

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

-TESIS DOCTORAL-

**CARACTERIZACIÓN ETIOPATOGÉNICA DE DIFERENTES MODELOS
EXPERIMENTALES DE DAÑO RENAL AGUDO: BIOMARCADORES,
MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS Y APLICACIONES CLÍNICAS
DIAGNÓSTICAS**

Memoria presentada por
Víctor Blanco Gozalo
para optar al Grado de Doctor
por la Universidad de Salamanca.

Víctor Blanco Gozalo
Salamanca, 20 de diciembre de 2017

LA DOCTORA **DÑA. MARÍA JESÚS MONTE RÍO**, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que el presente trabajo, elaborado por el Ldo. en Biología **D. Víctor Blanco Gozalo** para optar al Grado de Doctor, con el título **“CARACTERIZACIÓN ETIOPATOGENICA DE DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTALES DE DAÑO RENAL AGUDO: BIOMARCADORES, MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS Y APLICACIONES CLÍNICAS DIAGNÓSTICAS”**, ha sido realizado bajo la dirección del Doctor Francisco J. López Hernández, en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expide y firma el presente certificado en Salamanca, a 17 de noviembre de 2017.

Fdo.: Dra. Dña. María Jesús Monte RíO

EL DOCTOR **D. FRANCISCO J. LÓPEZ HERNÁNDEZ**, INVESTIGADOR DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE SALAMANCA Y PROFESOR ASOCIADO DE FISIOLÓGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que el presente trabajo, titulado **“CARACTERIZACIÓN ETIOPATOGÉNICA DE DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTALES DE DAÑO RENAL AGUDO: BIOMARCADORES, MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS Y APLICACIONES CLÍNICAS DIAGNÓSTICAS”**, presentado por el Licenciado en Biología **D. Víctor Blanco Gozalo** para optar al Grado de Doctor, ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca, considera que cumple las condiciones necesarias y autoriza su presentación con el fin de que pueda ser defendido ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expide y firma el presente certificado en Salamanca, a 17 de noviembre de 2017.

Dr. D. Francisco López Hernández

Esta Tesis Doctoral ha sido financiada con el proyecto
del Ministerio de Economía y Competitividad,
**“Nuevo sistema de diagnóstico preventivo y
personalizado del riesgo de fracaso renal agudo”.**
INNFACTO (2013/2015).

A mi familia

Índice

Índice	I
Índice de figuras	XIII
Índice de tablas	XIX
Abreviaturas	XXIII
INTRODUCCIÓN	1
Bloque I: el daño renal agudo (DRA)	3
1. El Sistema Renal	4
1.1 Descripción anatómica	4
1.2 La nefrona	6
1.2.1 El corpúsculo renal o de Malpighi	7
1.2.2 El sistema tubular	8
1.2.3 El aparato yuxtaglomerular	9
2. Procesos renales	11
2.1 Filtración glomerular	12
2.2 Reabsorción y secreción tubulares: mecanismos de transporte	14
2.3 Caracterización de la función renal	16
3. El Daño Renal Agudo	17
3.1 Epidemiología y etiopatogenia	18
3.2 Repercusión clínica y económica	21
3.3 Pronóstico, prevención, medidas de protección y tratamiento	23
4. El DRA pre-renal	25
5. El DRA renal o intrínseco	27
5.1 Morfología de la NTA	27
5.2 Fases de la NTA	31
5.3 Formas clínicas	33
5.3.1 Tóxica	34
5.3.2 Isquémica	38
5.3.3 Séptica	40

Bloque II: perspectivas en el diagnóstico del DRA	41
6. Criterios diagnósticos del DRA	43
6.1 Risk Injury Failure Loss End (RIFLE)	43
6.2 Acute Kidney Injury Network (AKIN)	44
6.3 Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO)	45
7. Estado de la técnica del diagnóstico del DRA	45
7.1 Diagnóstico de referencia	47
7.2 Medida de la filtración glomerular	48
7.3 Estudio histopatológico del riñón	50
7.4 Estudio de la composición de la orina	51
7.5 Análisis del sedimento urinario	51
8. Diagnóstico temprano y etiológico del DRA renal o intrínseco	52
8.1 Diagnóstico etiológico diferencial de DRA	53
8.2 Biomarcadores emergentes	55
OBJETIVOS	61
MÉTODOS	67
1. Materiales	69
2. Animales de experimentación	69
2.1 Dieta y condiciones ambientales	69
2.2 Manipulación de los animales	70
3. Modelos experimentales	70
3.1 DRA inducido por Nefrotóxicos: gentamicina, cisplatino y nitrato de uranilo	70
3.1.1 Procedimiento experimental	70
3.1.2 Diseño experimental	71
3.2 DRA inducido por isquemia reperusión (I/R)	73
3.2.1 Procedimiento quirúrgico	74
3.2.2 Diseño experimental	75
3.3 DRA inducido por ligadura y punción cecal	76
3.3.1. Procedimiento quirúrgico	77
3.3.2. Diseño experimental	78
3.4 Inhibición de los transportadores tubulares con maleato sódico	79

3.4.1	Procedimiento quirúrgico	79
3.4.2	Diseño experimental	80
3.5	Perfusión renal con homodímero de etidio	82
3.5.1	Procedimiento quirúrgico	83
3.5.2	Diseño experimental	84
3.6	Sistema de perfusión renal: circuito extracorpóreo	85
3.6.1	Auto perfusión renal	86
3.6.2	Perfusión renal con Krebs-dextrano	87
3.6.3	Perfusión renal con Krebs-dextrano+NGAL exógeno	88
3.6.4	Perfusión renal con Krebs-dextrano eluido	89
3.6.5	Diseños experimentales	90
4.	Técnicas experimentales in vivo	92
4.1	Recogida de orina de 24 horas: jaulas metabólicas	92
4.2	Recogida de sangre y obtención del plasma	94
4.3	Perfusión y recogida de órganos	94
5.	Determinaciones bioquímicas	95
5.1	Concentración de la creatinina en el plasma y en la orina. Aclaramiento de creatinina	95
5.2	Concentración de la urea plasmática	97
5.3	Concentración de proteínas en la orina	98
5.4	Concentración de Na ⁺ en la orina y en el plasma	99
5.5	Fracción excretada de glucosa	100
5.5.1	Concentración de glucosa en el plasma	100
5.5.2	Concentración de la glucosa en la orina	101
5.6	Determinaciones enzimáticas	102
5.6.1	Excreción urinaria de N-acetil-β-D-glucosaminidasa (NAG)	102
5.6.2	GGT	103
5.6.3	GST	104
6.	ELISA	105
6.1	NGAL	106
6.2	FABP1 o L-FABP	108
6.3	Albúmina	109
7.	Análisis histológico	110
7.1	Tinción con hematoxilina y eosina	110

7.2	Inmunohistoquímica	113
7.3	Evaluación de la muerte celular por inmunofluorescencia	114
7.3.1	DAPI	115
7.3.2	Homodímero etidio	115
7.3.3	Viabilidad celular	116
8.	Análisis de proteínas mediante Western blot	117
8.1	Obtención de extractos de proteínas de tejidos	117
8.2	Cuantificación de proteínas	117
8.3	Preparación de las muestras, electroforesis y transferencia	118
8.4	Bloqueo e incubación con los anticuerpos	119
8.5	Revelado	123
8.6	Normalización de datos	123
9.	Análisis del nivel de expresión génica	124
9.1	Extracción de ARN de tejido	124
9.2	Obtención del ADNc	125
9.3	Diseño de los cebadores	125
9.4	PCR semicuantitativa	127
10.	Recogida y análisis de muestras de orina de pacientes con DRA	129
11.	Tratamiento de los datos y análisis estadístico	130
12.	Reactivos, materiales y equipos	131
12.1	Reactivos y productos	131
12.2	Equipos y aparatos	134
12.3	Programas informáticos	135
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		139
Bloque I: diagnóstico temprano y etiológico de DRA en animales		141
1.	Caracterización de los modelos experimentales animales de daño renal agudo	143
1.1	Caracterización de la función renal	144
1.1.1	Análisis de la creatinina y de la urea plasmática	144
1.1.2	Medida de la tasa de filtración glomerular	145
1.2	Caracterización del tipo de DRA	148

1.2.1	Concentración de proteínas en la orina	148
1.2.2	Excreción fraccional de sodio (EFNa)	149
1.2.3	Diagnóstico diferencial del DRA: CrU/CrP	151
1.2.4	Estudio histológico del riñón	153
2.	Estudio del patrón diferencial de marcadores urinarios asociados a distintas formas de daño renal agudo	156
3.	Desarrollo de un algoritmo matemático	156
	Bloque II: diagnóstico etiológico, temprano y pronóstico de DRA en humanos.	156
4.	Clasificación de los pacientes	156
5.	Valor pronóstico de los biomarcadores urinarios	157
	Bloque III: significado biológico de los marcadores: origen y mecanismos fisiopatológicos de aparición en la orina	157
6.	Estudio del papel biológico de los marcadores urinarios	157
6.1	NGAL	162
6.2	KIM-1	163
6.3	PAI-1	165
6.4	t-gelsolina	166
6.5	TCP-1	167
6.6	Reg IIIb	168
6.7	GM2AP	169
7.	GM2AP como marcador diferencial de daño tubular cortical	171
7.1	La excreción urinaria de GM2AP depende de la dosis del cisplatino	172
7.1.1	Efecto de diferentes dosis del cisplatino en la función renal	172
7.1.2	Excreción urinaria de GM2AP, t-gelsolina y Reg IIIb	177
8.	El origen de NGAL, KIM-1 y NAG urinarios es plasmático y no renal.	181
8.1	NGAL y KIM-1 están incrementados en los modelos animales de nefrotoxicidad e isquemia	181
8.1.1	Marcadores en el tejido renal evaluados por PCR, ELISA y WB	181
8.1.2	Marcadores en el tejido renal evaluados por inmunohistoquímica	183

8.1.3	Marcadores en la orina y en el plasma	185
8.2	NGAL y KIM-1 desaparecen de la orina durante la perfusión renal in situ con Krebs	187
8.3	NGAL reaparece en la orina de ratas con DRA, y no de ratas controles, cuando se perfunde los riñones con Krebs que contiene NGAL exógeno	191
8.4	NGAL se detecta en el efluente de la vena renal durante la perfusión con Krebs en ratas con DRA, pero no en el de los controles	193
	DISCUSIÓN GENERAL	249
1.	Hacia un nuevo sistema de diagnóstico precoz y etiológico del DRA	250
2.	NGAL y KIM-1 urinarios vienen de la sangre y no del tejido renal: cambio en su significado diagnóstico	250
	CONCLUSIONES	265
	BIBLIOGRAFÍA	271

Índice de figuras

Sección eliminada por sostener datos susceptibles de ser incluidos en una solicitud de patente.

Índice de tablas

Sección eliminada por sostener datos susceptibles de ser incluidos en una solicitud de patente.

Abreviaturas

Sección eliminada por sostener datos susceptibles de ser incluidos en una solicitud de patente.

“Una ciudadanía que no entienda como opera la ciencia corre el peligro de caer en las redes de la ignorancia”.

Isaac Asimov

Introducción

BLOQUE I: EL DAÑO RENAL AGUDO

El fracaso renal agudo (FRA) es la pérdida repentina de la capacidad de los riñones de mantener un balance hidro-electrolítico adecuado y de depurar la sangre de fármacos, tóxicos y productos nocivos de desecho procedentes del metabolismo. Como consecuencia, se produce una retención de los fluidos (oliguria o anuria) y una acumulación en la sangre de productos normalmente encontrados en la orina (uremia), como la creatinina, la urea y otros productos nitrogenados (azotemia) (Kellum, Leblanc, & Venkataraman, 2008; Quiros y cols., 2010a). En la actualidad, se prefiere el uso del término daño renal agudo (DRA), que hace referencia a un espectro de enfermedad más amplio, desde un daño leve hasta el fracaso renal. El DRA normalmente cursa con oliguria, sin embargo, la diuresis depende de muchos factores independientes del daño renal, como la ingesta de líquidos, los cambios hormonales y los cambios osmóticos. Por ello, es también común encontrar casos de DRA no oligúrico.

Un aspecto determinante para el éxito del manejo clínico del DRA es su diagnóstico precoz, que mejora significativamente la intervención terapéutica y su pronóstico (Prasad Devarajan, 2008a). Tradicionalmente, el DRA se ha diagnosticado a través de signos de disfunción renal, como el aumento de la concentración plasmática de creatinina y urea, oliguria o cambios en la excreción fraccional de sodio (Vishal S. Vaidya, Ferguson, & Bonventre, 2008). Sin embargo, debido a la adaptación compensatoria proporcionada por la reserva funcional, la disfunción renal sólo aparece después de que ocurra una extensa pérdida funcional de las nefronas (Mueller, Price, & Finn, 1998). Por tanto, para diagnosticar la afectación renal no es suficiente sólo con la alteración de la diuresis o de la creatinina plasmática, por lo que no se dispone todavía de marcadores fiables de daño renal que sustituyan estos dos elementos diagnósticos (Kellum y cols., 2008).

Entre las causas más comunes del daño renal agudo cabe destacar la isquemia renal, y la nefrotoxicidad farmacológica (Binswanger, 1997). De hecho, un 25% de los fármacos más comunes utilizados en las unidades de cuidados intensivos son potencialmente nefrotóxicos ya que originan algún grado de daño renal agudo en los pacientes a los que se les suministra (Taber & Mueller, 2006a). La necrosis tubular aguda (NTA) es la causa más frecuente del DRA adquirido en el hospital.

El DRA tiene un gran peso socioeconómico y humano derivado de su alta incidencia y alarmante tasa de mortalidad, así como por los desproporcionados

costes derivados del tratamiento, seguimiento de los pacientes y del correspondiente absentismo laboral. Uno de los grandes problemas, y gran reto para el futuro, es que esta tasa de mortalidad ha permanecido prácticamente invariable en los últimos 50 años, al igual que la necesidad de aplicar diálisis en la mayoría de los casos, lo que genera un gran coste económico.

En este contexto, el diagnóstico actual del DRA presenta una serie de necesidades para reducir su alta tasa de morbimortalidad. Es necesario adoptar las siguientes medidas que son objeto de esta tesis doctoral: diagnóstico temprano mediante la búsqueda de marcadores de daño renal que se anticipen a la creatinina plasmática y la oliguria; diagnóstico etiopatológico más exacto que el actual basado en marcadores urinarios que diferencien entre el tipo de DRA y su causa; y el pronóstico con el que va a cursar la enfermedad.

1. El Sistema Renal

1.1 Descripción anatómica

El aparato excretor está constituido por dos riñones, con sus correspondientes uréteres asociados, la vejiga y la uretra (figura 1). Los riñones son los responsables del filtrado de agua y solutos que viajan en la sangre hacia esta región del organismo. Una vez en ellos, el líquido resultante de dicho proceso de filtración sufre una serie de modificaciones en su composición hasta llegar a formar la orina. Este líquido –ya modificado– abandona el riñón, pasando al uréter, que, a su vez, desemboca en la vejiga, en la que permanece almacenado de forma transitoria hasta que, llegado el momento, se produce su contracción y la orina es expulsada a través de un conducto único: la uretra.

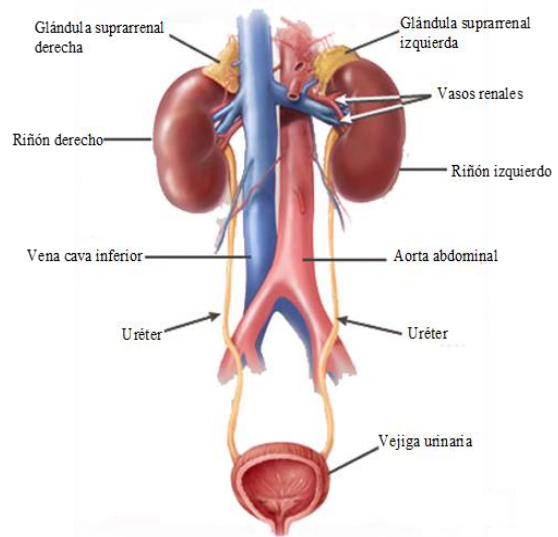


Figura 1. Representación esquemática del aparato urinario.

Los riñones son unas vísceras que llevan a cabo numerosas funciones endocrinas, funcionales y bioquímicas con el fin de mantener la sangre limpia de desechos y químicamente equilibrada. Por una parte, los riñones son capaces de retirar los productos metabólicos de la sangre (urea, ácido úrico, creatinina, bilirrubina...) así como productos químicos extraños, fármacos o metales entre otros (Eaton & Pooler, 2006). Además, estos órganos son los responsables de mantener la homeostasis del organismo mediante su participación en la regulación de la excreción de iones y moléculas orgánicas (como son la glucosa, aminoácidos, proteínas, urea, ácido úrico y otros) (Eaton, Pooler, & Vander, 2009). Además, los riñones participan en los mecanismos reguladores de la presión arterial (PA) y del mantenimiento del volumen sanguíneo.

Si al riñón se le realiza un corte longitudinal se puede observar una ligera incisión denominada hilio renal que, a su vez, se continúa con el seno renal por el que discurren los vasos sanguíneos renales, nervios y vasos linfáticos junto con el uréter que, en esta región, conforma la pelvis renal.

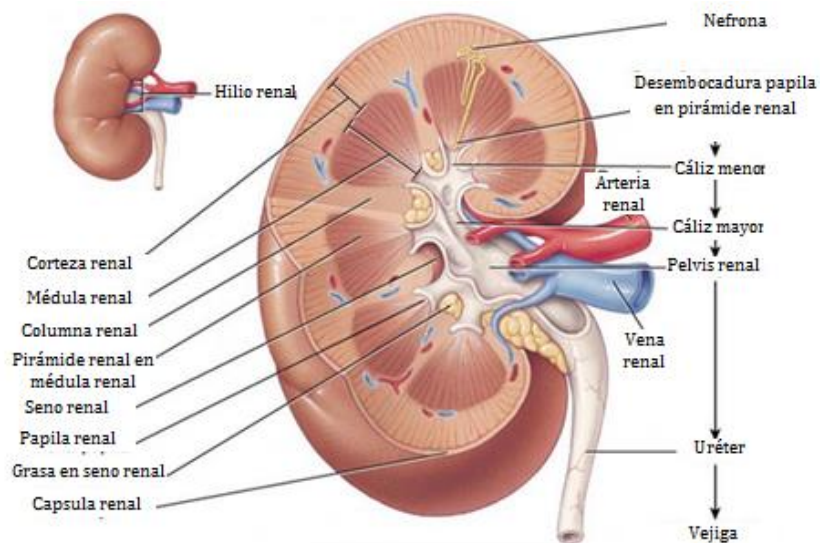


Figura 2. Representación del riñón a nivel histológico. Ruta que sigue la orina desde la papila a la vejiga.

El seno renal se encuentra recubierto por tejido conjuntivo de la cápsula renal y muestra diversas protusiones conocidas en general como papilas renales. Sobre

las papilas renales se acoplan los cálices menores, que emergen como divisiones de los cálices mayores irradiados desde la pelvis renal y se encuentran en número de entre 7 y 14. Asimismo, en los vértices de cada papila desembocan los túbulos colectores perforando tanto la papila como el cáliz para dar lugar al área cribosa papilar.

El riñón, de forma análoga al resto de órganos macizos presenta dos componentes principales: estroma y parénquima. El estroma renal comprende: (i) la cápsula renal: de conjuntivo denso y a su vez compuesta por dos capas, la interna recubierta por tejido adiposo y la externa con abundantes miofibroblastos; (ii) el tejido intersticial de conjuntivo laxo que emite prolongaciones hacia el parénquima.

Por su parte, en el parénquima renal se pueden apreciar dos zonas: (i) la corteza renal que es una capa de unos 10 mm de grosor que se localiza en la porción más externa del riñón. Se encuentra dividida en varias regiones por unas prolongaciones denominadas rayos medulares de Ferrein (400 o 500, irradian desde la médula). La zona más externa de la corteza, a la que no alcanzan los rayos de Ferrein se conoce como *cortex corticis* (del latín corteza de la corteza) (Netter & Hansen, 2003); (ii) la médula renal que ocupa la porción interna del riñón y está constituida por 8-18 pirámides renales de Malpighi (cuyo vértice es la ya citada papila renal) separadas por columnas renales de Bertin. Las pirámides renales están formadas por asas de Henle, túbulos colectores y vasos sanguíneos rectos y las columnas renales, por prolongaciones de la corteza que rodean a las pirámides renales.

1.2 La nefrona

La nefrona es la unidad anatómica y funcional del riñón. El riñón humano está formado por cerca de un millón y medio de nefronas. Cada una de ellas consta de un corpúsculo renal y un sistema tubular que se extiende por fuera del corpúsculo renal. El riñón lleva a cabo sus funciones mediante dos procesos fundamentales producidos en estas unidades, i) la filtración y ii) el transporte tubular (que comprende la reabsorción y secreción tubular) que estudiaremos en el apartado 2.1 y 2.2 respectivamente.

1.2.1 El corpúsculo renal o de Malpighi

Es la estructura donde se produce el proceso de filtración. Está compuesto por el glomérulo capilar y la cápsula de Bowman que lo recubre.

El glomérulo está formado por una red de capilares fenestrados que surgen como ramificaciones de la arteriola aferente y acaban por reunirse en la arteriola eferente. Especialmente importante en el glomérulo, es la existencia de la barrera de filtración, que consta de tres porciones fundamentales: el endotelio capilar, los pedicelos de los podocitos y la membrana basal. Esta última tiene una lámina rara externa, una lámina densa y una lámina rara interna. Las dos láminas raras se componen fundamentalmente de heparán sulfato que, por repulsión, impide el filtrado de sustancias aniónicas y la lámina densa, de colágeno IV que actúa como filtro físico.

La cápsula de Bowman con forma de copa presenta un polo vascular donde se encuentran las arteriolas y un polo urinario que se continúa con la luz del túbulo. Consta de dos hojas, la externa y la interna donde se sitúan los podocitos. Los podocitos son células epiteliales especializadas que emiten prolongaciones que, a su vez, se interdigitan entre sí y rodean a los capilares glomerulares configurando la denominada hendidura de filtración.

Entre el glomérulo y la cápsula de Bowman se localiza el mesangio glomerular, formado por las células mesangiales y la matriz que producen. Estas células tienen capacidad contráctil y modifican el diámetro de los capilares en respuesta a estímulos hormonales como la angiotensina II o el péptido natriurético auricular (PNA).

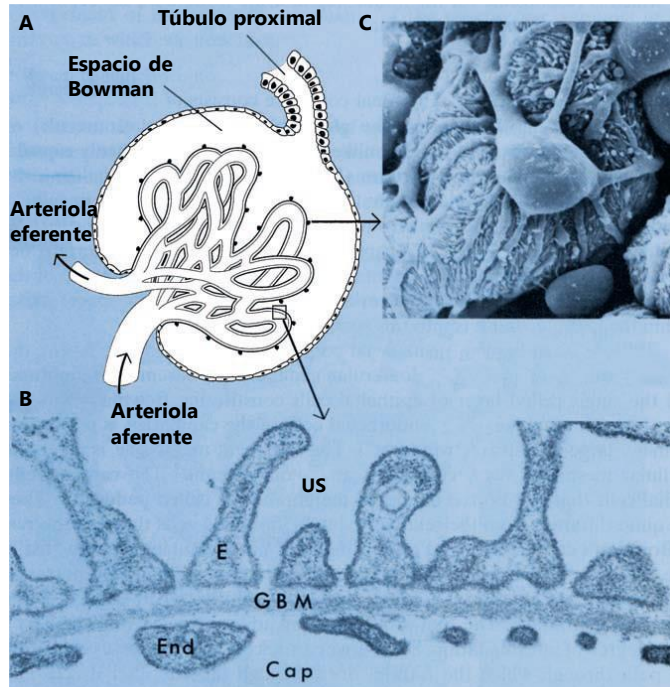


Figura 3. El corpúsculo renal. Adaptado (Eaton y cols., 2009). A: Anatomía del glomérulo. B: Sección transversal del glomérulo. C: Microscopía electrónica de un podocito visto desde el espacio de Bowman. Cap: lumen del capilar; End: endotelio capilar; GMB: membrana basal glomerular; E: pedicelo; US: espacio urinario.

1.2.2 El sistema tubular

El sistema tubular de la nefrona es el encargado de llevar a cabo los procesos de secreción y reabsorción, que determinan la composición de la orina (Madsen & Tisher, 1986a) y que se describen con más detalle en el apartado 2.2. La secreción es muy importante para determinar las cantidades finales urinarias de potasio e hidrogeniones entre otras, mientras que la reabsorción se encarga de reabsorber casi el 90 % del agua contenida en el filtrado glomerular y prácticamente la totalidad de otros componentes del filtrado, como la glucosa, los aminoácidos y el sodio. Así, los túbulos separan las sustancias que deben ser eliminadas por la orina de las que deben ser conservadas por el organismo sin perder una cantidad excesiva de agua (Guyton & Hall, 2016).

La pared de los túbulos está constituida por una sola capa de células epiteliales que descansan sobre una membrana basal. La estructura y función de esas células epiteliales varía mucho de un segmento a otro del túbulo ya que este epitelio tubular es el encargado de reabsorber y secretar de forma selectiva los distintos compuestos nombrados anteriormente. En la nefrona se pueden distinguir las diferentes porciones del sistema tubular desde el glomérulo hasta la pelvis renal: (i) túbulo contorneado proximal, (ii) rama estrecha descendente del asa de Henle; (iii) rama gruesa ascendente del asa de Henle, (iv) túbulo contorneado distal y (v) túbulo o conducto colector.

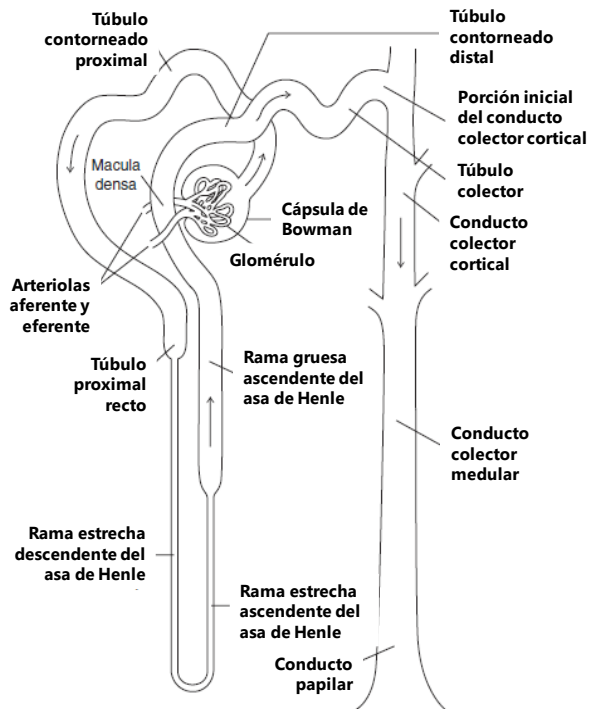


Figura 4. Porciones tubulares básicas de la nefrona. Adaptado (Eaton y cols., 2009). No están representadas gráficamente a escala las longitudes relativas de las distintas porciones del túbulo.

1.2.3 El aparato yuxtaglomerular

En el túbulo distal, algunas células de su pared tienen unas características especiales que dan lugar a una estructura denominada mácula densa, que va a formar parte de un dispositivo específico denominado aparato yuxtaglomerular. Está situado entre la primera porción del túbulo contorneado distal y de la arteriola aferente y eferente pertenecientes al corpúsculo renal de su propia nefrona (Barajas, 1979). Formado por tres tipos de células; i) las células yuxtaglomerulares, ii) las células de la mácula densa y iii) las células de Goormaghtigh o del lacis. Las células yuxtaglomerulares son células mioepiteliales que rodean el final de la arteriola aferente, ricas en gránulos de secreción que producen el 90 % de la renina del

organismo. Por otra parte, las células de la mácula densa son células epiteliales diferenciadas de la pared del túbulo recto distal ascendente, que controlan la secreción de renina y la velocidad de filtración glomerular. Estas células actúan como sensores de Na^+ en el túbulo distal y controlan la TFG, por lo que son fundamentales en la homeostasis renal mediante el mecanismo del retrocontrol túbulo glomerular (RCTG). Por último, las células del lacis son células mesangiales extraglomerulares que poseen finas prolongaciones en íntimo contacto con el resto de formaciones del aparato yuxtaglomerular y con las células mesangiales intercapilares del glomérulo (Arias Rodríguez, Aljama, & Hernando Avendaño, 2013).

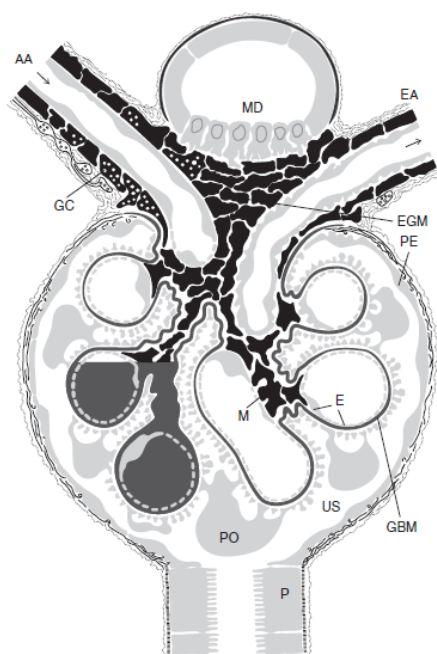


Figura 5. Representación esquemática del aparato yuxtaglomerular. (Eaton y cols., 2009). AA: arteriola aferente; EA: arteriola eferente; MD: mácula densa; GC: células granulares; EGM: célula mesangial extraglomerular; PE: hoja externa de cápsula de Bowman; E: endotelio capilar; M: célula mesangial intraglomerular; PO: podocito; US: espacio urinario; GBM: membrana basal glomerular; P: célula proximal

El RCTG permite controlar la TFG en relación con la cantidad de Na^+ filtrado que llega a la mácula densa, mediante una mayor o menor contracción de la arteriola aferente (Just, 2006). Estas células presentan cotransportadores $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ (NKCC2) (Obermüller, Kunchaparty, Ellison, & Bachmann, 1996) que actúan como sensores, detectan la concentración de Na^+ que llega a la parte final del asa de Henle y activan el RCTG para mantener la homeostasis renal mediante vías de señalización aún no comprendidas por completo (Vallon, 2003).

Una filtración excesiva en el glomérulo (hiperperfusión renal), o una absorción inadecuada de sodio en el túbulo contorneado proximal o en el asa ascendente de Henle producen un filtrado en el túbulo contorneado distal con una concentración de sodio anormalmente alta. Los cotransportadores Na^+/Cl^- introducen sodio en las células de la mácula densa, que no pueden salir porque la bomba Na^+/K^+ no consigue eliminar el exceso de Na^+ . Como consecuencia, la osmolaridad de las células aumenta, por lo que entra agua y las células se hinchan. En este momento, un canal aniónico no selectivo activado por el estiramiento se activa en el polo basolateral de las células. El ATP sale por estos canales y es transformado en adenosina. La adenosina tiene un efecto vasoconstrictor sobre la arteriola aferente adyacente, vía los receptores A1, y (en menor grado) un efecto vasodilatador de las arteriolas eferentes vía los receptores A2. Esto produce una reducción de la perfusión del glomérulo, y por tanto una reducción de la TFG (Castrop, Klar, Wagner, Höcherl, & Kurtz, 2003; Persson, Ollerstam, Liu, & Brown, 2004; Vallon, 2003).

2. Procesos renales

La formación de orina pasa por una serie de procesos renales básicos que engloban la filtración glomerular y la reabsorción y secreción tubular (figura 6). El resultado final de estos tres procesos define la cantidad de orina eliminada por un individuo, de modo que tal cantidad se puede calcular de la siguiente manera:

$$\text{Cantidad de orina} = \text{Filtración glomerular} - \text{Reabsorción} + \text{Secreción}$$

Con ello, se eliminan del organismo sustancias tóxicas y metabolitos carentes de utilidad, además de contribuir a la regulación de la presión arterial, el control del balance ácido base e hidroelectrolítico.

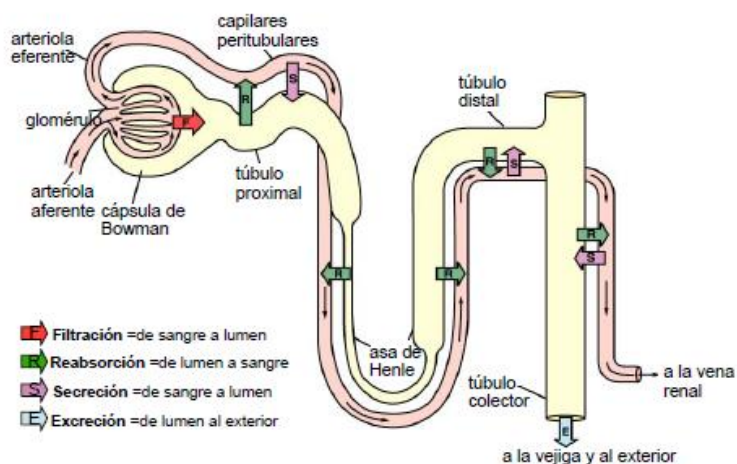


Figura 6. Procesos básicos en la función renal. (Guyton & Hall, 2016)

2.1 Filtración glomerular

Proceso en el cual el plasma es filtrado en los capilares glomerulares y entregado a la cápsula de Bowman dando lugar al ultrafiltrado u orina primitiva. Normalmente los riñones filtran unos 125 mL de plasma por minuto lo que corresponde aproximadamente a un 20 % del plasma que pasa por el riñón. La tasa de filtración glomerular (TFG) es la suma de la filtración de todas las nefronas funcionales de ambos riñones por unidad de tiempo. Hasta el momento, una disminución de la TFG se consideraba un aspecto relevante a la hora de diagnosticar el DRA, sin embargo, estudios actuales centrados en el concepto de DRA subclínico han modificado dicha consideración, ya que en el DRA de tipo intrínseco o parenquimatoso puede existir un daño tisular sin la presencia de un daño funcional. Incluso en condiciones fisiológicas la TFG varía de acuerdo con la dieta y otros factores y permanece normal a pesar de una disminución importante del número de nefronas. Esto se debe a la denominada reserva funcional renal (RFR), que no es más que la diferencia entre el pico de TFG alcanzado con “estrés” y la TFG basal. Gracias a los mecanismos adaptativos, la RFR puede utilizarse parcial o completamente para alcanzar una función renal normal o por encima de lo normal en estados de hiperfiltración en los que existe una TFG alta como en el embarazo, hipertensión, nefropatía diabética, riñones únicos o donantes renales (Murillo-Brambila y cols., 2015). Esta idea está ampliamente discutida en el bloque II.

La filtración está condicionada por los pesos moleculares de las sustancias, así como por la presencia de cargas en su superficie. De esta manera, las sustancias o moléculas de peso molecular elevado o con carga negativa son incapaces de atravesar la barrera de filtración. Como resultado de este condicionamiento, la concentración de proteínas en el filtrado glomerular representa unas 1/240 veces el contenido proteico del plasma (Guyton & Hall, 2016). Al margen del filtro impuesto por la propia estructura del corpúsculo renal, la filtración resulta dependiente del gradiente de presiones que se establece entre los elementos implicados en este proceso. Así, el proceso de filtración glomerular depende de cuatro presiones:

- Favorecen la filtración:
 - La presión hidrostática de los capilares glomerulares (P_G). El valor normal de esta presión ronda los 60 mmHg.
 - La presión oncótica debida a las proteínas que se acumulan en la cápsula de Bowman (π_B). Esta presión es prácticamente nula en condiciones normales (0 mm Hg).
- Se oponen a la filtración:
 - La presión hidrostática de la cápsula de Bowman (P_B): 18 mm Hg.
 - La presión coloidosmótica u oncótica ejercida por las proteínas plasmáticas en los capilares y no filtradas (π_G): 32 mm Hg.

Estas presiones, en asociación con el coeficiente de filtración capilar (K_f), que es producto de la permeabilidad capilar y la superficie de filtración, permiten calcular la tasa de filtración glomerular conforme a la fórmula que sigue:

$$\text{TFG} = K_f \cdot (P_G - P_B - \pi_G + \pi_B)$$

En cualquier caso, dada la multitud de factores que condicionan el flujo sanguíneo renal y la TFG, el riñón ha desarrollado varios mecanismos, anteriormente explicados, que le permiten mantener estos factores relativamente constantes. Entre ellos destacan el retrocontrol túbulo glomerular (RCTG) y la autorregulación renal mediante el aparato yuxtaglomerular.

2.2 Reabsorción y secreción tubulares: mecanismos de transporte

La composición de la orina final difiere sustancialmente de la del ultrafiltrado. En los túbulos, el ultrafiltrado sufre variaciones considerables debido a dos procesos: la reabsorción y la secreción. En el primero las moléculas deben ser transportadas primeramente a través de la membrana luminal de las células tubulares, para después atravesar la membrana de la cara basal de las células y llegar hasta las membranas de los capilares peritubulares atravesando el espacio intersticial. En general, la reabsorción de solutos implica un aumento de su concentración en el capilar y un descenso de la misma en los túbulos renales, de manera que se propicia un arrastre osmótico de agua desde el túbulo a la circulación. El segundo, al contrario que la reabsorción, las moléculas son transportadas desde los capilares peritubulares hasta el lumen tubular. Debido a esto, de los 180 L de ultrafiltrado que se producen cada día mediante la filtración glomerular, sólo 1,5 L pasan a convertirse en orina que será liberada al exterior.

Al igual que sucediera en el caso de la filtración, en la reabsorción participa un juego de presiones que proporciona el gradiente óptimo para que todo transcurra con normalidad. En este caso, se oponen a la reabsorción la presión oncótica tubular y la presión hidrostática capilar mientras que, la favorecen la presión hidrostática tubular y la presión oncótica capilar. Es entonces, la baja presión hidrostática de los capilares peritubulares la que desempeña un papel más importante a fin de que se produzca la reabsorción.

Existen dos abordajes a la hora de estudiar el proceso de reabsorción en detalle. Por un lado, se puede hacer una descripción de la reabsorción de los iones y compuestos de mayor importancia en el organismo y por otro, se puede desmembrar el proceso atendiendo a lo que sucede en cada uno de los segmentos del túbulo renal. En este caso, se opta por la segunda de las opciones, aunque haciendo hincapié en el mecanismo de absorción de algunos solutos particulares, de modo que a continuación se detalla lo que sucede en las porciones tubulares.

En la membrana basolateral de las células tubulares se encuentra la bomba de Na^+/K^+ ATPasa, la cual bombea 3 iones Na^+ hacia el exterior de la célula y 2 iones K^+ al interior celular utilizando como fuente de energía la hidrólisis del ATP (transporte activo primario). La actividad de esta bomba permite mantener concentraciones intracelulares de Na^+ bajas y de K^+ altas. Esta bomba se encuentra en la membrana basolateral de las células tubulares de todos los segmentos tubulares de la nefrona. El gradiente electroquímico para el Na^+ que se mantiene gracias a la actividad de esta bomba permite el ingreso

de Na^+ desde el lumen tubular hacia el interior celular. Este ingreso de Na^+ se realiza a través de la vía transcelular utilizando transportadores y permite el cotransporte de otros iones y compuestos (transporte activo secundario). Los componentes del ultrafiltrado glomerular (UFG) que utilizan este mecanismo de transporte incluyen: la glucosa, aminoácidos, fosfatos, sulfatos y el anión HCO_3^- . Además, el agua se reabsorbe por vía paracelular o transcelular en un 70% en el TCP siguiendo el gradiente osmótico

transtubular originado por la reabsorción de solutos citados. Es por ello por lo que la alteración en la reabsorción del Na^+ y de los demás solutos alterará la difusión de agua y provocará su aparición en la orina provocando poliuria, que como vimos al principio del bloque, es un indicativo para diagnosticar una afectación renal, aunque *per se*, esta alteración es insuficiente para realizar un correcto diagnóstico necesitándose unos marcadores fiables de daño renal (Kellum y cols., 2008). Estos marcadores, fundamentalmente proteínas, tienen unos procesos de reabsorción y secreción específicos, fundamentalmente mediados por el transportador megalina cubilina y que estudiaremos en mayor profundidad en el apartado de resultados.



Figura 7. Mecanismos celulares de reabsorción de sodio en la porción inicial del túbulo proximal. (Arias Rodríguez y cols., 2013)

En el asa de Henle se absorbe el 25% del sodio y el 20% de agua y actúa como un sistema de amortiguación, a fin de reducir el contenido intratubular de sodio a unas dimensiones manejables por los túbulos distal y colector. Finalmente, la primera porción del túbulo distal es prácticamente impermeable al agua. En ella se reabsorben activamente sodio, cloro y potasio y, el líquido tubular continúa diluyéndose. El túbulo colector junto con la última porción del túbulo distal, presentan una permeabilidad susceptible de ser regulada por la hormona antidiurética (ADH). En presencia de altos niveles de esta hormona son permeables al agua, siendo impermeables en ausencia de la misma. En este caso, la osmolaridad del líquido tubular dependerá de los niveles de la ADH.

2.3 Caracterización de la función renal

Para la caracterización de la función renal, una primera aproximación consiste en recurrir a aquellos parámetros que proporcionan información sobre el funcionamiento de los procesos renales básicos. Además de realizarse análisis de orina y estudios del sedimento urinario, existen tres parámetros que proporcionan un valor numérico y resultan de fácil comprensión y comparación con rangos de normalidad preestablecidos. Tales parámetros son:

- La tasa de filtración glomerular (TFG), cuya fórmula se ha expuesto en el apartado 2.1 correspondiente a filtración glomerular.
- El aclaramiento plasmático (C): se define el aclaramiento plasmático como la cantidad de plasma que es depurado de una sustancia a su paso por el riñón en un minuto. La fórmula que define el aclaramiento de una sustancia, S es:

$$C = \frac{U_s \cdot V_m}{P_s}$$

Donde U_s es la concentración de sustancia en orina, P_s la concentración de sustancia en plasma y V_m , el volumen de orina por minuto. Especialmente importante en la evaluación de la función renal es la determinación del aclaramiento de creatinina e inulina. La primera de ellas es una sustancia endógena derivada del metabolismo de creatina en el músculo esquelético y con una tasa de liberación al plasma prácticamente constante que, además, se

filtra libremente en el glomérulo y no se secreta ni reabsorbe, de modo que sirve para estimar la tasa de filtración glomerular. Por su parte, la inulina, es una sustancia exógena de similares características en cuanto a su comportamiento en los procesos renales básicos pero que ha de ser inyectada por vía intravenosa. Otra de las sustancias con un aclaramiento susceptible de ser medido es el ácido paraaminohipúrico (AHA). Esta sustancia se filtra libremente en el riñón y, además, la porción de la misma que queda en plasma tras la filtración es secretada en los capilares peritubulares, de manera que la medida de su aclaramiento permite estimar la cantidad de plasma que atraviesa los riñones.

- Transporte tubular máximo (T_m): se define como tal la cantidad máxima de una sustancia que puede ser reabsorbida o secretada activamente. Se expresa en mg/min y depende de las características del sistema de transporte de la sustancia en particular.
- Excreción Fraccional de Sodio (EFNa): El sodio urinario (NaU) es un indicador excelente de la capacidad de reabsorción tubular cuando se considera el balance total de sodio del paciente. La excreción urinaria de sodio en circunstancias normales es igual que la ingesta. La sensibilidad de la excreción urinaria de sodio se puede aumentar calculando la excreción fraccional de sodio, que no es más que la fracción del sodio filtrado que, finalmente, se excreta en la orina y se calcula de la forma siguiente:

$$EFNa (\%) = \frac{Na \text{ filtrado}}{Na \text{ excretado}} \times 100$$

EFNa es lo opuesto a la reabsorción fraccional de sodio y, por tanto, es un excelente indicador de reabsorción tubular.

3. El Daño Renal Agudo

El daño renal agudo es un tipo de lesión de gravedad clínica en la que la función excretora renal se reduce súbitamente, tanto que los riñones son incapaces de depurar la sangre de los fármacos, tóxicos y productos nocivos de desecho procedentes del metabolismo, y de conseguir el equilibrio electrolítico. Como consecuencia, la función de muchos otros órganos y tejidos se ven seriamente comprometida y con ella la vida del paciente. El DRA se caracteriza por una disfunción renal aguda (que surge horas o pocos días después del inicio del daño) derivada de

un estímulo patológico rápido e intenso (A & Cordero, 1998; Gaínza, F.J. & Liaño García, 2007).

Se estima que entre el 19 y el 33 % de los casos de daño renal agudo detectado en los hospitales, se debe a la nefrotoxicidad de distintos fármacos, siendo los antibióticos, principalmente los aminoglucósidos gentamicina y tobramicina, los más comunes (Choudhury & Ahmed, 2006; Vishal S. Vaidya y cols., 2008). Otros fármacos que pueden desembocar en un DRA son los agentes quimioterapéuticos como el cisplatino o inmunosupresores como la ciclosporina, de uso común tras el trasplante de órganos como, paradójicamente, el riñón.

