002>
- Yang, J., Goetz, D., Li, J. Y., Wang, W., Mori, K., Setlik, D., Du, T., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Strong, R., & Barasch, J. (2002). An iron delivery pathway mediated by a lipocalin. *Molecular Cell*, 10(5), 1045–1056. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00710-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00710-4)
- Yang, L., Besschetnova, T. Y., Brooks, C. R., Shah, J. V., & Bonventre, J. V. (2010). Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury. *Nature Medicine*, 16(5), 535–543. <https://doi.org/10.1038/nm.2144>
- Yang, L., Humphreys, B. D., & Bonventre, J. V. (2011). Pathophysiology of acute kidney injury to chronic kidney disease: Maladaptive repair. *Contributions to Nephrology*, 174, 149–155. <https://doi.org/10.1159/000329385>
- Yao, X., Panichpisal, K., Kurtzman, N., & Nugent, K. (2007). Cisplatin Nephrotoxicity: A Review. *The American Journal of the Medical Sciences*, 334(2), 115–124. <https://doi.org/10.1097/MAJ.0b013e31812dfe1e>
- Yoshida, Y., Fogo, A., & Ichikawa, I. (1989). Glomerular hemodynamic changes vs. hypertrophy in experimental glomerular sclerosis. *Kidney International*, 35(2), 654–660. <https://doi.org/10.1038/ki.1989.35>
- Zager, R. A., Gmur, D. J., Bredl, C. R., & Eng, M. J. (1989). Degree and time sequence of hypothermic protection against experimental ischemic acute renal failure. *Circulation Research*, 65(5), 1263–1269.

<https://doi.org/10.1161/01.RES.65.5.1263>

Zandi-Nejad, K., Eddy, A. A., Glasscock, R. J., & Brenner, B. M. (2004). Why is proteinuria an ominous biomarker of progressive kidney disease? *Kidney International. Supplement*, 92, S76–89.

<https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.09220.x>

Zeng, F., Kloepper, L. A., Finney, C., Diedrich, A., & Harris, R. C. (2016). Specific endothelial heparin-binding EGF-like growth factor deletion ameliorates renal injury induced by chronic angiotensin II infusion. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 311(4), F695–F707.

<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00377.2015>

Zhai, X. Y., Nielsen, R., Birn, H., Drumm, K., Mildenerger, S., Freudinger, R., Moestrup, S. K., Verroust, P. J., Christensen, E. I., & Gekle, M. (2000). Cubilin- and megalin-mediated uptake of albumin in cultured proximal tubule cells of opossum kidney. *Kidney International*, 58(4), 1523–1533.

<https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00314.x>

Zhang, M., Wang, J., & Guo, J. (2019). Role of Regenerating Islet-Derived Protein 3A in Gastrointestinal Cancer. *Frontiers in Oncology*, 9, 1449. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01449>

Zhang, Y.-W., Ding, L.-S., & Lai, M.-D. (2003). Reg gene family and human diseases. *World Journal of Gastroenterology*, 9(12), 2635–2641. <https://doi.org/10.3748/wjg.v9.i12.2635>

Zhou, H., Pisitkun, T., Aponte, A., Yuen, P. S. T., Hoffert, J. D., Yasuda, H., Hu, X., Chawla, L., Shen, R.-F., Knepper, M. A., & Star, R. A. (2006). Exosomal Fetuin-A identified by proteomics: a novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury. *Kidney International*, 70(10), 1847–1857.

<https://doi.org/10.1038/sj.ki.5001874>

Zuk, A., & Bonventre, J. V. (2016). Acute Kidney Injury. *Annual Review of Medicine*, 67(1), 293–307.

<https://doi.org/10.1146/annurev-med-050214-013407>

Zymantiene, J., Zelvyte, R., Oberauskas, V., & Spancerniene, U. (2016). Influence of metabolic cage on wistar rat physiological state. *Macedonian Veterinary Review*, 39(1), 33–38.

<https://doi.org/10.1515/macvetrev-2015-0062>

BIBLIOGRAFÍA