La nefropatía inducida por contraste (NIC) no se trata de una complicación menor, puesto que su incidencia se sitúa en torno al 12% (Rihal y cols., 2002). Aproximadamente un 10% de los pacientes que sufren NIC necesitan diálisis, una fracción de los cuales requiere diálisis permanente (Peter A McCullough y cols., 2006). La NIC prolonga el tiempo de hospitalización y aumenta la mortalidad, tanto intrahospitalaria, como a 30 días, 1 año (22 vs 1.4%) y 5 años (12 vs 4% y 45 vs 15%) también incrementa la estancia hospitalaria, la morbilidad y la incidencia de fallo renal crónico (Block & Schoolwerth, 2006a; Gupta, Gurm, Bhatt, Chew, & Ellis, 2005; Kuchulakanti y cols., 2006; P A McCullough, Wolyn, Rocher, Levin, & O'Neill, 1997; Sinning y cols., 2010; S. S. Waikar, Liu, & Chertow, 2008a). Hasta un 30% de los sujetos que sufren NIC permanecerá posteriormente con cierto grado de insuficiencia renal.

La función renal puede normalizarse si se descubre y se trata satisfactoriamente la causa subyacente del problema. El pronóstico depende fundamentalmente de la intensidad y el tipo de lesión. En general, una lesión tisular leve o una disfunción moderada desaparecen con la retirada del agente nefrotóxico, mientras que la destrucción extensa de uno o varios compartimentos renales (por ejemplo, la necrosis tubular aguda) puede originar una deficiente reparación e incluso un deterioro progresivo y crónico.

3.1 Epidemiología y etiopatogenia

El DRA presenta todavía una alta morbimortalidad con consecuencias humanas y sociales muy importantes. Se calcula que aproximadamente entre el 1-2% de los pacientes que ingresan en los hospitales presentan DRA (Cerdeja y cols., 2008; G M

Chertow y cols., 2001a; O. Liangos y cols., 2005a), el 1-7% de los pacientes desarrollan un DRA durante su ingreso hospitalario (Kellum & Hoste, 2008a; Kerr, Bedford, Matthews, & O'Donoghue, 2014; Sushrut S Waikar, Liu, & Chertow, 2008) y el 25% de los pacientes en la unidad de cuidados intensivos (UCI) desarrollan DRA en algún momento. La tasa de mortalidad debido al DRA se mantiene alarmantemente constante alrededor del 45% de los casos, que asciende al 80% entre los pacientes que desarrollan fallo multiorgánico (Gaínza, F.J. & Liaño García, 2007) y en la mayoría de los casos es necesario aplicar diálisis, lo que supone un gran coste humano y socioeconómico (Hoste & De Corte, 2011).

Un estudio reciente mostró que, en el mundo, la incidencia de DRA en los hospitales está cercana a 1 de cada 5 adultos y en 1 de cada 3 niños (Susantitaphong y cols., 2013). Es importante destacar que la incidencia del DRA crece a una tasa anual de 10% (Murugan & Kellum, 2011; Siew & Himmelfarb, 2013), debido en parte al crecimiento de la población y un aumento en la incidencia de factores desencadenantes de esta lesión. Además, la incidencia de diálisis que requieren los pacientes con DRA crece a una tasa similar (R. K. Hsu, McCulloch, Dudley, Lo, & Hsu, 2013).

La etiología clínica del DRA es variada ya que puede ser consecuencia de la administración de fármacos, de la exposición a diferentes toxinas medioambientales, de procedimientos quirúrgicos, de la aparición de una sepsis o de una combinación de varios factores, entre otras (Melnikov & Molitoris, 2008; Molitoris y cols., 2007). Para el funcionamiento renal adecuado se necesita una perfusión renal apropiada, un parénquima renal íntegro y una correcta permeabilidad de las vías excretoras. La alteración súbita de cualquiera de estas características puede ocasionar un deterioro de la función renal. Dependiendo del elemento funcional alterado podemos encontrar tres tipos de DRA: (i) DRA pre-renal, si la etiología del daño es una alteración en la perfusión renal; (ii) DRA renal o intrínseco, en el que el daño aparece como consecuencia de una alteración en el parénquima renal y (iii) DRA post-renal, si la causa del daño es la obstrucción de las vías urinarias (Arias Rodríguez y cols., 2013).

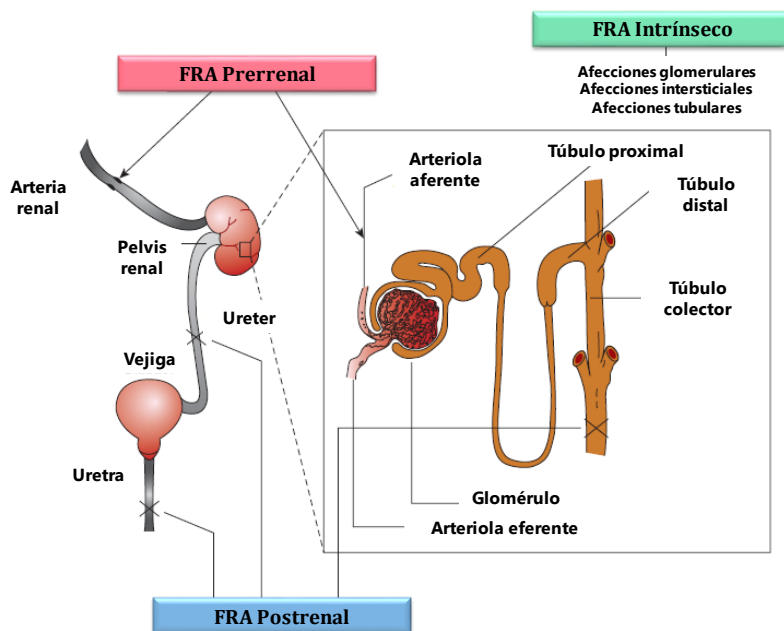


Figura 8. Etiología del DRA. Adaptado (DiPiro y cols., 2014)

Las causas pre-renales y renales representan el mayor porcentaje de casos, aunque no es infrecuente observar que la etiología sea multifactorial y que un mismo agente nocivo produzca simultáneamente efectos pre-renales y renales (A & Cordero, 1998; Singri, Ahya, & Levin, 2003) La tabla 1 resume las principales características de los tres tipos de DRA anteriormente mencionados. El DRA más común es el DRA de tipo pre-renal ya que causa el 55-60 % de los casos, mientras que el DRA renal causa el 35 % y el DRA post-renal el 5 % restante.

Etiología de DRA	Efecto patológico	Causa
DRA Pre-renal	Hipoperfusión renal y alteración de la autorregulación renal	Deshidratación Fármacos Envejecimiento Patologías como estenosis bilateral de arteria renal
DRA renal	Daño del parénquima renal	Daño vascular y glomerular NTA por isquemia, toxinas exógenas (metales pesados, fármacos (aminoglucósidos) y contrastes radiológicos)
DRA post-renal	Obstrucción súbita del flujo de orina	Fármacos Patologías obstructivas (tumores, cálculos renales...)

Tabla 1. Características principales de los tipos de DRA. Adaptada (Porth, 2011). DRA: daño renal agudo.

3.2 Repercusión clínica y económica

El daño renal agudo es un problema sanitario y económico muy grave ya que presenta una elevada morbilidad y mortalidad. Además, este síndrome renal tiene grandes consecuencias para la salud, no sólo en los grados de mayor severidad en los que se necesita diálisis, sino también en aquellos grados de severidad media o DRA subclínico, lo que conlleva un gran gasto socioeconómico asociado (Sancho-Martínez, Prieto, y cols., 2015).

El DRA es un problema muy importante en las Unidades de Cuidados Intensivos. En este contexto, la incidencia es tan alta como el 30-50% de los casos (Endre y cols., 2013; Sutherland y cols., 2015), y la mortalidad asociada se ha mantenido bastante constante durante décadas alrededor del 45-80% de los casos (Block & Schoolwerth, 2006b; Kellum & Hoste, 2008b; Neild, 2001; S. S. Waikar, Liu, & Chertow, 2008b). En otros estudios, la incidencia del DRA en la UCI es menor (1-25%), lo que indica que la incidencia es variable entre poblaciones, circunstancias y estudios, y, lo que es más importante, difiere según los criterios utilizados de definición de DRA (Brochard y cols., 2010). Los pacientes críticamente enfermos con fallo multiorgánico son más susceptibles a los estragos provocados por el DRA. Una fracción de los pacientes con DRA nunca recupera la función renal normal o previa.

Entre el 4 y el 6% de los pacientes necesitan diálisis durante un DRA (Dennen, Douglas & Anderson, 2010), un número que aumenta hasta el 13% entre los pacientes de la UCI (Brochard y cols., 2010).

Además de las consecuencias inmediatas, la morbimortalidad a medio y largo plazo también se incrementa después del DRA. Hasta el 7,5% de los pacientes necesitan diálisis de por vida. Pero en aquellos pacientes con baja función renal antes del DRA (<44 ml/min), el 40-60% nunca sale de diálisis (González y cols., 2008). Se ha establecido una asociación que vincula el DRA con mayores probabilidades de progresar a enfermedad renal crónica (Bucaloiu, Kirchner, Norfolk, Hartle, & Perkins, 2012; C. Hsu, 2012). Esta relación es especialmente relevante para los casos de DRA grave, para los episodios de DRA repetidos y para los pacientes con la función renal disminuida antes del episodio de DRA (Belayev & Palevsky, 2014; Bellomo, Kellum & Ronco, 2012; Canaud & Bonventre, 2015; Chawla & Kimmel, 2012; Heung & Chawla, 2012; Thakar, Christianson, Himmelfarb & Leonard, 2011). Pero el DRA temporal (Brown y cols., 2012; Brown, Kramer, Coca, & Parikh, 2010; Steven G. Coca, King, Rosenthal, Perkal, & Parikh, 2010; Nejat y cols., 2012; Uchino, Bellomo, Bagshaw, & Goldsmith, 2010). DRA leve (Praught & Shlipak, 2005) e incluso el DRA subclínico (Haase y cols., 2011) también se asocian con mayor incidencia de enfermedad renal crónica (ERC) y un peor pronóstico a medio y largo plazo. Una extrapolación por (N. H. Lameire y cols., 2013) de un estudio realizado por (Wald y cols., 2009) concluyeron que la ERC inducida por el DRA representaba el 3% de la incidencia anual de enfermedad renal en etapa terminal. Los pacientes con DRA tienen una mayor incidencia de eventos cardiovasculares y una mayor mortalidad (Ferenbach & Bonventre, 2015; Ronco & Rosner, 2012).

El coste directo asociado al DRA representa el 1% del gasto sanitario total (Kerr y cols., 2014) y el 5% de los gastos hospitalarios totales (R. K. Hsu y cols., 2013; Murugan & Kellum, 2011). Este coste se deriva fundamentalmente de los tiempos prolongados de los pacientes en el hospital, de una monitorización más cercana y personalizada y fundamentalmente de la aplicación de la diálisis. Casi el 50% de los pacientes hospitalizados con DRA requieren algún tipo de atención post-hospitalaria, de los que el 27% se les presta atención médica prolongada mientras que el 22% recibe atención domiciliaria (Glenn M Chertow, Burdick, Honour, Bonventre, & Bates, 2005). El DRA costó 10 mil millones de dólares al año en Estados Unidos en la década de los 2000 (Siew & Himmelfarb, 2013) y 1,02 millones por año en Inglaterra en la década de 2010 (Kerr y cols., 2014). Además, en 2003, se estimó que en EE.UU. un

incremento en la creatinina plasmática de 0.3 mg/dL originó un coste adicional de 8.902 dólares por paciente y un incremento de 2,0 mg/dL de 33.162 dólares (Murugan & Kellum, 2011).

3.3 Pronóstico, prevención, medidas de protección y tratamiento

El DRA surge por unas causas e incide sobre un sujeto condicionado por su edad, sus antecedentes personales y generalmente, una enfermedad de base. Todos estos aspectos condicionan la evolución del enfermo y por tanto hay que tomarlos en consideración a la hora de hacer el pronóstico (Abosaif, Tolba, Heap, Russell, & Nahas, 2005). Teniendo en consideración estos aspectos podemos acercarnos al pronóstico de tres formas: en función del origen del síndrome (según el tipo de DRA y según la enfermedad base), a la presencia en el enfermo de una circunstancia determinada (hipotensión, ictericia, sepsis, oliguria, etc), o con un enfoque actual. Con este fin se utiliza un método exclusivo en enfermos de daño renal agudo, el índice de gravedad individual (ISI) (Arias Rodríguez y cols., 2013). El ISI es un sistema pronóstico español que permite establecer precozmente el pronóstico de un paciente individual durante los primeros 15 días de evolución del daño y estratificar el riesgo. El ISI se calcula resolviendo la siguiente ecuación:

$$\text{ISI} = 0,032 (\text{edad en décadas}) - 0,086 (\text{varón}) - 0,109 (\text{nefrotóxico}) + 0,109 (\text{oliguria}) + 0,116 (\text{hipotensión}) + 0,122 (\text{ictericia}) + 0,150 (\text{coma}) - 0,154 (\text{conciencia normal}) + 0,182 (\text{respiración asistida}) + 0,210$$

Donde ISI es la probabilidad de muerte, nefrotóxico implica ese origen del fracaso, oliguria una diuresis inferior a 400 mL/día, hipotensión una presión sanguínea sistólica inferior a 100 mmHg durante 10 horas, ictericia una concentración de bilirrubina sérica superior a 2 mg/dL, coma si hay coma profundo y respiración asistida si hay necesidad de ventilación mecánica. 0,21 es la constante de la ecuación. Cada variable toma un valor de 1 ó 0, dependiendo de su presencia o ausencia, a excepción de la edad que toma el valor de la década. El ISI sirve tanto para estimar el pronóstico de los enfermos menos graves como el de los más graves. Tiene también un umbral discriminativo, 0,9 por encima del cuál no hay supervivencia de los enfermos.

El factor más importante para la prevención del DRA es la eliminación de los desencadenantes isquémicos o nefrotóxicos en pacientes y situaciones de riesgo. El medio de prevención más efectivo es asegurar un volumen intravascular y gasto cardíaco adecuado (Brienza, Giglio, Marucci, & Fiore, 2009), ya que la deshidratación y la hipoperfusión renal son los principales estímulos de la concentración urinaria que predisponen a la lesión hipóxica. Por ello, la estrategia general preventiva básica del DRA consiste en identificar los pacientes y situaciones de riesgo renal, monitorizar la hemodinámica y la diuresis, corregir la hipovolemia con reposición hidroelectrolítica, evitar los nefrotóxicos y usar fármacos protectores con efecto preventivo.

Algunas de las situaciones donde se han demostrado medidas eficaces en la prevención del daño renal son:

i) Con los tóxicos renales: Para evitar el daño renal por tóxicos como el contraste radiológico, cisplatino o ciclosporina entre otros, la mejor protección es la hidratación profiláctica con bicarbonato o salino. La administración del antioxidante N-acetilcisteína podría, asociado a hidratación, aumentar la protección. La toxicidad por aminoglucósidos como la gentamicina puede ser reducida utilizando pautas de dosis diaria única y monitorizando los niveles del fármaco (Asif & Epstein, 2004; Fishbane, 2008; P. Meier, Ko, Tamura, Tamhane, & Gurm, 2009).

ii) En el shock hemorrágico y cardiogénico. La lesión renal en el shock es directamente proporcional a la gravedad y duración de la isquemia. Por tanto, la detección precoz del shock y la intervención hemodinámica agresiva pueden disminuir la morbilidad y mortalidad del DRA. Una presión arterial media > 65 mmHg se considera adecuada para mantener presión de perfusión renal en pacientes no hipertensos.

iii) En el shock séptico. Una estrategia para proteger la función renal en los pacientes sépticos debe incluir la eliminación del foco séptico, el mantenimiento de un volumen intravascular normal, así como evitar los fármacos nefrotóxicos.

iv) En la cirugía con circulación extracorpórea. Aunque la medida profiláctica más importante para proteger la función renal en la derivación cardiopulmonar es el mantenimiento de la función cardíaca postoperatoria, se han utilizado con éxito algunas medidas farmacológicas como bicarbonato (Haase, Haase-Fielitz, y cols.,

2009), fenoldopam (Landoni y cols., 2008), manitol y péptidos natriuréticos atriales (Joannidis y cols., 2017).

En general, la conversión de la oliguria a DRA no-oligúrico con diuréticos se considera beneficiosa por facilitar el manejo del paciente, así como por proteger al riñón frente a la lesión por isquemia o diferentes nefrotóxicos, y permitir retrasar el inicio de los tratamientos con depuración extrarrenal (TDE), aunque no ha mostrado ningún impacto en la mortalidad ni tampoco mejora la recuperación de la función renal (Bagshaw, Bellomo, & Kellum, 2008; Bagshaw, Delaney, Haase, Ghali, & Bellomo, 2007; Sampath y cols., 2007; Townsend & Bagshaw, 2008). El diurético de elección en la disfunción renal es un diurético de asa.

Los TDE son el tratamiento de los pacientes con DRA avanzado. Un 85% de pacientes oligúricos con DRA requieren TDE, mientras que sólo el 30-40% de los pacientes con IRA no oligúrica las necesitan (Fieghen, Wald, & Jaber, 2009; K. V Liang y cols., 2016).

4. El DRA pre-renal

Se considera DRA pre-renal o azotemia pre-renal a una disfunción renal transitoria producida por factores que comprometen la perfusión renal sin daño en las estructuras renales. La disminución de la presión de perfusión renal (PPR) puede estar producida por una disminución aguda de la presión arterial sistémica más allá de los límites de la autorregulación, o por una alteración en la autorregulación renal necesaria en una situación de hipoperfusión renal transitoria, y se traduce en un descenso de la TFG (Ostermann & Joannidis, 2016). La incapacidad de la autorregulación renal para solventar el problema lleva asociado, además del descenso en la filtración glomerular, un descenso en la presión hidrostática de los capilares peritubulares, lo que favorece la reabsorción de agua ocasionando oliguria (figura 9). Además de los mecanismos compensadores dependientes de la autorregulación renal, el conjunto de interacciones entre sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras resulta fundamental a la hora de subsanar defectos de este tipo.

Entre las causas de DRA pre-renal cabe destacar:

- Disminución del volumen extracelular: hemorragias, vómitos, diarreas, quemaduras, hepatopatías, síndrome nefrótico, pancreatitis, peritonitis...

- Disminución del gasto cardíaco: shock cardiogénico, infarto agudo de miocardio (IAM), valvulopatías, arritmias...(Padhi, Bullock, Li, Stroud, & National Institute for Health and Care Excellence (NICE) Guideline Development Group, 2013).
- Vasodilatación periférica: shock anafiláctico, sepsis, vasodilatadores...
- Vasoconstricción renal: sepsis, hipercalcemia, síndrome hepatorenal, inhibición de la síntesis de prostaglandinas...
- Tratamientos farmacológicos: fármacos que antagonizan las acciones de la angiotensina (IECAs y ARAs). La utilización de estos fármacos conlleva a un descenso en la cantidad efectiva de angiotensina en el organismo y consecuentemente implica una vasodilatación de la arteriola aferente. Además de los IECAs y los ARAs ya mencionados, el tratamiento con antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) también puede provocar a la larga un DRA pre-renal al disminuir el flujo sanguíneo renal por inhibición de la síntesis de prostaglandinas (Miyahira Arakaki, 2003) que, en condiciones normales, ejercen un efecto vasodilatador sobre los vasos sanguíneos renales (Arias Rodríguez y cols., 2013).

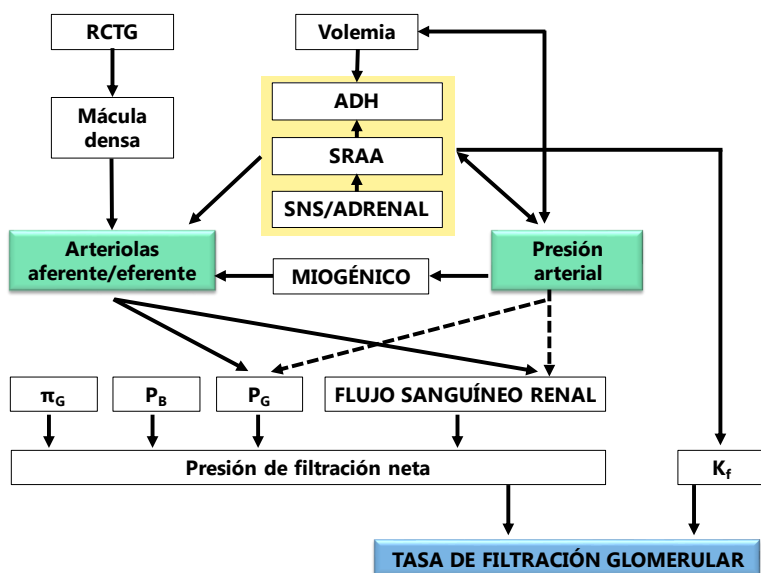


Figura 9. Regulación de los determinantes de la TFG. RCTG: retrocontrol túbulo-glomerular; ADH: hormona antidiurética; SNS: sistema nervioso sistémico; SRAA: sistema renina angiotensina aldosterona; π_G : presión oncótica glomerular; P_B : presión hidrostática de la cápsula de Bowman; P_G : presión hidrostática de los capilares glomerulares; K_f : coeficiente de filtración capilar.

5. El DRA renal o intrínseco

Es el deterioro brusco de las funciones renales ocasionado por una lesión de cualquiera de las estructuras renales: glomérulos, túbulos, intersticio o vasos. En este grupo estarían incluidas las glomerulonefritis agudas primarias o secundarias, los brotes agudos de enfermedades glomerulares crónicas sean primarias o secundarias, las enfermedades tubulointersticiales agudas, la necrosis tubular aguda, la necrosis cortical, las vasculitis, las microangiopatías y la enfermedad ateroembólica con afectación renal. La enfermedad tromboembólica que comporte infarto global o parcial de la masa renal podría englobarse en el grupo de enfermedades parenquimatosas que cursan con daño renal agudo, aunque también podrían incluirse en un subgrupo de causa vascular (Arias Rodríguez y cols., 2013). La necrosis tubular aguda es el fenómeno más común de DRA intrínseco y por su relevancia, el resto de esta sección se dedicará a ella. Se caracteriza por la destrucción de las células tubulares con supresión de la función renal (Brenner & Rector, 2008; Klatt & Kumar, 1999). La afección tubular asociada a la NTA resulta con frecuencia reversible.

5.1 Morfología de la NTA

El lugar fundamental de la lesión en la NTA de origen isquémico y séptico es el segmento recto del túbulo proximal (S3), ocasionalmente existe una lesión concomitante en la parte gruesa ascendente del asa de Henle (mTAL), mientras que el lugar de la lesión de origen tóxico son los segmentos contorneados del túbulo proximal (S1 y S2) (Mingeot-Leclercq & Tulkens, 1999; Sharfuddin & Molitoris, 2011).

Pese al calificativo de "necrosis tubular aguda" la necrosis propiamente dicha es poco frecuente y a veces incluso está ausente. El cuadro histológico predominante es la pérdida focal de células del epitelio tubular proximal, con falta de continuidad del mismo, exposición de la membrana basal tubular y pérdida difusa del borde en cepillo de las células tubulares.

La NTA se caracteriza por la heterogeneidad en la respuesta morfológica de los diversos segmentos de la nefrona. Las células que revisten los túbulos del conducto colector dentro de la médula interna y de la rama cortical ascendente no se lesionan con frecuencia. Las células del S1, S2, S3 y del mTAL muestran cambios

acordes con la gravedad de la lesión, la mayoría de las células dañadas tienen capacidad de recuperarse por completo.

El DRA inducido en nuestros modelos animales, llevados a cabo en esta tesis doctoral, provoca unos cambios morfológicos en las células tubulares (Figura 10), que son:

Lesión del citoesqueleto de actina: la integridad del citoesqueleto de actina es crucial para llevar a cabo la función de las células epiteliales del túbulo renal, incluye el mantenimiento de la distribución asimétrica (polaridad) de las proteínas de membrana, el mantenimiento de las uniones estrechas (función de barrera), la estructura de las microvellosidades, y las interacciones célula-célula y célula-sustrato.

La NTA tiene como resultado, entre otros, la ruptura de los microfilamentos de actina, junto con una serie de cambios celulares que impiden el mantenimiento de las funciones de las células tubulares (Du y cols., 2010).

El agotamiento de ATP altera la ultraestructura de la actina, los acúmulos de actina desaparecen de las microvellosidades y del polo apical y se redistribuyen hacia el citoplasma. Estos cambios parecen indicar daño celular reversible, ya que, si se restituye el nivel normal de ATP antes de que muera la célula, se da paso a una normalización en la distribución de la actina al cabo de 30 minutos. Por lo tanto, la redistribución de la actina no es una manifestación de muerte celular (Genescà, Sola, & Hotter, 2006).

Perdida de polaridad celular: en las células tubulares renales, la bomba Na^+/K^+ -ATPasa está restringida a la porción basolateral, como vimos en el apartado 2.2.1, pero en situación de NTA se redistribuye a las porciones apicales celulares, en donde conserva su función (García-Criado y cols., 1998a; Rodríguez-Pena, García-Criado, Eleno, Arevalo, & López-Novoa, 2004a).

Estos cambios de polaridad celular explican las alteraciones de reabsorción de Na^+ , agua y otros solutos que ocurren en la NTA, funciones que se restablecen después del daño, de la recuperación del nivel celular de ATP y del citoesqueleto de actina, lo que conlleva una reparación definitiva de la polaridad celular (Woroniecki, Ferdinand, Morrow, & Devarajan, 2003).

Pérdida de la integridad del borde en cepillo: de todo lo expuesto, puede deducirse que el borde en cepillo de las células tubulares proximales pierde su

estructura y función en condiciones tóxicas e isquémicas. Además, los fragmentos de epitelios dañados y desprendidos a la luz tubular pueden obstruir la misma, al compactarse en segmentos tubulares más distales.

Alteración de la unión entre las células tubulares y de estas a las membranas basales tubulares: la unión íntima entre células tubulares adyacentes y el sustrato de la membrana basal tubular, está normalmente asegurado por las integrinas α , proteínas transmembrana con una localización extracelular que unen las células a la membrana basal tubular basolateral.

Una vez más el daño renal altera estos mecanismos de unión y anclaje celular, produciéndose el desprendimiento de las células tubulares con dos consecuencias fundamentales:

- a) Permitir la salida del filtrado glomerular al intersticio renal (back leakage) (Kwon y cols., 1998).
- b) Desprendimiento celular a la luz tubular, con posibilidad de obstrucción tubular más distal.

Alteración funcional de las uniones intercelulares: en condiciones normales, las células tubulares adyacentes están unidas firmemente entre sí por sus caras laterales, con la porción más próxima a la luz tubular impidiendo el paso directo del contenido tubular entre las células, aunque los solutos de la luz tubular pueden emplear esta vía de paso (como ya vimos en el apartado 2.2), se crea un gradiente electroquímico y la sustancia en cuestión es capaz de atravesar esta unión intercelular.

El citoesqueleto de actina juega un importante papel en estas uniones. Una vez más los tóxicos y eventos dañinos lesionan el citoesqueleto de actina, aumenta la permeabilidad paracelular, aumentando el flujo de moléculas. Como hemos dicho antes, estos cambios son reversibles si se aumentan los niveles de ATP antes de que la célula muera.

Muerte celular y obstrucción tubular: las células epiteliales desprendidas por cualquiera de los mecanismos expuestos muestran una tendencia a unirse entre sí o a células dañadas que permanecen unidas aún a la pared tubular. La consecuencia de ello es la obstrucción tubular típica de la NTA y que podremos observar perfectamente en las histologías renales mostradas en el apartado resultados. Esta

adherencia intercelular anormal puede estar mediada por la integrina α 1 β expresada en las zonas apicales de las células dañadas o por sus receptores presentes en la matriz proteica. Esta interacción requiere la presencia de los motivos arginina-glicerol-asparaginasa (Arg-Gly-Asp o RGD) motivos que se encuentran en los receptores de la integrina. En NTA experimental, la administración de péptidos cortos que contienen el motivo RGD mejora significativamente la formación de cilindros y deterioro funcional, evitando la adhesión entre las células dañadas (Molina y cols., 2005).

La muerte de las células del túbulo letalmente dañadas se lleva a cabo a través de dos mecanismos distintos. Las células con lesiones más graves muestran una profunda disminución de los niveles de ATP y sufren necrosis. Se caracteriza por el edema celular, la alteración mitocondrial, y la pérdida de la integridad de la membrana plasmática, que conduce a la liberación de componentes intracelulares al espacio extracelular y la activación de una respuesta inflamatoria.

Las células menos dañadas presentan una disminución parcial del ATP y activan las vías apoptóticas. La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso que requiere energía y está caracterizado por: activación de caspasas, progresiva contracción celular, condensación y fragmentación nuclear, exposición de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática, y desintegración de la célula en cuerpos apoptóticos, que son fagocitados rápidamente sin provocar una respuesta inflamatoria (Kaushal, Basnakian, & Shah, 2004).

La obstrucción tubular contribuye a la reducción de la TFG (Abuelo, 2007). Otro factor que conduce a la reducción de la TFG es la combinación de la membrana basal desnuda y la pérdida de uniones estrechas en las células del túbulo proximal que posteriormente dan lugar al retorno del ultrafiltrado urinario hacia la circulación renal (back-leakage) de diversas sustancias, incluyendo creatinina y urea. La activación del retrocontrol túbulo glomerular (explicado en el apartado 1.2.3) también puede contribuir a la reducción de la TFG (Lopez-Novoa, Quiros, Vicente, Morales, & Lopez-Hernandez, 2011a).

Recuperación del daño renal: Remodelación tubular: una vez resuelto el desencadenante del daño renal, las células apoptóticas se hacen evidentes dentro de las primeras 24 horas. Una segunda concentración de células apoptóticas se ha observado durante la fase de recuperación del DRA, cuando probablemente representa un mecanismo para la eliminación del exceso de células tras la

proliferación, facilitando así la remodelación de los túbulos dañados. Los mecanismos moleculares que subyacen a los primeros pasos de la apoptosis son actualmente objeto de investigación intensa ya que la inhibición selectiva de estas vías puede constituir una nueva estrategia de gran alcance para la disminución de la muerte celular en NTA.

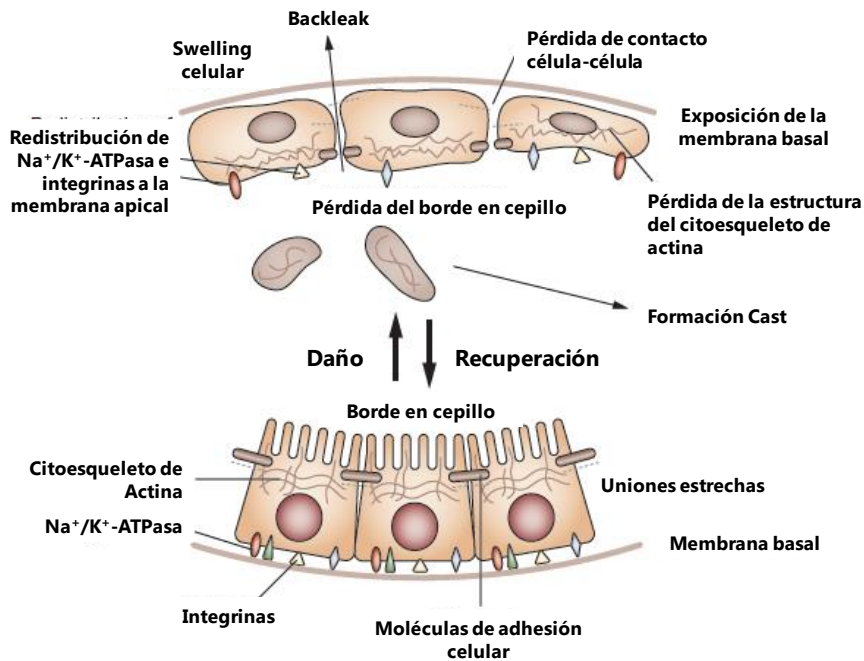


Figura 10. Efectos tóxicos e isquémicos en las células tubulares proximales y su recuperación. Adaptada (Sharfuddin & Molitoris, 2011). Los efectos tóxicos e isquémicos provocan una pérdida de la polaridad celular. La bomba Na^+/K^+ -ATPasa migra a la membrana apical. Provoca una depleción de ATP que induce a una desorganización del citoesqueleto de actina, con ruptura de las uniones estrechas y pérdida de contacto célula-célula. Esto provoca que las células tubulares mueran formando *casts* obstruyendo los lúmenes de las nefronas.

5.2 Fases de la NTA

Como acabamos de ver, diversos estudios sugieren que las anomalías persistentes que afectan a la región corticomedular pueden contribuir a la reducción

de la TFG (Bonventre & Zuk, 2004; Friedewald & Rabb, 2004; Molitoris & Sutton, 2004). Los segmentos tubulares situados en esta región (segmentos S1, S2 y S3 del túbulo proximal y mTAL) son particularmente vulnerables a la isquemia y a las nefrotoxinas que interrumpen la producción de energía o de la función mitocondrial (P. Devarajan, 2006).

En general, la NTA se caracteriza por los siguientes fenómenos a nivel de la nefrona (figura 11), cada una de ellas con unas características fisiopatológicas propias:

Exposición: presentación de una agresión hemodinámica, que ocurre cuando disminuye el flujo sanguíneo renal, o tóxica. Se mantiene la integridad celular.

Iniciación: es el periodo de tiempo que media desde la exposición al agente etiológico y comienzo del daño parenquimatoso, que aún no está establecido. Durante este periodo, que dura horas o días, la NTA puede aún evitarse, especialmente si se restaura el flujo sanguíneo renal cuando la causa es isquémica o cuando se retira el tóxico. La TFG desciende debido a la caída del flujo sanguíneo renal y de la presión de ultrafiltración glomerular. Así mismo intervienen la pérdida de integridad del epitelio tubular, lo que origina fuga del líquido filtrado glomerular al intersticio, y la obstrucción al paso de la orina en los túbulos obstruidos por las células tubulares dañadas.

Fase de extensión y mantenimiento: durante la fase de mantenimiento, las lesiones del túbulo renal están establecidas, la TFG se estabiliza en un nivel muy por debajo de lo normal, y la producción de orina es baja o ausente. A pesar de que la oliguria (o anuria) es una de las señales clínicas de NTA, en algunos pacientes con NTA no se produce y se denomina NTA no oligúrica (como ya se vio en la introducción de este Bloque). El DRA producido por nefrotoxinas es típicamente no oligúrica. La segunda fase de la NTA suele durar 1-2 semanas, pero puede extenderse hasta unos pocos meses. Durante esta fase, es cuando aparecen las complicaciones urémicas. No se conoce con exactitud porqué la TFG permanece baja a pesar de que se corrija la causa del fracaso renal. Posiblemente intervengan varios mecanismos entre los que se incluyen la vasoconstricción renal persistente (Bonventre & Zuk, 2004; Friedewald & Rabb, 2004; Molitoris & Sutton, 2004).

Fase de recuperación: la fase de recuperación de NTA se caracteriza por poliuria y por una normalización gradual de la TFG, sin embargo, cuando se produce

NTA, como ocurre a menudo, en un contexto de disfunción multiorgánica, la regeneración del tejido renal puede verse gravemente afectada y la función renal no volvería a recuperarse. La morbimortalidad en este tipo de situaciones sigue siendo alta a pesar de los significativos avances científicos y tecnológicos. En ausencia de fallo multiorgánico, la mayoría de los pacientes con NTA recuperan la función renal. La fase de recuperación consiste en la restitución de la polaridad celular y la integridad de la unión estrecha en las células dañadas, la eliminación de células tubulares por apoptosis, eliminación de cilindros intratubulares mediante el restablecimiento del flujo de líquido tubular, y la regeneración de las células epiteliales renales (Abuelo, 2007).

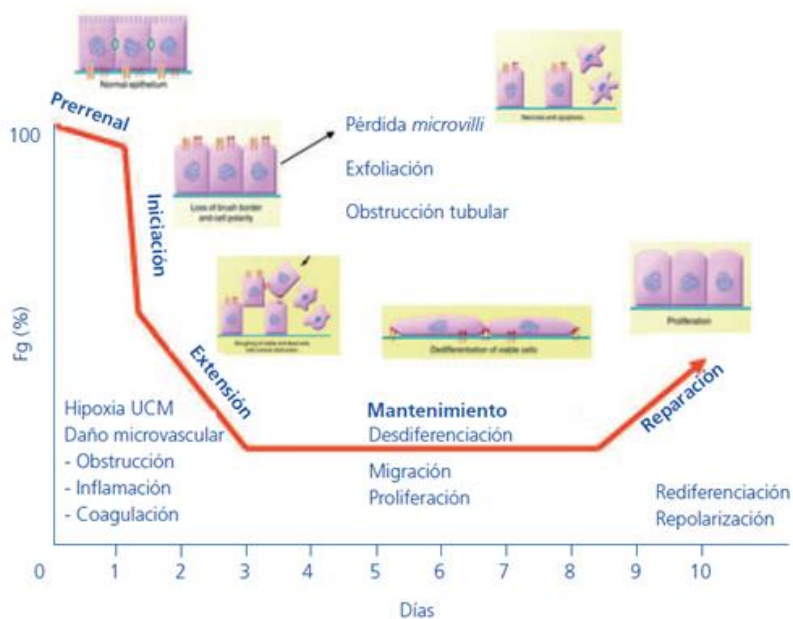


Figura 11. Fases fisiopatológicas de la NTA. (Tenorio, Galeano, Rodríguez, & Liaño, 2010).

5.3 Formas clínicas

Para el estudio exhaustivo del diagnóstico etiológico de DRA y de los mecanismos fisiopatológicos involucrados, se ha querido abordar en el presente trabajo un estudio con los principales agentes nefrotóxicos o eventos dañinos que

actualmente son causantes de la mayor parte de los casos clínicos de DRA de tipo intrínseco mediante la experimentación animal. Se recogen a continuación:

5.3.1 Tóxica

La nefrotoxicidad constituye un problema de salud y socioeconómico muy serio en todo el mundo. Aproximadamente el 25% de los 100 fármacos más utilizados en las unidades de cuidados intensivos son potencialmente nefrotóxicos (Taber & Mueller, 2006b). Además, se estima que la nefrotoxicidad es la causa del 10-20% de los casos de DRA (Himmelfarb & Hakim, 1997). El DRA se puede producir, por tanto, como consecuencia de cualquier proceso que disminuya la función renal (medida actualmente por la tasa de filtración glomerular) como por ejemplo por medicamentos (aminoglucósidos como la gentamicina), agentes antineoplásicos (cisplatino) o compuestos químicos (nitrato de uranilo) entre otros.

La gentamicina es un antibiótico aminoglucósido ampliamente utilizado en la práctica clínica para el tratamiento de infecciones por microorganismos Gram negativos y de la endocarditis bacteriana (Chen & Kaye, 2009). La nefrotoxicidad es su principal limitación terapéutica, que aparece en un 10-25% de los pacientes tratados con este fármaco, y puede dar lugar a un DRA. A pesar de eso, los aminoglucósidos continúan siendo la única alternativa terapéutica efectiva contra bacterias sensibles a otros antibióticos, e incluso los fármacos de elección en muchas circunstancias, por su eficacia y por su bajo coste (Martínez-Salgado, López-Hernández, & López-Novoa, 2007a).

Los diversos mecanismos fisiopatogénicos implicados en el daño renal producido por la gentamicina, se agrupan en factores vasculares (disfunción endotelial y autorregulación vascular anormal), glomerulares (contracción, proliferación y apoptosis de las células mesangiales y pérdida de la barrera de filtración glomerular) y tubulares (muerte de las células de los túbulos proximales con una importante respuesta inflamatoria, pérdida del borde en cepillo y alteración de los sistemas de transporte, objetivo del presente estudio). Esta diversidad de mecanismos pone de manifiesto la complejidad de este proceso. La nefrotoxicidad de la gentamicina se caracteriza por una disfunción de las células renales del túbulo proximal. En particular, interfiere con los transportadores de sodio como la Na^+/K^+ -ATPasa y con los transportadores megalina cubilina. Como consecuencia, se produce

una alteración en el transporte de agua, electrolitos y proteínas en las células tubulares renales, pudiendo producir una disminución de la tasa de filtración glomerular (Lopez-Novoa y cols., 2011a).

El cisplatino es uno de los agentes antineoplásicos más efectivos en el tratamiento de tumores sólidos, con un amplio espectro de acción (Wang & Lippard, 2005). Sin embargo, la nefrotoxicidad acumulativa dosis-dependiente, es la principal limitación terapéutica de este fármaco, requiriendo en algunos casos una reducción en la dosis o discontinuidad en el tratamiento (Tsang, Al-Fayea, & Au, 2009).

La utilización clínica del cisplatino no sólo depende de su eficacia terapéutica, sino también de la reducción de su nefrotoxicidad. Una de las estrategias aceptadas como estándar en la clínica es la hidratación intensiva con suero salino antes, durante y después de la administración del cisplatino y la diuresis forzada mediante tratamiento simultáneo con furosemida o manitol. Sin embargo, a pesar de las intensas medidas profilácticas encaminadas a proteger las complicaciones renales, aproximadamente un 20-30% de los pacientes hospitalizados tratados con cisplatino padece fallo renal agudo (Kuriakose & Kurup, 2008). A pesar de su severa toxicidad renal, en la actualidad el cisplatino sigue siendo uno de los fármacos antineoplásicos más ampliamente utilizado por su potente eficacia antitumoral.

El cisplatino se acumula en el riñón por captación peritubular en células tubulares, predominantemente en el segmento S3 de los túbulos proximales, en la región corticomedular, donde ejerce sus efectos nefrotóxicos. No obstante, en algunos casos se evidencian daños distales, e incluso lesiones tóxicas en los túbulos colectores como consecuencia de un daño tubulointerstial por tratamientos prolongados con cisplatino (Uchida, Miyoshi, & Miyamoto, 2017). Es importante destacar que la incidencia, severidad y duración de los efectos nefrotóxicos del cisplatino son variables, pudiéndose manifestar como una disfunción renal derivando en un DRA o incluso una insuficiencia renal crónica y progresiva, alteraciones dependientes en gran medida de las dosis quimioterápicas empleadas (Taguchi, Nazneen, Abid, & Razzaque, 2005).

Los diversos mecanismos fisiopatogénicos implicados en el daño renal producido por cisplatino se agrupan en factores vasculares (disfunción endotelial y autorregulación vascular anormal), glomerulares (el cisplatino puede dañar directamente los glomérulos y alterar tanto su estructura como su permeabilidad dando lugar a la aparición de proteinuria en el rango nefrótico (Ahmadzadeh,

Shahbazian, Safapour, Tulabi, & Zandifar, 2015) y un descenso de la TFG debido a la disminución del K_f y de un aumento de la resistencia vascular renal (RVR) y tubulares (disfunción mitocondrial, respuesta inflamatoria, alteración de proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPKs) y alteración de los sistemas de transporte, objetivo del presente estudio). Esta diversidad de mecanismos pone de manifiesto la complejidad de este proceso.

Como consecuencia, se produce una alteración en el transporte de agua, nutrientes, electrolitos y proteínas en las células tubulares renales, pudiendo incluso producir una disminución de la tasa de filtración glomerular (TFG) (Yoshiki, Kubota, & Aso, 2000).

Aunque el daño renal agudo provocado por el **nitrate de uranio** no es forma clínica muy común, se comenta brevemente su mecanismo fisiopatológico de intoxicación, debido a que uno de los modelos animales experimentales que se utiliza en esta tesis doctoral es de DRA inducido por nitrato de uranio.

Los seres humanos están constantemente expuestos a una cierta cantidad de uranio porque está presente heterogéneamente en forma natural en la comida, el aire, el suelo y el agua. La repercusión de una sobreexposición al uranio puede resultar en toxicidad, que se deriva de un exceso de acumulación en el organismo (Briner, 2010). El uranio se acumula principalmente en los huesos (66%), riñones (8%) e hígado (16%) (Cousins, Boice Jr, Cooper, Lee, & Lochard, 2011), y se elimina con la orina, rápidamente de la sangre y lentamente de depósitos de órganos (La Touche, Willis, & Dawydiak, 1987).

El mecanismo fisiopatológico mediante el que produce el daño renal aún no está completamente esclarecido. Algunos autores han propuesto que el uranio no necesita penetrar en las células, ya que sus efectos (o gran parte de ellos) se derivan de la unión a determinados componentes de la membrana celular (Vicente-Vicente L, Quiros Y, Pérez-Barriocanal F, López-Novoa JM, López-Hernández FJ, 2011). Se ha podido caracterizar en animales que el daño renal causado por este elemento provoca disminuciones en el aclaramiento de creatinina (Banday, Priyamvada, Farooq, Yusufi, & Khan, 2008; Sánchez, Bellés, Albina, Sirvent, & Domingo, 2001; Shim y cols., 2009). Aún hoy en día, no se conoce muy bien si esta disminución se debe a efectos glomerulares, el RCTG provocado tras el daño tubular para prevenir la pérdida incontrolada de agua y electrolitos, o una combinación de ambos.

En este sentido animales tratados de forma aguda con uranio presentan alteraciones funcionales en los túbulos proximales, con un incremento de la excreción de electrolitos (sodio, potasio, magnesio, calcio, y fosfato inorgánico) (Banday y cols., 2008), proteínas (Sánchez y cols., 2001), β -2-microglobulina (Ohmachi y cols., 2015) y glucosa (Taulan, Paquet, Argiles, Demaille, & Romey, 2006). Además, a dosis tóxicas (5 mg/kg) el nitrato de uranilo provoca daños específicos en los segmentos S2 y S3 del túbulo proximal (Gilman y cols., 1998c), vacuolización celular (Vicente-Vicente y cols., 2010a), pérdida de la membrana del borde del cepillo, y en el segmento S1 un aumento en la masa lisosomal y vacuolar. A dosis muy altas (5-10 mg/kg de peso corporal, ip), también es posible observar necrosis de los túbulos proximales, especialmente en el área corticomedular (Fukuda, Ikeda, Nakamura, Yan, & Xie, 2009; Shim y cols., 2009).

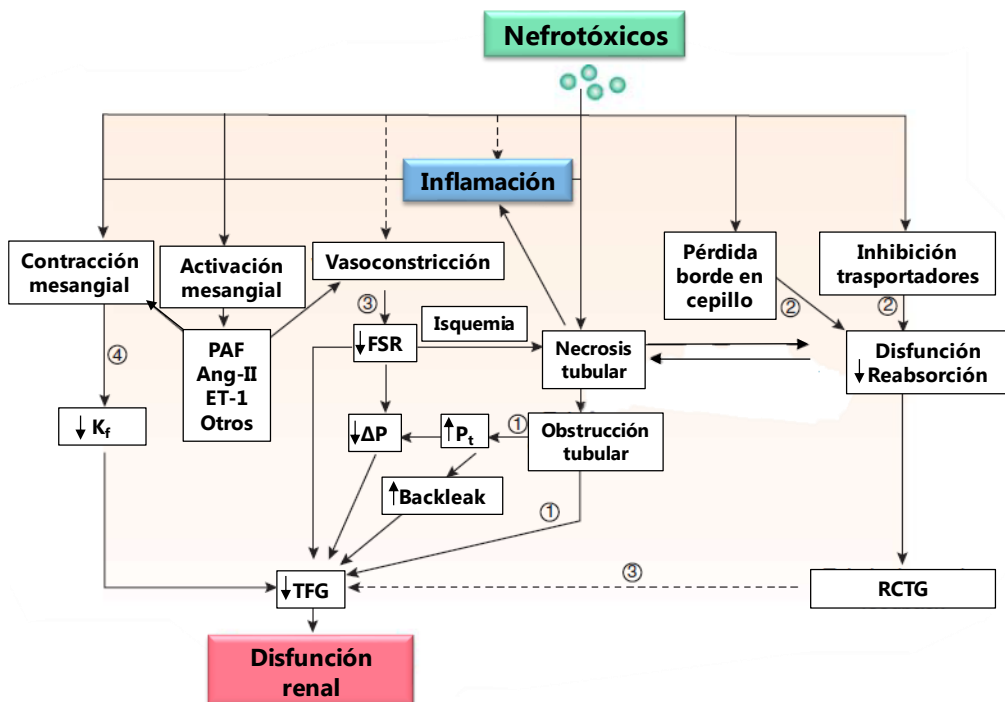


Figura 12. Mecanismos de disfunción renal de los fármacos nefrotóxicos. Adaptada (Lopez-Novoa, Quiros, Vicente, Morales, & Lopez-Hernandez, 2011b). Se puede observar que, en ausencia de una obstrucción tubular significativa, los mecanismos vasculares y mesangiales son necesarios para explicar la reducción de la TFG. Ang-II: angiotensina II; ET-1: endotelina 1; TFG: tasa de filtración glomerular; K_f : coeficiente de filtración capilar; ΔP : presión de ultrafiltración neta; PAF: factor activador de plaquetas (del inglés *platelet-activating factor*); P_t : presión intratubular; FSR: Flujo sanguíneo renal.

5.3.2 Isquémica

La isquemia y la hipoperfusión provocan dos alteraciones fundamentales en el riñón: alteraciones hemodinámicas que, a través de vasoconstricción, contracción mesangial y congestión medular, conducen a una importante reducción del filtrado glomerular (Thierry Hauet y cols., 2000) y daño tubular isquémico con desprendimiento de estas células hacia la luz del túbulo proximal, que forman cilindros y lo obstruyen, aumenta la presión tubular y conduce de nuevo a una reducción del filtrado glomerular. La lesión renal es directamente proporcional a la gravedad y duración de la isquemia (Monedero, García-Fernández, Pérez-Valdivieso, Vives, & Lavilla, 2011).

La isquemia-reperfusión (I/R) está caracterizada por un daño inflamatorio severo; una depleción energética que es la responsable de una cascada de eventos bioquímicos que conducen a la disfunción celular, al daño subletal y eventualmente a la muerte. Las consecuencias fundamentales derivan de la disminución del transporte activo dependiente de ATP con pérdida de los gradientes iónicos que determinan la polaridad del epitelio tubular, la activación no regulada de sistemas enzimáticos nocivos como las fosfolipasas y las proteasas, el daño oxidativo causado por el incremento de especies reactivas del oxígeno (ERO), y las alteraciones del citoesqueleto (Belzer, 1988). Se ha demostrado que el incremento del calcio intracelular se asocia con un aumento en la producción de ERO. La acumulación de este ion en el interior de la mitocondria y el estrés oxidativo, pueden disparar la organización y apertura de un poro de alta conductancia en su membrana interna. Este fenómeno conocido como transición de la permeabilidad mitocondrial (TPM) detiene la producción de ATP y desencadena la producción de ERO (Paller, 1992; Salahudeen, Huang, Patel, & Jenkins, 2000).

Una reducción significativa en el flujo sanguíneo renal es el factor principal en el desarrollo de la isquemia renal, que puede ser causada por una disminución de la presión arterial sistémica como en el DRA pre-renal, o por enfermedad vascular de los grandes vasos renales que implica trombosis de arteria renal, embolia, o la aterosclerosis, que conduce a DRA o, si es crónico, al denominado daño renal crónico (DRC). La isquemia de uno o ambos riñones es también un problema común experimentado durante la cirugía aórtica, trasplante renal, o durante la anestesia cardiovascular, conduciendo a la disfunción renal y a la lesión del tejido u órgano (Bonventre, 2004a; Perico, Cattaneo, Sayegh, & Remuzzi, 2004a; Siedlecki, Irish, &

Brennan, 2011a). Los procedimientos quirúrgicos relacionados con pinzamiento de la aorta y/o de las arterias renales, por ejemplo, la cirugía de aneurismas y supra-aórticos abdominales yuxtarenales y el trasplante renal, también son particularmente susceptibles de producir isquemia renal, dando lugar a importantes complicaciones postoperatorias, incluyendo el desarrollo del DRA (Gueller, Gwinner, Schwarz, & Haller, 2004). Cuando se establece la reperfundación del riñón, se produce una lesión adicional en el riñón. Esto implica el desarrollo del estrés oxidativo, por ejemplo, a través de la generación de aniones superóxido (O_2^-), que recientemente ha sido medido como un indicador de lesión de I/R en riñones trasplantados. Otros mecanismos celulares implicados en el desarrollo de la lesión por reperfundación renal incluyen disfunciones en la homeostasis del calcio, la fosfolipasa y la activación de la proteasa, alteraciones en el pH celular, y la infiltración de células inflamatorias al tejido renal isquémico. Además la isquemia renal también contribuye a la lesión de otros órganos no renales a través de mediadores liberados a la circulación desde el riñón dañado o debido a alteraciones bioquímicas (Gao & Li, 2012).

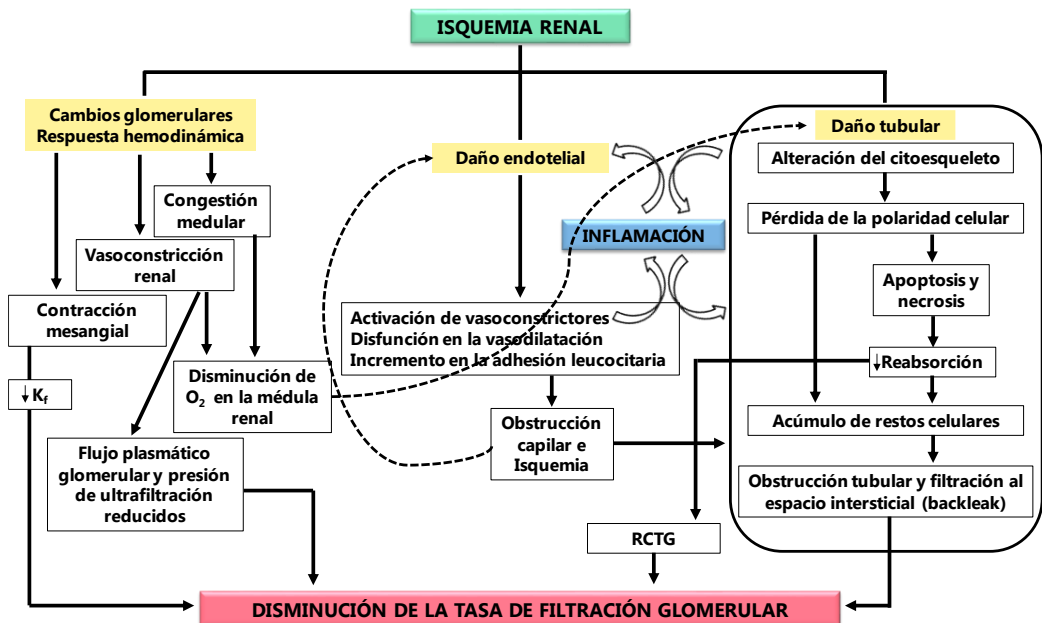


Figura 13. Alteraciones isquémicas que llevan a cabo la disminución de la tasa de filtración glomerular.

5.3.3 Séptica

El síndrome de sepsis se caracteriza por una respuesta inflamatoria sistémica asociada con una infección bacteriana grave. Presenta una alta mortalidad en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), particularmente en casos de fallo orgánico múltiple como el DRA, que alcanzan tasas entre el 20% en sepsis y el 60% en shock séptico, a pesar de los avances en su manejo (como cuidados intensivos y tratamiento antibiótico adecuado) y en la comprensión de su fisiopatología (Bone, Sprung, & Sibbald, 1992; Brun-Buisson, Roudot-Thoraval, Girou, Grenier-Sennelier, & Durand-Zaleski, 2003).

En pacientes sépticos el principal mecanismo de DRA es la isquemia o hipoperfusión, con una característica caída en el FSR y la vasoconstricción renal, aunque no es el único mecanismo, pues el 22% de los pacientes con sepsis presentan necrosis tubular aguda (NTA) (Langenberg, Bagshaw, May, & Bellomo, 2008). Los procesos fisiopatológicos propios de la sepsis (como la hipovolemia absoluta y relativa por vasoplejía y fuga capilar, la disfunción miocárdica y el compromiso de la oxigenación, entre otros) sugieren que la caída en el transporte de oxígeno es un mecanismo relevante del DRA en la sepsis, principalmente en las etapas precoces o en la sepsis acompañada de shock cardiogénico.

La histología del DRA séptico es heterogénea, son relevantes la infiltración leucocitaria, mayormente mononuclear, con algún grado de vacuolización de células tubulares, pérdida del ribete en cepillo y apoptosis (Doi, Leelahavanichkul, Yuen, & Star, 2009; Lerolle y cols., 2010). Otros cambios descritos son la disfunción de las uniones estrechas intercelulares, que favorecen el reflujo de fluido tubular a través del epitelio (Fink & Delude, 2005), y la disfunción de la membrana basal con el consiguiente desprendimiento celular hacia el lumen tubular, lo que se asocia a aparición de células tubulares o cilindros en el sedimento de orina. Estos cilindros celulares a su vez generan micro-obstrucción al FU tubular, provocando el cese de la función de dicha nefrona, provocando una disminución de la TFG (Regueira & Andresen, 2010; Robert y cols., 2010).

BLOQUE II: PERSPECTIVAS EN EL DIAGNÓSTICO DEL DRA

La detección precoz es un aspecto clave para el manejo clínico eficaz del DRA. En la práctica clínica no se considera DRA hasta que la concentración de creatinina plasmática aumenta respecto a la concentración plasmática basal (Thomas y cols., 2015a) o disminuye la diuresis, por lo que el diagnóstico de este síndrome se basa en estos parámetros. Sin embargo, es necesario que la TFG se reduzca un 60-70 % para que la creatinina aumente en el plasma, por lo que esta dolencia es detectada cuando la lesión está instaurada en el riñón y el fallo renal es tan acusado que es difícil de tratar. Por ello, la creatinina plasmática presenta grandes limitaciones para detectar la disfunción renal, puede ser inexacta en muchas ocasiones y no detecta las lesiones que no dan lugar a su alteración (figura 14), lo que se entiende por “DRA subclínico” (Ronco, Kellum, & Haase, 2012).

Por este motivo, en la última década, se ha identificado, validado y desarrollado una nueva generación de marcadores tempranos, localizados mayoritariamente en la orina, capaces de detectar el daño renal agudo en sus fases iniciales, mediante el uso de modelos animales de daño renal o estadios variables en humanos. Éstos incluyen, entre otros, la molécula de lesión renal 1 (KIM-1), la lipocalina asociada a la gelatinasa neutrófila (NGAL) y el inhibidor 1 del activador del plasminógeno (PAI-1) (Ferguson, Vaidya, & Bonventre, 2008; Vishal S. Vaidya y cols., 2008; Sushrut S Waikar & Bonventre, 2008). El potencial de los biomarcadores para transformar el modo de diagnosticar y tratar a los pacientes con este síndrome es indiscutible, y los esfuerzos tienen que ir dirigidos al desarrollo de tecnologías que permitan su detección precoz.

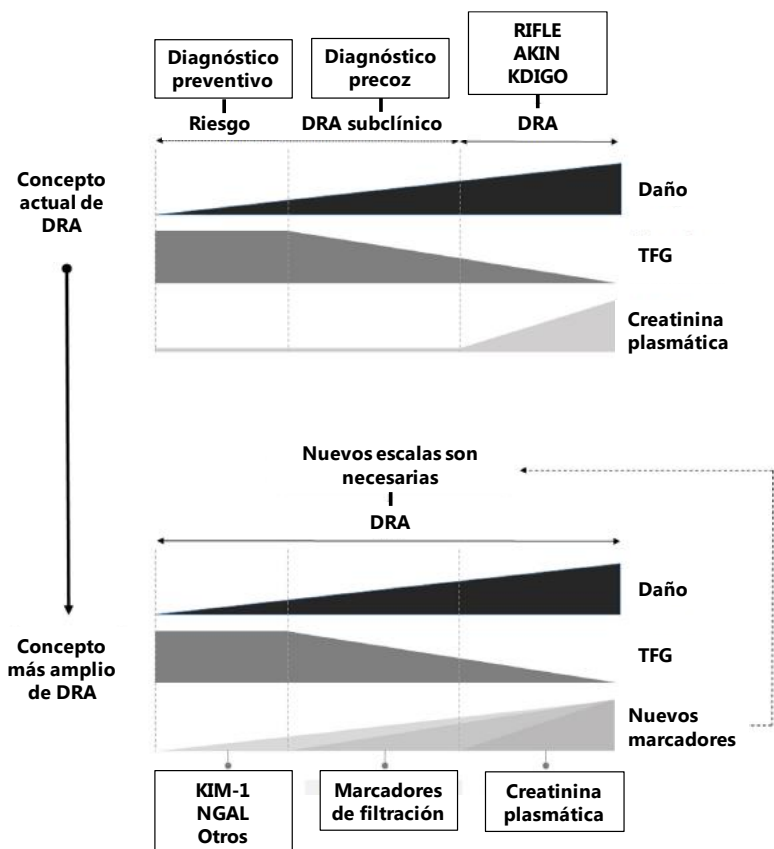


Figura 14. Evolución del daño renal, TFG y marcadores en el concepto actual y ampliado de DRA. Adaptada (Sancho-Martínez, Prieto, y cols., 2015). DRA: daño renal agudo; TFG: tasa de filtración glomerular; AKIN: Red de lesión renal aguda (del inglés *Actue Kidney Injury Network*); KDIGO: del inglés *Kidney Disease Improving Global Outcommes*; RIFLE: del inglés *Risk, Injury, Failure, Loss*; KIM-1: molécula de lesión renal 1 (del inglés *Kidney injury molecule 1*); NGAL: lipocalina asociada a la gelatinasa neutrófila (del inglés *neutrophil gelatinase associated lipocalin*).

Por otro lado, igual de importante es el diagnóstico diferencial de esta patología. Actualmente en la práctica clínica, los análisis y técnicas utilizadas en la distinción entre el DRA de tipo pre-renal y de tipo renal no son del todo fiables. Entre estas técnicas destacan la osmolaridad urinaria o la excreción fraccional de sodio. Además, marcadores de referencia como la CrP no son útiles ya que en el DRA de tipo pre-renal la CrP está incrementada igual que en el DRA de tipo renal, sin embargo, el primero tiene intacta la estructural renal mientras que el segundo

presenta alteraciones en el parénquima renal. En nuestro laboratorio hemos caracterizado en el nivel preclínico un marcador para el diagnóstico etiológico, concretamente la proteína Reg IIIb (Ferreira y cols., 2011a). Animales tratados con gentamicina a dosis nefrotóxicas presentaban niveles altos de Reg IIIb en la orina mientras que animales tratados con cisplatino a dosis nefrotóxicas no lo presentaban.

Por tanto, estas nuevas formas de diagnóstico van a ser el eje central del presente trabajo, donde se integra la capacidad de evaluar precozmente el DRA, para detectarlo tan temprano y específicamente como sea posible (cuando ocurra), para determinar la etiología (simple, mixta o compleja), para identificar los eventos y mecanismos fisiopatológicos más importantes involucrados, para monitorizar la recuperación y acertar en el pronóstico. Así reduciremos la incidencia y la gravedad de la enfermedad, y con ello, el perjuicio para la salud, la esperanza de vida de las personas que la sufren y los elevados costes sociosanitarios asociados.

6. Criterios diagnósticos del DRA

En el ámbito del diagnóstico funcional, se dispone en la actualidad de varios sistemas de clasificación que permiten evaluar la función renal. Estos son:

6.1 Risk Injury Failure Loss End (RIFLE)

En mayo de 2002, la Iniciativa para la Calidad de la Diálisis Aguda (ADQI, del inglés Acute Dialysis Quality Initiative) se reunió en Italia con el fin de establecer una definición del DRA (Lopes & Jorge, 2013). Tras esta reunión, en 2004 surgió la clasificación RIFLE, acrónimo de las siglas en inglés Risk (riesgo), Injury (Enfermedad), Failure (Fallo), Loss of function (pérdida de función) y End stage renal-disease (fallo irreversible de función renal) (Ricci, Cruz, & Ronco, 2008). Los parámetros utilizados para estratificar la lesión renal aguda son descensos porcentuales del filtrado glomerular, elevaciones relativas de la creatinina sérica con respecto a un valor basal y el descenso de la diuresis. De estos tres criterios, se selecciona aquél que indique mayor gravedad y, en virtud de éste, se establece la clasificación del paciente conforme a unos rangos preestablecidos. Estos tres parámetros se aplican en el caso de los tres primeros estadios, en el caso de los dos últimos, la clasificación se hace en base a la pérdida de función renal y el tiempo de evolución. Este sistema tiene

utilidad tanto diagnóstica como pronóstica. La observación se realiza en el plazo de una semana.

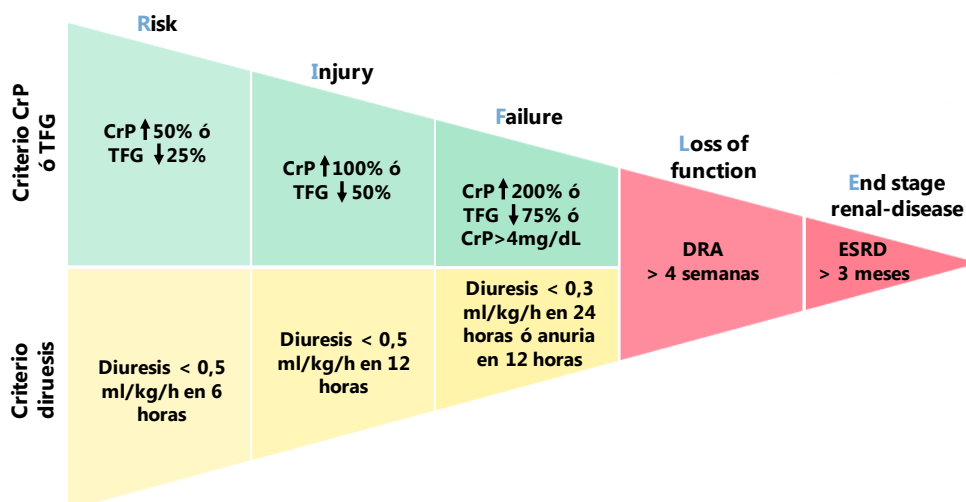


Figura 15. Criterio de clasificación funcional del daño renal agudo según el sistema RIFLE. Adaptada (Bellomo y cols., 2004). DRA: daño renal agudo; TFG: tasa de filtración glomerular; CrP: creatinina plasmática; ESRD: fallo irreversible de la función renal (del inglés *end stage renal-disease*).

6.2 Acute Kidney Injury Network (AKIN)

Es una modificación del sistema RIFLE que surgió en septiembre de 2005. Se fundamenta en la aparición de nuevos datos epidemiológicos que demuestran un incremento del 80% en el riesgo de mortalidad con cambios tan mínimos en la concentración de creatinina sérica como de 0,3 a 0,5 mg/dL (G M Chertow y cols., 2001b). Sólo hay dos diferencias entre ambos sistemas: la clasificación AKIN incluye en su estadio 1 pequeños incrementos de la creatinina sérica (0,3 mg/dl) y los cambios observados en la función renal deben producirse en 48 horas.

Nivel	Criterio CrP o TFG	Criterio diuresis
1	Incremento CrP > 0,3 mg/dL CrP \geq 1,5-2 veces basal	Diuresis < 0,5 mL/kg/h x 6 horas
2	CrP \geq 2-3 veces basal	Diuresis < 0,5 mL/kg/h x 12 horas
3	Incremento CrP > 0,5 mg/dL si CrP basal \geq 4 mg/dL ó CrP \geq 3 veces basal ó Necesidad de diálisis	Diuresis < 0,3 mL/kg/h x 24 horas ó anuria x 12 horas

Tabla 2. Criterio de clasificación funcional del DRA según el sistema AKIN. Adaptada (Tsai y cols., 2017). DRA: daño renal agudo; TFG: tasa de filtración glomerular; CrP: creatinina plasmática.

6.3 Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO)

Se trata de una guía para el manejo de la enfermedad renal desarrollada por el consorcio que lleva su mismo nombre y cuyas siglas vienen de *Kidney Disease: Improving Global Outcomes*. Su objetivo es ayudar a profesionales que atienden a pacientes con DRA a clasificar el daño y a prestar la atención adecuada a cada situación. De la misma manera, existen guías KDIGO para el manejo de la enfermedad renal crónica y otras patologías. Según la guía KDIGO el DRA se define como cualquiera de las siguientes situaciones (Li, Burdmann, & Mehta, 2013):

- Aumento de CrP \geq 0.3mg/dl (\geq 26,5 μ mol/L) en 48 h.
- Aumento de CrP hasta 1.5 veces su valor basal, que se sabe o se presume, que se ha producido en los 7 días anteriores o,
- Volumen de orina <0,5 mL/Kg/h durante 6h.

7. Estado de la técnica del diagnóstico del DRA

Dada la elevada morbimortalidad asociada al DRA se hace necesario el establecimiento de un diagnóstico precoz del mismo. En la actualidad, numerosos laboratorios y unidades de investigación vuelcan sus esfuerzos para alcanzar este objetivo, pero entre tanto, el diagnóstico del DRA sigue basándose en la medida de productos nitrogenados en sangre y del aclaramiento. Es importante recordar que el

daño renal agudo en múltiples ocasiones es multifactorial, especialmente aquel que se desarrolla en el ámbito hospitalario. Además, es un proceso dinámico y puede evolucionar de un estadio a otro más grave. Debemos abordar el diagnóstico diferencial del DRA desde cuatro puntos de vista (Tenorio y cols., 2010).

Diagnóstico	Objetivo	Foco de Interés
Sindrómico	Confirmar el origen agudo del deterioro funcional	Confirmar el carácter agudo Descartar DRC Puede haber DRA sobre DRC
Funcional	Determinar el grado de deterioro funcional	Graduar el descenso de la función renal utilizando AKIN o RIFLE
Fisiopatológico	Establecer el mecanismo principal del DRA	¿Pre-renal, renal, post-renal? Facilita el enfoque terapéutico
Etiológico	Identificar la causa	Ayuda a determinar el tipo de DRA

Tabla 3. Abordajes diagnósticos del DRA. DRC: daño renal crónico; DRA: daño renal agudo; AKIN: red de lesión renal aguda (del inglés *acute kidney injury network*); RIFLE: del inglés *risk, injury, failure, loss y end*.

El primero de los pasos es, por tanto, determinar si las anomalías en cuanto a productos nitrogenados en sangre o a otros signos asociados a daño renal se deben a un caso de DRA o a una patología de otro tipo. Esclarecer este punto resulta, a menudo, complicado puesto que, ante una situación de daño renal detectada en un momento puntual el saber si ha sido producida de manera súbita o si lleva un tiempo acaeciendo se torna, en ausencia de pruebas médicas previas, prácticamente imposible. La primera aproximación que debe hacerse es precisamente la búsqueda de un historial de pruebas de función renal previas, en el que se pudieran detectar indicios de daño, así como de una historia de antecedentes familiares. Sin embargo, en caso de no disponer de este tipo de datos, la única opción viable es la mera observación de los síntomas del paciente y en este caso, la asociación del daño a un proceso agudo o crónico puede resultar incierta.

Por su parte, respecto al diagnóstico fisiopatológico, ante un caso de DRA, una de las primeras pruebas a realizar es la ecografía abdominal, que permite determinar la presencia o ausencia de obstrucción en las vías urinarias. Una vez descartado el fallo post-renal, el siguiente paso consiste en discriminar entre el DRA pre-renal y el intrarrenal o parenquimatoso, para lo cual hay que atender a signos como la perfusión renal, la pérdida de volumen sanguíneo que denotarían un origen pre-renal de la patología. En estas situaciones pueden observarse signos como taquicardia e hipotensión y signos como sequedad en mucosas, e hipotonicidad ocular.

Finalmente, una vez se ha dirimido el carácter fisiopatológico del proceso, el último paso consiste en determinar la etiología del mismo. Para ello se ha de estudiar el historial clínico previo de cada paciente. Este aspecto lo abordaremos más extensamente en el apartado 8.1.

7.1 Diagnóstico de referencia

Las clasificaciones actualmente empleadas en el diagnóstico del DRA se basan fundamentalmente en el valor de creatinina sérica. La creatinina es un compuesto aminoacídico derivado principalmente del metabolismo del músculo esquelético y la ingesta de carne. Su peso molecular es de 113 Da y es liberada al plasma a un ritmo relativamente constante, tras lo cual, se filtra en el glomérulo y no es reabsorbida ni metabolizada por el riñón (Bagshaw & Bellomo, 2007). Por estas razones, el valor de creatinina en plasma se utiliza como estimador de la TFG asumiendo en general, una relación inversa entre ambos parámetros (Stevens & Levey, 2005), de manera que, un aumento en el valor de CrP se asocia con un descenso en la TFG y viceversa.

No obstante, existen limitaciones a la hora de utilizar la CrP como estimador de la TFG. En primer lugar, aproximadamente el 10-20 % del aclaramiento de creatinina tiene lugar mediante secreción tubular (Shemesh, Golbetz, Kriss, & Myers, 1985), de modo que esta situación puede enmascarar el descenso inicial en la TFG, especialmente en aquellos casos en los que la TFG decae y la porción de CrP que no es filtrada pasa a los capilares peritubulares, en los que tiene lugar la secreción ya citada. En segundo lugar, existen fármacos capaces de alterar los niveles normales de CrP, tales como la cimetidina o el trimetoprim (Bagshaw & Bellomo, 2007). En tercer lugar, los niveles basales de CrP en cada individuo pueden presentar gran variabilidad en función del sexo, edad, raza, dieta, masa muscular, procesos

patológicos ajenos al daño renal agudo como la cetoacidosis o las alteraciones neuromusculares (Dirkes, 2011) o estado de hidratación (Lane, 2013). Por último, y como limitación principal de la CrP en el diagnóstico del DRA, hay que considerar el hecho que, ante un descenso agudo en la TFG, los valores de creatinina sérica no se elevan hasta alcanzarse un estado de equilibrio que permita su acumulación, lo que requiere varios días (Prasad Devarajan, 2008a, 2011; N. Lameire, Van Biesen, & Vanholder, 2005) y una pérdida de la función renal superior al 50%, puesto que, de no ser así, la elevada reserva renal es capaz de mantener la filtración que las nefronas dañadas no pueden efectuar y el valor de CrP permanece cercano a la normalidad. Por tanto, a corto plazo, la CrP muestra escasa sensibilidad y especificidad en la detección de la enfermedad renal (Star, 1998). Esta última limitación de la CrP aparece reflejada en la figura 16.

7.2 Medida de la filtración glomerular

En la práctica clínica, la estimación de la TFG es un parámetro clave en el diagnóstico del DRA (Urbschat, Obermüller, & Haferkamp, 2011). Estas estimaciones se hacen fundamentalmente aplicando dos ecuaciones: i) la ecuación de Cockcroft y Gault (Cockcroft & Gault, 1976) que estima la TFG en base a la creatinina plasmática; ii) la ecuación de Levey o fórmula MDRD, "Modification of Diet in Renal Disease" (Levey y cols., 1999). Sin embargo, estas ecuaciones pueden aplicarse únicamente en pacientes con una función renal alterada de manera estable o crónica. En el DRA, por su parte, el descenso en la TFG se produce de forma brusca pero como ya se ha mencionado, se necesita un intervalo de tiempo mayor para que la CrP comience a acumularse en plasma y se haga detectable (Urbschat y cols., 2011).

Ecuación de Cockcroft y Gault

$$\text{CrCl} = \frac{(140 - \text{Edad}) \times \text{Peso (kg)}}{72 \times \text{CrP} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}}\right)} \times (0,85 \text{ si es mujer})$$

Ecuación MDRD (Levey)

$$\text{TFG estimada} = 186 \times (\text{CrP})^{-1,154} \times (\text{Edad})^{-0,203} \times 1,21 \text{ (raza negra)} \times 0,742 \text{ (mujer)}$$

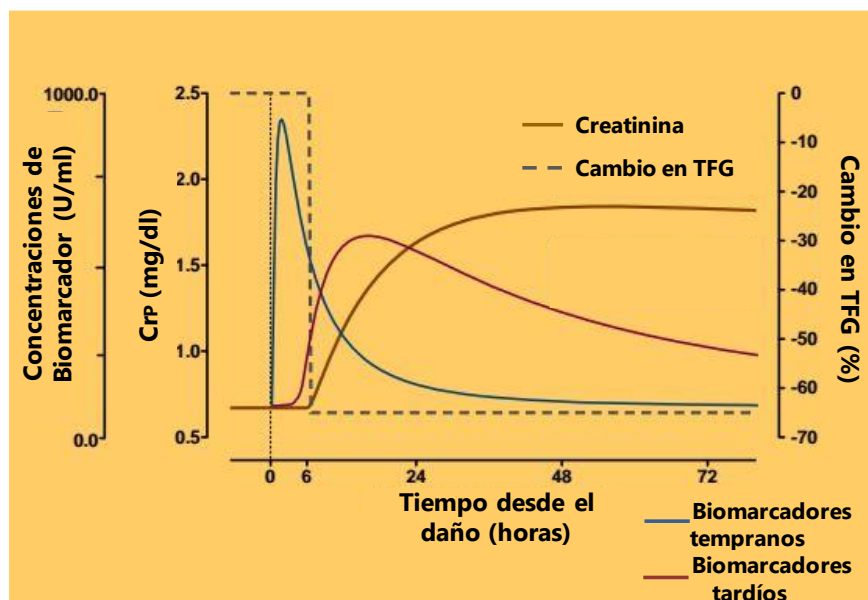


Figura 16. Representación esquemática del desfase existente entre el tiempo tras la agresión o exposición al tóxico y lo que tarda en producirse el descenso en la TFG. Adaptado (WPickering & H, 2012). DRA y el tiempo en el que un incremento en el valor de CrP se hace detectable. En ella aparecen reflejados además los picos que corresponderían a los biomarcadores ideales de enfermedad renal, cuya aparición se anticiparía al aumento de CrP.

Quedan patentes, por tanto, las limitaciones asociadas a la utilización de la CrP como estimador de la TFG, pese a las medidas y parámetros introducidos para remediar sus carencias.

Además de la CrP, clásicamente se han utilizado otros marcadores en el diagnóstico del DRA. Uno de ellos es la urea plasmática o nitrógeno ureico plasmático. Sin embargo, tiene unas carencias similares a la creatinina plasmática y

también diagnóstica de una manera tardía el DRA, cuando el daño es ya elevado. Otros marcadores utilizados son la excreción fraccional de sodio y la proteinuria (Prasad Devarajan, 2011). La presencia de proteínas en orina se da cuando la permeabilidad de la barrera de filtración glomerular está afectada, o cuando hay alteraciones tubulares que impiden la reabsorción de las mismas a lo largo de la nefrona (Cohen & Lemann, 1991). Sin embargo, presenta una escasa especificidad en cuanto a la etiología del daño y tampoco permite detectar el DRA de una manera precoz.

Visto todo esto, resulta ahora evidente, la carencia de un sistema alternativo que simplifique el proceso diagnóstico y permita reducir el número de escalones a superar antes de obtener una visión global definitiva de la situación del paciente. Es decir, el objetivo ideal que se pretende alcanzar con la búsqueda de nuevos marcadores es llegar a desarrollar un sistema diagnóstico más rápido y eficiente en el que la simple aparición de varios marcadores de forma combinada y en unas proporciones concretas, permita no sólo detectar el riesgo de enfermedad con mayor prontitud si no también, averiguar la etiología de la misma, objetivo del presente trabajo. Así, la Sociedad Americana de Nefrología ha definido el desarrollo e investigación de biomarcadores para la detección temprana del DRA como una prioridad en investigación.

7.3 Estudio histopatológico del riñón

El análisis histopatológico del riñón después de la administración de un agente químico es muy útil para identificar la localización, la naturaleza y la intensidad de la lesión nefrotóxica. Sin embargo, su uso está muy restringido por la dificultad que entraña la obtención de muestras tisulares. La mera observación de una preparación de tejido renal, debidamente procesada y teñida (normalmente con hematoxilina y eosina) proporciona una idea de las estructuras más afectadas. Mediante estudios histoquímicos e inmunocitoquímicos puede detectarse la presencia o ausencia de antígenos marcadores de daño menos evidente, de forma muy localizada en cada estructura y tipo celular.

7.4 Estudio de la composición de la orina

La lesión renal puede ser detectada también mediante la evaluación de una serie de compuestos presentes en la orina, como proteínas, glucosa y electrolitos. Una elevada concentración de glucosa en orina (glucosuria), en tanto que su concentración plasmática es normal, puede estar relacionada con defectos de reabsorción de los azúcares en el túbulo proximal causados por un tóxico.

La excreción urinaria de proteínas de elevado peso molecular, como la albúmina, sugiere la existencia de lesiones glomerulares, mientras que la excreción de proteínas de bajo peso molecular, como la β -2-microglobulina debe hacer sospechar una lesión del túbulo proximal. Además, son marcadores de proteinuria tubular: alfa-1-microglobulina, proteína unida a retinol (RBP), cistatina C, amilasa, etc., así como las proteínas villin (del citoesqueleto tubular e intestinal) y Tamm-Horsfall (THP) (del asa de Henle). La eliminación por la orina de enzimas que ocupan el borde en cepillo de las células tubulares, como la fosfatasa alcalina (FAL) y la gamma-glutamilttransferasa (GGT), se debe a lesiones del borde en cepillo, mientras que la excreción de otras enzimas, como la lactatodeshidrogenasa (LDH), glutatión transferasa (GST) y la alanina-aminopeptidasa (AAP) puede reflejar una lesión celular más generalizada. Algunos de estos marcadores, junto con los propios de nuestro laboratorio van a emplearse en este estudio con el objetivo de evaluar su capacidad diagnóstica, etiológica y de pronóstico, y que veremos más en detalle en el apartado 8.2.

7.5 Análisis del sedimento urinario

El sedimento urinario en el diagnóstico diferencial del DRA es una herramienta extraordinariamente útil para diferenciar los diferentes tipos de insuficiencia renal aguda (pre-renal, renal, y post-renal) y, lógicamente, para diferenciar tipos de enfermedades parenquimatosas.

En la insuficiencia renal aguda pre-renal el sedimento no contiene células, pero si cilindros hialinos formados por una proteína normalmente presente en la orina y secretadas por las células epiteliales del asa de Henle denominada proteína de Tamm-Horsfall.

En el DRA con necrosis tubular, suelen existir cilindros granulosos, pigmentados y de células epiteliales, generalmente en asociación con hematuria microscópica. No obstante, los cilindros pueden faltar en un 25% de los casos y no son necesarios para el diagnóstico. Los cilindros hemáticos, no suelen verse en esta situación, indicando su presencia enfermedad glomerular o nefritis intersticial aguda. Lo mismo ocurre con los eritrocitos dismórficos, típicos de las enfermedades glomerulares, pero menos específicos que los cilindros.

El análisis del sedimento urinario por tanto proporciona la siguiente información:

- Hematuria: asociada con cálculos renales, infecciones, tumores, y otras enfermedades.
- Piuria: Presencia de piocitos en la orina, asociada con infecciones urinarias.
- Eosinofilia: asociada con nefritis intersticial, o con el síndrome del dedo azul.
- Exceso de glóbulos rojos: asociado a vasculitis, glomerulonefritis e hipertensión maligna.
- Exceso de glóbulos blancos: asociado con nefritis aguda, glomerulonefritis, pielonefritis severa.
- Cilindros urinarios, asociados con necrosis tubular aguda.
- Oxalato de calcio, algunos alimentos producen su aparición (alcachofas) y a veces están asociados con intoxicaciones por etilenglicol.

8. Diagnóstico temprano y etiológico del DRA renal o intrínseco

Como se ha mencionado en el apartado anterior, la comunidad científica actual se centra en la búsqueda de biomarcadores que sean capaces de detectar el DRA cuando el proceso fisiopatológico está comenzando, con el fin de conseguir un diagnóstico temprano que mejore el pronóstico de cada paciente. Además, una nueva vertiente científica tiene como finalidad encontrar marcadores que permitan determinar el riesgo asociado de cada individuo de desarrollar un DRA, lo que permitiría llevar a cabo un diagnóstico preventivo del DRA antes de que el síndrome se desarrolle.

La palabra biomarcador se definió por primera vez en 1989 como un indicador medible para una condición biológica específica o una enfermedad específica. Más

adelante, en 2001, la definición fue actualizada a la siguiente: una característica que puede ser medida y evaluada como normal en un proceso biológico, patológico o en una respuesta farmacológica a una intervención terapéutica (Adiyanti & Loho, 2012a). En el ámbito del DRA las características deseables para un marcador son las siguientes: (i) accesible a partir de muestras no invasivas, como sangre y preferiblemente orina; (ii) rápida y fácilmente determinable en un margen de tiempo adecuado (Figura 16); (iii) alta sensibilidad para facilitar su detección temprana, con un rango amplio de valores para poder estratificar el riesgo; (iv) alta especificidad para poder permitir la identificación de los subtipos de daño renal agudo (pre-renal, parenquimatoso, post-renal) y su patogenia (isquemia, toxicidad, sepsis, etc.); (v) permitir la localización primaria de la lesión: glomérulo, túbulo, intersticio, compartimento vascular; (vi) informar sobre la duración del daño renal: agudo, crónico, agudo sobre crónico; (vii) valoración de las posibilidades pronósticas: duración y gravedad del DRA, necesidad de terapia renal sustitutiva, mortalidad, etc.; y (viii) definir el curso del daño renal agudo (Prasad Devarajan, 2011).

Sin embargo, es difícil pensar que una única molécula sea capaz de indicar todo lo anteriormente descrito. Por ello, en la actualidad las investigaciones en el diagnóstico temprano y etiológico, así como el pronóstico del DRA se centran en el estudio de un panel de marcadores que, en conjunto, puedan describir todas las características mencionadas, objetivo final del presente trabajo.

8.1 Diagnóstico etiológico diferencial de DRA

Otra posibilidad para mejorar el diagnóstico del daño renal agudo es el diagnóstico etiológico diferencial, es decir, la identificación del tipo de DRA y de la causa. En la actualidad disponemos de unos índices urinarios (tabla 4) que nos sirven de ayuda a la hora de diferenciar el DRA sin embargo, no son suficientes para discriminar el fármaco o evento causante del mismo.

	DRA pre-renal	NTA	NTIA	DRA glomerular	DRA obstructivo
OsmU mOsm/kg)	>400	<350	300	400	300-400
NaU (mEq/L)	<20	>40	20	30	Variable
uU/Up	>10	<10	<10	Variable	10
CrU/CrP	>20	<15	>15	Variable	15
IFR	<1	>2,5	<1 ó >2	≤1	Variable
EFNa	<1	>1	<1 ó >2	≤1	Variable

Tabla 4. Indicadores utilizados en el diagnóstico diferencial del DRA. Adaptado (Arias Rodríguez y cols., 2013). Osm, osmolaridad; u: concentración urea; Cr, concentración creatinina; U: urinaria; P: plasmática; IFR, índice de fallo renal [$IFR = (NaU * CrP) / CrU$]; EFNa: excreción fraccional de sodio [$EFNa = ((NaU * CrP) / (NaP * CrU)) * 100$]; NTA: necrosis tubular aguda; NTIA: nefritis tubulointerstitial aguda; DRA: daño renal agudo.

Así mismo, sería de gran utilidad poder diferenciar el daño renal causado por un fármaco o agentes determinados a la ejercida por otros (Mussap y cols., 2002). Actualmente esto es casi imposible ya que casi todas las formas de daño renal agudo dan lugar a los mismos marcadores, especialmente dentro del grupo de causas de un mismo tipo de DRA, como por ejemplo, la necrosis tubular aguda. Esto sería de gran utilidad en aquellas situaciones clínicas en las que en un mismo paciente convergen a la vez diferentes fármacos y procedimientos potencialmente nefrotóxicos. En ese contexto, en aquellos pacientes en los que aparecen síntomas precoces de daño renal, sería muy útil poder conocer cuál de todas las causas potenciales de daño renal es la responsable principal del daño. De esta manera se podría actuar específicamente sobre esa y respetar las demás. Un ejemplo específico de estas situaciones es el caso de los pacientes polimedicados. En ellos, cuando aparecen síntomas de daño renal, es imposible determinar con la tecnología existente cuál de esos fármacos es el desencadenante del efecto tóxico. La identificación de marcadores específicos de cada fármaco y de cada causa de DRA permitirá realizar un tratamiento más racional, individualizado y específico de estas situaciones clínicas cotidianas. El trabajo de esta tesis doctoral también supone una prueba de concepto sobre el diagnóstico diferencial, ya que realiza una huella

proteica con estos biomarcadores urinarios para cada una de las diferentes etiologías que provocan DRA (la nefrotoxicidad de la gentamicina, el cisplatino o el nitrato de uranilo, la isquemia renal y la sepsis, o tratamientos farmacológicos que dan lugar a un fallo pre-renal) y que servirán potencialmente para la diferenciación de la enfermedad. De esta forma, se abren nuevas posibilidades de mejora del diagnóstico del DRA.

8.2 Biomarcadores emergentes

En la actualidad se han estudiado más de 20 biomarcadores, en modelos animales experimentales y en clínica, sepsis y bypass cardiopulmonar entre otros (Sirota, Klawitter, & Edelstein, 2011a). Algunos de los más destacados son: KIM-1 (Kidney Injury Molecule 1), NGAL (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin), L-FABP (Liver-Fatty Acid Binding Protein), Cystatin C, NAG (N-Acetil-Glucosaminidase), netrina-1, enzimas tubulares (como la gamma-glutamyl transfesina o γ GT, la glutathione-S-transferasa o GST y el lactato deshidrogenasa o LDH).

Son muchos las moléculas sugeridas por la comunidad científica como potenciales marcadores del DRA en su fase inicial. De todos ellos, los biomarcadores NGAL o KIM-1 son los más estudiados en fase clínica (Haase, Bellomo, y cols., 2009; Shinke y cols., 2015; Torregrosa y cols., 2015) y en modelos animales y celulares (Kaucsár y cols., 2016; Palm y cols., 2016; Sinha, Vence, & Salahudeen, 2013). Numerosos estudios verifican el papel de las proteínas NGAL y L-FABP como biomarcadores de diagnóstico temprano del DRA (Devarajan, 2011) mientras que diferentes estudios han demostrado que las moléculas KIM-1 e IL-18 son buenos marcadores para diferenciar el DRA (especialmente asociado a la NTA) y otros tipos de daño renal, como la enfermedad renal crónica (S.G. Coca, Yalavarthy, Concato, & Parikh, 2008a), es decir son más específicos (Peres y cols., 2013a).

Por tanto, no existe un biomarcador capaz de abarcar todas las características deseables en el marcador ideal, sino que, posiblemente, sea la combinación de varios de ellos la que proporcione la información óptima. La imagen siguiente recoge los marcadores que se están utilizando con mayor frecuencia, así como su principal utilidad diagnóstica y pronóstica y la localización preferente del daño que marcan (figura 16).

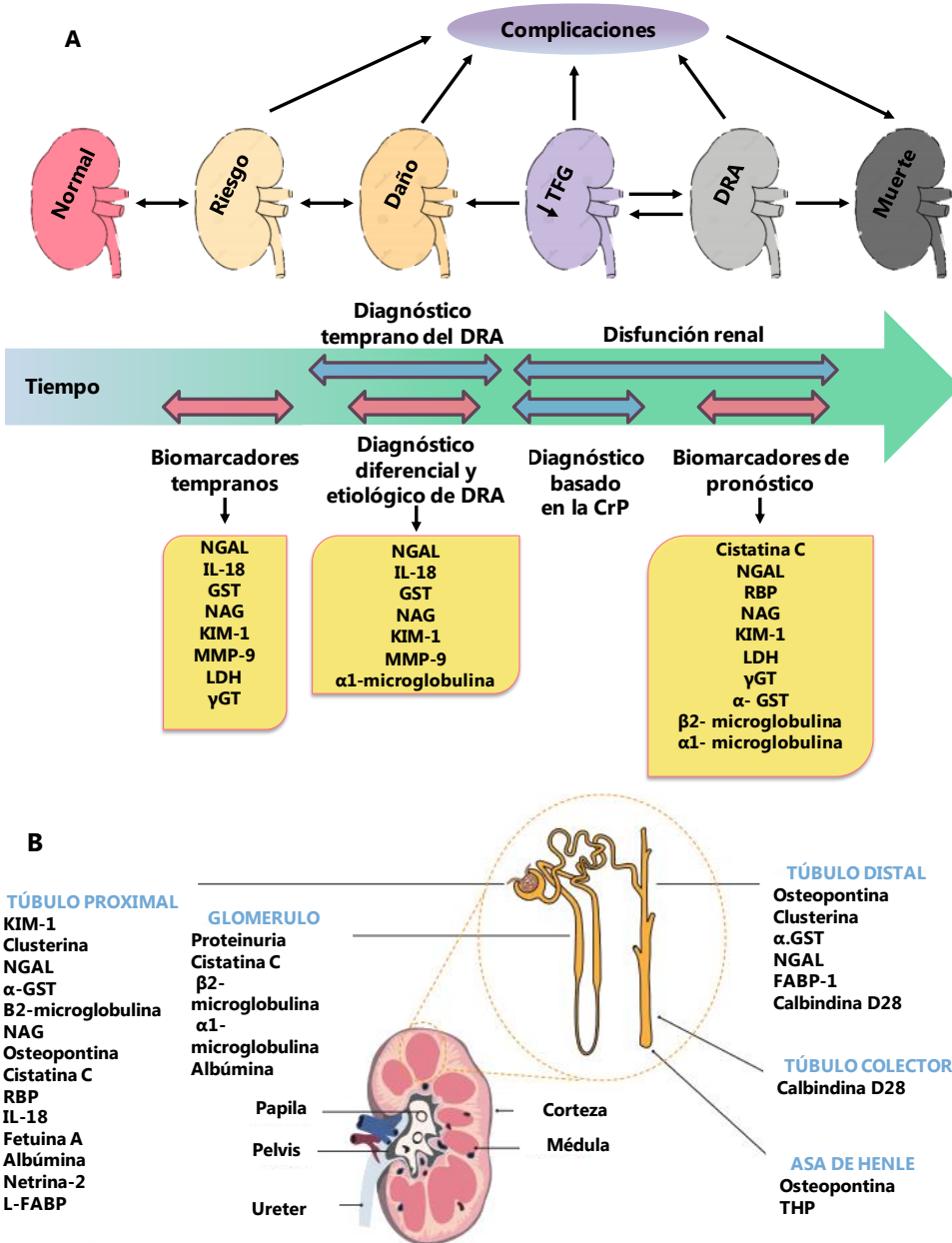


Figura 17. A: Utilización potencial de biomarcadores en DRA. Muchos biomarcadores están ahora disponibles para evaluar los cambios en la función renal y detectar el daño renal. Imprescindibles para el nuevo concepto de diagnóstico diferencial y el pronóstico. **B: Mecanismos potenciales y especificidad de los biomarcadores urinarios del daño renal.** Los biomarcadores de daño también son específicos del sitio, magnitud y la duración. Imprescindibles para el nuevo concepto de diagnóstico etiológico. Adaptado (Murray y cols., 2014).

Para este estudio, se han seleccionado NGAL, KIM-1, PAI-1, NAG, FABP-1, Fetuina A, BMP-7, GGT, GST y albúmina por ser biomarcadores muy investigados en la actualidad o por su futuro prometedor según las últimas investigaciones, y junto a ellos, los marcadores propios y ya patentados por nuestro grupo de investigación, GM2AP, t-gelsolina, TCP-1 y Reg IIIb. Las principales características de estos biomarcadores se recogen en la siguiente tabla:

Nivel	Descripción	Ubicación del daño
NGAL	Proteína de fase aguda. Se expresa fundamentalmente en neutrófilos. Regula el transporte de hierro y promueve la supervivencia celular del túbulo.	Túbulo proximal y colector
KIM-1	Glicoproteína transmembrana tipo I. Participa en degradación de restos celulares y promueve la regeneración epitelial. Regula la apoptosis.	Túbulo proximal
PAI-1	Inhibidor del activador de plasminógeno tipo I. Inhibe la fibrinólisis.	Endotelio vascular
NAG	N-Acetil-β-D-Glucosaminidasa. Enzima lisosomal. Cataliza la hidrólisis de los enlaces glucosídicos.	Túbulo proximal
FABP-1	Proteína de unión a ácidos grasos. Antioxidante e inhibición del daño tubulointersticial.	Túbulo proximal
Fetuina A	Se expresa en hígado, riñón y tejido adiposo, y se secreta a la circulación. Evita la formación de calcificaciones en el músculo esquelético	Túbulo proximal
BMP-7	Proteína morfogenética ósea. Organogénesis ósea y renal. Regeneración tisular.	Túbulo distal.
GGT	Metabolismo de glutation. Superficie externa de varios tipos celulares.	Borde en cepillo del túbulo proximal
GST	Enzima sintetizada en hígado y riñón. Responsable de detoxificación de un amplio rango de xenobióticos.	Túbulo proximal y porción delgada del asa de Henle
Albúmina	Proteína transportadora mayoritaria en suero	Glomérulo Túbulo proximal

GM2AP	Proteína activadora de gangliósido 2. Biomarcador de predisposición de DRA	Túbulo proximal
t-gelsolina	Organización del citoesqueleto y regulador de apoptosis	Túbulo proximal
TCP-1	Chaperonina tipo II. Posible inhibición de guanilil ciclasas	Túbulo proximal
Reg IIIb	Proteína antimicrobiana. Intestino y páncreas exocrino. Biomarcador etiológico	Túbulo proximal

Tabla 5. Principales biomarcadores de DRA. (Adiyanti & Loho, 2012b; Alge & Arthur, 2015; Prasad Devarajan & Murray, 2014; Ferreira y cols., 2011a; Hoffmann y cols., 2010; Quiros y cols., 2010a; Vanmassenhove, Vanholder, Nagler, & Van Biesen, 2013) NGAL: lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos; KIM-1: molécula de daño renal 1; PAI-1: inhibidor del activador de plasminógeno; NAG, N-acetyl-beta-D-glucosaminidasa; FABP-1: proteína hepática fijadora de ácidos grasos; BMP-7: Proteína morfogenética ósea-7; GGT: Gamma glutamil transpeptidasa ; GST: Glutation S-transferasa; GM2AP: Proteína ativadora del gangliósido M2; TCP-1: del inglés *tailless complex polypeptide*; Reg IIIb: Proteína 3-β derivada de islote regenerador.

La idea es establecer una huella proteica basada en estos biomarcadores urinarios específica y única de cada etiología de DRA con el consiguiente desarrollo de un algoritmo matemático que nos sirva para realizar un diagnóstico temprano y etiológico. El siguiente paso en la validación de estos marcadores del daño renal consiste en su estudio en el ámbito clínico, es decir, comprobar si las huellas estudiadas en los diferentes modelos animales se mantienen en los humanos frente a las mismas causas de DRA y, de no ser así, realizar un nuevo panel de biomarcadores para intentar buscar nuevamente un algoritmo matemático. Puesto que los tratamientos farmacológicos que influyen en esta enfermedad, así como sus dosis, son tan variados, esta tesis doctoral se ha centrado en el estudio de aquellos pacientes sometidos a tratamientos potencialmente nefrotóxicos o dañinos para los riñones relacionados con enfermedades de importante magnitud humana, médica y socioeconómica, en las que además se produce una gran incidencia y mortalidad. Finalmente, con la información de estos mismos biomarcadores, se intentó dilucidar el mecanismo fisiopatológico asociado al DRA con el fin último de realizar un tratamiento más efectivo y reducir los costes sociales y sanitarios.

“No se debe llamar ciencia más que al conjunto de fórmulas que siempre tiene éxito. Todo el resto es literatura”.

Paul Valéry

Objetivos

Una de las principales limitaciones en el diagnóstico del daño renal agudo reside en la inexactitud de los marcadores de referencia que actualmente son utilizados en clínica, y por otro lado en la inexistencia de biomarcadores capaces de identificar de forma temprana el daño y diferenciar su etiopatología.

Por tanto, nuestro objetivo final es el desarrollo preclínico y clínico de un sistema de diagnóstico preventivo y etiológico para la mejora del manejo del daño renal agudo, basado en la determinación de un panel de marcadores urinarios, que permitan un pronóstico y un manejo personalizado.

En este trabajo se han abordado algunos aspectos parciales conducentes al objetivo general. Concretamente, se propusieron los siguientes objetivos específicos:

1. Asociar paneles de marcadores urinarios diferenciales a distintos tipos de daño renal agudo experimental, tanto pre-renal como de necrosis tubular.
2. Estudiar la utilidad clínica de estos paneles de biomarcadores en el diagnóstico etiopatogénico personalizado y el pronóstico de pacientes con daño renal agudo.
3. Profundizar en el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos y el significado biológico de la aparición en la orina de biomarcadores urinarios seleccionados.

“El animal tiene, como tú, un corazón que siente.

El animal conoce, como tú, la alegría y el dolor.

El animal tiene, como tú, sus aspiraciones.

El animal tiene, como tú, un derecho a la vida”.

Peter Rosegger

Métodos

1. Materiales

Todos los reactivos y productos, anticuerpos, equipos y aparatos, y programas y softwares utilizados para la realización de este trabajo, así como las casas comerciales y correspondientes referencias, están recogidos en las tablas 10, 11 y 12 que se encuentran al final de la sección de Métodos.

2. Animales de experimentación

2.1 Dieta y condiciones ambientales

Para la realización de este trabajo de investigación se utilizaron ratas Wistar macho de un peso comprendido entre 240-260 gramos al comienzo de cada experimento procedentes del Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Salamanca. Estas instalaciones presentan unas condiciones ambientales constantes (20 °C de temperatura, 60 % de humedad ambiental, sistemas de renovación y filtrado de aire, y un sistema de luz con temporizador que proporciona un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad) que facilitan la reproducibilidad de los experimentos.

Los animales se mantuvieron durante todo el proceso experimental en jaulas de 50 x 28 cm, se colocaron un máximo de cinco ratas por jaula (manteniendo separados en todo momento los animales provenientes de diferentes grupos experimentales). En determinados periodos se trasladaron a jaulas metabólicas para poder obtener muestras de orina individuales. En todo momento tuvieron acceso libre a comida y agua de bebida.

Todos los animales se alimentaron con una dieta estándar (AØ4, Panlab), 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 %), humedad (10,54 %), 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). Para la preparación de esta dieta estándar, se utilizaron los siguientes ingredientes: cereales, subproductos de molinería, harinas o tortas oleaginosas, harina de carne, compuestos minerales y corrector vitamínico mineral.

2.2 Manipulación de los animales

Los animales se manipularon siguiendo las recomendaciones de la Declaración de Helsinki y los principios del cuidado y la utilización de los animales de experimentación estipulados en las regulaciones internacionales y en las siguientes instituciones europeas y nacionales: la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos; la Ley 32/2007 del Estado Español, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio; y los Reales Decretos RD 1201/2005 y RD 53/2013 sobre la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

El sacrificio de los animales se llevó a cabo siguiendo las guías para la eutanasia de los animales de experimentación detalladas en el Anexo III del RD 53/2013, basadas en el reglamento N.º 1099/2009 del Consejo, relativo a la protección de los animales en el momento de la matanza.

3. Modelos experimentales

3.1 DRA inducido por Nefrotóxicos: gentamicina, cisplatino y nitrato de uranilo

La nefrotoxicidad constituye un problema de salud y socioeconómico muy serio en todo el mundo. Aproximadamente el 25% de los 100 fármacos más utilizados en las unidades de cuidados intensivos son potencialmente nefrotóxicos (Taber & Mueller, 2006b). Además, se estima que la nefrotoxicidad es la causa del 10-20% de los casos de DRA (Himmelfarb & Hakim, 1997). El DRA se puede producir, por tanto, como consecuencia de cualquier proceso que disminuya la función renal (medida actualmente por la tasa de filtración glomerular) como por ejemplo por medicamentos (aminoglucósidos como la gentamicina), agentes antineoplásicos (cisplatino) o compuestos químicos (nitrato de uranilo) entre otros.

3.1.1 Procedimiento experimental

Como ya vimos en el apartado 5.2.1 de la Introducción, la gentamicina es un antibiótico aminoglucósido ampliamente utilizado en la práctica clínica que interfiere

con los transportadores de sodio de las nefronas como la Na^+/K^+ ATPasa y con los transportadores megalina-cubilina. El cisplatino afecta predominantemente al segmento S3 de los túbulos proximales, en concreto con el cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$, el intercambiador Na^+/H^+ tipo III, los canales de agua de la membrana como las acuaporinas 1, 2 y 3 y con los transportadores megalina-cubilina (Bae y cols., 2009; Pedersen, Procida, Larsen, Holstein-Rathlou, & Frederiksen, 2005). Por último, el nitrato de uranilo es un compuesto oxidante y altamente tóxico que provoca insuficiencia renal severa. Se sabe que dosis entre 5 y 20 mg/kg de nitrato de uranilo inyectado i.p. en ratas causan un daño específico en los segmentos S2 y S3 de los túbulos proximales, vacuolización celular y pérdida del borde en cepillo (Lopez-Novoa y cols., 2011b).

Para llevar a cabo el modelo experimental de DRA inducido por nefrotóxicos, se trataron ratas con inyecciones intraperitoneales de Gentamicina 150 mg/kg, Cisplatino 5 mg/kg o Nitrato de Uranilo 5 mg/kg. Para la preparación de las disoluciones de los diferentes nefrotóxicos se utilizó suero salino 0,9% atemperado (37 °C) como disolvente, y se mantuvieron en agitación hasta la total disolución. Para el caso de la gentamicina, la agitación fue de 2 minutos a 150 rpm en agitador Eppendorf MixMate®. Se preparó la gentamicina necesaria para todas las ratas y todos los días del tratamiento. En este periodo, la disolución se almacenó adecuadamente a 4 °C, atemperándolo previamente a la inyección i.p. Por otro lado, se tuvo especial cuidado a la hora de preparar las soluciones de cisplatino y nitrato de uranilo debido a que son compuestos fotosensibles, por este motivo se utilizaron eppendorfs opacos. Además, se mantuvieron en agitación durante 30 minutos a la misma velocidad antes mencionada. Tanto para el cisplatino como el nitrato de uranilo, al ser dosis única, el mínimo excedente que pudiera haber tras la inyección i.p. se eliminó según dictan los protocolos de seguridad del grupo de investigación.

3.1.2 Diseño experimental

En base a estudios preliminares llevados a cabo en nuestro laboratorio (Ferreira y cols., 2011a; Quiros y cols., 2010a; Vicente-Vicente y cols., 2013, 2015) el estudio se ha diseñado evaluando unas pautas terapéuticas a dosis nefrotóxicas: (i) gentamicina en dosis de 150 mg/kg/día durante 6 días por vía i.p.; (ii) cisplatino en dosis única de 5 mg/kg por vía i.p.; y (iii) nitrato de uranilo en dosis única también a 5 mg/kg vía i.p. Al sexto día post administración, momento de máximo daño renal evaluado por el

aumento de los niveles plasmáticos de creatinina, para las ratas tratadas con la gentamicina, o al cuarto día para las ratas tratadas con el cisplatino o el nitrato de uranilo, se llevó a cabo la perfusión renal, según se describe en el apartado 4.3, para la obtención de muestras de tejido renal con el fin de realizar estudios histológicos, de WB, ELISAs o PCR. Además, durante todo el periodo experimental, los animales se mantuvieron en jaulas metabólicas individuales con libre acceso a comida y bebida con el objetivo de obtener muestras de 24 horas de orina según describe el apartado 4.1, muestras de plasma según apartado 4.2. Ambas muestras biológicas se recogieron los días basal (antes de la primera inyección del nefrotóxico en cuestión), 2, 4 y 6 para los animales tratados con gentamicina; o los días basal, 2 y 4 para los animales tratados con cisplatino o nitrato de uranilo. Por último, los animales se monitorizaron todos los días durante el experimento. Se observó su estado de salud general, movilidad, color del pelo y peso corporal entre otros parámetros. El diseño experimental se desarrolló como se describe a continuación:

- **Grupo I - Control (Ctrl; n=5):** Ratas a las cuales se les administró 1 mL de suero fisiológico por kg de peso corporal, vía i.p., diariamente durante un periodo de 6 días.
- **Grupo II - Gentamicina 150 mg/kg (G150; n=7):** Ratas a las cuales se les administró gentamicina diariamente durante 6 días a una dosis nefrotóxica de 150 mg/kg de peso corporal, vía i.p.
- **Grupo III - Cisplatino 5 mg/kg (CDDP5; n=6):** Ratas a las cuales se les administró una dosis nefrotóxica única de cisplatino 5 mg/kg, de peso corporal, vía i.p.
- **Grupo IV - Nitrato de Uranilo 5 mg/kg (NU5; n=5):** Ratas a las cuales se les administró una dosis nefrotóxica única de nitrato de uranilo 5 mg/kg, de peso corporal, vía i.p.

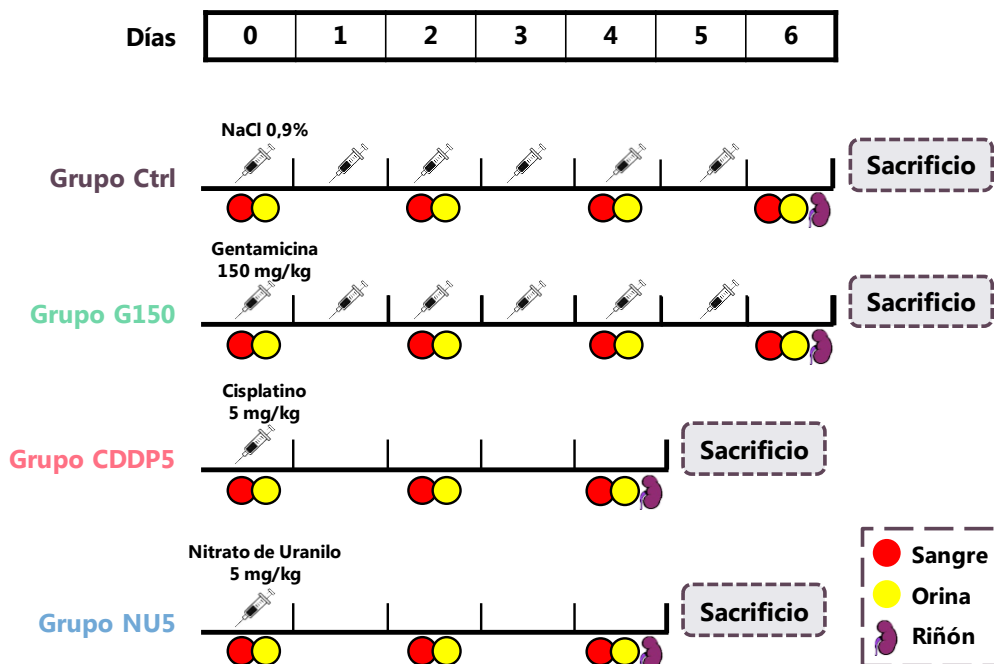


Figura 18. Esquema diseño experimental de 3 modelos de DRA inducidos por nefrotóxicos: Gentamicina, Cisplatino y Nitrato de Uranilo. C: control; G150: gentamicina 150 mg/kg; CDDP5: cisplatino 5 mg/kg; NU: nitrato de uranilo 5 mg/kg.

3.2 DRA inducido por isquemia reperusión (I/R)

Una reducción significativa en el flujo sanguíneo renal es el factor principal en el desarrollo de la isquemia renal, que puede ser causada por una disminución de la presión arterial sistémica como en el DRA pre-renal, o por enfermedad vascular de los grandes vasos renales que implica trombosis de arteria renal, embolia, o la aterosclerosis, que conduce a DRA o, si es crónico, al denominado daño renal crónico (DRC). La isquemia de uno o ambos riñones es también un problema común experimentado durante la cirugía aórtica, trasplante renal, o durante la anestesia cardiovascular, conduciendo a la disfunción renal y a la lesión del tejido u órgano (Bonventre, 2004b; Perico, Cattaneo, Sayegh, & Remuzzi, 2004b; Siedlecki, Irish, & Brennan, 2011b). La isquemia y la hipoperfusión provocan dos alteraciones fundamentales en el riñón: alteraciones hemodinámicas que, a través de vasoconstricción, contracción mesangial y congestión medular, conducen a una importante reducción del filtrado glomerular y daño tubular isquémico (T Hauet y

cols., 2000). La isquemia-reperfusión (I/R) está caracterizada por un daño inflamatorio que deriva en la disminución del transporte activo dependiente de adenosintrifosfato (ATP), una pérdida de los gradientes iónicos que determinan la polaridad del epitelio tubular y un incremento de especies reactivas del oxígeno (ERO) (Barker & Markmann, 2013).

3.2.1 Procedimiento quirúrgico

Los animales se anestesiaron con una mezcla de ketamina, diazepam y atropina en proporción 2:2:1 vía intraperitoneal a la dosis de 60 mg/kg de peso corporal. Si a lo largo de la cirugía el animal comenzaba a mostrar signos de consciencia, la anestesia se administró en dosis de 100 - 200 μ L de la mezcla inicial por goteo directamente en el mesenterio. A todos los animales al finalizar la intervención quirúrgica se les administró como analgésico buprenorfina a una dosis de 0,015 mg/kg vía subcutánea (s.c.).

El modelo se realizó mediante la técnica quirúrgica puesta a punto por García-Criado y cols. en 1998 (García-Criado y cols., 1998b; Rodríguez-Pena, García-Criado, Eleno, Arevalo, & López-Novoa, 2004b). Una vez anestesiado el animal se colocó sobre una tabla de microcirugía calefactora, diseñada para minimizar la pérdida de calor del animal, en posición decúbito supino con sujeción de las cuatro extremidades, ofreciendo así una completa exposición del campo quirúrgico abdominal. Previa preparación del campo quirúrgico: rasurado de la piel y administración de solución antiséptica de povidona yodada (Betadine®) se desarrolló el procedimiento quirúrgico.

Vía laparotomía media, se abordó el espacio retroperitoneal, se realizó la disección e identificación del pedículo vascular del riñón izquierdo. El mesenterio del animal se mantuvo cubierto con gasas humedecidas en solución salina atemperada (37 °C) para evitar la deshidratación. El daño renal isquémico se indujo por clampaje de la arteria y vena renal del riñón izquierdo una pinza vascular o clamp por cada pedículo renal durante 60 minutos, hablamos por tanto de una isquemia caliente (figura 19). La fuerza ejercida de cada clamp fue de 90 g/cm². Cinco minutos antes del final de la isquemia, se realizó la uninefrectomía contralateral, se ligó el pedículo renal y uréter derecho (con suturas absorbibles 4/0 y 6/0 respectivamente). Para finalizar y tras los 60 minutos de isquemia caliente se retiró la pinza vascular

estimulando el pedículo del riñón izquierdo con bastoncillos humedecidos en suero salino hasta que se confirmó visualmente la reperfusión total del riñón, momento en el que se suturó el abdomen de las ratas con suturas no absorbibles 4/0. La temperatura corporal de los animales se mantuvo a 37 °C hasta la recuperación total de la anestesia.

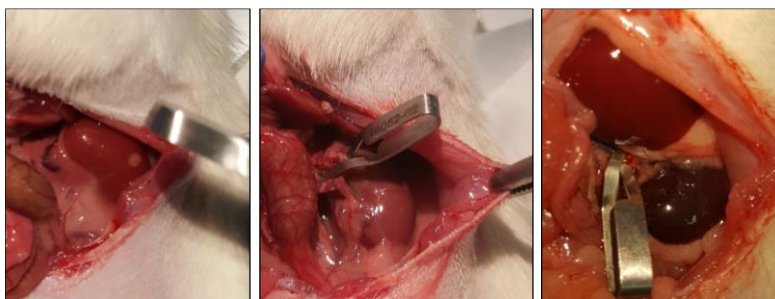


Figura 19. Procedimiento quirúrgico de isquemia reperfusión renal.

3.2.2 Diseño experimental

En base a estudios pilotos llevados a cabo en nuestro laboratorio el estudio se ha diseñado para realizar una isquemia caliente renal de 60 minutos. A las 24 horas post-reperfusión renal, momento de máximo daño renal evaluado por el aumento de los niveles plasmáticos de creatinina, se llevó a cabo la perfusión renal, según se describe en el apartado 4.3, para la obtención de muestras de tejido renal con el fin de realizar estudios histológicos, de WB, ELISAs o PCR. Además, durante todo el periodo experimental, los animales se mantuvieron en jaulas metabólicas individuales con libre acceso a comida y bebida con el objetivo de obtener muestras de 24 horas de orina según describe el apartado 4.1, muestras de plasma según apartado 4.2. Ambas muestras biológicas se recogieron los días basal (antes de las intervenciones quirúrgicas) y tras 24 horas. Los animales se monitorizaron durante el experimento. Se observó su estado de salud general, movilidad, color del pelo y peso corporal entre otros parámetros. El diseño experimental se desarrolló como se describe a continuación:

- **Grupo V - simulado (SIM; n=5):** Ratas sometidas a una cirugía de exposición y posterior cierre abdominal.
- **Grupo VI - Uninefrectomía contralateral (UNX; n=5):** Rata sometidas a una uninefrectomía contralateral y posterior cierre abdominal.
- **Grupo VII - Isquemia caliente 60 minutos y posterior reperusión (I/R; n=5):** Las ratas fueron sometidas a una isquemia renal caliente de 60 minutos, a falta de 5 minutos se les realizó una uninefrectomía contralateral y finalmente cierre abdominal.

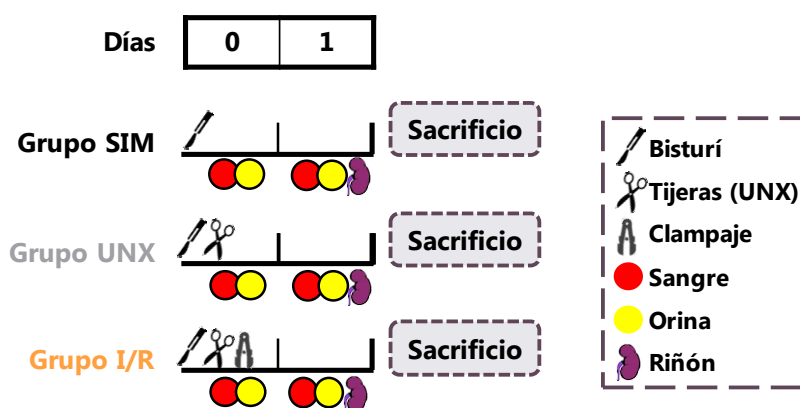


Figura 20. Esquema diseño experimental del modelo animal de DRA inducido por isquemia reperusión. SIM: simulado; UNX: uninefrectomía contralateral; I/R: isquemia reperusión.

3.3 DRA inducido por ligadura y punción cecal

El síndrome de sepsis se caracteriza por una respuesta inflamatoria sistémica asociada con una infección bacteriana grave. Presenta una alta mortalidad en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), particularmente en casos de fallo orgánico múltiple como el DRA, que alcanzan tasas entre el 20% en sepsis y el 60% en shock séptico, a pesar de los avances en su manejo (como cuidados intensivos y tratamiento antibiótico adecuado) y en la comprensión de su fisiopatología (Bone y cols., 1992; Brun-Buisson y cols., 2003). La incidencia del síndrome séptico y su pronóstico son claros; sin embargo, sus mecanismos subyacentes siguen siendo muy debatidos. Los estudios experimentales con modelos animales son fundamentales para definir y

caracterizar mejor las fases fisiopatológicas y sugerir estrategias de tratamiento y seguimiento que alteran las estadísticas desfavorables de la DRA inducido por sepsis. Existen varios modelos animales de sepsis, como el de inflamación inducido por lipopolisacárido (LPS), aunque el modelo que se llevó a cabo fue el de ligadura y punción cecal (CLP) (Hua, Liu, Lv, & Wang, 2017).

3.3.1. Procedimiento quirúrgico

Los animales se anestesiaron con una mezcla de ketamina, diazepam y atropina en proporción 2:2:1 vía intraperitoneal a la dosis de 60 mg/kg de peso corporal. Si a lo largo de la cirugía el animal comenzaba a mostrar signos de consciencia, la anestesia se administró en dosis de 100 - 200 μ L de la mezcla inicial por goteo directamente en el mesenterio.

A todos los animales al finalizar la intervención quirúrgica se les administró analgesia, buprenorfina, cada 8 horas a una dosis de 0.015 mg/kg via subcutánea (s.c.) durante las primeras 48 horas, pudiéndose alargar en el tiempo según los síntomas de dolor observados.

Una vez anestesiados los animales se colocaron en decúbito supino sobre una tabla de microcirugía calefactada a 37 ° C con el abdomen afeitado. Bajo condiciones estériles, la piel y el músculo abdominales se abrieron y se expuso el ciego. El ciego se ligó con seda de prolono 4/0 por debajo de la válvula ileocecal, preservando el flujo sanguíneo al ciego (es decir, ligadura distal), luego el ciego se pinchó cuatro veces, desde el área distal hasta el área de ligadura, utilizando una aguja de calibre 18G que permite que el contenido cecal esté presente intraperitonealmente (figura 21). El ciego fue devuelto a su posición intraabdominal normal y la herida se cerró en dos capas con suturas no absorbibles 4/0.

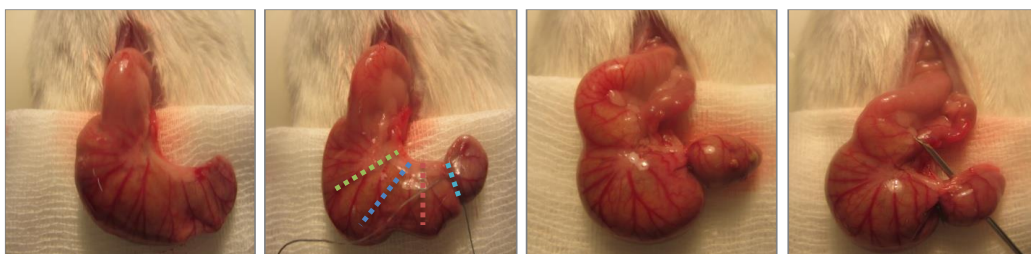


Figura 21. Procedimiento quirúrgico de ligadura y punción cecal.

3.3.2. Diseño experimental

En base a estudios pilotos llevados a cabo en nuestro laboratorio el estudio se ha diseñado para realizar una ligadura y punción cecal de 4 punciones. A los 4 días post ligadura y punción cecal, momento de máximo daño renal evaluado por el aumento de los niveles plasmáticos de creatinina, se llevó a cabo la perfusión renal, según se describe en el apartado 4.3, para la obtención de muestras de tejido renal con el fin de realizar estudios histológicos, de WB, ELISAs o PCR. Además, durante todo el periodo experimental, los animales se mantuvieron en jaulas metabólicas individuales con libre acceso a comida y bebida con el objetivo de obtener muestras de 24 horas de orina según describe el apartado 4.1, muestras de plasma según apartado 4.2. Ambas muestras biológicas se recogieron los días basal (antes de las intervenciones quirúrgicas) y tras 2 y 4 días. Los animales se monitorizaron todos los días durante el experimento. Se observó su estado de salud general, movilidad, color del pelo y peso corporal entre otros parámetros. El diseño experimental se desarrolló como se describe a continuación:

- **Grupo VIII - control (C; n=5):** Ratas sometidas a una cirugía de exposición y posterior cierre abdominal.
- **Grupo IX - punción y ligadura cecal (CLP4; n=5):** Para inducir la sepsis las ratas fueron sometidas a una ligadura y 4 punciones cecales.

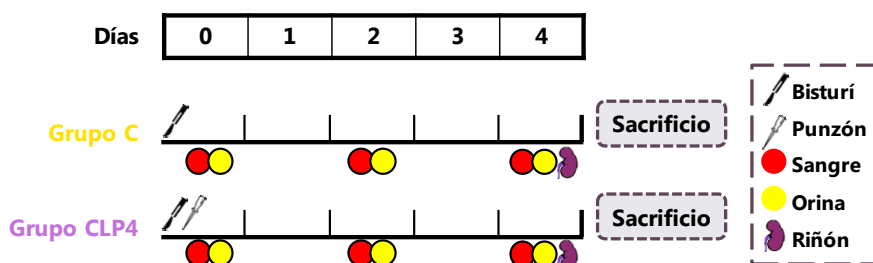


Figura 22. Esquema diseño experimental del modelo animal de DRA inducido por ligadura y punción cecal. C: control; CLP4: ligadura y 4 punciones cecales.

3.4 Inhibición de los transportadores tubulares con maleato sódico

En modelos animales experimentales la administración endovenosa del maleato sódico produce un síndrome que consiste en un incremento de la diuresis, fosfaturia, aminoaciduria y glucosuria (Berliner, Kennedy, & Hilton, 1950; Harrison & Harrison, 1954). Además debido a que este compuesto químico produce proteinuria tubular en modelos experimentales (Kramer & Gonick, 2008) y en base a estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio (Quiros y cols., 2010a) donde observamos que la administración de maleato sódico en un modelo animal de DRA demostraba que la excreción urinaria de GM2AP no estaba necesariamente asociada a un daño en el tejido renal, sino que se podría deber a una alteración de la reabsorción tubular. Consideramos de extraordinaria relevancia el estudio del manejo tubular que sufren ciertos biomarcadores en varios modelos animales de DRA bajo condiciones de inhibición de los transportadores tubulares. Con este fin se utilizó el maleato sódico que como ya se ha visto es un inhibidor de los transportadores tubulares principalmente de la zona proximal. La dosis utilizada fue de 400 mg/kg de peso corporal vía i.v. disuelto en suero salino 0,9% y atemperado a 37 °C.

3.4.1 Procedimiento quirúrgico

Los animales se anestesiaron con una mezcla de ketamina, diazepam y atropina en proporción 2:2:1 vía intraperitoneal a la dosis de 60 mg/kg de peso corporal. Si a lo largo de la cirugía el animal comenzaba a mostrar signos de consciencia, la anestesia se administró en dosis de 100 - 200 µL de la mezcla inicial por goteo directamente en el mesenterio.

Durante el procedimiento quirúrgico se situó al animal de experimentación sobre una tabla de microcirugía calefactada, en decúbito supino con sujeción de las cuatro extremidades. Previa preparación del campo quirúrgico y administrando solución antiséptica de povidona yodada (Betadine®) se desarrolló el procedimiento quirúrgico.

Vía laparotomía media eviscerando parte del contenido abdominal se abordó la vejiga. El mesenterio del animal se mantuvo cubierto con gasas humedecidas en solución salina atemperada (37 °C) para evitar la deshidratación. El pene se ligó con

una ligadura 6/0 para evitar posibles pérdidas de orina. Mediante unas pinzas de punta curva se sujetó la vejiga por el polo superior y se realizó un pequeño corte por donde se introdujo la cánula, fijándola con una ligadura 6/0 a la pared de la vejiga. Es importante tener en cuenta que la cánula no debe moverse durante el experimento debido a que el movimiento de la cánula puede producir pequeños cortes en los vasos sanguíneos de la luz de la vejiga y contaminar las muestras recogidas de orina con sangre, alterando los resultados del estudio. Una vez introducida la cánula se dejó un tiempo prudencial 15 minutos para que la vejiga se estabilizase (figura 23 "minuto -45").

Antes de inyectar el maleato sódico se recogieron tres fracciones urinarias con tiempos de diferencia de 15 minutos entre ellas (figura 23 "minuto -30 a 0"). Estas fracciones urinarias nos sirven de control interno para confirmar que los resultados observados no se deben a un artefacto experimental. A continuación, se procedió a inyectar el maleato sódico. La administración se hizo por la vena femoral del animal con una jeringa de insulina (29 G). Se inyectó un volumen en μL igual al peso en gramos del animal. Una vez inyectado el maleato sódico se recogieron 8 fracciones urinarias cada 15 minutos, siempre cambiando de eppendorf entre un intervalo de tiempo y el siguiente (figura 23 "minutos 15 hasta 120").

3.4.2 Diseño experimental

El estudio se ha diseñado para desarrollar un DRA de origen nefrotóxico con las siguientes pautas terapéutica: (i) gentamicina en dosis de 150 mg/kg/día durante 6 días por vía i.p.; (ii) cisplatino en dosis única de 5 mg/kg por vía i.p.; (iii) cisplatino en dosis única también a 7,5 mg/kg vía i.p.; y DRA por un evento dañino (iv) una isquemia caliente renal de 60 minutos.

Al sexto día post administración, momento de máximo daño renal evaluado por el aumento de los niveles plasmáticos de creatinina, para las ratas tratadas con la gentamicina; al cuarto día para las ratas tratadas con el cisplatino; o a las 24 horas post-reperusión renal, se llevó a cabo el estudio de la excreción urinaria de diferentes biomarcadores con la administración o no del maleato sódico, según descrito en el apartado 3.3.1. El diseño experimental se desarrolla como se describe a continuación:

- **Grupo X - Control + Maleato (C+M; n=3):** Ratas a las cuales se les administró 1 mL de suero fisiológico por kg de peso corporal, vía i.p., diariamente durante un periodo de 6 días. Seguidamente fueron sometidas a una cirugía de exposición y canulación de la vejiga e inyección de maleato sódico 400 mg/kg de peso corporal, vía i.v. disuelto en suero salino 0,9%.
- **Grupo XI - Gentamicina 150 mg/kg + Maleato (G150+M; n=4):** Ratas a las cuales se les administró gentamicina diariamente durante 6 días a una dosis nefrotóxica de 150 mg/kg de peso corporal, vía i.p. 6 días después fueron sometidas a una cirugía de exposición y canulación de la vejiga e inyección de maleato sódico 400 mg/kg de peso corporal, vía i.v. disuelto en suero salino 0,9%.
- **Grupo XII - Cisplatino 5 mg/kg + Maleato (CDDP5+M; n=4):** Ratas a las cuales se les administró una dosis nefrotóxica única de cisplatino 5 mg/kg, de peso corporal, vía i.p. 4 días después fueron sometidas a una cirugía de exposición y canulación de la vejiga e inyección de maleato sódico 400 mg/kg de peso corporal, vía i.v. disuelto en suero salino 0,9%.
- **Grupo XIII - Cisplatino 7,5 mg/kg + Maleato (CDDP7,5+M; n=6):** Ratas a las cuales se les administró una dosis nefrotóxica única de cisplatino 7,5 mg/kg, de peso corporal, vía i.p. 4 días después fueron sometidas a una cirugía de exposición y canulación de la vejiga e inyección de maleato sódico 400 mg/kg de peso corporal, vía i.v. disuelto en suero salino 0,9%.
- **Grupo XIV - Isquemia caliente 60 minutos y posterior reperusión + Maleato (I/R+M; n=5):** Las ratas fueron sometidas a una isquemia renal caliente de 60 minutos, a falta de 5 minutos se les realizó una uninefrectomía contralateral y finalmente cierre abdominal. 24 horas después fueron sometidas a una cirugía de exposición y canulación de la vejiga e inyección de maleato sódico 400 mg/kg de peso corporal, vía i.v. disuelto en suero salino 0,9%.

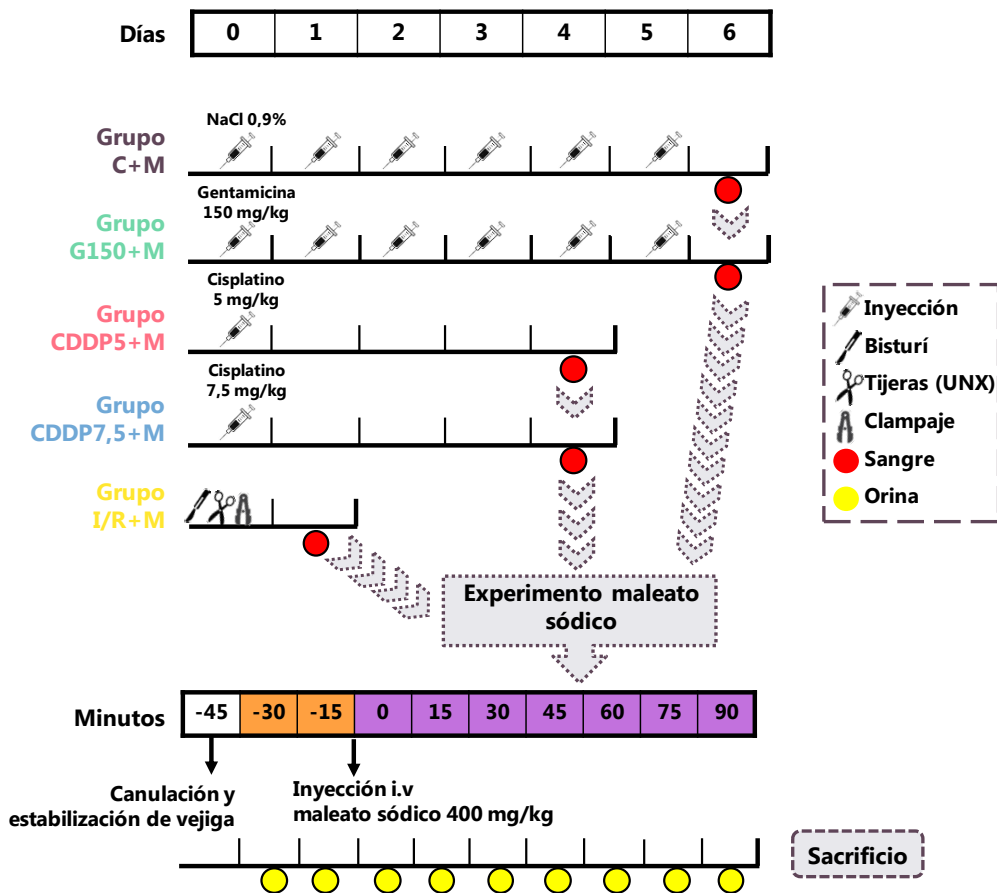


Figura 23. Esquema diseño experimental de inyección i.v. de maleato sódico. C: control; M: maleato sódico; G150: gentamicina 150 mg/kg; CDDP5: cisplatino 5 mg/kg; CDDP7,5: cisplatino 7,5 mg/kg; I/R: isquemia reperusión.

3.5 Perfusión renal con homodímero de etidio

En condiciones fisiológicas, algunas proteínas de pequeño tamaño, como GM2AP, se filtran libremente a través de la barrera glomerular y se reabsorben en los túbulos proximales. Sin embargo, en situaciones patológicas, el incremento de GM2AP en orina se correlaciona con un descenso en la filtración glomerular y con un incremento en la degeneración del parénquima renal (Espandiari y cols., 2010; Hvidberg y cols., 2005a). Ante este hallazgo, consideramos de extraordinaria relevancia clínica, profundizar en los mecanismos fisiopatológicos implicados en la excreción urinaria de GM2AP sobre la lesión renal causada por el cisplatino, en un

modelo experimental en rata. Para ello, utilizamos homodímero de etidio, un fluorocromo nuclear con alta afinidad por el ADN ($K_a = 2 \times 10^8 M^{-1}$), peso molecular de 856,8 y baja permeabilidad de membrana, lo que significa que únicamente se adhiere a células que han sufrido necrosis y no apoptosis o células que estén vivas (Edwards, Diamantakos, Peuler, Lamar, & Prozialeck, 2007).

3.5.1 Procedimiento quirúrgico

Los animales se anestesiaron con una mezcla de ketamina, diazepam y atropina en proporción 2:2:1 vía intraperitoneal a la dosis de 60 mg/kg de peso corporal. Si a lo largo de la cirugía el animal comenzaba a mostrar signos de consciencia, la anestesia se administró en dosis de 100 - 200 μL de la mezcla inicial por goteo directamente en el mesenterio.

Se colocó al animal de experimentación sobre una tabla de microcirugía en decúbito supino con sujeción de las cuatro extremidades, ofreciendo así una completa exposición del campo quirúrgico abdominal. Previa preparación del campo quirúrgico: rasurado de la piel y administración de solución antiséptica de povidona yodada (Betadine®, Asta medica) se desarrolló el procedimiento quirúrgico.

Vía laparotomía media se apartó parte del contenido abdominal y se expusieron ambos riñones. El mesenterio del animal se mantuvo cubierto con gasas humedecidas en solución salina atemperada (37 °C) para evitar la deshidratación. Se disecaron los vasos abdominales y se dejaron ligaduras preparadas para ser anudadas siguiendo el orden: pedículo renal derecho (ligadura 6-0), arteria mesentérica (ligadura 4-0) y aorta y vena cava supra-renal (ligadura 4-0). El riñón derecho se anudó, se extrajo y se desechó, el estudio se llevó a cabo únicamente en el riñón izquierdo. A continuación, se anudó la arteria mesentérica y seguidamente se canuló la arteria aorta descendente por debajo del riñón con una cánula 24G interrumpiendo el flujo sanguíneo anudando la ligadura de la aorta-vena cava supra-renal. Se perfundió el riñón izquierdo con el homodímero de etidio 5 μM disuelto en PSS (del inglés physiological saline solution) a una velocidad de 1 mL/min durante 5 minutos y después a 3 mL/min durante 5 minutos sin superar los 100 mmHg de presión intra-renal. Para finalizar, se perfundió durante 10 minutos más a 3 mL/min únicamente con PSS para eliminar los restos de homodímero de etidio que hayan podido quedar unidos de forma inespecífica. Una vez terminada la perfusión, el riñón

izquierdo se extrajo y se realizó un corte longitudinal. La mitad del riñón se preservó en formol para estudios histológicos por H&E descritos en el apartado 7.1. y la otra mitad del riñón se preservó en PBS 1X al 30% sacarosa para estudios de inmunofluorescencia descritos en el apartado 7.3.

3.5.2 Diseño experimental

En base a estudios preliminares llevados a cabo en nuestro laboratorio (Sánchez-González, López-Hernández, López-Novoa, & Morales, 2011; Sancho-Martínez, López-Novoa, & López-Hernández, 2015) el estudio se ha diseñado evaluando una pauta terapéutica de cisplatino en dosis única por vía i.p. Al cuarto día post administración, momento de máximo daño renal evaluado por el aumento de los niveles plasmáticos de creatinina, se llevó a cabo el estudio de la necrosis tubular aguda (NTA) con la administración del homodímero de etidio vía i.v. El diseño experimental se desarrolló como se describe a continuación:

- **Grupo XV Control (C; n=5):** Las ratas fueron tratadas con una dosis única de suero salino vía i.p.
- **Grupo XVI Cisplatino 5 mg/kg (CDDP5; n=5):** Las ratas fueron tratadas con una dosis única de cisplatino 5 mg/kg, de peso corporal, vía i.p.
- **Grupo XVII Cisplatino 7,5 mg/kg (CDDP7,5; n=5):** Las ratas fueron tratadas con una dosis única de cisplatino 7,5 mg/kg, de peso corporal, vía i.p.
- **Grupo XVIII Cisplatino 10 mg/kg (CDDP10; n=5):** Las ratas fueron tratadas con una dosis única de cisplatino 10 mg/kg, de peso corporal, vía i.p.

Cuatro días después de comenzar el tratamiento, 3 animales de cada uno de los 4 grupos experimentales fueron sometidos a una cirugía de exposición, canulación de la arteria aorta y perfusión del riñón izquierdo con el homodímero de etidio según se describió en el apartado 3.5.1.

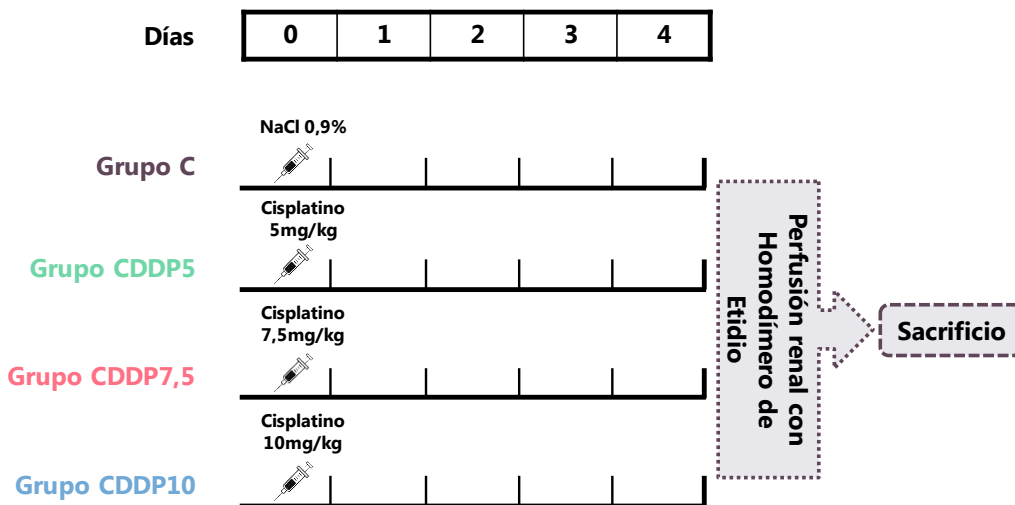


Figura 24. Esquema diseño experimental de perfusión renal con homodímero de etidio. C: Control; CDDP5, CDDP7,5 y CDDP10: cisplatino 5 mg/kg, 7,5 mg/kg y 10 mg/kg.

3.6 Sistema de perfusión renal: circuito extracorpóreo

Todos los animales se anestesiaron con una mezcla de ketamina, diazepam y atropina en proporción 2:2:1 vía intraperitoneal a la dosis de 60 mg/kg de peso corporal. Si a lo largo de la cirugía el animal comenzaba a mostrar signos de consciencia, la anestesia se administró en dosis de 100 - 200 μ L de la mezcla inicial por goteo directamente en el mesenterio.

Durante los procedimientos se colocó a los animales de experimentación sobre una tabla de microcirugía calefactada, diseñada para minimizar la pérdida de calor del animal, en decúbito supino con sujeción de las cuatro extremidades y la cabeza mediante una ligadura 6/0 a través de los incisivos, ofreciendo así una completa exposición del campo quirúrgico abdominal. Todas las técnicas quirúrgicas se realizaron bajo las máximas condiciones de asepsia posibles. Previas preparaciones del campo quirúrgico se desarrollaron los siguientes procedimientos quirúrgicos de circuitos extracorpóreos:

3.6.1 Auto perfusión renal

Vía laparotomía media se abordó el espacio retroperitoneal, se realizó la disección e identificación del pedículo vascular del riñón izquierdo. Utilizando una micropinzza vascular y preservando el sistema pielocalicial, se procedió a canular la vejiga urinaria para dejar que se estabilizase, pues al introducir la cánula se pueden producir pequeños cortes de vasos sanguíneos en la luz de la vejiga pudiendo contaminar la orina con sangre. El riñón que se perfundió para llevar a cabo el estudio fue el izquierdo, por lo que el riñón derecho se ligó (tanto pedículo renal como uréter) para asegurarnos que la orina recogida viniese en su totalidad del riñón perfundido.

A continuación, se disecaron y separaron la arteria renal de vena renal y la arteria carótida del nervio vago (previa separación de los músculos esternohioideos). Una vez aisladas ambas arterias se procedió a su canulación (figura 25). Por último, se administró por vía i.v. a través de la vena femoral un bolo de heparina (1.000 UI/Kg).

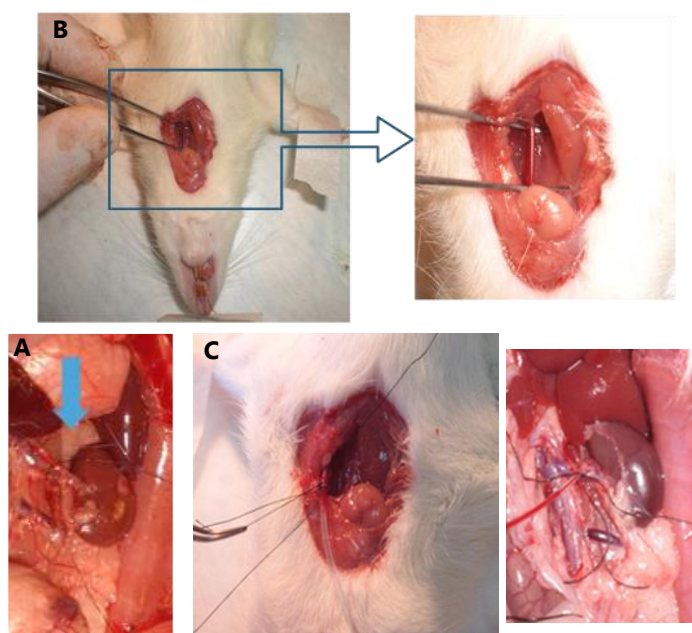


Figura 25. Preparación quirúrgica de vasos sanguíneos para circuito extracorpóreo.

A: Aislamiento y separación de la arteria renal de la vena renal. B: Aislamiento y separación de la arteria carótida del nervio vago. C: Canulación de la arteria carótida (imagen izquierda) y arteria renal (imagen derecha).

Como control del experimento de perfusión y para descartar un posible artefacto experimental derivado de la manipulación quirúrgica se conectó la arteria carótida y la arteria renal a través de un catéter para permitir que la sangre fluyese directamente hacia el riñón como se observa en la figura 26. En este primer periodo se recogieron fracciones urinarias, directamente de la cánula colocada en la vejiga urinaria, cada 10 minutos durante una hora.

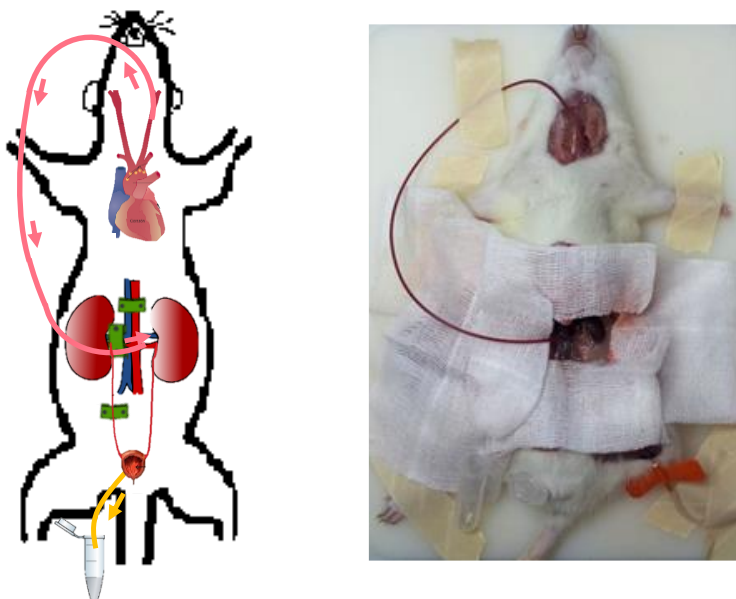


Figura 26. Circuito extracorpóreo. Auto perfusión o perfusión renal con sangre del propio animal. Esquema (imagen izquierda) e imagen real de la auto perfusión.

3.6.2 Perfusión renal con Krebs-dextrano

Después de este tiempo, el flujo de sangre procedente de la carótida se interrumpió mediante un clamp y se procedió a la perfusión con Krebs-dextrano oxigenado y atemperado (37°C, mediante un baño caliente) [40 g/L de dextrano (peso molecular 64K-76K) en solución Krebs (120 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 1,2 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 0,026 mM EDTA, 11,1 glucosa, pH=7.4)] a través de la arteria renal a una velocidad de 3 mL/min gracias a una bomba de perfusión (Blázquez-Medela y cols., 2014) según muestra la figura 27. Rápidamente, se procedió a realizar una venotomía renal para permitir que el Krebs-dextrano saliera del riñón y no se dañara el endotelio renal. En este segundo periodo

se recogieron fracciones urinarias a través de la cánula situada en la vejiga urinaria cada 10 minutos durante otra hora más.

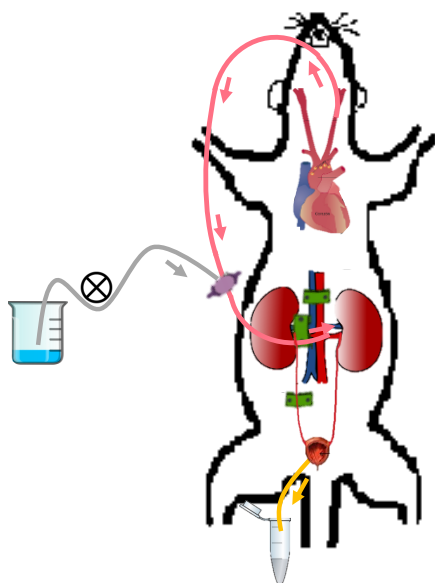


Figura 27. Circuito extracorpóreo. Perfusión renal con Krebs-dextrano (KD). Esquema de la perfusión renal con Krebs-dextrano.

3.6.3 Perfusión renal con Krebs-dextrano+NGAL exógeno

Se sabe que la concentración fisiológica de NGAL en el plasma de las ratas es de 25 ng/mL (Torrens y cols., 2009) por lo que nos pareció interesante estudiar qué ocurría en una situación de patología renal cuando al Krebs-dextrano se le añadía NGAL. Previamente se hizo un estudio titulando la concentración de NGAL exógeno que las ratas reabsorbían en condiciones fisiológicas.

Finalmente se añadió un exceso de NGAL de rata, 40 ng/mL en el Krebs-dextrano y se procedió a la perfusión renal como se observa en la figura 28. Se mantuvo la perfusión durante 60 minutos y se recogieron fracciones urinarias directamente de la cánula colocada en la vejiga urinaria, cada 10 minutos. Este experimento se realizó únicamente en las ratas de los grupos experimentales número XIX y XX, que veremos en el apartado 3.6.5. Ver también el segundo conjunto de experimentos del mismo apartado.

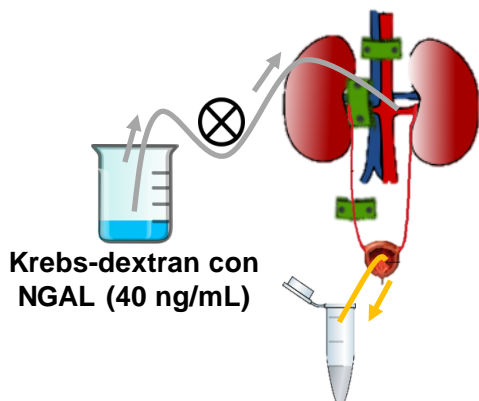


Figura 28. Circuito extracorpóreo. Perfusión renal con Krebs-dextrano + NGAL. Esquema de la perfusión renal con Krebs-dextrano + NGAL exógeno a la dosis de 40 ng/mL.

3.6.4 Perfusión renal con Krebs-dextrano eluido

Vía laparotomía media, se abordó el espacio retroperitoneal, realizándose la disección e identificación del pedículo vascular del riñón izquierdo. Se canuló la vejiga urinaria, se disecaron y separaron la arteria renal de vena renal y se canuló la arteria renal. A continuación, se procedió a perfundir el riñón izquierdo con el efluente obtenido de la vena renal durante la perfusión renal con Krebs-dextrano (figura 29). Se mantuvo la perfusión durante 60 minutos y se recogieron fracciones urinarias directamente de la cánula colocada en la vejiga urinaria, cada 10 minutos. Este experimento se realizó únicamente en las ratas de los grupos experimentales número XIX y XX, que veremos en el apartado 3.6.5. Ver también el tercer conjunto de experimentos del mismo apartado.

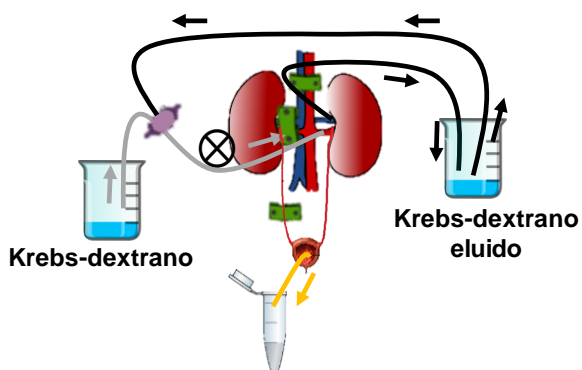


Figura 29. Circuito extracorpóreo. Perfusión renal con Krebs-dextrano eluido (KDE). Esquema de la perfusión renal con Krebs-dextrano eluido obtenido de la vena renal durante la perfusión con KD.

3.6.5 Diseños experimentales

En base a estudios preliminares llevados a cabo en nuestro laboratorio (Ferreira y cols., 2011a; Quiros y cols., 2010a; Vicente-Vicente y cols., 2013, 2015) el estudio se ha diseñado para desarrollar un DRA de origen nefrotóxico con las siguientes pautas terapéutica: (i) gentamicina en dosis de 150 mg/kg/día durante 6 días por vía i.p.; (ii) cisplatino en dosis única de 5 mg/kg por vía i.p.; y DRA por un evento dañino (iii) una isquemia caliente renal de 60 minutos.

Al sexto día post administración, para las ratas tratadas con gentamicina; al cuarto día para las ratas tratadas con cisplatino; o a las 24 horas post-reperusión renal, se llevó a cabo el estudio del origen urinario de diferentes biomarcadores con las perfusiones renales explicadas en los apartados 3.6.1, 3.6.2, 3.6.3 y 3.6.4. El diseño experimental se desarrolla como se describe a continuación:

- **Grupo XIX - Control (C; n=9):** Ratas a las cuales se les administró 1 mL de suero fisiológico por kg de peso corporal, vía i.p., diariamente durante un periodo de 6 días. Seguidamente fueron sometidas los 3 conjuntos de experimentos explicados más abajo.
- **Grupo XX - Gentamicina 150 mg/kg (G150; n=9):** Ratas a las cuales se les administró gentamicina diariamente durante 6 días a una dosis nefrotóxica de 150 mg/kg de peso corporal, vía i.p. 6 días después fueron sometidas a los 3 conjuntos de experimentos explicados más abajo.
- **Grupo XXI - Cisplatino 5 mg/kg (CDDP5; n=3):** Ratas a las cuales se les administró una dosis nefrotóxica única de cisplatino 5 mg/kg, de peso corporal, vía i.p. 4 días después fueron sometidas únicamente al conjunto de experimento número 1 explicado más abajo.
- **Grupo XXII - Isquemia caliente 60 minutos y posterior reperusión (I/R; n=3):** Las ratas fueron sometidas a una isquemia renal caliente de 60 minutos, a falta de 5 minutos se les realizó una uninefrectomía contralateral y finalmente cierre abdominal. 24 horas después fueron sometidas únicamente al conjunto de experimento número 1 explicado más abajo.

A cada uno de los grupos experimentales se les realizaron uno o los tres tipos de conjuntos de experimentos según:

- **Primer conjunto de experimentos:** 3 ratas de cada uno de los grupos experimentales XIX a XXII fueron sometidas a la auto perfusión renal y posterior perfusión con Krebs-dextrano, descritos en los apartados 3.5.1 y 3.5.2 respectivamente.
- **Segundo conjunto de experimentos:** 3 ratas únicamente de los grupos experimentales XIX y XX fueron sometidas a la auto perfusión renal y posterior perfusión con Krebs-dextrano el cual tenía NGAL exógeno, descritos en los apartados 3.5.1 y 3.5.3 respectivamente.
- **Tercer conjunto de experimentos:** 3 ratas únicamente de los grupos experimentales XIX y XX fueron sometidas a la perfusión renal con Krebs-dextrano y posterior perfusión con Krebs-dextrano eluido de la vena renal, descritos en los apartados 3.5.2 y 3.5.4 respectivamente.

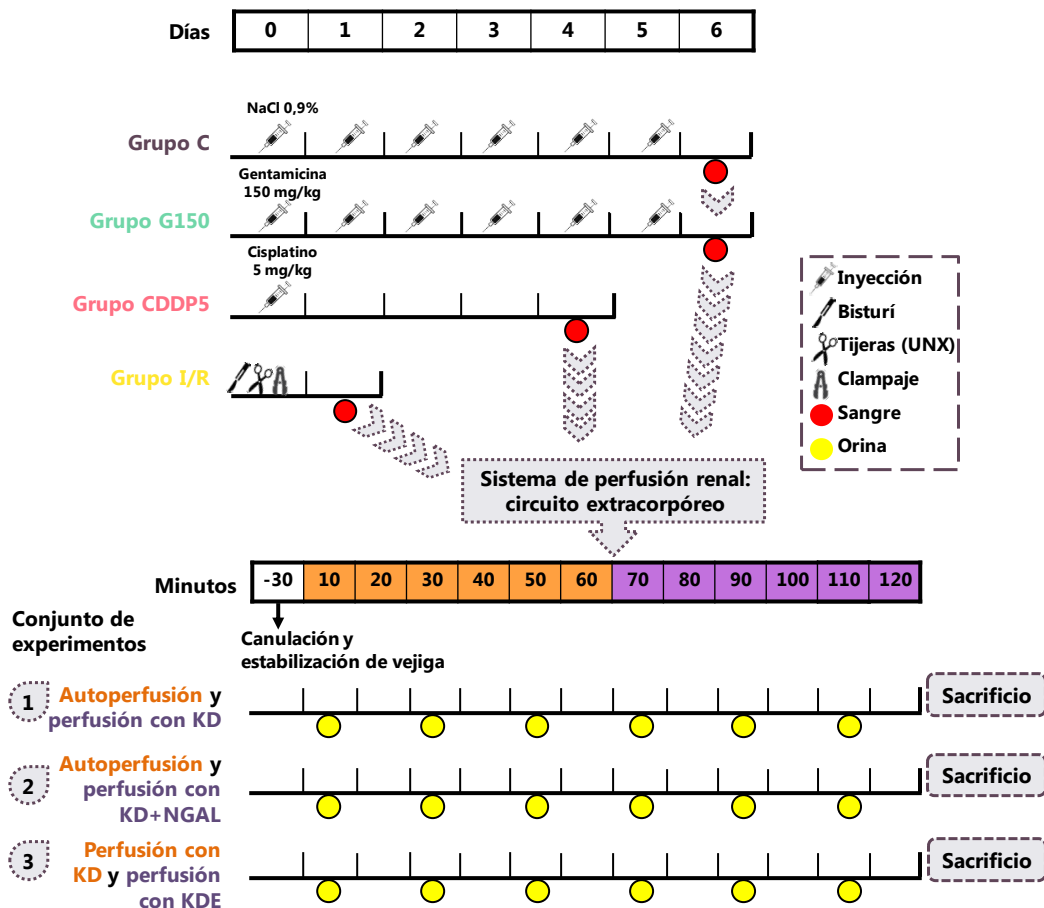


Figura 30. Esquema diseño experimental sistema de reperfusion renal: circuito extracorpóreo. C: control; G150: gentamicina 150 mg/kg; CDDP5: cisplatino 5 mg/kg; I/R: isquemia reperfusion; KD: Krebs-dextrano; NGAL: lipocalina asociada a la gelatinasa neutrófila; KDE: Krebs-dextrano eluido.

4. Técnicas experimentales in vivo

4.1 Recogida de orina de 24 horas: jaulas metabólicas

Durante el desarrollo del modelo experimental se utilizaron jaulas metabólicas individuales (Panlab) para la recogida de la orina de 24 horas de los animales. Estas jaulas están perfectamente diseñadas para separar de forma efectiva la orina de las heces del animal en tubos externos a la jaula (Kurien, Everds, & Scofield, 2004). Los animales se sitúan en un habitáculo de policarbonato transparente donde disponen de comida y bebida *ad libitum*. Este habitáculo presenta un suelo de rejilla que

permite la caída de las heces y de la orina a un embudo especialmente diseñado para la separación entre el líquido y el sólido (figura 31).

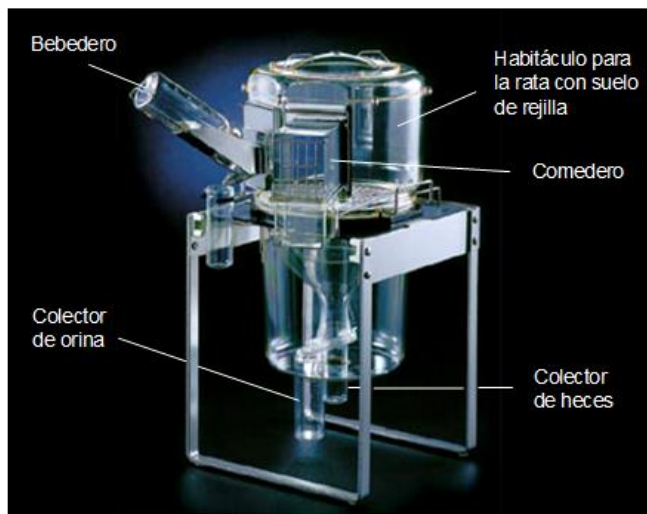


Figura 31. Jaula metabólica individual.

Este método para la recolección de orina resulta estresante para los animales, de forma que debe realizarse un periodo de acostumbramiento de 24 a 48 horas antes de la recogida de las muestras y de los datos, para que el animal pueda familiarizarse con el habitáculo. Aun así, las jaulas metabólicas se deben utilizar el menor tiempo posible, para evitar la generación de estrés en los animales y la posible alteración en los resultados del estudio. Antes de la recogida de la orina se debe añadir 1 mL de aceite mineral al correspondiente colector para evitar la evaporación de la orina y 100 μ L de azida sódica al 0,1 % para evitar la contaminación bacteriana de la muestra.

Tras la recogida de la orina, ésta debe ser procesada para eliminar el aceite mineral y otros elementos (resto de comida, pelos del animal, etc) con los que se haya podido contaminar la muestra. Para ello, se centrifuga a 2.000 g durante 8 minutos a 4 °C. Posteriormente, se preparan alícuotas que se conservan a -20 °C o -80 °C en función del tiempo que vaya a transcurrir hasta el análisis que se vaya a realizar.

4.2 Recogida de sangre y obtención del plasma

Se recolectaron muestras de sangre de los animales mediante la canulación de la vena caudal situada en la cola del animal. Se anestesió a los animales con anestesia inhalatoria isoflurano al 5 % para inducir y del 1,5 al 2 % para mantener a los animales anestesiados, con el fin de evitar dolor al animal y facilitar la manipulación al investigador. Para canular la vena caudal se utilizó un catéter de 25 G y se recogió la sangre directamente del catéter con la ayuda de capilares heparinizados o sin heparinizar dependiendo de los requerimientos experimentales. Su contenido fue depositado en tubos tipo eppendorf y éstos fueron centrifugados a 7.000 g, 4 °C durante 4 minutos para la obtención del plasma y de los restos celulares. El plasma fue conservado a -20 °C o -80 °C en función del tiempo que vaya a transcurrir hasta el análisis que se vaya a realizar.

4.3 Perfusión y recogida de órganos

En el momento de máximo daño renal determinado por los niveles de creatinina plasmática, los animales de cada uno de los modelos de DRA explicados en los puntos 3.1.1., 3.2.1. y 3.3.1. fueron perfundidos con suero salino 0,9 % heparinizado 5 UI/mL para recoger los riñones antes de sacrificarlos.

La perfusión con suero salino heparinizado es la sustitución de la sangre en los órganos del animal por suero salino con el fin de limpiar los tejidos para facilitar su posterior análisis. Para llevar a cabo esta técnica se utilizó una bomba de infusión (Dinko Instruments D-21V, 80 rpm, cánula de 0,8 mm) (figura 32). Este tipo de aparatos permite perfundir los órganos del animal a la velocidad fisiológica de perfusión, esto es a una velocidad máxima de 3 mL/min para no superar los 100 mmHg de presión intra-renal, con el fin de evitar posibles alteraciones en el tejido por el método experimental.

Se realizó la perfusión únicamente de los riñones para evitar consumir suero salino heparinizado innecesario. Se ligan en



Figura 32. Bomba de infusión.

bloque aorta y cava infra-renales. Se coloca una pinza vascular en la aorta infra-renal para poder canularla sin interrumpir el flujo sanguíneo renal. Se cánula mediante un catéter de 25 G y se fija la cánula con la ligadura de la aorta infra-renal. Se retira la pinza vascular. Se abre el paso de la solución de perfusión e inmediatamente se interrumpe el flujo sanguíneo anudando la ligadura de la aorta supra-renal y arteria mesentérica superior. La cantidad de líquido de perfusión utilizado fue de 6 mL por animal.

Tras la perfusión, los riñones se descapsularon y se recogieron tan rápido como fue posible para evitar la degradación de proteínas, del ácido ribonucleico (ARN) y del ácido desoxirribonucleico (ADN). Uno de los riñones se incluyó en formaldehído al 3,7 %, pH 7, para estudios histológicos, y el otro riñón fue ultracongelado en nitrógeno líquido y conservado a -80°C para su posterior análisis por diferentes técnicas (rt-PCR, Western blot y ELISA).

5. Determinaciones bioquímicas

5.1 Concentración de la creatinina en el plasma y en la orina.

Aclaramiento de creatinina

La creatinina es una proteína de origen muscular constituida por tres aminoácidos. Es un producto de degradación del metabolismo muscular producido para obtener energía a partir de la creatinina fosfato, que debe ser eliminado a través de la filtración glomerular, de forma que la creatinina se acumula excesivamente en la sangre cuando disminuye la filtración glomerular y, paralelamente, disminuye su excreción urinaria, ya que el 80-85 % de su eliminación se debe a la filtración glomerular, y el 15-20 % restante a su secreción tubular. Además, el aclaramiento de creatinina es un valor utilizado para estimar la TFG, debido a que esta molécula no se absorbe ni se secreta en grandes cantidades a lo largo de la nefrona, por lo que la cantidad de creatinina que aparezca en la orina dependerá directa y únicamente de la filtración glomerular (Delanghe & Speeckaert, 2011). Para la determinación de la concentración de la creatinina en el plasma y en la orina se utilizó un kit comercial (Quantichrom creatinine assay kit, BioAssay System). Esta técnica se fundamenta en el método colorimétrico-cinético conocido como reacción de Jaffé (Husdan & Rapoport, 1968). La creatinina es capaz de unirse al ácido pícrico en medio alcalino y

dar lugar a un complejo coloreado (complejo de Janvosky), cuya absorbancia es directamente proporcional a la concentración de la creatinina en la muestra.

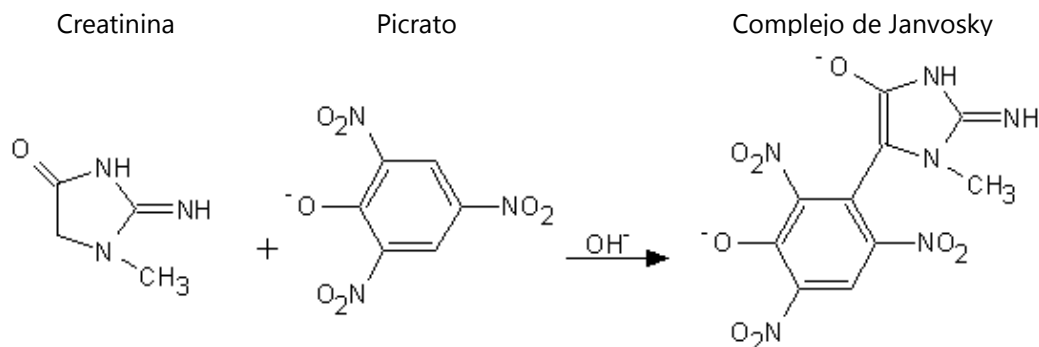


Figura 33. Reacción de Jaffé.

Se utilizó este kit comercial para medir la concentración de la creatinina en las muestras de plasma y orina, siguiendo el protocolo sugerido para cada tipo de muestra. En el caso de las muestras de plasma, se pipeteó 30 μL del plasma y de los patrones de la recta estándar preparada (rango 0,5-10 mg/dL de creatinina) en una placa de 96 pocillos. Se añadieron 200 μL de la mezcla de reactivos A y B del kit comercial (proporción 1:1) y se midió la absorbancia en un lector de placas a 490 nm tras añadir los reactivos (DO0) y tras cinco minutos (DO5). En el caso de las muestras de orina, se pipetearon 5 μL de cada una de las muestras de estudio previamente diluidas 1/10 y de los patrones de la recta estándar de creatinina (rango 0,5-50 mg/dL). Se añadieron 200 μL de la mezcla de reactivos A, B y agua destilada (proporción 1:1:2) y se midió la absorbancia siguiendo los pasos explicados anteriormente. En ambos casos, se determinó la concentración de creatinina: i) se calculó la diferencia entre DO5-DO0 de las muestras y de los calibradores de la recta estándar; ii) se determinó la recta estándar a partir de las absorbancias obtenidas para cada calibrador utilizado; iii) se extrapoló la concentración de creatinina de cada una de las muestras y se tuvo en cuenta el factor de dilución en cada caso.

Como se ha explicado en el apartado 6.2 de la Introducción, el aclaramiento de la creatinina es un fiable estimador de la tasa de filtración glomerular. Se puede calcular según la siguiente fórmula:

Creatinina filtrada = Creatinina excretada

$$\text{TFG} = \frac{\text{FU} \left(\frac{\text{mL}}{\text{min}} \right) \times \text{CrU} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right)}{\text{CrP} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right)} \equiv \text{ClCr} \left(\frac{\text{mL}}{\text{min}} \right)$$

Donde TFG es la tasa de filtración glomerular, ClCr es el aclaramiento de creatinina (mL/min), FU es el flujo urinario (mL/min), CrU es la concentración de creatinina en la orina (mg/dL) y CrP es la concentración de creatinina en el plasma (mg/dL).

5.2 Concentración de la urea plasmática

La urea es un metabolito hepático que se acumula excesivamente en la sangre cuando disminuye la filtración glomerular. Para la determinación de la concentración de urea en el plasma se utilizó un kit comercial (Quantichrom Urea Assay Kit, BioAssay System). Este kit comercial se fundamenta en el método colorimétrico propuesto por Jung (Jung, Biggs, Erikson, & Ledyard, 1975), que describe la reacción que se produce entre la urea, y dos moléculas, el ortoftalaldehído (OPA) y el N-naptileno diamida (NED) para dar lugar a un compuesto coloreado cuya intensidad será directamente proporcional a la concentración de urea. Según el protocolo comercial, se pipetearon 5 μL de las muestras plasma previamente diluidas 1/10 en una placa de 96 pocillos (Becton Dickinson Labware) y de los calibradores de la recta estándar de urea (0 a 50 mg/dL de urea). Se añadieron 200 μL de la mezcla de reactivos A y B del kit comercial (proporción 1:1) a cada pocillo y se incubó la placa durante 20 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente, se midió la absorbancia de los pocillos en un lector de placas a 520 nm. Tras obtener las absorbancias correspondientes a cada calibrador de la recta estándar y hallar la recta estándar, se extrapoló la concentración de urea de cada una de las muestras de plasma analizadas y se tuvo en cuenta el factor de dilución.

5.3 Concentración de proteínas en la orina

La elevada concentración urinaria de proteínas es un indicador de una alteración renal funcional (glomerular, tubular o ambas). Se determinó mediante un kit comercial (Quantichrom Protein Assay, BioAssay System). Esta técnica de análisis se basa en el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976). El colorante utilizado, azul de Coomassie G-250, se une a los aminoácidos básicos de las proteínas en una solución ácida lo que produce un cambio en la longitud de onda de absorción máxima del colorante, pasando de 465 nm a 595 nm. La intensidad de la absorbancia medida a 595 nm de longitud de onda es proporcional a la concentración de proteínas de las muestras de estudio. Según el protocolo comercial, se pipetearon 10 μL de las muestras de orina y de los calibradores de una recta patrón estándar de albúmina de suero bovino (BSA) (0 a 2 mg/mL de BSA) en una placa de 96 pocillos. Se añadieron 200 μL del reactivo comercial previamente diluido 1/5 con agua destilada. Se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de placas. Tras obtener las absorbancias correspondientes a cada calibrador de la recta estándar, se extrapola la concentración de proteínas de cada una de las muestras de orina.

La concentración de proteínas en las muestras de orina de los animales del estudio no nos reporta información relevante sobre su función renal, ya que es necesario tener en cuenta el volumen de orina en el que se han excretado dichas proteínas, es decir, la excreción de proteínas. Para evaluar la función renal de nuestros animales se determinó la excreción de proteínas totales por día, con el fin de valorar si éstos presentaban proteinuria (presencia de proteínas en la orina en un valor superior al normal). Se calculó la excreción total de proteínas por día según la siguiente fórmula:

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

Donde Conc. P es la concentración de proteínas en la orina en mg/mL y FU es el flujo urinario en mL/día.

5.4 Concentración de Na⁺ en la orina y en el plasma

Se evaluó en muestras biológicas de plasma y orina mediante la utilización de un medidor de Na⁺ compacto (LAQUATWin B-722, Horiba Scientific (figura 34)). El principio de medición de este sensor potenciómetro, el electrodo selectivo de iones (ISE, por sus siglas en inglés Ion-selective-electrode), se establece por la ecuación de Nerst, que utiliza las medidas de los potenciales eléctricos en soluciones para calcular las concentraciones de un tipo preciso de ión. Para ello, consta de un dispositivo para medir potenciales, un electrodo de referencia y un electrodo selectivo del ión a caracterizar. Este tipo de electrodos presentan una membrana que responde selectivamente a un determinado ión. Esta membrana está en contacto, por una parte con la disolución de estudio, y por otra, con una solución estándar del mismo de una concentración conocida. Esta solución estándar está, a su vez, en contacto con un electrodo de referencia. La presencia de la membrana modifica el transporte a través de ella, lo que produce una diferencia de potencial, en función de la composición de las soluciones a ambos lados de la membrana. Esta diferencia de potencial puede ser medida mediante un voltímetro y permite ahí calcular la concentración de la disolución aplicando la ecuación de Nerst. Para analizar las muestras, solamente fue necesario colocar 300 µL de la muestra a analizar en el soporte donde se encuentra situada la membrana y el aparato determinó la concentración de Na⁺ de cada muestra.



Figura 34. Potenciómetro para medir iones Na⁺.
Equipo LAQUATWin B-722.

A partir de los valores de Na⁺ en el plasma y en la orina se calculó la fracción excretada de Na⁺, la cual mide el manejo total de Na⁺ por el riñón ya que indica la proporción del Na⁺ filtrado que es excretado. Para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$\mathbf{FENa} = \frac{(\mathbf{NaU} \times \mathbf{CrP})}{(\mathbf{NaP} \times \mathbf{CrU})} \times 100$$

Donde NaU es concentración de Na⁺ urinario, CrP es la concentración de la creatinina en el plasma en mg/dL, NaP es la concentración de Na⁺ en el plasma y CrU es la concentración de la creatinina en la orina en mg/dL.

5.5 Fracción excretada de glucosa

La fracción excretada de glucosa es la proporción de glucosa que es excretada en relación con la glucosa filtrada. Es un estimador de la correcta función tubular y se calcula a partir de la concentración de glucosa en la sangre y en la orina según la siguiente fórmula:

$$\text{FEGlc} = \frac{\left(\text{GlcU} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) \times \text{CrP} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) \right)}{\left(\text{GlcP} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) \times \text{CrU} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) \right)} \times 100$$

Donde GlcU es la concentración de glucosa en la orina en mg/dL, CrP es la concentración de la creatinina en el plasma en mg/dL, GlcP es la concentración de la glucosa en el plasma en mg/dL y CrU es la concentración de la creatinina en la orina en mg/dL.

5.5.1 Concentración de glucosa en el plasma

Para el análisis de la concentración de glucosa en el plasma de los animales se utilizó el dispositivo Contour®Next EC (Bayer) y las tiras reactivas correspondientes. Es necesario colocar una gota de sangre o de plasma en un extremo de la tira reactiva debidamente colocada y posteriormente introducirla en el glucómetro. El fluido biológico asciende por capilaridad por la tira reactiva y en ella la glucosa se oxida por acción enzimática y como consecuencia se produce la liberación de electrones. Estos electrones son medidos por varios electrodos de la tira y generan una pequeña corriente eléctrica que es enviada al medidor. La corriente eléctrica generada es directamente proporcional a la concentración de glucosa contenida en la muestra analizada. El medidor es capaz de relacionar cada corriente eléctrica medida con un valor de glucosa gracias a un algoritmo implementado en el software del aparato.

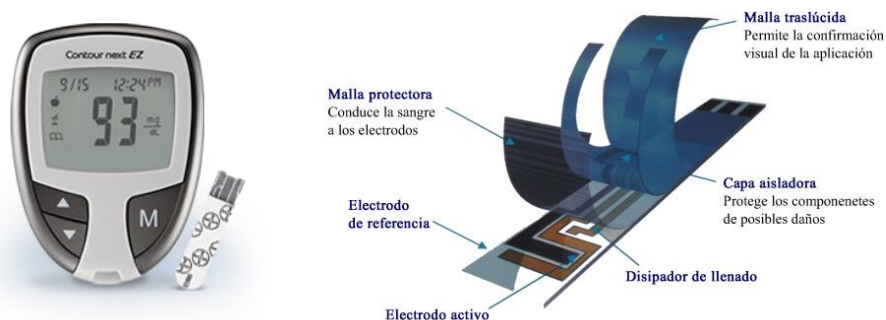


Figura 35. Medidor de la concentración de glucosa en el plasma. A) Dispositivo medidor de la concentración de glucosa en el plasma y sus tiras reactivas; B) componentes de las tiras reactivas necesarios para la medición de la glucosa.

5.5.2 Concentración de la glucosa en la orina

La concentración de la glucosa en la orina recolectada se analizó mediante el método de la O-toloudina. Este método analítico se fundamenta en la condensación de la glucosa y las aminas aromáticas primarias en un medio de ácido acético. El producto coloreado final es el resultado de la reacción de la o-toloudina (amina aromática) con la glucosa, formándose glucosilamina y la correspondiente base de Schiff. Este producto coloreado tiene un máximo de absorción a 625-635 nm (Brilla, Schosinsky, ESQuNEL, & Chavarria, 1977) . Para ello, se pipetearon 25 μL de la muestra a analizar y de la recta patrón de concentraciones conocidas de glucosa en tubos tipo eppendorf. Se añadieron 125 μL de ácido tricloroacético (TCA del inglés trichloroacetic acid) al 3 % por pocillo y 1.350 μL de la amina aromática o-toloudina. Esta mezcla fue hervida a 100 $^{\circ}\text{C}$ en un baño húmedo (Indelab) durante 12 minutos y tras enfriarse, se pipetearon 250 μL de cada uno de los eppendorf por triplicado en una placa de 96 pocillos. Se midió la absorbancia resultante a 630 nm de longitud de onda. Se calculó la recta estándar con las absorbancias correspondientes a los calibradores y se extrapoló la concentración de glucosa de las muestras de orina en mg/dL.

5.6 Determinaciones enzimáticas

5.6.1 Excreción urinaria de N-acetil-β-D-glucosaminidasa (NAG)

El marcador de daño tubular N-acetil-β-D-glucosaminidasa (NAG) es una enzima lisosomal encargada de catalizar la hidrólisis de los enlaces glucosídicos. Para determinar su concentración se utilizó un kit comercial (Diazyme N-acetyl-β-D-glucosaminidase assay) basado en su acción enzimática. La NAG hidroliza el compuesto 2-metoxi-4-(2'nitrovinil)-fenil 2 acetamida-2-deoxi- β-D-glucopiranosido (MNP-GlcNac) en 2-metoxi-4-(2'nitrovinil)-fenol, producto que desarrolla color (a 505 nm de longitud de onda) en contacto con una solución alcalina. Siguiendo el protocolo propuesto por la casa comercial, se pipetearon 10 μL de las muestras de orina y de una recta patrón estándar de concentraciones de NAG conocidas (0-46.9 IU/L) en una placa de 96 pocillos. Se añadieron 150 μL de la mezcla de reactivos R1+R2 (proporción 3:1) y se incubó la placa a 37 °C en una estufa (Infors HT) durante 5 minutos. Tras dicha incubación, se añadieron 50 μL del reactivo R3 a cada pocillo, reactivo alcalino que para la reacción y produce el viraje de color del compuesto formado, cuya absorbancia se midió a 505 nm en un lector de placas (ELx800, Bio-Tek Instruments). Con la absorbancia determinada de cada una de las muestras de estudio y de los calibradores de la recta estándar, se calculó la recta patrón de concentraciones de NAG conocidas y se extrapoló a partir de ésta la concentración de NAG en cada una de las muestras analizadas.

Tras obtener la concentración de NAG en las muestras de orina de los animales de experimentación, se calculó la excreción urinaria de NAG diaria según la siguiente fórmula:

$$\text{Excreción urinaria de NAG} \left(\frac{\text{UU. II.}}{\text{día}} \right) = \text{Conc. NAG} \left(\frac{\text{UU. II.}}{\text{mL}} \right) \times \text{FU} \left(\frac{\text{mL}}{\text{día}} \right)$$

La excreción urinaria de NAG en las muestras de orina de los humanos se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Excreción urinaria de NAG} \left(\frac{\text{UU. II.}}{\text{mg}} \right) = \frac{\text{Conc. NAG} \left(\frac{\text{UU. II.}}{\text{mL}} \right)}{\text{CrU} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right)}$$

Donde Conc. NAG es la concentración de NAG en la orina obtenido por el kit comercial en UU.II./mL, FU es el flujo urinario en mL/día y CrU es la concentración de la creatinina en la orina en mg/mL.

5.6.2 GGT

La gamma glutamil transpeptidasa (γ -GT o GGT) es una enzima hepática que cataliza la transferencia de una porción de gamma-glutamilo de glutatión a un aceptor que puede ser un aminoácido, un péptido o una molécula de agua (formación de glutamato) (Zhang, Jay Forman, & Choi, 2005). La GGT juega un papel clave en el ciclo de la gamma-glutamilo, una vía para la síntesis y degradación de glutatión y de desintoxicación de diferentes drogas y algunos xenobióticos a través de la vía renal.

Para determinar su concentración se utilizó un kit comercial (Gamma-glutamyl-transferase Activity Colorimetric Assay kit) basado en su acción enzimática. Siguiendo el protocolo propuesto por la casa comercial, se pipetearon 10 μ L de las muestras de orina y de una recta patrón estándar de concentraciones de GGT conocidas (0-40 nmol) en una placa de 96 pocillos. Se añadieron 90 μ L del reactivo de detección y se incubó la placa a 37 °C durante 3 minutos, seguidamente se midió la absorbancia a 418 nm en un lector de placas (ELx800, Bio-Tek Instruments), este punto se denominó DO0. Se incubó nuevamente la placa a 37 °C durante un tiempo entre 30 minutos a 2 horas. Se volvió a medir la absorbancia a 418 nm en el lector de placas denominándose este punto DO1. Con la absorbancia determinada de cada una de las muestras de estudio y de los calibradores de la recta estándar, se calculó la recta patrón de concentraciones de GGT conocidas y se extrapolaron a partir de ésta la concentración de GGT en cada una de las muestras analizadas mediante las siguientes fórmulas.

$$\Delta DO = DO1 - DO0 \equiv B$$

$$\text{Actividad GGT} \left(\frac{\text{nmol}}{\text{min}} \frac{\text{mL}}{\text{mL}} \equiv \frac{\text{mUU. II.}}{\text{mL}} \right) = \frac{B \text{ (nmol)}}{T \text{ (min)} \times V \text{ (mL)}}$$

Tras obtener la concentración de GGT en las muestras de orina de los animales de experimentación, se calculó la excreción urinaria de GGT diaria según la siguiente fórmula:

$$\text{Excreción urinaria de GGT} \left(\frac{\text{UU. II.}}{\text{día}} \right) = \frac{\text{Conc. GGT} \left(\frac{\text{mUU. II.}}{\text{mL}} \right) \times \text{FU} \left(\frac{\text{mL}}{\text{día}} \right)}{1000}$$

Donde B es la cantidad de pNA en nmol, T es el tiempo de incubación en min, V es el volumen de muestra cargada por pocillo en mL, Conc. GGT es la concentración de GGT en la orina obtenido por el kit comercial en mUU.II./mL y FU es el flujo urinario en mL/día.

5.6.3 GST

La superfamilia de glutation S-transferasas (GST) constituyen un grupo de isoenzimas multifuncionales que participan en la detoxificación celular de una serie de compuestos electrofílicos que incluyen las especies reactivas de oxígeno (EROS) (Hayes, Flanagan, & Jowsey, 2005) y de los productos generados durante el daño celular, tales como lipoperóxidos (Sharma, Yang, Sharma, Awasthi, & Awasthi, 2004). Esta detoxificación se realiza principalmente a través de la conjugación de glutatión con xenobióticos y/o endobióticos, convirtiéndolos en compuestos más solubles capaces de ser eliminados por el organismo (Oakley, 2011), principalmente por la vía renal y hepática.

Para determinar su concentración se utilizó un kit comercial (Glutathione-S-transferase Fluorescent Activity Kit) basado en su acción enzimática. Este kit utiliza una molécula no fluorescente, sustrato de la enzima GST, que se une covalentemente al glutatión (GSH) para producir un producto altamente fluorescente.

Siguiendo el protocolo propuesto por la casa comercial, se pipetearon 50 μL de las muestras de orina (previamente diluidas 1:2) y de una recta patrón estándar de concentraciones de GST conocidas (7,81-500 mUU.II./mL) en una placa de 96 pocillos. Se añadieron 25 μL del reactivo de detección, posteriormente se añadieron otros 25 μL de GSH y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Tras dicha incubación se produce el viraje de color del compuesto formado, cuya absorbancia se midió a 460 nm en un lector de placas fluorescentes (ELx800, Bio-Tek Instruments) con excitación a 390 nm. Con la absorbancia determinada de cada una de las muestras de estudio y de los calibradores de la recta estándar, se calculó la recta patrón de concentraciones de GST conocidas y se extrapoló a partir de ésta la concentración de GST en cada una de las muestras analizadas y se tuvo en cuenta el factor de dilución.

Tras obtener la concentración de GST en las muestras de orina de los animales de experimentación, se calculó la excreción urinaria de GST diaria según la siguiente fórmula:

$$\text{Excreción urinaria de GST} \left(\frac{\text{UU. II.}}{\text{día}} \right) = \frac{\text{Conc. GST} \left(\frac{\text{mUU. II.}}{\text{mL}} \right) \times \text{FU} \left(\frac{\text{mL}}{\text{día}} \right)}{1000}$$

Donde Conc. GST es la concentración de GST en la orina obtenido por el kit comercial en mUU.II./mL y FU es el flujo urinario en mL/día.

6. ELISA

El ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA, del inglés enzyme linked immunosorbent assay) es un método cuantitativo basado en la detección de un antígeno presente en una muestra mediante anticuerpos que, directa o indirectamente, producen una reacción cuantificable espectrofotométricamente (Engvall & Perlmann, 1971; Voller, 1978).

El tipo de ELISA aplicado en estos experimentos es un ELISA de captura o ELISA tipo "sándwich". En él, la proteína o antígeno a determinar queda inmovilizado en la superficie sólida a través de un anticuerpo de captura previamente adherido a ella. Una vez inmovilizado, se añade un segundo anticuerpo primario frente a la misma molécula conjugado con biotina, una vitamina a la que se une con elevada afinidad la estreptavidina asociada a peroxidasa de rábano picante (HRP). La adición de un sustrato coloreado susceptible de ser modificado por esta última enzima permite obtener una señal visible por espectrofotometría.

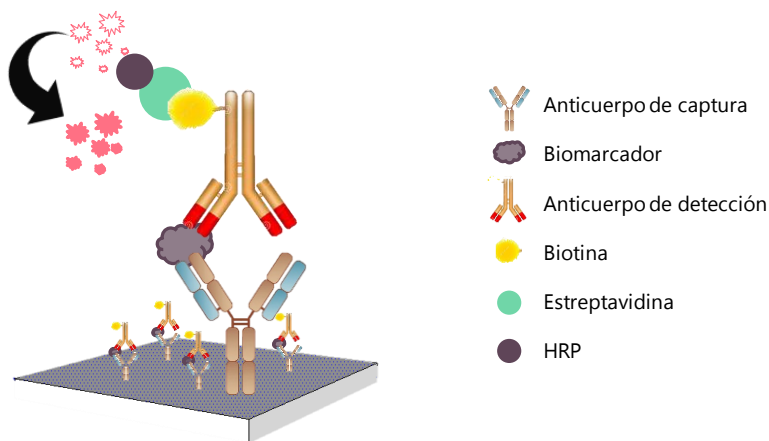


Figura 36. Esquema representativo del ELISA tipo sándwich llevado a cabo para determinar la concentración de los biomarcadores NGAL, FABP1 y albúmina en muestras de plasma, tejido y/u orina. HRP: peroxidasa de rábano picante.

6.1 NGAL

La realización del ensayo se llevó a cabo con el kit comercial "rat NGAL ELISA kit, 046 de BioPorto Diagnostics" para detectar NGAL en orina, plasma y tejido de ratas y con el kit comercial "human NGAL ELISA kit, 037 de BioPorto Diagnostics" para detectar NGAL en orina de humanos. La orina se recogió tal y como se ha explicado en el apartado 4.1. para ratas y apartado 10 para humanos, el plasma según el apartado 4.2. y el riñón según el apartado 4.3. El inmunoensayo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante: se pipetearon 100 μL de las muestras a analizar (previamente diluidas 1/2500), de la recta patrón y de los controles, y se mantuvo 1 h en agitación a 300 rpm en agitador Eppendorf MixMate®. Se lavaron los pocillos 3 veces con la solución de lavado y posteriormente se añadió 100 μL por pocillo del anticuerpo anti-NGAL biotinilado manteniéndolo en agitación análoga la anterior. Finalmente se añadieron 100 μL de HRP-estreptavidina y tras varios lavados, este complejo de unión se detectó al añadir en cada pocillo 100 μL de TMB. Tras 10 minutos de incubación en oscuridad se añadieron 100 μL de un reactivo específico necesario para parar la reacción. El color producido por la acción de dicha enzima en el sustrato fue medido en un lector de placas de ELISA (ELx800, Bio-Tek Instruments)

a 460 nm, siendo la intensidad de color directamente proporcional a NGAL contenida en las muestras de estudio.

Con la absorbancia determinada de cada una de las muestras de estudio y de los calibradores de la recta estándar, se calculó la curva de concentraciones de NGAL conocidas mediante la realización de un análisis de tipo Four Parametric Logistic (4PL), un modelo de regresión no lineal de uso común en ensayos biológicos. La ecuación que define este modelo es la siguiente:

$$x = C \times \sqrt[B]{\frac{A - D}{f(x) - D} - 1}$$

Donde A es la asíntota horizontal que define el mínimo, B es el coeficiente de Hill Slope que define lo pronunciada que es la curva, C representa el punto de inflexión de la curva, D es la asíntota horizontal que define el máximo de la curva y x es la concentración medida.

Se extrapoló a partir de ésta la concentración de NGAL en cada una de las muestras analizadas y se tuvo en cuenta el factor de dilución. Tras obtener la concentración de NGAL en las muestras de orina y riñón de los animales de experimentación, se calculó la excreción urinaria y cantidad renal de NGAL según las siguientes fórmulas:

$$\text{Excreción urinaria de NGAL} \left(\frac{ng}{min} \right) = \text{Conc. NGAL} \left(\frac{pg}{\mu L} \equiv \frac{ng}{mL} \right) \times \text{FU} \left(\frac{mL}{min} \right)$$

$$\text{NGAL renal} \left(\frac{ng}{mg} \right) = \text{Conc. NGAL} \left(\frac{pg}{\mu L} \equiv \frac{ng}{mL} \right) \times \text{Conc. P} \left(\frac{mg}{mL} \right)$$

La excreción urinaria de NGAL en las muestras de orina de los humanos se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Excreción urinaria de NGAL } \left(\frac{\text{ng}}{\text{mg}} \right) = \frac{\text{Conc. NGAL } \left(\frac{\text{pg}}{\mu\text{L}} \equiv \frac{\text{ng}}{\text{mL}} \right)}{\text{CrU } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right)}$$

Donde Conc. NGAL es la concentración de NGAL en la orina, plasma o riñón obtenido por el kit de ELISA en pg/ μ L ó ng/mL, FU es el flujo urinario en mL/min, Conc. P es la concentración de proteínas en el riñón en mg/mL y CrU es la concentración de creatinina en la orina en mg/mL.

La concentración de NGAL plasmático se expresó en ng/mL por lo que no hubo que realizar ningún factor de conversión a los datos obtenidos.

6.2 FABP1 o L-FABP

La realización del ensayo se llevó a cabo con el kit comercial "human Fatty Acid Binding Protein 1 kit, E-EL-R2435 de BioPorto Diagnostics" para detectar FABP1 en orina de humanos. La orina se recogió tal y como se ha explicado en el apartado 10. El inmunoensayo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante: se pipetearon 50 μ L de las muestras a analizar (previamente diluidas 1/16), de la recta patrón y de los controles. Se añadieron 50 μ L de la solución de pretratamiento y se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente (20 – 28 °C). Se lavaron los pocillos 3 veces con 350 μ L de solución de lavado y posteriormente se añadieron 100 μ L por pocillo del anticuerpo anti-L-FABP biotinilado dejándolo reposar 55 minutos nuevamente a temperatura ambiente. Se lavaron los pocillos 3 veces con 350 μ L de solución de lavado y finalmente se añadieron 100 μ L de HRP-estreptavidina, este complejo de unión se detectó al añadir en cada pocillo 100 μ L de TMB. Tras 25 minutos de incubación en oscuridad se añadieron 50 μ L de un reactivo específico necesario para parar la reacción. El color producido por la acción de dicha enzima en el sustrato fue medido en un lector de placas de ELISA (ELx800, Bio-Tek Instruments) a 492 nm, siendo la intensidad de color directamente proporcional a L-FABP contenida en las muestras de estudio.

Con la absorbancia determinada de cada una de las muestras de estudio y de los calibradores de la recta estándar, se calculó la recta patrón de concentraciones de L-FABP conocidas y se extrapoló a partir de ésta la concentración de L-FABP en cada una de las muestras analizadas.

Tras obtener la concentración de L-FABP en las muestras de orina humanas, se calculó la excreción urinaria de L-FABP según la siguiente fórmula:

$$\text{Excreción urinaria de L - FABP } \left(\frac{ng}{mg} \right) = \frac{\text{Conc. L - FABP } \left(\frac{ng}{mL} \right)}{CrU \left(\frac{mg}{mL} \right)}$$

Donde Conc. L-FABP es la concentración de L-FABP en la orina obtenido por el kit de ELISA en ng/mL y CrU es la concentración de creatinina en la orina en mg/mL.

6.3 Albúmina

La realización del ensayo se llevó a cabo con el kit comercial "rat Albumin ELISA kit, E111-125 de Bethyl laboratories" para detectar albúmina en orina. La orina se recogió tal y como se ha explicado en el apartado 4.1. El inmunoensayo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante: se incubó el anticuerpo de captura en la placa de ELISA proporcionada por el fabricante durante 1 hora, se lavaron los pocillos 3 veces con la solución de lavado, posteriormente se incubó con la solución de bloqueo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de realizar 3 lavados se pipetearon 100 μ L de las muestras a analizar, de la recta patrón y de los controles. Posteriormente se produjo una incubación de 1 hora con el conjugado de anticuerpo de albúmina y la enzima HRP (100 μ L) que se une específicamente a la albúmina. Finalmente, tras varios lavados, este complejo de unión se detectó al añadir en cada pocillo 100 μ L de un sustrato colorimétrico para la enzima HRP. Tras 15 minutos de incubación, se añadieron 50 μ L de un reactivo específico necesario para parar la reacción. El color producido por la acción de dicha enzima en el sustrato fue medido en un lector de placas de ELISA (ELx800, Bio-Tek Instruments) a 450 nm, siendo la intensidad de color directamente proporcional a la albúmina contenida en las muestras de estudio.

Con la absorbancia determinada de cada una de las muestras de estudio y de los calibradores de la recta estándar, se calculó la recta patrón de concentraciones de albúmina conocidas y se extrapola a partir de ésta la concentración de albúmina en cada una de las muestras analizadas. Tras obtener la concentración de albúmina

en las muestras de orina de los animales de experimentación, se calculó la excreción urinaria de albúmina diaria según la siguiente fórmula:

$$\text{Excreción urinaria de Albúmina} \left(\frac{\text{ng}}{\text{día}} \right) = \text{Conc. albúmina} \left(\frac{\text{ng}}{\text{mL}} \right) \times \text{FU} \left(\frac{\text{mL}}{\text{día}} \right)$$

Donde Conc. albúmina es la concentración de albúmina en la orina obtenido por el kit de ELISA en ng/mL y FU es el flujo urinario en mL/día.

7. Análisis histológico

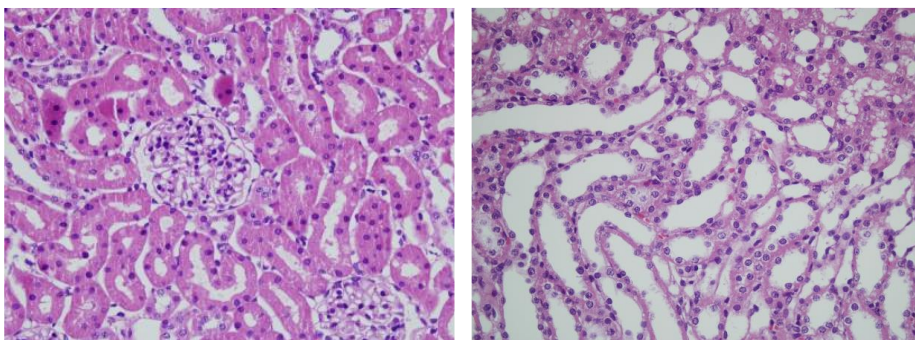
Los riñones destinados a la realización de los estudios histológicos se fijaron con formaldehído tamponado al 3,7% o en PBS 1X al 30% de sacarosa durante al menos 24 horas, capaz de evitar la degradación del tejido. Después se deshidrataron en etanol de concentración creciente desde 50% hasta 100% para permitir que la parafina pueda penetrar posteriormente en el tejido ya que no es miscible con el agua. Tras la deshidratación se sumergió el tejido en xileno, para sustituir el alcohol en el tejido deshidratado y por tanto favorecer la penetración de la parafina en el siguiente paso. Finalmente, el tejido se incluyó en parafina en una estufa a 60 °C durante 24 horas y se obtuvieron bloques, que se cortaron con un microtomo (*HM-310, Micron*) en secciones transversales de 5 µm de grosor. Por último, los cortes se depositaron en un portaobjetos y se dejaron secar en la estufa durante 24 horas. Antes de realizar las diferentes tinciones, se desparafinan los cortes de tejido con xileno y se rehidratan haciéndolos pasar por una serie de graduaciones decrecientes de alcohol etílico hasta finalizar con una solución 100% de agua destilada.

7.1 Tinción con hematoxilina y eosina

Esta técnica histológica permite el estudio de la estructura morfológica de las células que conforman el tejido. La hematoxilina tiene afinidad por los ácidos, por lo que se une a los ácidos nucleicos y por tanto tiñe de azul los núcleos celulares. La eosina, debido a su afinidad por los compuestos básicos tiñe de color rosado el citoplasma de la célula.

Para llevar a cabo la tinción se sumergió el riñón desparafinado e hidratado en hematoxilina de Harris durante 10 minutos, se lavaron los restos de colorante con agua y se sumergió en eosina durante 30 segundos. Por último, se deshidrató nuevamente el tejido con etanoles en distintas concentraciones siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Después de la deshidratación, se añadió el medio de montaje DPX a los portaobjetos y se colocó un cubreobjetos para proteger los cortes teñidos.

Cuando el medio de montaje se secó, se codificaron los portaobjetos para hacer un estudio ciego y se hicieron fotos con una cámara digital conectada a un microscopio óptico (*Olympus BX51*). Para ello, se utilizó el software DP Controller. Además de una descripción de las fotos tomadas, se realizó una valoración semicuantitativa del grado de daño de las mismas mediante la determinación de un índice de daño histológico. Para ello, se tomaron en cada riñón 10 fotos de la zona cortical y otras 10 de la zona corticomedular de manera aleatoria y representativa, con un aumento 400X. Dado que la región corticomedular subyace directamente bajo la cortical, es necesario distinguirlas para poder hacer las capturas pertinentes. La distinción entre ambas resulta no obstante, sencilla, puesto que en la zona cortical (o corteza externa) se ubican los glomérulos de las nefronas en tanto que, en la zona corticomedular (o médula externa) no aparecen estas estructuras (figura 37). Por último, cada una de las 10 fotos tomadas, se dividieron a su vez en 10 secciones (figura 39).



Área corteza externa

Área médula externa

Figura 37. Diferencias histológicas entre el área corteza externa y médula externa de una rata control (400X).

A cada una de estas secciones, se le dio un valor de 0 a 3 de acuerdo con el siguiente criterio (figura 38):

Valor 0: Histología normal.

Valor 1: Hinchamiento de células tubulares, pérdida de borde en cepillo, vacuolización, presencia de material hialino y casts, pérdida de núcleos en el perímetro de los túbulos renales, presencia de necrosis tubular y dilatación tubular en un máximo de un tercio de la sección.

Valor 2: Mismas características que el valor 1, pero entre uno y dos tercios de la sección.

Valor 3: Mismas características que el valor 1, pero en más de dos tercios de la sección.

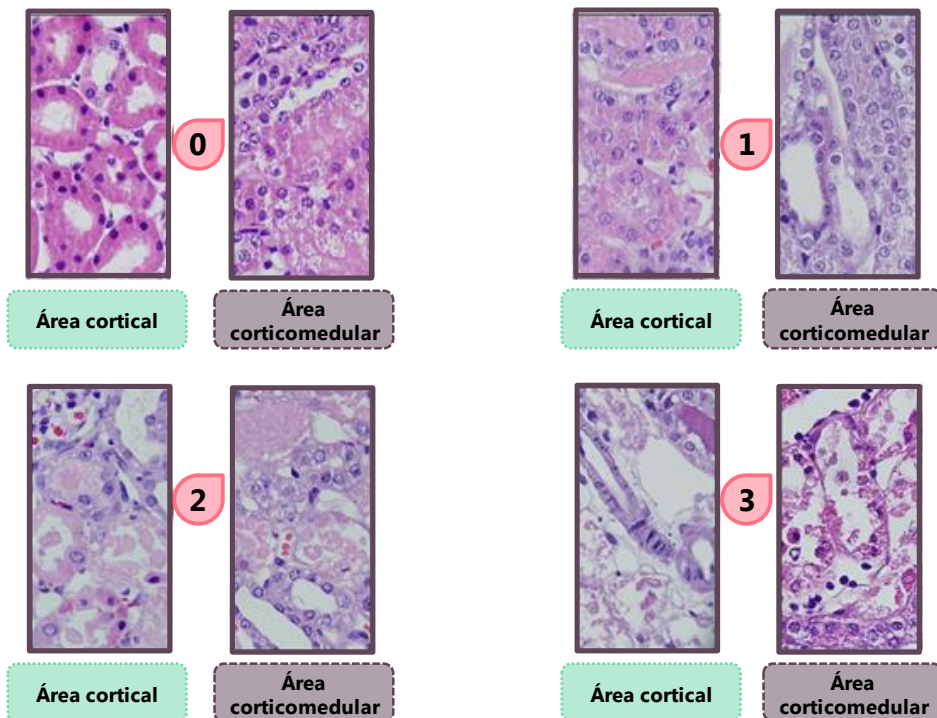


Figura 38. Ejemplos gráficos de los scores asignados para el área cortical y el área corticomedular según el daño.

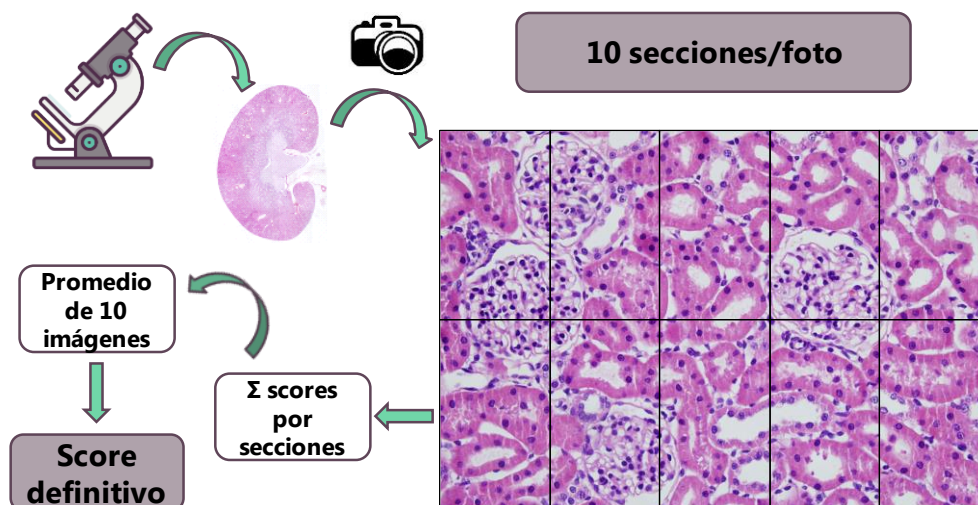


Figura 39. Plantilla de cuadrícula para semicuantificación sobre una imagen de histología y metodología empleada.

Los valores de las secciones se sumaron de manera que cada foto tenía un valor total situado entre 0 y 30. El índice de daño histológico para un riñón dado se determinó mediante el promedio de los valores de las 10 imágenes tomadas.

7.2 Inmunohistoquímica

Esta técnica se basa en la localización específica de proteínas en cortes de tejidos. Consiste en la conjugación de un anticuerpo primario con la proteína a identificar y en su posterior detección mediante anticuerpos secundarios ligados a moléculas que permiten la visualización microscópica tras la adición de un cromógeno. Tras la hidratación del tejido renal anteriormente descrito se llevó a cabo el desenmascaramiento del antígeno hirviendo las muestras en un buffer citrato a pH 6 durante 4 minutos a 130 °C en olla a presión y se dejó reposar 20 minutos. Después se incubó con peróxido de hidrógeno al 1,6% durante 10 minutos y se bloqueó el tejido renal con BSA al 5% en PBS-TWEEN 20 (PBS, del inglés phosphate buffered saline) al 0,1% durante 1 hora a temperatura ambiente para saturar los posibles sitios de unión inespecífica de los anticuerpos y se incubó el anticuerpo primario en la solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C. Después se realizó otro lavado

con PBS-TWEEN, se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado conjugado con la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP, del inglés horseradish peroxidase) en la solución de bloqueo durante 30 minutos y se lavó de nuevo con PBS. Inmediatamente después se añadió el cromógeno diaminobenzidina durante 10 minutos, y se lavaron con abundante agua corriente. Seguidamente se contrastaron ligeramente sumergiéndolos en hematoxilina unos segundos, aclarándolos rápidamente.

Por último, se deshidrataron, se montaron las preparaciones y se almacenaron hasta su observación en el microscopio óptico (*Olympus BX51*), donde se evaluó la expresión y localización de las proteínas de estudio y se obtuvieron imágenes representativas a diferentes aumentos, para ello se utilizó el software DP Controller.

Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
AcM de ratón anti-NGAL NBP2-21621 (Novus Biologicals)	1:50	Anti-ratón	1:300
AcP de cabra anti-KIM-1 AF3689 (R&D Systems)	1:100	Anti-cabra	1:300

Tabla 6. Condiciones de los anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica.

7.3 Evaluación de la muerte celular por inmunofluorescencia

La evaluación de la muerte celular que se quiso estudiar consistió en observar la proporción de células, y qué tipo de células, habían sufrido necrosis tras el tratamiento con cisplatino respecto de las células que seguían vivas. Se realizó un estudio histológico de muerte celular en el tejido renal obtenido de los animales descritos en el apartado 3.5. Tras la perfusión renal con el fluorocromo nuclear específico de células que ha sufrido necrosis, explicada en el apartado 3.5.1., los riñones preservados en PBS 1X al 30% de sacarosa, fueron teñidos con un nuevo fluorocromo específico de células sanas (DAPI). El objetivo de la evaluación de la muerte celular por inmunofluorescencia fue dilucidar el mecanismo fisiopatológico por el cual el GM2AP urinario aparece en este tipo de DRA.

7.3.1 DAPI

DAPI ó (4',6-diamino-2-fenilindol) es un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de ADN. DAPI puede pasar a través de la membrana celular, debido a eso, se utiliza para teñir células vivas y también células fijadas.

Transcurrido el tratamiento y perfusión renal con homodímero de etidio, se procedió a la tinción con DAPI. Para llevar a cabo esta tinción, las muestras fueron permeabilizadas con Tritón X100 al 0,1% en 0,1M PBS a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación, se sumergieron los portaobjetos en una solución de PBS con 1 µg/mL de DAPI durante 20 min en oscuridad para teñir, de manera específica el ADN. Las preparaciones se montaron añadiendo una gota de medio de montaje con 0,1% (p/v) de o-fenilendiamina, 10% (v/v) de PBS y 90% (v/v) de glicerol. Se esperó al menos una hora tras el montaje para poder observar las preparaciones en un microscopio de fluorescencia, manteniendo las muestras en todo momento a 4 °C en oscuridad. Se utilizó un microscopio confocal de fluorescencia (Axiovert 200M, Carl Zeiss) para evaluar la localización y cuantificar las células vivas. Tras la señal de excitación UV, las estructuras teñidas con DAPI emiten fluorescencia en color azul a una longitud de onda de 461 nm (figura 40).

7.3.2 Homodímero etidio

El homodímero de etidio es un reactivo fluorescente nuclear con alta afinidad por el ADN y baja permeabilidad de membrana normalmente empleado para medir la citotoxicidad celular. Esto es debido a que se une al ADN de aquellas células con la membrana dañada, tiñéndolo de color rojo. Las células necróticas se caracterizan por una pérdida temprana de la integridad de la membrana plasmática y una liberación del contenido intracelular al medio. La rotura de la membrana plasmática permite la entrada libre de este fluorocromo.

Tras la espera a 4 °C y en oscuridad, las preparaciones se observaron en un microscopio confocal de fluorescencia (Axiovert 200M, Carl Zeiss) para evaluar la localización y cuantificar las células necrosadas. Tras la señal de excitación UV, las estructuras teñidas con el homodímero de etidio emiten fluorescencia en color rojo a una longitud de onda de 645 nm (figura 41).

7.3.3 Viabilidad celular

Cuando el medio de montaje se secó, se codificaron los portaobjetos para hacer un estudio ciego y se hicieron fotos con una cámara digital conectada a un microscopio óptico (Olympus BX51). Para ello, se utilizó el software DP Controller. Además de una descripción de las fotos tomadas, se realizó una valoración cuantitativa del porcentaje de muerte celular mediante el programa Image J (Fiji). Para ello, se tomaron en cada riñón 10 fotos de la zona cortical y otras 10 de la zona corticomedular de manera aleatoria y representativa, con un aumento 400X. El porcentaje de muerte celular se calculó según la siguiente fórmula:

$$\text{Muerte celular (\%)} = \frac{\sum \frac{(\text{Mean HE (UU. AA.)} \times 100)}{\text{Mean DAPI (UU. AA.)}}}{10}$$

Donde Mean HE es el valor de células necrosadas teñidas con homodímero de etidio y detectadas en rojo en UU.AA. y Mean DAPI es el valor de células vivas teñidas con DAPI y detectadas en azul.

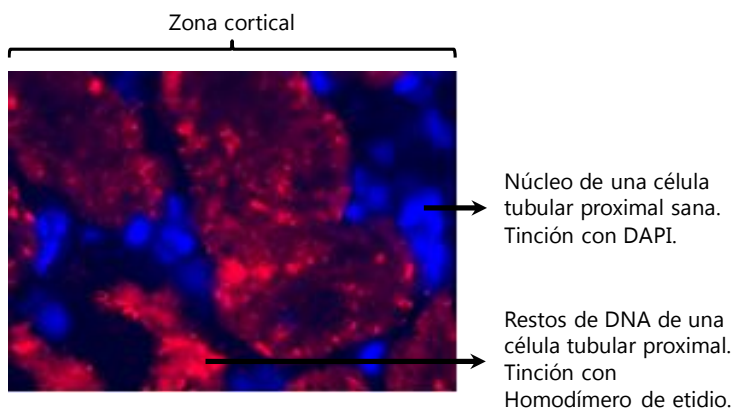


Figura 40. Imagen obtenida mediante inmunofluorescencia en tejido renal de rata, zona cortical. Imagen representativa (800X) de varias células de túbulos contorneados proximales con y sin necrosis tubular aguda (NTA). Fluoróforo azul: DAPI; fluoróforo rojo: Homodímero etidio.

8. Análisis de proteínas mediante Western blot

La técnica de Western blot (Gallagher, Winston, Fuller, & Hurrell, 2008) permite la identificación y localización de proteínas de diferentes tipos de muestras biológicas: orina, sangre o tejido. Se basa en la separación de proteínas de una muestra en un gel de poliacrilamida en función de su peso molecular y su posterior transferencia a una membrana. En dicha membrana las proteínas son reconocidas mediante anticuerpos específicos (anticuerpos primarios) y anticuerpos secundarios, que reaccionan con los anticuerpos primarios y están conjugados con la enzima HRP que, al reaccionar con su sustrato, produce una reacción fácilmente detectable y relativamente proporcional a la cantidad de proteína de la muestra.

8.1 Obtención de extractos de proteínas de tejidos

La extracción de proteínas tisulares se efectuó a 4 °C, utilizando el siguiente tampón de lisis (1 ml por 100 mg de tejido): MLB5X (HEPES 125 mM pH 7,5, NaCl 750 mM, glicerol 10%, Igepal 5%, MgCl₂ 50 mM, EDTA 5 mM; Upstate Biotechnology) y glicerol 80%, al que se añadieron inhibidores de proteasas (aprotinina 1 mg/ml, leupeptina 1 mg/mL y fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF) 100 mM) e inhibidores de fosfatasa (NaF 0,5 M y Na₃VO₄ 100 mM). Con la ayuda de un politrón (Ultraturax T8, IKA Laborotechnick, Alemania) se procedió a la homogenización de las muestras. El lisado tisular se centrifugó durante 15 minutos a 14.000 g a 4 °C (Universal 32 R, Hettich, Alemania). Después de la centrifugación se recogió el sobrenadante y se congeló a -80 °C hasta el momento de su utilización. Una alícuota se utilizó para la determinación de la concentración de proteínas.

8.2 Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de la concentración de proteínas, se utilizó el kit comercial colorimétrico "DCTM Protein Assay", basado en el método de Lowry (Lowry et al, 1951). Para las muestras de tejido, se hizo previamente una dilución 1:20 de la muestra en tampón de lisis. Se hizo reaccionar una muestra (5 µL) por triplicado de cada uno de los extractos proteicos, así como de cada uno de los puntos de una recta patrón de BSA de concentraciones conocidas (0-1 mg/mL) en una placa de 96 pocillos, con los reactivos del kit (25 µL de la mezcla de reactivos A+S y 200 µL de

reactivo B). Se midió la absorbancia del producto de reacción a 720 nm en un lector de placas de ELISA y se analizaron los resultados con el programa Gen 5.0. A partir de la recta patrón de concentraciones conocidas de BSA se extrapolaron las concentraciones de proteínas de las muestras teniendo en cuenta el factor de dilución.

8.3 Preparación de las muestras, electroforesis y transferencia

La técnica del Western blot se utilizó para estudiar el patrón de aparición de determinadas proteínas urinarias relacionadas con el DRA. Además, se estudió la presencia o no de estas proteínas en el tejido renal.

Se prepararon las muestras en condiciones desnaturalizantes y reductoras con el fin de deshacer la estructura tridimensional de éstas. Para ello, se añadió el tampón de carga Laemmli (Tris 125 mM, glicerol al 10 %, SDS al 2 %, β -mercaptoetanol al 1 % y azul de bromofenol al 0,0005 %; pH 6,8) y se hirvieron a 100 °C durante 5 minutos (Laemmli, 1970).

Las proteínas se separaron mediante electroforesis vertical en geles de acrilamida o SDS-PAGE (del inglés sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis). El porcentaje de acrilamida del gel (8 al 15 %) utilizado dependió del peso molecular de la proteína a analizar. Se utilizaron geles caseros (acrilamida-bisacrilamida 29,1 %, agua destilada, tampón lower (1,5 M Tris-Cl, pH 8,8, 0,4 % SDS), tampón upper (0,5 M Tris-Cl, pH 6,8, 0,4% SDS), APS 10 % y temed o geles comerciales (Biorad). En uno de los pocillos del gel fue necesario cargar el marcador de pesos moleculares (una serie de proteínas de pesos moleculares conocidos teñida con colorantes para su identificación en el gel, Gibco TM, Invitrogen). La electroforesis se realizó en cubetas Mini-PROTEAN®III (BioRad) donde el gel estaba sumergido en un tampón de electroforesis (Tris 25 mM, Glicina 192 mM pH 8.3, SDS al 0,1 %, BioRad). Este tampón favorece la electroforesis y el SDS es capaz de unirse a las proteínas y enmascarar su carga positiva, de forma que, cargadas negativamente, se desplazan hacia el polo positivo separándose únicamente por su peso molecular.

Una vez que las proteínas se separaron por su tamaño, se transfirieron a una membrana de PVDF (difluoruro de polivinilideno, PVDF del inglés polyvinylidene

difluoride; Immobilon P, Millipore) para facilitar la detección por los anticuerpos en los pasos siguientes. Se utilizó el método de transferencia húmeda, se aplicó un campo eléctrico en una cubeta Mini-PROTEAN®III (BioRad) donde el gel y la membrana se encontraban sumergidos en un tampón de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 92 mM, BioRad; metanol al 20 %, VWR Chemicals). El gel se dispuso en el polo negativo y la membrana en el polo positivo, de forma que gracias al campo eléctrico formado las proteínas migraron hacia el polo positivo y quedaron atrapadas en la membrana.

8.4 Bloqueo e incubación con los anticuerpos

Una vez finalizada la transferencia, para evitar uniones inespecíficas durante la inmunodetección se procedió al bloqueo de los lugares de la membrana no ocupados por proteínas. Para ello se incubó la membrana con tampón de bloqueo, BSA en tampón de lavado (Tween-20 al 0,1%, NaCl 150 mM, Tris 20 mM, pH 7,5); la concentración de BSA depende de la proteína estudiada y del tipo de muestra biológica, variando entre el 3 y 5%, durante 2 horas en agitación. A continuación, se incubó la membrana con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo, durante al menos 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C en agitación. Seguidamente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con tampón de lavado (TTBS: 50 mL de NaCl 3M, 20 mL de Tris Ph 7,5 1M, 1 mL de Tween y c.s.p. 1 L de H₂O) y se incubó con el anticuerpo secundario (IgG conjugada con la enzima HRP, capaz de reconocer una región específica del anticuerpo primario), diluido en tampón de lavado, durante 1 hora a temperatura ambiente, en agitación. La tabla 7 muestra los anticuerpos primarios y la tabla 8 los secundarios utilizados, su dilución y condiciones. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 7 minutos con tampón de lavado.

Anticuerpo primario	Dilución	% BSA	Tiempo	T ^a
AcM de conejo anti-GM2AP (grupo TRECARD, USAL)	1:1000	1 %	1 h	RT
AcP de conejo anti-L-FABP SWY-32764 (SAB)	1:2000	1 %	o/n	4 °C

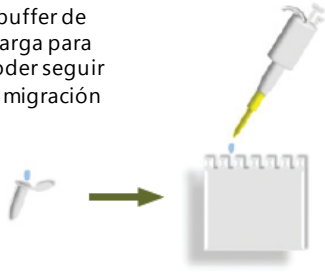
AcP de cabra anti-Fetuina A sc-20872 (Santa Cruz Biotech)	1:5000	1 %	o/n	4 °C
AcP de cabra anti-BMP-7 sc-9305 (Santa Cruz Biotech)	1:1000	1 %	o/n	4 °C
AcP de cabra anti-KIM-1 AF3689 (R&D Systems)	1:500	1 %	o/n	4 °C
AcM de conejo anti-NGAL JM-3819-100 (MBL)	1:1000	1 %	o/n	4 °C
AcP de conejo anti-TCP-1 NBP2-20588 (Novus Biologicals)	1:1000	1 %	o/n	4 °C
AcP de cabra anti-t-gelsolina sc-6405 (Santa Cruz Biotech)	1:1000	1 %	o/n	4 °C
AcP de oveja anti-Reg IIIb AF51100 (R&D Systems)	1:1000	1 %	o/n	4 °C
AcM de ratón anti-PAI-1 612025 (BD Biosciences)	1:2000	1 %	o/n	4 °C
AcP de oveja anti-Reg IIIa AF9940 (R&D Systems)	1:200	1 %	o/n	4 °C

Tabla 7. Relación de anticuerpos primarios utilizados para la técnica de Western blot. BSA: albúmina de suero bovino (del inglés *bovine serum albumine*); h: hora; o/n: toda la noche (del inglés *over night*) RT: Temperatura ambiente (del inglés *Room temperature*); GM2AP: Proteína activadora del gangliósido M2; ; L-FABP: proteína hepática fijadora de ácidos grasos; BMP-7: Proteína morfogenética ósea-7; KIM-1: molécula de daño renal 1; NGAL: lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos; TCP-1: del inglés *tailless complex polypeptide*; Reg IIIb: Proteína 3- β derivada de islote regenerador; PAI-1: inhibidor del activador de plasminógeno; Reg IIIa: proteína 3-alfa derivada de islote regenerador.

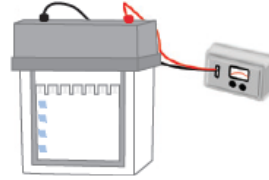
Anticuerpo secundario	Dilución	% BSA	Tiempo	T ^a
Cabra anti conejo IgG (H+L)-HRP 4052-05 (Southern Biotech)	1:10000	1%	1 h	RT
Cerdo anti cabra IgG (H+L)-HRP 6300-05 (Southern Biotech)	1:10000	1%	1 h	RT
Conejo anti oveja IgG (H+L)-HRP A130-201P (Bethyl Laboratories)	1:10000	1%	1 h	RT
Cabra anti ratón IgG (H+L)-HRP 1034-05 (Southern Biotech)	1:10000	1%	1 h	RT

Tabla 8. Relación de anticuerpos secundarios utilizados para la técnica de Western blot. IgG: inmunoglobulina; HRP: enzima peroxidasa de rábano picante (del inglés *horseradish peroxidase*); BSA: albúmina de suero bovino (del inglés *bovine serum albumine*); h: hora; RT: Temperatura ambiente (del inglés *Room temperatura*).

Adición de buffer de carga para poder seguir la migración



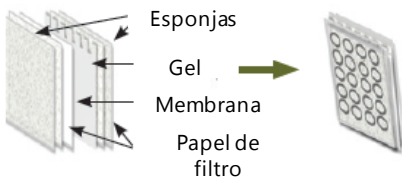
Carga de muestras en los pocillos del gel



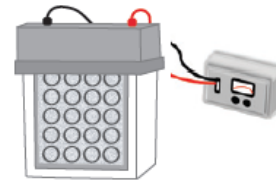
Electroforesis

El gel se coloca en una cubeta de electroforesis con una cantidad de buffer apropiada. Las proteínas cargadas negativamente (por el SDS) migran alejándose del cátodo

El gel y la membrana se colocan en contacto entre esponjas y papel de filtro



La aplicación de voltaje fuerza la migración de las proteínas desde el gel a la membrana



Transferencia

El casete mantiene la presión necesaria para garantizar el contacto entre la membrana y el gel

Detección

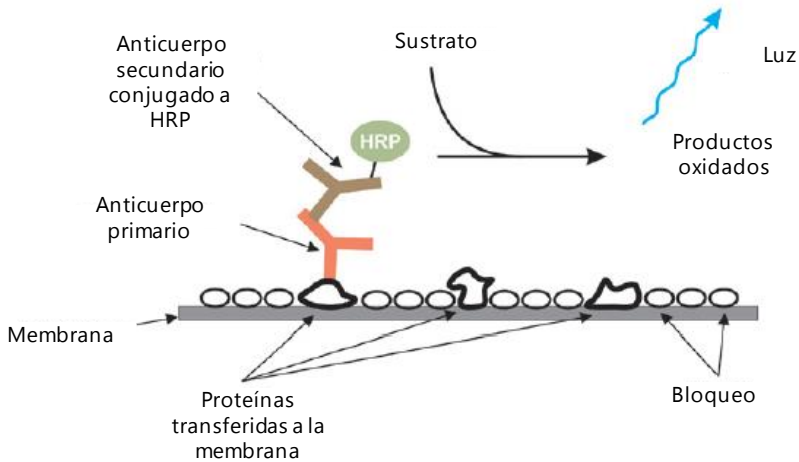


Figura 41. Representación esquemática del Western blot.

8.5 Revelado

Para la detección de la señal ofrecida por el anticuerpo secundario, se utilizó un sistema basado en la oxidación del luminol potenciada con fosfo-iodofenol. Las membranas se incubaron durante 1 minuto en una solución ECL (Tris-HCl 1M, pH 9,35; luminol 2,2 mM, piodofenol 2,2 mM) suplementada con H₂O₂ al 0,03-0,06%. La enzima HRP unida al anticuerpo secundario cataliza la descomposición del H₂O₂ y libera O₂ 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.

Esta señal impresionó en cámara oscura a una película de autorradiografía FUJIFILM que fue revelada mecánicamente (máquina de revelado Medical X Ray). Finalmente, se digitalizaron las películas utilizando el programa de tratamiento de imágenes Adobe Photoshop 7.0, y las imágenes resultantes se cuantificaron mediante el programa Scion Image.

8.6 Normalización de datos

Los Western Blot de modelos animales se realizaron previa corrección por flujo urinario refiriendo el volumen de orina cargado de cada uno de los animales al volumen de orina de aquel animal con mayor flujo urinario, de manera que de éste último se carga un volumen de orina igual a la máxima cantidad cargada y del resto de animales un volumen inferior que se completa con agua destilada. Tras el revelado, la normalización se efectuó de la siguiente manera:

$$\text{Biomarcador} = \frac{\text{Volumen de banda de cada muestra (\% UU. AA.)}}{\text{Volumen de banda del control positivo (\% UU. AA.)}} \times 100$$

Por otro lado, la normalización del Western Blot de pacientes humanos se realizó siguiente la siguiente fórmula:

$$\text{Biomarcador} = \frac{\text{Volumen de banda de cada muestra (\% UU. AA.)}}{\text{Volumen de banda del control positivo (\% UU. AA.)}} \times 100$$

$$CrU \left(\frac{mg}{dL} \right)$$

Donde % UU.AA. es el porcentaje en unidades arbitrarias y CrU es la concentración de creatinina en la orina (mg/dL).

9. Análisis del nivel de expresión génica

Se estudió la expresión génica en el tejido renal de dos moléculas implicadas en el daño renal agudo, NGAL, KIM-1 y PAI-1, mediante la técnica de PCR del inglés *polymerase chain reaction*.

9.1 Extracción de ARN de tejido

Para la obtención de ARN de las muestras de tejido renal se utilizó el kit comercial "NucleoSpin®RNA" (figura 42). Este método se basa en la separación del ARN mediante cromatografía de adsorción. Bajo condiciones nativas, los ácidos nucleicos son solubles en soluciones acuosas ya que están recubiertos de una capa de moléculas de agua. Con la adición de iones caotrópicos se destruye esta estructura ordenada de moléculas de agua creándose un entorno hidrofóbico alrededor de los ácidos nucleicos. Bajo estas condiciones hidrofóbicas, los ácidos nucleicos son retenidos en la membrana de sílica de las columnas, mientras que las proteínas, los metabolitos y otros contaminantes no se unen y, por lo tanto, son eliminados de la muestra durante los pasos de lavado.

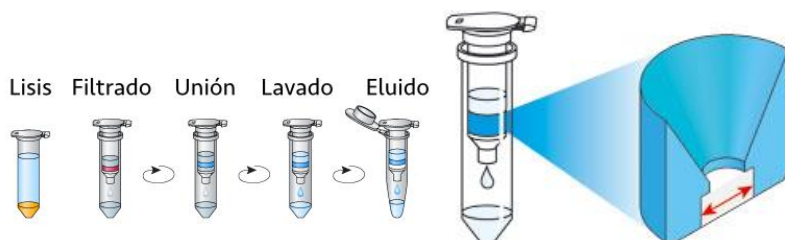


Figura 42. Kit de extracción de ARN: NucleoSpin® RNA. Izquierda: Esquema de protocolo. Derecha: Detalle de las columnas NucleoSpin® ARN XS, con una membrana más pequeña para muestras pequeñas.

En primer lugar, se pulverizó el tejido y se lisó en el tampón RA1 del kit, suplementado con β -mercaptoetanol al 1%. El lisado se filtró por unas columnas específicas y se pasó a una columna capaz de retener los ácidos nucleicos en la membrana de sílice. Se incubó con ADNasa recombinante para eliminar el ADN que pudiera permanecer en la membrana de sílice. Se hicieron 3 lavados con tampones de lavado para eliminar sales, metabolitos y componentes macromoleculares y finalmente el ARN se eluyó con H₂O libre de ARNasas permitiendo devolver la capa hidratante de agua alrededor de estos ácidos nucleicos y liberarlos así de la membrana en la que estaban retenidos.

El ARN obtenido se cuantificó en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 y se almacenó a -80 °C.

9.2 Obtención del ADNc

Para el análisis de la expresión génica necesitamos utilizar ADN como sustrato de la reacción. La obtención de ADN complementario (ADNc) se llevó a cabo mediante la técnica de transcripción reversa de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR, del inglés, reverse transcription polymerase chain reaction) que permite sintetizar ADNc a partir de ARN gracias a la enzima transcriptasa reversa.

Para sintetizar ADNc, se diluyeron 400 ng de ARN de cada muestra con agua libre de ARNasas hasta un volumen final de 16 μ L. Se añadieron 4 μ L de la iScript RT Supermix 5X, que contiene transcriptasa reversa, dNTP, oligo(dT), random primers, inhibidor de ARNasas, estabilizadores de MgCl₂ y el tampón de reacción. Los 20 μ L totales fueron incubados 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.

9.3 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 se consideró 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 nuestros cebadores, es decir, que tuviese un Ct más bajo (ver apartado 9.4). Por otro lado, el análisis de la curva de melting 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 melting similar por su composición en pares de bases, llevamos a cabo una electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenido 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 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 nuestros cebadores para su uso.

Las parejas de cebadores utilizadas en este trabajo se detallan en la Tabla 9.

Gen	Secuencia de los cebadores (5' → 3')	Tª de anillamiento
NGAL	TCT GGG CCT AAG GAT AAC AAC GAC AGG TGG GAC CTG AAC CA	64
KIM-1	CCA AGC TCA GAG AGC CTA AG TCA AGA GAA ACC CGA AG	61
18S	TAG AGC TAA TAC ATG CCG ACG TTA ATC ATG GCC TCA GTT CCG	56

Tabla 9. Cebadores de diseño propio y condiciones empleadas en la técnica de PCR.

Tª: Temperatura; NGAL: lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos; KIM-1: molécula de daño renal 1; 18S: fracción ribosomal 18S ARN.

9.4 PCR semicuantitativa

La técnica de PCR permite la amplificación de una determinada región de ADN gracias a la utilización de cebadores específicos que anillan a ambos flancos de dicha región y a la capacidad de una enzima ADN polimerasa para sintetizar ADN nuevo mediante la copia de la secuencia de dicha región gracias a la elongación de los cebadores (Bessman et al, 1958). Se denomina reacción en cadena porque esta copia se produce durante ciclos sucesivos, dando lugar a la amplificación exponencial del ADN (Mullis et al, 1986). Es posible realizarla tanto a partir de ADN genómico como de ADNc obtenido mediante la retrotranscripción del ARN.

Para llevar a cabo la reacción de PCR, en el caso de los cebadores caseros, se realizó sobre un volumen final de 50 µL. Se mezclaron 1 µL de ADNc previamente obtenido, 1 µL de dNTPs, 1 µL de cada cebador, 5 µL de tampón (que ya contiene Mg²⁺), 0,4 µL de FastStart Taq DNA polimerase (Roche) y 40,6 µL de H₂O mQ autoclavada. La reacción se realizó en un termociclador MyCycler (Bio-Rad) y se empleó el siguiente protocolo para llevar a cabo las diferentes etapas de la reacción: 5 minutos a 95 °C, n ciclos de 1 minuto a 95 °C + 1 minuto a la temperatura de anillamiento específica + 1 minuto a 72 °C. Donde n fue de 35 para NGAL, de 35 para KIM-1 y de 30 para 18S.

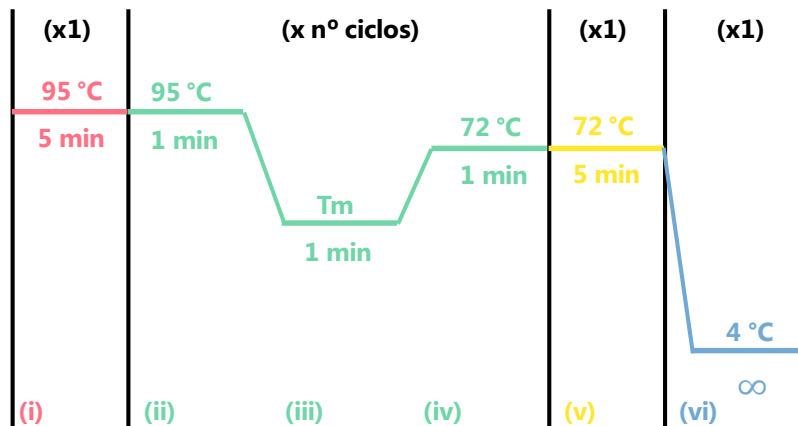


Figura 43. Protocolo empleado con las diferentes etapas de reacción. Tm: temperatura de anillamiento (del inglés *Temperature melting*).

Donde:

- (i) Fase de Inicio. Preparación del ADN polimerasa mediante activación por calor.
- (ii) Fase de Desnaturalización. Separación de las dos cadenas complementarias de DNA.
- (iii) Fase de alineamiento o unión de los primers. Se disminuye la temperatura para que los primers puedan unirse a su secuencia complementaria del ADN molde. La temperatura de unión o Tm (del inglés *Temperature melting*) depende del par de primers utilizado.
- (iv) Fase de extensión o elongación de la cadena. El ADN polimerasa sintetiza la cadena complementaria a partir del ADN molde, y partiendo de los primers como soporte inicial necesario para llevar a cabo el proceso.
- (v) Fase de Elongación final. Se lleva a cabo tras el último ciclo de PCR para asegurar que todas las cadenas de ADN simple sean ampliadas.
- (vi) Fase de conservación. Se mantienen las muestras a 4°C durante un tiempo indefinido para conservar la reacción a corto plazo.

Se utilizó como housekeeping la expresión de la fracción ribosomal 18S (del inglés, *ribosomal protein S18*).

Finalmente, para verificar que la PCR generó el fragmento de ADN previsto, se utilizó la técnica de electroforesis en gel de agarosa, que separa los fragmentos de ADN generados de acuerdo con su carga o longitud. Se cargaron en el gel las diferentes muestras a analizar (10 µL) y como referencia para conocer la longitud de

las bandas resultantes se cargó en un pocillo el marcador con tamaños ADN conocidas (2 μ L). Se aplicó un voltaje constante (~100-120 Voltios) mediante una fuente de alimentación y se detuvo cuando se estimó oportuno o bien cuando el frente de carrera llegó al final del gel. Se reveló el gel de agarosa en el transiluminador ImageQuant RT ECL GE Healthcare y las imágenes resultantes se cuantificaron mediante el programa Scion Image.

10. Recogida y análisis de muestras de orina de pacientes con DRA

Se recogieron muestras de orina de un total de 104 pacientes del servicio de nefrología del hospital "xxx" (xxx) con el fin de verificar los resultados obtenidos en el análisis de los biomarcadores de DRA de nuestros modelos animales. 86 pacientes con DRA; 6 pacientes como controles de enfermedad y 12 pacientes sanos. Todas las muestras de orina fueron recogidas a lo largo del tiempo en diferentes visitas, de manera que cada paciente tenía un máximo de 5 muestras.

Antes de la inclusión de los pacientes en el estudio, se informó de los objetivos de la investigación y se obtuvo el consentimiento informado debidamente cumplimentado y firmado. Las muestras de orina se recogieron en un contenedor estéril lambda-test, y se traspasaron posteriormente a un tubo vacuette, sin aditivos. Una alícuota se destinó a los análisis rutinarios, se realizó un análisis sistemático de orina y sedimento, por lo que se procesó según los protocolos internos de los laboratorios del hospital. El resto de la muestra se destinó a fines de la investigación. La orina se centrifugó durante 8 minutos a 600 g para descartar la fracción insoluble y se congeló en alícuotas a -80 °C hasta su análisis. Las muestras se almacenaron en el Biobanco del Hospital Universitario de Salamanca, cumpliendo la normativa europea "EU: 1997 European Convention on Human Rights and Biomedicine: The Council of Europe's Committee of Ministers' Recommendation (2006) 4 on research on biological materials of human origin, and the guidelines by The European Group on Ethics in Science and New Technologies", publicada el 21 de julio de 1998 con la designación "Ethical Aspects of Human Tissue Banking"; y el Real Decreto español 1716/2011 sobre Biobancos.

Las muestras de sangre fueron extraídas en tubos EDTA de 10 mL y solamente fueron analizadas en los laboratorios del hospital, por lo que se procesaron según sus protocolos internos y no se almacenaron en el Biobanco.

El servicio de nefrología en colaboración nos cedió los siguientes datos de los pacientes correctamente anonimizados, extraídos de la base de datos interna del hospital, con los que se pudo crear una base de datos para el estudio:

- Datos demográficos: sexo, edad, talla, peso y raza.
- Caracterización de la función renal: concentración de la creatinina plasmática y urinaria, concentración de la urea en el plasma y en la orina, proteinuria y estimación de la TFG.
- El diagnóstico establecido por el Servicio de Nefrología: etiología del DRA, así como tratamientos previos o coetáneos al estudio.

Además, se analizó la presencia de 9 de los marcadores estudiados en el modelo experimental animal mediante Western blot y/o ELISA.

11. Tratamiento de los datos y análisis estadístico

Todos los resultados se expresaron como la media \pm error estándar de la media (EEM). Se utilizaron entre 3 y 9 animales por cada grupo experimental.

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). En caso afirmativo se aplicaron los test estadísticos paramétricos oportunos. Se utilizó el test estadístico de análisis de la varianza (ANOVA) para determinar las diferencias significativas entre más de dos grupos de datos y/o en un mismo grupo experimental en los diferentes días de tratamiento, y el test estadístico t de Student para determinar la existencia de diferencias significativas entre dos grupos de datos en un mismo día de estudio. Consideramos significativo un valor de $p < 0,05$ y altamente significativo un valor de $p < 0,01$. En caso de encontrar diferencias significativas en el estudio del ANOVA, empleamos para las comparaciones "post hoc" el test de Dunnet para comparar cada uno de los diferentes grupos de estudio con el grupo control o para comparar dentro de un mismo grupo experimental los diferentes días con su respectivo día basal y el test de Turkey para comparar dos grupos en un mismo día de tratamiento.

En el caso en el que los conjuntos de datos no presentaran una distribución normal, se utilizaron los test estadísticos no paramétricos. Se empleó el test de Kruskal-Wallis para comparar los grupos de estudio con el grupo control y en un

mismo grupo los diferentes días de tratamiento con su respectivo basal, y el test de Man-Whitney para comparar dos grupos en un mismo día de tratamiento. En este caso 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 Microsoft Excel 2016 y GraphPad Prism 6.0.

12. Reactivos, materiales y equipos

12.1 Reactivos y productos

Reactivo / Producto	Referencia	Casa comercial
Aceite mineral	141003.1211	Panreac
Acetonitrilo	271004	Sigma-Aldrich
Ácido acético	71251	Sigma-Aldrich
Ácido trifluoroacético	T62200	Sigma-Aldrich
Albúmina bovina sérica	0332	VWR Life Science
Albúmina ELISA kit	E-110-1-25-17	Bethyl Laboratories
Aprotinina	A-1153	Sigma-Aldrich
APS (persulfato de amonio)	A3678	Sigma Aldrich
Azida sódica	6688	Merck
Azul de bromofenol	B8026	Sigma Aldrich
Capilares heparinizados	7301	Deltalab
Cebadores qPCR	-	Isogen Life Science
Colorante Sypro ruby	S4942	Sigma Aldrich
Cubreobjetos	200x200	Thermo Fischer Scientific
DC Protein Assay (lowry)	5000112	Bio-Rad
Dieta estandarizada	-	Panlab
DMSO (dimetil sulfósido)	154938	Sigma Aldrich
dNTPs	11277049001	Roche
Dodecil sulfato sódico 20 % (SDS)	161-0418	Bio-Rad
Dolethal	3064369	Vetoquinol

EDTA (etilendiaminotetracético)	E5134	Sigma-Aldrich
ELISA angiotensina I	DB52011	IBL
Eosina surgipath	353501601	Casa Álvarez
Etanol 95 %	100983	Merk
Filtros amicon	H3569	Millipore
Formaldehído	252931.12.14	Panreac
Furosemida	F4381	Sigma Aldrich
Gamma-glutamyl-transferase activity colorimetric Assay	K784-100	BioVision
Gentamicina	G3632	Sigma Aldrich
Glicerol	D4751	Sigma Aldrich
Glicerol	G5516	Sigma-Aldrich
Gltutathione-S-transferase fluorescent activity kit	K008F1	Arbor Assays
HCl	H/1200/PB15	Thermo Fischer Scientific
Hematoxilina de Harris	10-2332	Casa Álvarez
Heparina 5 %	6547533	Hospira
Igepal CA630	13021	Sigma Aldrich
Iodoacetamida	I1149	Sigma-Aldrich
iScript RT Supermix	170-8841	Bio-Rad
Isoflorano (IsoFlo)	34009XU	Esteve
Jeringuillas 1 mL	9161406V	Braun
Ketamina	CN776211H	Pfizer
Kit comercial clean up	80-6484-51	GE Healthcare
Kit comercial NAG	DZ062A-K	Diazyme Laboratories
Leche en polvo	M-7409	Sigma Aldrich
Leupeptina	L-2023	Sigma-Aldrich
Luminol	A8511	Sigma Aldrich
Marcador pesos moleculares PageRulerTM	26616	Thermo Fisher Scientific
Material quirúrgico	-	Fine Science Tools (FST)
Medio de montaje DPX	10-8500	Casa Álvarez
Membrana de PVDF	IPVH00010	Millipore
Metanol	20846.292	VWR Chemicals
Na₃VO₄	S-6508	Sigma-Aldrich

NaCl	S3014	Sigma-Aldrich
NaF	56776	Sigma-Aldrich
NAG kit colorimétrico	DZ-062AK	Dyazime Laboratories
NGAL ELISA kit	KIT 037	BioPorto
NH4H2PO4	NIST194A	Sigma-Aldrich
NH4HCO3	09830	Sigma-Aldrich
NucleoSpin® RNA II	T40955	Machery Nagel
Parafina	-	Casa Álvarez
Película fotográfica	47410	Fuji Medicals
Peróxido de hidrógeno	H6520	Sigma Aldrich
p-iodofenol	I10201	Sigma-Aldrich
PMSF (fluoruro de fenilmetil sulfonilo)	P-1585	Sigma-Aldrich
Portaobjetos	76x26	Thermo Fischer Scientific
Puntas micropipeta con filtro	-	Neptune
Puntas micropipeta sin filtro	2000/80 /16	Deltalab
QuantiChrom™ Creatinine Assay Kit	DICT-500	BioAssay Systems
QuantiChrom™ Protein Assay Kit	QCPR-500	BioAssay Systems
QuantiChrom™ Urea Assay Kit	DIUR-500	BioAssay Systems
Quantichrom™ kit creatinina	DICT-500	BioAssay Systems
Quantichrom™ kit proteínas	QTPR-100	BioAssay Systems
Quantichrom™ kit urea	DIUR-500	BioAssay Systems
SDS	1614363	Sigma-Aldrich
Supermix IQTMSYBR® Green	170-8882	Bio-Rad
Sutura 4/0 absorbible	CO765073	Braun
Sutura 5/0 no absorbible	CO765074	Braun
Sutura 6/0 no absorbible	CO765075	Braun
TEMED (tetrametil-etilendiamina)	142093	Panreac
Tripsina porcina	V5111	Promega
Tris Base	Tris-RO	Roche
Tris-Glicina 10x	1610771	Biorad
Tris-HCL	RES3098T	Sigma-Aldrich

Tubos de plástico de 10 y 15 mL	4092.7N	Deltalab
Tubos de plástico de 15 y 50 mL	-	Corning
Tween-20	P7949	Sigma-Aldrich
Urea	86180	Sigma-Aldrich
Xilacina	CN5721262	Bayer
β-mercaptoetanol	M6250	Sigma-Aldrich

Tabla 10. Relación de productos y reactivos utilizados.

12.2 Equipos y aparatos

Equipos / Aparatos	Casa comercial
Agitador	Grant BOEKEL
Agitador rotatorio	Biocomp Navigator
Aparato IPGphor	GE Healthcare
Baño húmedo	Indelab
Baño seco	Termolyne, modelo 17600
Bomba de infusión	Dinko Instrumentes
Cassette de revelado	Amersham
Centrífuga de vacío	Biogen
Centrífugas	Eppendorf
Cepos rata	Panlab
Cubeta SE 600 Ruby	GE Healthcare
Equipo de Western blot Mini-Protean®III	Bio-Rad
Escáner	Canon
Escáner Ettan DIGE imager	GE Healthcare
Estufa	BioTek
Fuente de alimentación Power Pac 3000	Bio-Rad
Jaulas metabólicas	Panlab
Lector de placas ELISA	BioTek
Máquina anestesia inhalatoria	MSS Isoflurane
Máquina de revelado Medical X Ray Processor	Kodak

Microscopio confocal	Carl Zeiss
Microscopio de fluorescencia Axiovert 200M	Carl Zeiss
MyCycler™ Bio-Rad	Bio-Rad
Nanodrop (ND-1000)	Thermo Fisher Scientific
Osmómetro	Gonotec
Politrón Ultra-turrax T8	IKA Labortechnik
Sonda flujómetro	Transonic
Soporte agitador rotatorio	Biocomp Navigator
Termociclador iQ™ 5	Bio-Rad
Ultracongelador	Thermo Fisher Scientific

Tabla 11. Relación de equipos y aparatos utilizados.

12.3 Programas informáticos

Programas / Softwares informáticos	Casa comercial
Adobe Photoshop 7.0	Adobe
DP Controller	Olympus
Fiji (Image j)	Fiji
Gen 5.0	Bio-Tek
GraphPad Prism 6	GraphPad
Image Pro Plus	Media Cybernetics
Mendeley Desktop	Mendeley
Microsoft Excel 2016	Microsoft
Microsoft Power Point 2016	Microsoft
Microsoft Word 2016	Microsoft
Primer Blast	NCBI (National Center for Biotechnology Information)
Scion Image	Scion Corporation

Tabla 12. Relación de programas informáticos utilizados.

"Duda siempre de ti mismo, hasta que los datos
no dejen lugar a dudas"

Louis Pasteur

Resultados y discusión

BLOQUE I: DIAGNÓSTICO TEMPRANO Y ETIOLÓGICO DE DRA EN ANIMALES

El diagnóstico actual del DRA se realiza mediante la medida de la CrP y el flujo urinario y así se ha mantenido durante décadas. Sin embargo, estos marcadores muestran escasa sensibilidad y especificidad a la hora de marcar cambios agudos en la función renal (Urbschat y cols., 2011). La CrP presenta varias limitaciones para el diagnóstico fiable del DRA, entre los que cabe destacar el hecho de que, ante un descenso agudo de la TFG, los valores de CrP no se elevan hasta que la pérdida de la función renal es superior al 65%, (Prasad Devarajan, 2008a, 2011; Eknayan y cols., 2004). Otras limitaciones son la gran variabilidad que presentan los niveles de la CrP en función del sexo, edad, dieta, masa muscular, entre otros (Dirkes, 2011), y de la existencia de fármacos capaces de alterar sus niveles normales (Bagshaw & Bellomo, 2007).

Las carencias de marcadores sensibles y específicos junto con el progreso de la proteómica han promovido la búsqueda de nuevos marcadores que permitan detectar la enfermedad de forma más precoz y específica así como caracterizar el proceso fisiopatológico subyacente (Prasad Devarajan, 2008b; Smith, Banks, Wood, Lewington, & Selby, 2009). Simultáneamente, el potencial de estos marcadores para estratificar el riesgo de forma preventiva, esclarecer la causa principal del DRA, los mecanismos implicados en cada caso, tomar decisiones clínicas informadas y guiar el tratamiento farmacológico de los pacientes, ha llevado a la Sociedad Americana de Nefrología a designar el desarrollo de nuevos marcadores de daño renal agudo como una prioridad de la investigación (Siew, Ware, & Izkizler, 2011).

La respuesta en pocos años dio como resultado la identificación de una gran cantidad de potenciales marcadores del DRA en humanos. Algunos de los más prometedores incluyen la lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL) (Mishra y cols., 2005), la molécula de lesión renal 1 (KIM-1) (Won K. Han, Bailly, Abichandani, Thadhani, & Bonventre, 2002; Ichimura y cols., 1998), la cistatina C (Åhlström, Tallgren, Peltonen, & Pettilä, 2004), IL-18 (Parikh, Jani, Melnikov, Faubel, & Edelstein, 2004), la proteína de unión a ácidos grasos de hígado (L-FABP) (Tokunori Yamamoto y cols., 2007), IL-6 (Nechemia-Arbely y cols., 2008), glutatión S-transferasa (GST) (Sundberg, Appelkvist, Bäckman, & Dallner, 1994), y la N-acetil-β-D-glucosaminidasa (NAG) (O. Liangos y cols., 2007). Sin embargo, esta validación, desde nuestro punto de vista, no se realiza con el enfoque adecuado pues hasta la fecha no

se conoce un solo marcador que sea capaz de cubrir por sí mismo todas las necesidades que se plantean si no que es necesario visualizar la información de todos los marcadores de forma conjunta, ya que muy probablemente cada marcador proporciona información específica y no redundante.

Es precisamente este objetivo el que impulsa la búsqueda de una relación firme entre el grado de excreción urinario de un conjunto de 14 marcadores, escogidos de la bibliografía o identificados por nuestro grupo de investigación, y la causa que desencadenó el DRA. Esto se traduce en el establecimiento de una "huella de marcadores", que sea única y exclusiva de cada situación nefrotóxica. Esto sería de gran utilidad en aquellas situaciones clínicas en las que en un mismo paciente convergen a la vez diferentes fármacos o procedimientos potencialmente nocivos para los riñones, pues con el panel de marcadores seríamos capaces de diagnosticar, no sólo más precozmente el DRA, sino la causa responsable y de esta forma poder ajustar el tratamiento apropiadamente. Este punto es imprescindible pues el DRA es un proceso dinámico y puede evolucionar de un estadio a otro más grave, y de una forma de DRA a otra.

Nos hemos centrado en el estudio de la excreción urinaria de 14 biomarcadores que pueden ser útiles para la práctica clínica como son: los anteriormente citados (NGAL, KIM-1, NAG, FABP1 y GST), nuevas incorporaciones (PAI-1, Fetuina A, GGT, albúmina, BMP7) y los identificados por nuestro grupo (GM2AP, t-gelsolina, TCP-1 y Reg IIIb). Hay que recalcar que la huella proteica se estudió en la orina pues es una muestra biológica fácil de obtener de forma no invasiva y no traumática. Un aspecto clave y que en nuestro laboratorio defendemos, es la gran utilidad que tiene la orina para el diagnóstico y monitorización en el DRA. Se evita por tanto la extracción de sangre y la ansiedad que ello conlleva para algunos pacientes, lo que se conoce como hematófobia, así como la mayor complejidad de su obtención y preservación. Además, la recogida de muestras de orina es un método positivamente valorado por la mayoría de los pacientes. Y, con vistas al futuro, es también una muestra ideal para el análisis de rutina, que podría llegar a realizarlo incluso el propio paciente en su domicilio, una vez desarrollados sistemas diagnósticos apropiados y las aplicaciones de telemedicina necesarias para el envío de los datos a los profesionales sanitarios.

La diferenciación entre un DRA pre-renal y un DRA intrínseco es complicada en la práctica clínica debido a que el DRA puede ser multifactorial y no existen

parámetros diagnósticos diferenciales lo suficientemente fiables, pero tiene gran trascendencia terapéutica y pronóstica. En ciertas enfermedades, como en la isquemia, el DRA pre-renal es la antesala de la aparición de una necrosis tubular aguda (Arias Rodríguez y cols., 2013). En este contexto, en esta tesis doctoral se utilizaron 5 modelos animales de DRA de tipo renal (explicados en la sección de Métodos) y un modelo animal de DRA tipo pre-renal denominado Triple Whammy (Prieto-García y cols., 2016)*. Son animales que recibieron una administración conjunta de tres tipos de fármacos que alteran el estado hemodinámico sistémico y renal. Esta triple terapia consiste en un AINE (Ibuprofeno 400 mg/kg/día) + un diurético (Furosemida 20 mg/kg/día) + un inhibidor de la angiotensina II (Trandolapril 0,7 mg/kg/día). El objetivo de introducir este modelo animal puro de DRA pre-renal es analizar si la huella proteica es capaz de diferenciar un tipo de DRA del otro.

*Resultados que dieron lugar a la Tesis Doctoral "Caracterización fisiopatológica de un modelo experimental de daño renal agudo triple Whammy: diagnóstico diferencial y preventivo", presentada por Laura Prieto García el 26 de Julio de 2017 en la Universidad de Salamanca.

1. Caracterización de los modelos experimentales animales de daño renal agudo

Con estos antecedentes, se quiso analizar el patrón de aparición de los marcadores en tres modelos animales de DRA intrínseco por tóxicos: gentamicina 150 mg/kg/día (Quiros y cols., 2010a), cisplatino 5 mg/kg (Vicente-Vicente y cols., 2010a) y nitrato de uranilo 5 mg/kg (Vicente-Vicente y cols., 2010b), en dos modelos animales de DRA intrínseco por condiciones lesivas: la isquemia renal (García-Criado y cols., 1998b) y la sepsis, y en un modelo animal de DRA pre-renal. Sin embargo, a pesar de ser modelos animales que reproducen bastante bien el DRA visto en clínica, previo al análisis de los marcadores urinarios, se caracterizó la función renal de los 6 modelos experimentales, aspecto importante a la hora de determinar si los modelos cumplían las características de daño renal previamente descritas por nuestro grupo.

1.1 Caracterización de la función renal

1.1.1 Análisis de la creatinina y de la urea plasmática

Para este fin, se ha usado el criterio de diagnóstico internacional. La creatinina es un producto derivado del metabolismo muscular. Se sintetiza y se libera al plasma de forma bastante constante, ya que la síntesis disminuye cuando los niveles en el plasma aumentan (probablemente debido al retrocontrol). Así, la concentración plasmática de creatinina no varía demasiado en un individuo sano, aunque sí existen pequeñas variaciones circadianas con valores más altos por la tarde (Finco, Brown, Barsanti, Bartges, & Cooper, 1997). Por su parte, la urea es una molécula tóxica resultante de la degradación de los compuestos nitrogenados del organismo.

La figura 44 representa el análisis de la creatinina (a y b) y de la urea plasmática (c y d) a lo largo del tiempo. La exposición a una dosis de 150 mg/kg/día de gentamicina, y 5 mg/kg de cisplatino o nitrato de uranilo indujo un incremento significativo de la concentración de creatinina (panel a) y urea (panel c) en la sangre. Estos incrementos de creatinina y urea plasmáticas también se aprecian en los modelos de DRA inducidos por condiciones lesivas para el riñón: isquemia y sepsis (paneles b y d). Finalmente, en el modelo de DRA pre-renal, la triple terapia también produce un aumento claramente significativo de la creatinina y de la urea plasmática.

Estos resultados son similares a los obtenidos previamente en nuestro laboratorio en experimentos realizados también en ratas Wistar donde el tratamiento con gentamicina (Quiros y cols., 2016) y cisplatino (Vicente-Vicente y cols., 2015), o los resultados de otros laboratorios en cuanto al nitrato de uranilo (Mahmood & Waters, 1980) e isquemia renal (Shokeir y cols., 2012) produjeron también aumentos semejantes en la concentración plasmática de creatinina y urea. Nuestros resultados nos indican la presencia de un fallo en la función renal de los animales que hace que sean incapaces de eliminar estos compuestos nitrogenados de su organismo. Sin embargo, en los respectivos grupos controles estos marcadores no están alterados.

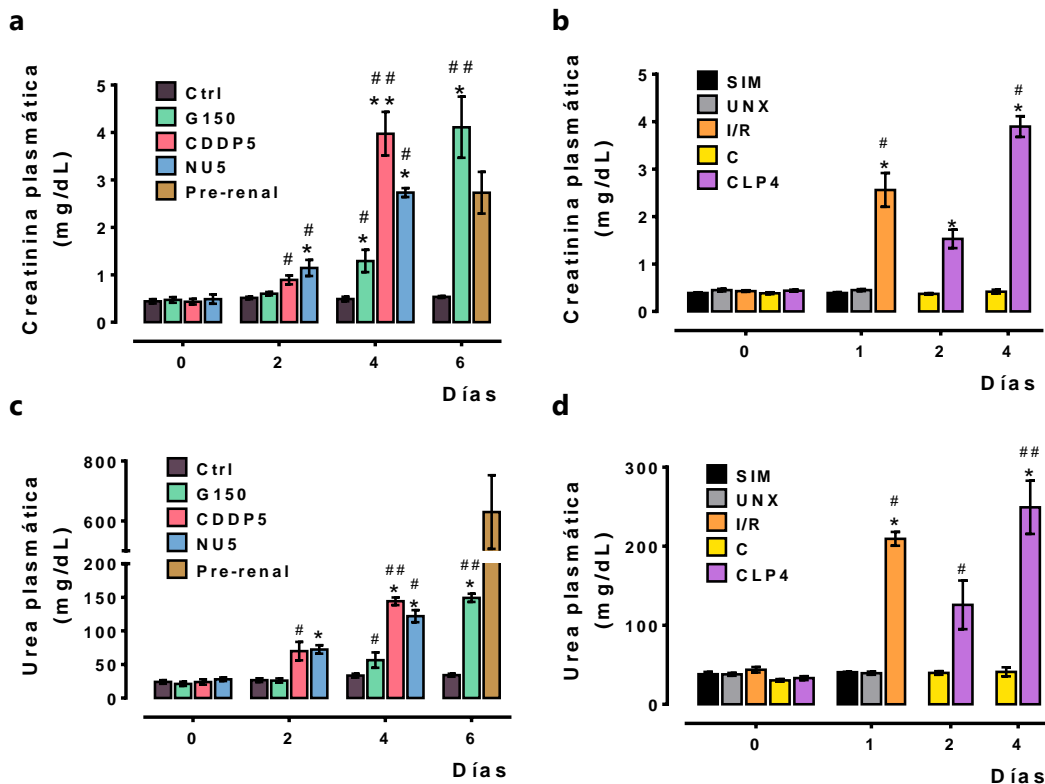


Figura 44. Evolución temporal de la creatinina plasmática (a y b) y de la urea plasmática (c y d). Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (EEM). Control (Ctrl, n=5), gentamicina 150 mg/kg (G150, n=6), cisplatino 5 mg/kg (CDDP5, n=4), nitrato de uranilo 5 mg/kg (NU5, n=4), simulado (SIM, n=4), uninefrectomizado (UNX, n=5), isquemia-reperfusión 60 minutos (I/R, n=5), control (C, n=5), punción y ligadura cecal (CLP4, n=5) y Triple Whammy (pre-renal, n=10). * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$: G150, CDDP5 y NU5 vs grupo Ctrl, I/R vs UNX y CLP4 vs C en el mismo día; # $p < 0,05$ y ## $p < 0,01$ respecto a la muestra basal del grupo.

1.1.2 Medida de la tasa de filtración glomerular

El diagnóstico de daño renal basado en la concentración plasmática de creatinina y urea, no es siempre un índice fidedigno de la cuantía de la reducción del filtrado glomerular (Gault, Longerich, Harnett, & Wesolowski, 1992). Por ello se decidió valorar el aclaramiento de creatinina como índice más fiable para la cuantificación del filtrado glomerular.

Se observa cómo en los grupos Ctrl, SIM, UNX y C no hay modificaciones en el aclaramiento de creatinina durante el periodo experimental, mientras que en los grupos expuestos a los nefrotóxicos existe una disminución gradual del aclaramiento de creatinina (panel a). Estos resultados son coincidentes con otros estudios en los que también se ha observado disminución del ClCr por exposición aguda a estos fármacos (Mahmood & Waters, 1980; Quiros y cols., 2010a). Esta disminución también se observa en los modelos de isquemia renal y sepsis (panel b). En el grupo pre-renal la TFG se reduce un 90% respecto a su basal.

En todos los casos la disminución del aclaramiento de creatinina se asocia con el aumento de la creatinina plasmática. Existe una relación inversa entre la TFG (medida como el aclaramiento de creatinina) y la CrP. Sin embargo, se sabe que una reducción del 65% de la TFG no da lugar a un aumento de la creatinina plasmática, situación que se observa ya en el día 2 de los animales tratados con gentamicina (figura 45). Estos datos verifican que es necesario que la TFG se reduzca un 60-70% para que la creatinina plasmática comience a aumentar en el plasma (Thomas y cols., 2015a).

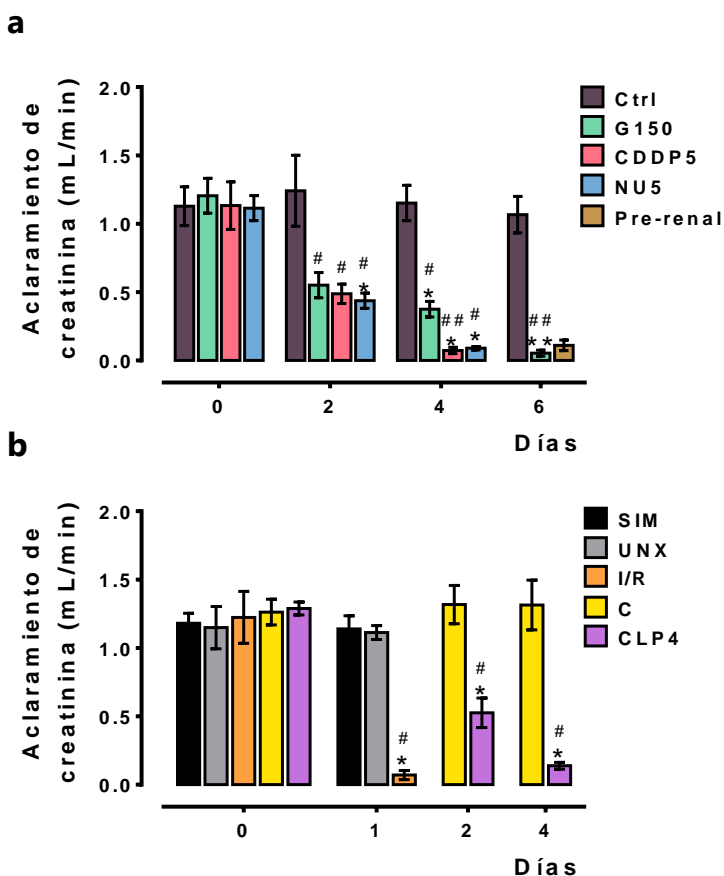


Figura 45. Evolución temporal del aclaramiento de creatinina. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (EEM). Control (Ctrl, n=5), gentamicina 150 mg/kg (G150, n=6), cisplatino 5 mg/kg (CDDP5, n=4), nitrato de uranilo 5 mg/kg (NU5, n=4), simulado (SIM, n=4), uninefrectomizado (UNX, n=5), isquemia-reperfusión 60 minutos (I/R, n=5), control (C, n=5), punción y ligadura cecal (CLP4, n=5) y Triple Whammy (pre-renal, n=10). * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$: G150, CDDP5 y NU5 vs grupo Ctrl, I/R vs UNX y CLP4 vs C en el mismo día; # $p < 0,05$ y ## $p < 0,01$ respecto a la muestra basal del grupo.

Estas 6 situaciones de daño renal reproducen experimentalmente el DRA, definido por un incremento de la urea y creatinina plasmática, acompañado de una disminución de la TFG. Estos aspectos analizados nos informan de que nuestros modelos animales son adecuados para estudiar el patrón de aparición de los biomarcadores urinarios de daño renal, objetivo final de este trabajo.

1.2 Caracterización del tipo de DRA

Para caracterizar el tipo de DRA se utilizó el análisis de la proteinuria, la razón CrU/CrP, la excreción fraccional de sodio, y fundamentalmente el análisis histológico con tinción hematoxilina eosina (H&E). Estos estudios nos permitieron concretar si la causa del DRA se debía a una lesión vascular, glomerular, intersticial o necrosis tubular aguda.

1.2.1 Concentración de proteínas en la orina

La proteinuria, es decir, la elevada excreción urinaria de proteínas es también un índice de daño renal. Puede deberse tanto a un daño tubular que altere los mecanismos de reabsorción de las proteínas, como a una alteración en la barrera de filtración glomerular, que tenga como consecuencia un aumento de la permeabilidad a las proteínas, o también a una combinación de ambos mecanismos (Emeigh Hart, 2005). En la NTA, el tipo de daño más común de DRA de tipo renal, diferentes elementos nocivos pueden provocar la muerte de las células del sistema tubular de la nefrona, por lo que se produce una disminución en la reabsorción tubular y como consecuencia, aparece proteinuria.

El rango normal de excreción urinaria de proteínas en una rata de laboratorio se encuentra alrededor de los 5 mg/día. Este parámetro puede aumentar hasta 10 veces en modelos de necrosis tubular. En la figura 45 panel a se observa que la proteinuria en los animales tratados con los nefrotóxicos presenta unos valores 7 veces superiores que los del grupo control. Según los datos de la literatura existente, la proteinuria que producen estos tres fármacos parece tener un origen tubular, es decir, parece deberse a una reducción de la reabsorción tubular de las proteínas filtradas (Bulacio & Torres, 2013; Martínez-Salgado, López-Hernández, & López-Novoa, 2007b). En contraposición, en el modelo de DRA pre-renal observamos una disminución de la excreción de proteínas respecto al control, fundamentalmente por el AINE. Múltiples estudios describen el efecto anti-proteinúrico de los AINEs (Sarafidis, Alexandrou, & Ruilope, 2017; Vogt, Laverman, & Navis, 2010).

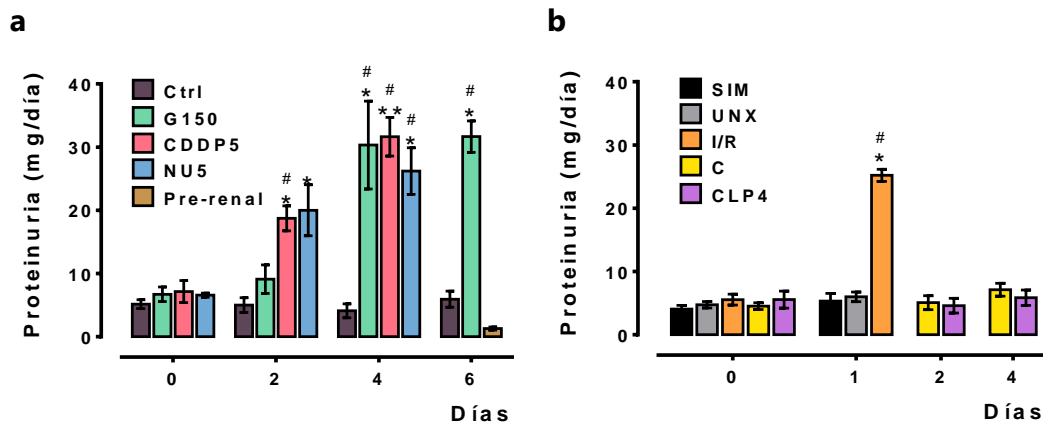


Figura 46. Excreción urinaria temporal de proteínas. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (EEM). Control (Ctrl, n=5), gentamicina 150 mg/kg (G150, n=6), cisplatino 5 mg/kg (CDDP5, n=4), nitrato de uranilo 5 mg/kg (NU5, n=4), simulado (SIM, n=4), uninefrectomizado (UNX, n=5), isquemia-reperfusión 60 minutos (I/R, n=5), control (C, n=5), punción y ligadura cecal (CLP4, n=5) y Triple Whammy (pre-renal, n=10). * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$: G150, CDDP5 y NU5 vs grupo Ctrl, I/R vs UNX y CLP4 vs C en el mismo día; # $p < 0,05$ y respecto a la muestra basal del grupo.

En el panel b se observa la proteinuria de los modelos de daño renal inducido por la isquemia y la sepsis. La gran diferencia con los modelos animales nefrotóxicos es que en la sepsis no se produce aumento de este parámetro. Existen numerosos estudios que demuestran que el modelo animal de punción y ligadura cecal no tiene elevados los niveles de proteinuria (Holly y cols., 2006), debido a que probablemente el daño hemodinámico que se observe sea mayor que el daño estructural. En contraposición, en la isquemia renal sí se observa un incremento de 5 veces en los niveles de proteínas en la orina respecto a su basal, debido a que, como veremos en el apartado 1.2.3, posee una NTA masiva en su zona cortical interna, por lo que la reabsorción tubular está comprometida.

1.2.2 Excreción fraccional de sodio (EFNa)

El DRA se caracteriza por la incapacidad de regular la homeostasis del organismo (equilibrio ácido-base e hidro-electrolítico) y su análisis puede ayudar a determinar el tipo de DRA. En el DRA de tipo renal la alteración de este equilibrio es

consecuencia de un daño en las estructuras de la nefrona, mientras que en el DRA de tipo pre-renal su modificación es debida a un cambio en los mecanismos de regulación de la homeostasis del organismo.

La excreción fraccional de sodio es una variable útil para evaluar la integridad tubular. Como se puede observar en la tabla 13, en individuos sanos la EFNa es inferior al 1 %, al igual que en un DRA de tipo pre-renal, lo que indica un funcionamiento normal de los mecanismos recaptadores de Na⁺ a lo largo de la nefrona, y por extensión, del funcionamiento y la homeostasis tubular, ya que el funcionamiento de la mayoría de los transportadores tubulares está directa o indirectamente acoplado al de los otros. Sin embargo, este valor aumenta por encima del 1 % con un DRA de tipo renal, debido a que las células tubulares dañadas son incapaces de reabsorber correctamente dicho electrolito.

En las ratas, el valor normal de EFNa se sitúa en torno del 0,5% (Quiros y cols., 2010b). En la siguiente tabla se muestran los valores de la EFNa del grupo de animales control, de un modelo de DRA de tipo renal y del modelo de DRA de tipo pre-renal. Los resultados del resto de los modelos animales de DRA renal tratados en esta tesis no se muestran, aunque en todos ellos la EFNa está por encima de 1.

Grupo Experimental	EFNa (%)
Ctrl	0,52 ± 0,03
NTA (G150)	1,15 ± 0,10 *
Pre-renal (Triple Whammy)	0,55 ± 0,11

Tabla 13. Excreción fraccional de sodio en un modelo de NTA y uno pre-renal, en el momento de máximo daño. NTA: necrosis tubular aguda; EFNa: excreción fraccional de sodio. Los datos representan la media ± el error estándar de la media (EEM). Control (Ctrl, n=5), gentamicina 150 mg/kg (G150, n=6) y Triple Whammy (pre-renal, n=5). Diferencias estadísticas: *p<0,05: G150 vs grupo Ctrl.

1.2.3 Diagnóstico diferencial del DRA: CrU/CrP

Un punto clave en el diagnóstico diferencial de las dos formas de DRA (pre-renal y renal) radica en pruebas analíticas sencillas en sangre y orina, que, de forma directa o con diferentes índices diagnósticos indican un origen pre-renal cuando el sodio urinario sea inferior a 20 mEq/L, la excreción fraccional de sodio inferior a 1% o el cociente creatinina urinaria/plasmática sea superior a 20. Por el contrario, en presencia de una NTA, el sodio urinario es habitualmente superior a 40 mEq/L, la EFNa superior a 1% y el cociente creatinina urinaria/plasmática es inferior a 15 (Arias Rodríguez y cols., 2013; Monedero y cols., 2011).

Es lógico pensar que en el DRA, cuando la función renal está comprometida debido a la administración de diferentes tóxicos o condiciones lesivas, la relación creatinina urinaria y creatinina plasmática disminuye debido a la acumulación de la creatinina en sangre. Sin embargo, esta disminución se produce de una forma diferente en el DRA renal y en el pre-renal. En la figura 47 podemos observar como los valores del cociente CrU/CrP de los animales tratados con gentamicina, cisplatino, nitrato de uranilo, isquemia renal y sepsis tienen un cociente inferior a 15, lo que nos indica que estamos en un DRA de tipo renal concretamente debido a una NTA. Sin embargo, los animales tratados con la triple terapia tienen un cociente CrU/CrP superior a 20, que nos indica un DRA de tipo pre-renal. En contraposición, los 4 grupos experimentales controles (Ctrl, SIM, UNX y C) poseen un cociente superior a 300, lo que nos indica que la función renal está intacta.

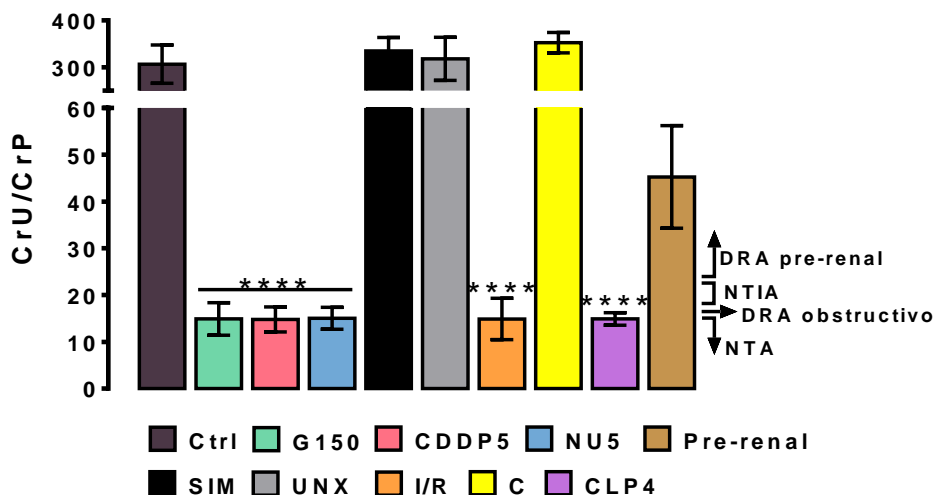


Figura 47. Cociente CrU/CrP en el momento de máximo daño renal como parámetro de diagnóstico diferencial del DRA. CrU: creatinina urinaria; CrP: creatinina plasmática; NTA: necrosis tubular aguda; NTIA: nefritis tubulointersticial aguda; DRA: daño renal agudo. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (EEM). Control (Ctrl, n=5), gentamicina 150 mg/kg (G150, n=6), cisplatino 5 mg/kg (CDDP5, n=4), nitrato de uranilo 5 mg/kg (NU5, n=4), simulado (SIM, n=4), uninefrectomizado (UNX, n=5), isquemia-reperfusión 60 minutos (I/R, n=5), control (C, n=5), punción y ligadura cecal (CLP4, n=5) y Triple Whammy (pre-renal, n=10). ****p<0,0001: G150, CDDP5 y NU5 vs grupo Ctrl, I/R vs UNX y CLP4 vs C en el momento de máximo daño renal.

Estas diferencias se deben a la integridad tubular y de los mecanismos de concentración en el caso del DRA pre-renal, lo que permite al riñón reabsorber, especialmente en el túbulo proximal, el escaso sodio que le llega y concentrar la orina. Además, la lesión de las células tubulares y la pérdida de la tonicidad medular explican, a su vez, los hallazgos observados en la mayoría de las NTA. En clínica, cuando se descarta el origen hemodinámico puro del DRA, es decir, un caso de DRA pre-renal, la atención se dirige hacia una etiología medicamentosa o tóxica, aspecto que desarrollaremos más extensamente en el apartado 2.

1.2.4 Estudio histológico del riñón

La tinción con hematoxilina y eosina de los cortes de tejido renal nos permite determinar visualmente si existen alteraciones histológicas muy evidentes de sus estructuras. De esta técnica escapa el análisis más fino de posibles modificaciones sutiles, aunque sí proporciona una evaluación histológica general. Dado que, en la mayoría de los casos y tipos de DRA, la mayor parte del daño se localiza en las zonas cortical y corticomedular, se han analizado y fotografiado estas dos regiones, aunque se ha descartado visualmente el daño en las zonas más profundas.

En nuestros experimentos (figura 48), se puede comprobar que los tres nefrotóxicos utilizados a estas dosis produjeron una necrosis tubular masiva, caracterizada por una pérdida de la integridad de las células epiteliales y por una acumulación de restos celulares en el lumen tubular que llegan a formar cilindros de material hialino que obstruyen los túbulos. En cambio, en el modelo de Triple Whammy no se produce ninguna alteración ni en la corteza externa ni en la médula externa.

En la figura 49 observamos que mientras que en los grupos experimentales SIM y UNX no se observan alteraciones en el riñón, en el grupo de I/R existe una NTA masiva en la zona medular externa con obstrucción tubular por material hialino en los túbulos más distales localizados en la zona medular (no se muestra). En los animales con sepsis también se observa un daño tubular en la misma área, aunque ligeramente inferior al observado en la I/R.

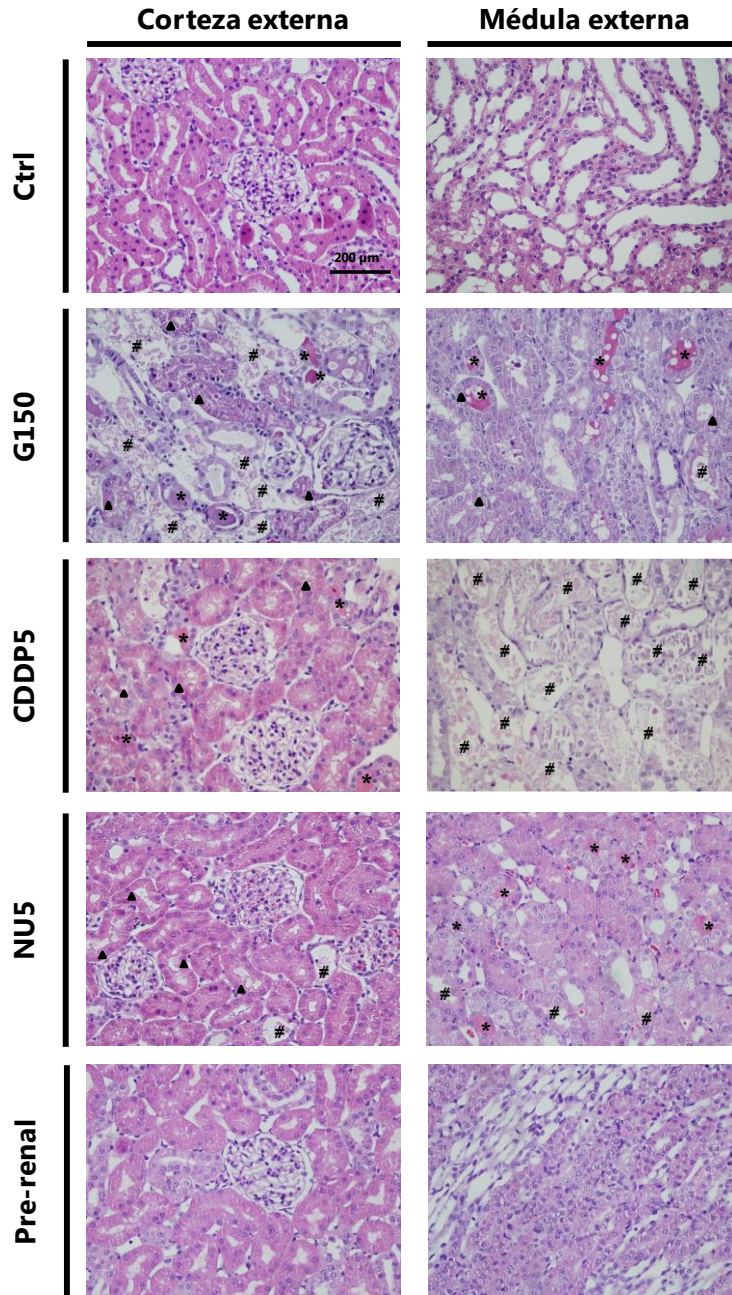


Figura 48. Imágenes representativas (400X) de cortes histológicos de la zona cortical externa e interna teñidos con hematoxilina y eosina. Control (Ctrl, n=3), gentamicina 150 mg/kg (G150, n=3), cisplatino 5 mg/kg (CDDP5, n=3), nitrato de uranilo 5 mg/kg (NU5, n=4) y Triple Whammy (Pre-renal; n=3). Los * simbolizan cilindros hialinos o casts, los triángulos señalan fenómenos de vacuolización y las # representan desepitelización y NTA.

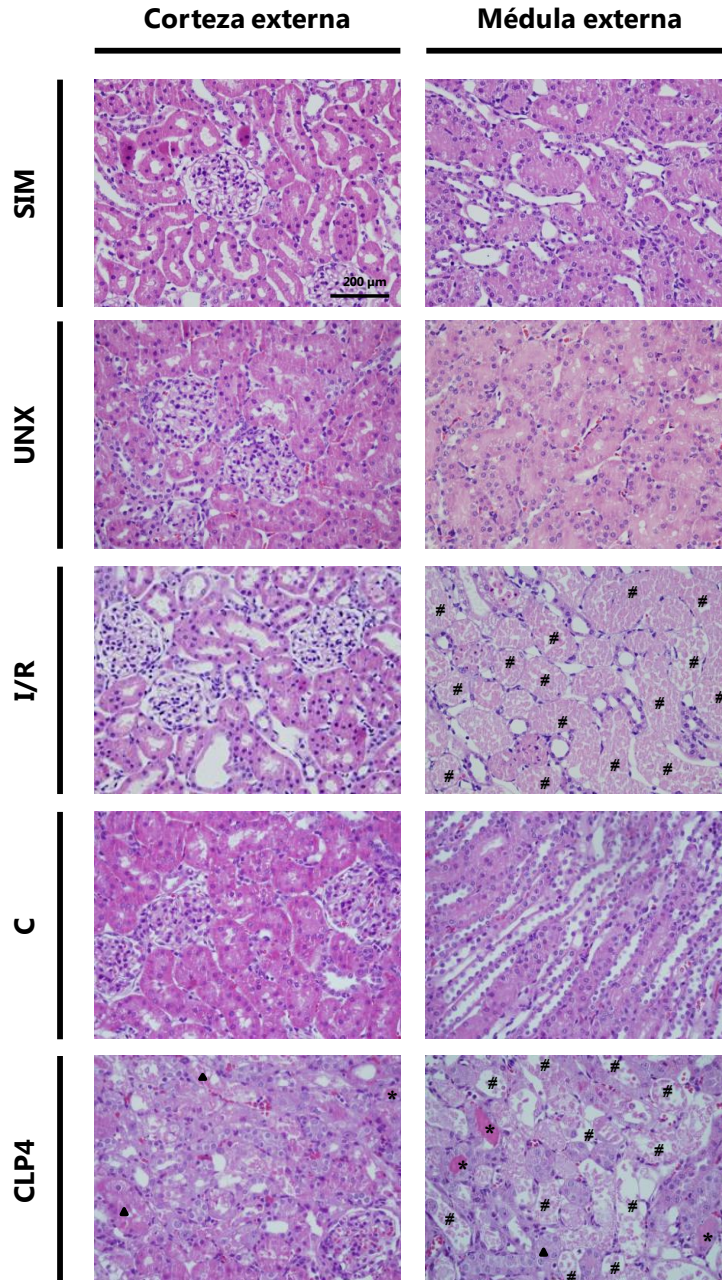


Figura 49. Imágenes representativas (400X) de cortes histológicos de la zona cortical externa e interna teñidos con hematoxilina y eosina. Simulado (SIM, n=4), uninefrectomizado (UNX, n=4), isquemia-reperfusión 60 minutos (I/R, n=4), control (C, n=4), punción y ligadura cecal (CLP4, n=4). Los * simbolizan cilindros hialinos o casts, los triángulos señalan fenómenos de vacuolización y las # representan desepitelización y NTA.

En resumen, podemos confirmar que estamos ante 5 modelos animales experimentales de DRA de tipo renal o intrínseco, y uno de DRA pre-renal. Los 5 grupos presentan niveles de creatinina y urea plasmáticas elevados, TFG disminuidas, niveles de proteinuria elevados (a excepción del grupo experimental CLP4), ratios CrU/CrP con valores inferiores a 15 que nos indican NTA la cual se ha podido observar en la zona cortical externa en gentamicina y medular externa en cisplatino, nitrato de uranilo, isquemia reperusión y sepsis mediante el estudio por hematoxilina eosina. Por tanto, podemos concluir que los 6 son modelos animales idóneos para estudiar la presencia o ausencia de los 14 marcadores urinarios candidatos a formar parte de la huella dactilar propuesta en secciones anteriores.

2. Estudio del patrón diferencial de marcadores urinarios asociados a distintas formas de daño renal agudo

Sección eliminada por sostener datos susceptibles de ser incluidos en una solicitud de patente.

3. Desarrollo de un algoritmo matemático

Sección eliminada por sostener datos susceptibles de ser incluidos en una solicitud de patente.

BLOQUE II: DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO, TEMPRANO Y PRONÓSTICO DE DRA EN HUMANOS.

Sección eliminada por sostener datos susceptibles de ser incluidos en una solicitud de patente.

4. Clasificación de los pacientes

Sección eliminada por sostener datos susceptibles de ser incluidos en una solicitud de patente.

5. Valor pronóstico de los biomarcadores urinarios

Sección eliminada por sostener datos susceptibles de ser incluidos en una solicitud de patente.

BLOQUE III: SIGNIFICADO BIOLÓGICO DE LOS MARCADORES: ORIGEN Y MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DE APARICIÓN EN LA ORINA

En el bloque que se sigue, se profundiza en algunos aspectos fisiopatológicos de algunos de los marcadores estudiados. En concreto, se abordan los siguientes aspectos: (i) papel biológico de NGAL, KIM-1, PAI-1, t-gelsolina, TCP-1, Reg IIIb y GM2AP; (ii) relevancia de GM2AP, t-gelsolina y Reg IIIb en el diagnóstico diferencial con diferentes dosis de cisplatino; (iii) localización exacta del daño renal con GM2AP; y (iv) origen de los marcadores NGAL, KIM-1, NAG y TCP-1.

Sin embargo, para cada uno de estos cuatro estudios no se pudo ampliar al total de 14 marcadores por ser demasiado extenso para el presente trabajo. Por tanto, en esta tesis doctoral se pretende sentar las bases de los mecanismos que están alterados en el daño renal y provocan la excreción urinaria de ciertos marcadores. En un futuro, lo ideal sería continuar el estudio con el resto de proteínas estudiadas.

Conforme a lo observado hasta ahora, a medida que aumenta el daño funcional en el riñón, aumenta el nivel de CrP y también los niveles en orina de determinados marcadores. Para explicar este incremento de la excreción urinaria se plantean dos hipótesis que se trabajan en los apartados que siguen: (i) los marcadores aparecen en la orina debido a un defecto en la reabsorción de los túbulos de las nefronas consecuencia del daño renal o bien, (ii) la liberación de moléculas o marcadores a la orina procede de las propias células tubulares dañadas que, por el contacto estrecho que existe, vierten de manera directa su contenido al lumen tubular.

6. Estudio del papel biológico de los marcadores urinarios

La primera de las hipótesis planteadas consistía en pensar que la aparición de los biomarcadores en la orina de los animales con DRA era consecuencia de un fallo

en el proceso de reabsorción. Para corroborar este supuesto, se puso a punto un experimento de perfusión intravenosa con maleato de sodio, un desacoplador (y por tanto inhibidor) de los sistemas de reabsorción tubular proximal (Bergeron, Mayers, & Brown, 1996a). En este contexto, hemos querido comprobar el comportamiento de los marcadores urinarios cuando a los animales de diferentes modelos con daño renal agudo se les administra este inhibidor.

Para llevar a cabo este estudio, se trataron diferentes animales con dos fármacos a dosis tóxicas: gentamicina 150 mg/kg/día y cisplatino a dosis 5 mg/kg y 7,5 mg/kg. El motivo de elegir 2 dosis tóxicas diferentes de cisplatino lo trabajaremos con más detalle en el apartado 7. Además, a un grupo de animales se les realizó una isquemia renal de 60 minutos que provoca daño renal agudo.

En la figura 71 se observan los valores de creatinina plasmática el día de máximo daño renal en los diferentes grupos experimentales. En el grupo de animales tratado con gentamicina este día se corresponde con el día 6, en los dos grupos de animales tratados con cisplatino 5 ó 7,5 mg/kg con el día 4 y en el grupo sometido a una isquemia renal con el día 1. Esto es importante recordarlo ya que la inyección vía endovenosa del maleato sódico se producirá en el momento del máximo daño determinado por los niveles de creatinina.

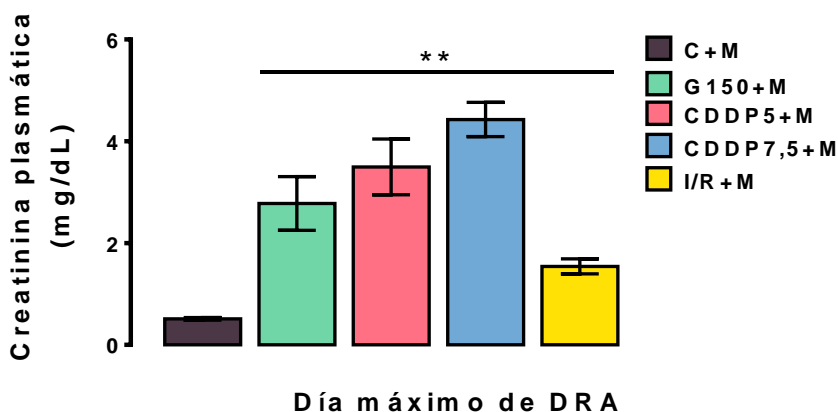
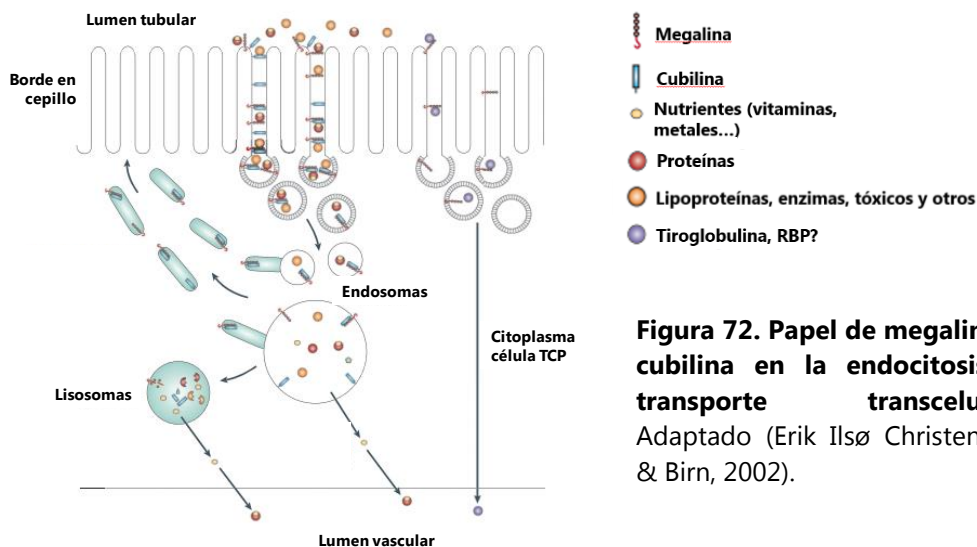


Figura 71. Creatinina plasmática en los diferentes modelos de DRA a los que se les administrará maleato sódico. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (EEM). Control + maleato (C+M, n=3), gentamicina 150 mg/kg/día + maleato (G150+M, n=4), cisplatino 5 mg/kg + maleato (CDDP5+M, n=4), cisplatino 7,5 mg/kg +

maleato (CDDP7,5+M, n=6), isquemia-reperfusión 60 minutos + maleato (I/R+M, n=5), ** $p < 0,01$: respecto grupo C+M

Se sabe que, en condiciones fisiológicas las proteínas de bajo peso molecular que se filtran libremente a través de la barrera glomerular se unen a receptores presentes en la membrana apical (megalina y cubilina). Esta unión estimula la invaginación de la membrana apical y la formación de una vesícula endocítica intracelular que contiene en su interior la proteína unida al receptor (Erik Ilsø Christensen & Birn, 2002). Dicha vesícula se fusiona con un lisosoma en el que existen diferentes enzimas proteolíticas que degradan a las proteínas hasta convertirlas en aminoácidos. Finalmente, los aminoácidos son transportados por difusión facilitada en la membrana basolateral hacia el capilar peritubular. La vesícula endocítica con los receptores en su interior se recicla nuevamente hacia la membrana apical (figura 72).



Megalina y cubilina son estructuralmente muy distintas. Megalina es una proteína transmembrana de 600 kDa perteneciente a la familia de los receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Raychowdhury, Niles, McCluskey, & Smith, 1989) mientras que cubilina es una proteína únicamente extracelular de 460 kDa. Sin embargo los ligandos de la cubilina dependen de la interacción con la megalina

(Jensen y cols., 2017) para que sean internalizados. Esta hipótesis se fundamentó en un estudio con unos ratones deficientes en megalina, donde comprobaron cómo una proteína se acumulaba en las membranas luminales de las células del TCP debido a que no era internalizada (Kozyraki y cols., 2001a).

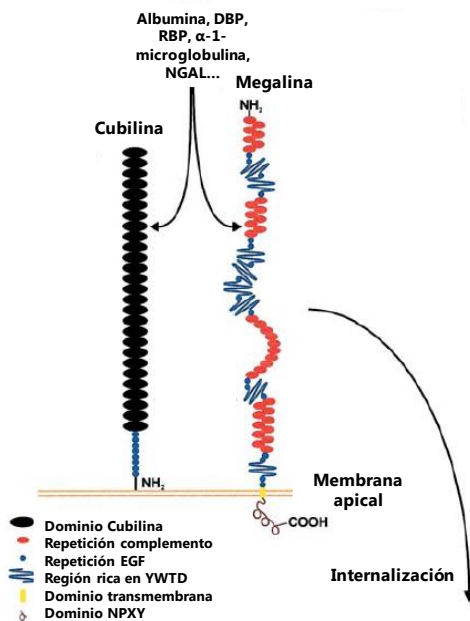


Figura 73. Representación esquemática del complejo endocítico megalina cubilina. Adaptado (Erik I. Christensen & Gburek, 2004). Responsable de la reabsorción de una gran parte de proteínas en el túbulo proximal.

Por tanto podemos concluir que las dos proteínas unidas, megalina y cubilina, son las responsables de la reabsorción de muchas proteínas como albúmina, proteína de unión a la vitamina D (DBP), proteína de unión al retinol (RBP), α-1-microglobulina, Cistatina C y la lipocalina asociada a la gelatinasa neutrófila (NGAL) entre otras (Amsellem y cols., 2010; E I Christensen y cols., 1999; De, Kuwahara, & Saito, 2014; Hvidberg y cols., 2005; Kozyraki y cols., 2001b; Moestrup y cols., 1998; Storm y cols., 2011).

Ya está descrito que el maleato sódico induce la pérdida de megalina del borde en cepillo de la membrana de las células del túbulo proximal renal en ratas. Esta pérdida provoca su incremento en la excreción urinaria (Bergeron, Mayers, & Brown, 1996b).

Además de producir la pérdida de megalina, el maleato sódico desacopla otros transportadores y las bombas de Na^+/K^+ -ATPasa entre otros, lo que provoca un incremento de cationes en la orina (NaU , KU , etc) que, por un equilibrio osmótico, irán acompañados de abundante agua. Este efecto de poliuria tras la administración del inhibidor lo observamos en nuestros resultados mediante la siguiente figura 74:

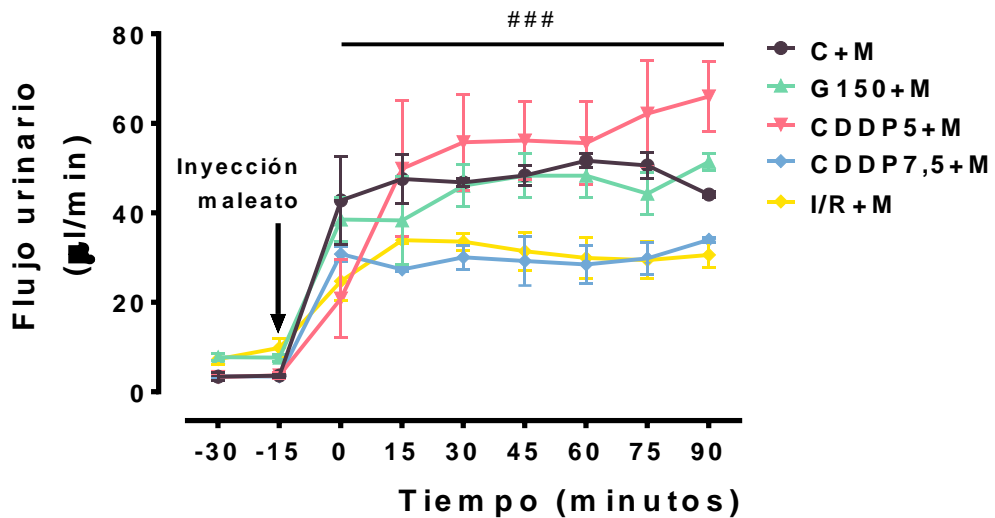


Figura 74. Flujo urinario recogido en fracciones de 15 minutos antes y después de la inyección del maleato en los diferentes modelos de DRA. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (EEM). Control + maleato (C+M, n=3), gentamicina 150 mg/kg/día + maleato (G150+M, n=4), cisplatino 5 mg/kg + maleato (CDDP5+M, n=4), cisplatino 7,5 mg/kg + maleato (CDDP7,5+M, n=6), isquemia-reperfusión 60 minutos + maleato (I/R+M, n=5). ###p<0,001: respecto a las muestras previas a la inyección del maleato sódico (-30 y -15 minutos) del mismo grupo.

En este contexto, se establecen dos hipótesis para interpretar los resultados que siguen:

- Tras la administración del maleato sódico, la excreción urinaria de los marcadores se incrementa, con independencia de si existe un daño tisular previo.
- En los animales con DRA el transportador megalina cubilina ya está bloqueado, inhibido o destruido por la NTA y en consecuencia, los niveles de

excreción urinaria de los marcadores tras la administración del maleato sódico no varían respecto a los previos.

6.1 NGAL

Se sabe que NGAL se une y es transportado al interior celular por megalina cubilina y en menor medida por el receptor denominado 24p3 (Ko y cols., 2010). Sin embargo, aunque ya hemos comentado que el maleato sódico inhibe a megalina cubilina también lo hace con el resto de transportadores localizados en los túbulos de las nefronas.

La figura 75 muestra la excreción urinaria de NGAL en cada uno de los modelos experimentales antes de la administración del maleato (muestra -30) y después (muestras 30, 60 y 90). Estudios previos en nuestro laboratorio indican que la excreción urinaria de NGAL se incrementa tras la inyección del maleato sódico en ratas Wistar sanas (Blázquez-Medela y cols., 2014). Esto mismo ocurre en nuestros grupos experimentales control, isquemia y cisplatino 5. Sin embargo, este incremento no se observa en el grupo de cisplatino 7,5. Esto puede deberse a que la dosis de 5 mg/kg no es suficientemente alta como para inhabilitar, mediante la necrosis tubular aguda, el 100% de los transportadores megalina/cubilina, mientras que la dosis de 7,5 mg/kg sí provoca la destrucción de todos los transportadores y añadir un inhibidor no aporta más marcador a la orina.

Un caso especial y que veremos en otros marcadores puntualmente más adelante, es lo ocurrido en el modelo de G150+M. Tras una investigación exhaustiva no tenemos respuesta a la disminución de la excreción urinaria de este marcador tras la administración del maleato sódico, por lo que es necesario profundizar en este complejo mecanismo mediante nuevos estudios.

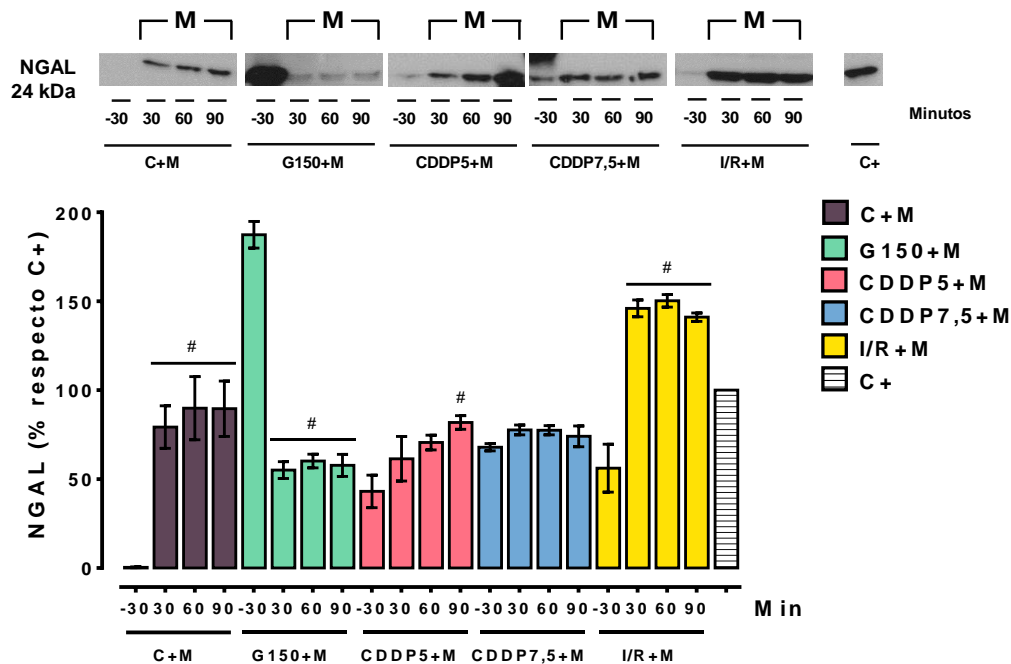


Figura 75. Nivel urinario de NGAL tras la administración de maleato sódico en los diferentes modelos de DR. NGAL: Lipocalina asociada a gelatinasa neutrófila. Imagen representativa de la presencia de NGAL en la orina de los animales del estudio. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (EEM). Control + maleato (C+M, n=3), gentamicina 150 mg/kg/día + maleato (G150+M, n=4), cisplatino 5 mg/kg + maleato (CDDP5+M, n=4), cisplatino 7,5 mg/kg + maleato (CDDP7,5+M, n=6), isquemia-reperfusión 60 minutos + maleato (I/R+M, n=5). #p<0,05: respecto a la muestra previa a la inyección del maleato sódico (-30) del mismo grupo.

6.2 KIM-1

KIM-1 es una glicoproteína de membrana con una porción extracelular con funciones de interacción célula-célula y célula-matriz. En situaciones de daño renal este dominio extracelular es cortado, de tal forma que se acumula en la orina (Blank y cols., 2009), lo que sugiere que KIM-1 es un indicador específico de enfermedad renal.

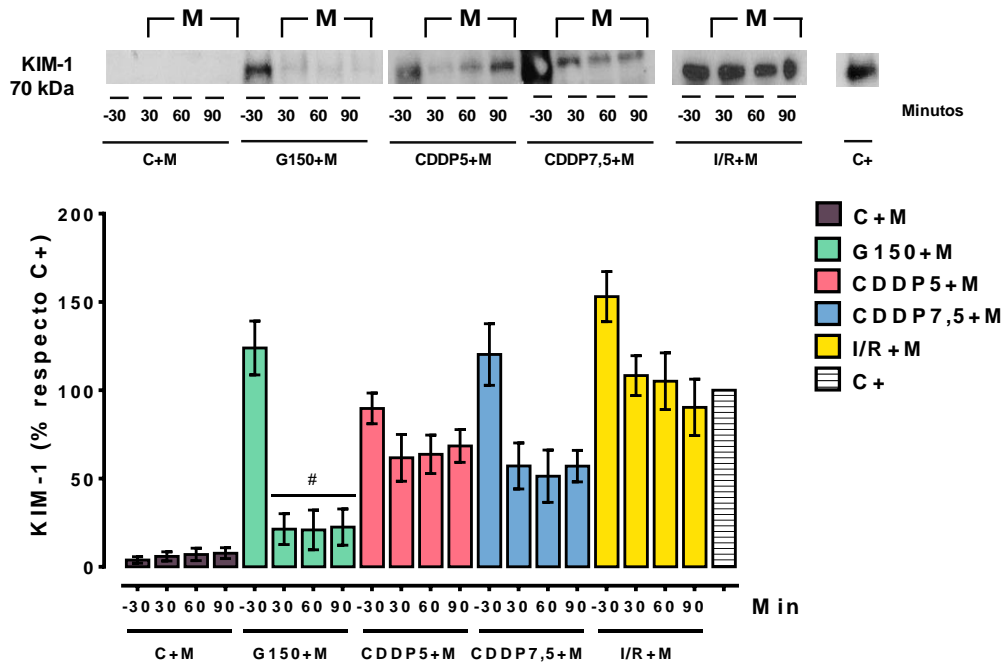


Figura 76. Nivel urinario de KIM-1 tras la administración de maleato sódico en los diferentes modelos de DRA. KIM-1: molécula de lesión renal 1. Imagen representativa de la presencia de KIM-1 en la orina de los animales del estudio. Los datos representan la media ± el error estándar de la media (EEM). Control + maleato (C+M, n=3), gentamicina 150 mg/kg/día + maleato (G150+M, n=4), cisplatino 5 mg/kg + maleato (CDDP5+M, n=4), cisplatino 7,5 mg/kg + maleato (CDDP7,5+M, n=6), isquemia-reperfusión 60 minutos + maleato (I/R+M, n=5). #p<0,05: respecto a la muestra previa a la inyección del maleato sódico (-30) del mismo grupo.

En la figura 76 se observa que en el grupo control, la inhibición de megalina no provoca ningún incremento de este marcador en la orina. Según este contexto sería lógico pensar que KIM-1 no se reabsorbe en las células del túbulo proximal. La excreción urinaria de KIM-1 tampoco se incrementa en los animales tratados con las dos dosis de cisplatino y los animales con isquemia renal.

6.3 PAI-1

La figura 77 muestra los niveles excretados de PAI-1 a la orina de los diferentes modelos animales. Si se observa el grupo C+M se concluye que PAI-1 es otro marcador de daño renal que se reabsorbe en condiciones fisiológicas por el transportador megalina cubilina. Los niveles de excreción urinaria no varían tras la administración del inhibidor en el grupo I/R. En contraposición, los grupos de animales tratados con gentamicina y con las dos dosis de cisplatino tienen el comportamiento anómalo y no esperado que se comentó antes.

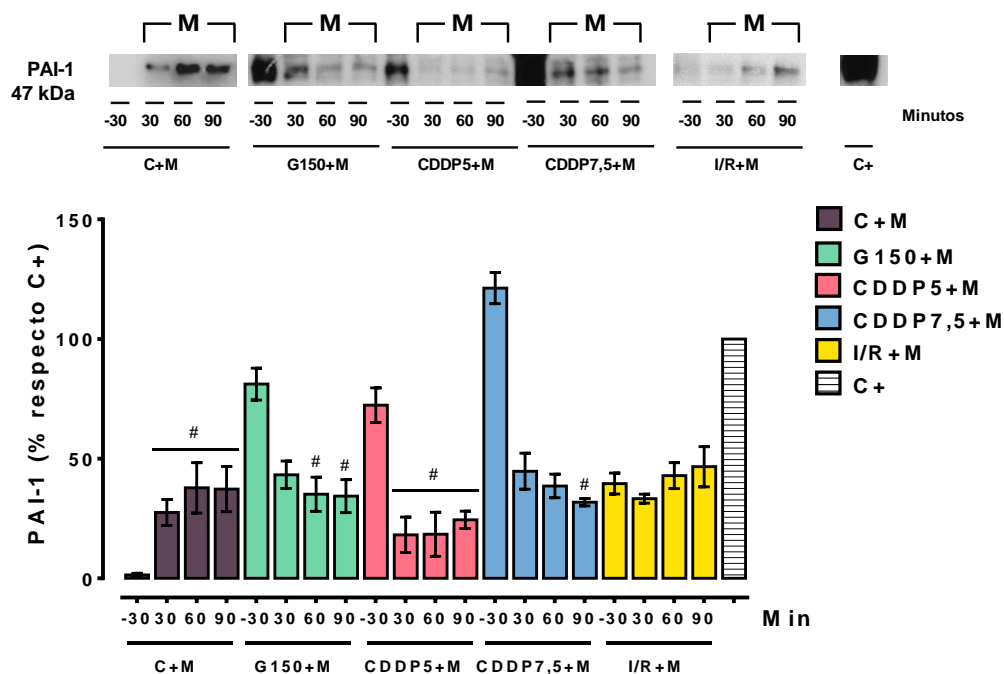


Figura 77. Nivel urinario de PAI-1 tras la administración de maleato sódico en los diferentes modelos de DRA. PAI-1: Inhibidor del activador de plasminógeno 1. Imagen representativa de la presencia de PAI-1 en la orina de los animales del estudio. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (EEM). Control + maleato (C+M, n=3), gentamicina 150 mg/kg/día + maleato (G150+M, n=4), cisplatino 5 mg/kg + maleato (CDDP5+M, n=4), cisplatino 7,5 mg/kg + maleato (CDDP7,5+M, n=6), isquemia-reperusión 60 minutos + maleato (I/R+M, n=5). #p<0,05: respecto a la muestra previa a la inyección del maleato sódico (-30) del mismo grupo.

6.4 t-gelsolina

El fragmento proteolítico de la gelsolina es endocitado al interior celular por el complejo megalina/cubilina. En ratas sanas cuando se inhibe el transportador la excreción urinaria de t-gelsolina se incrementa (figura 78). Esto mismo se observa en las ratas que han sido tratadas con cisplatino a dosis 5 mg/kg, pero no a dosis 7,5. Esto puede explicarse por qué la inhibición del maleato sódico se suma al daño causado por la dosis de 5 mg/kg incrementando así la excreción urinaria de t-gelsolina, mientras que la inhibición del transportador en la dosis de 7,5 mg/kg no aporta más marcador a la orina probablemente porque el 100% de los transportadores están inactivados a consecuencia del cisplatino.

La excreción urinaria de t-gelsolina en los animales con DRA por gentamicina o por isquemia no se incrementa respecto a los niveles previos a la inyección del maleato. Se sabe que la gentamicina compite por el transportador con la t-gelsolina.

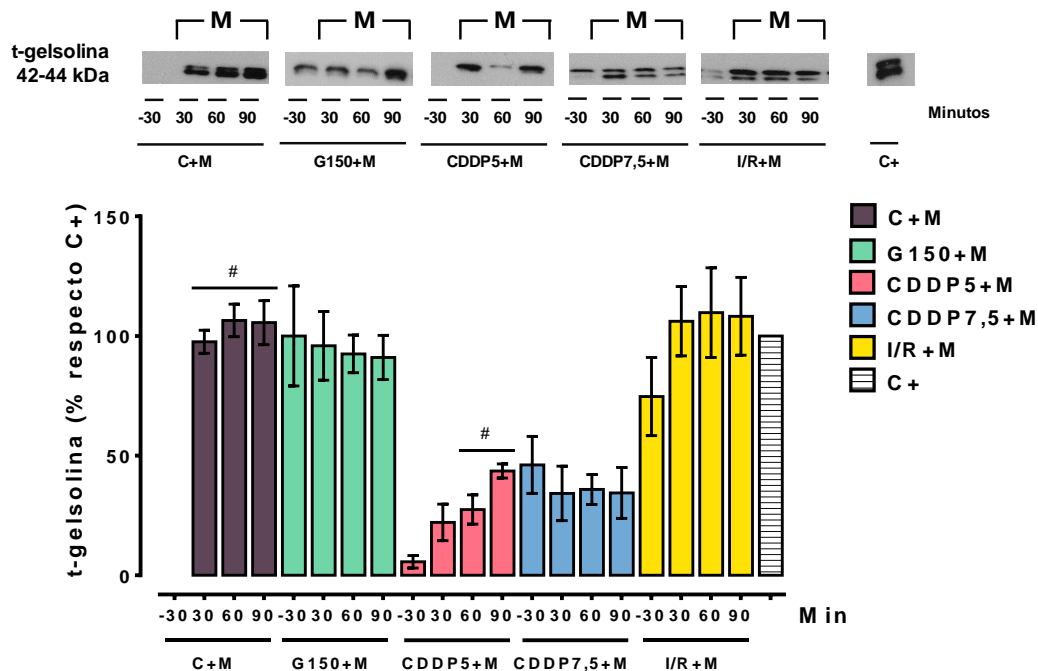


Figura 78. Nivel urinario de t-gelsolina tras la administración de maleato sódico en los diferentes modelos de DRA. Imagen representativa de la presencia de t-gelsolina en la orina de los animales del estudio. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (EEM). Control + maleato (C+M, n=3), gentamicina 150 mg/kg/día + maleato (G150+M, n=4), cisplatino 5 mg/kg + maleato (CDDP5+M, n=4), cisplatino 7,5 mg/kg + maleato (CDDP7,5+M, n=6), isquemia-reperfusión 60 minutos + maleato (I/R+M, n=5). #p<0,05: respecto a la muestra previa a la inyección del maleato sódico (-30) del mismo grupo.

6.5 TCP-1

La figura 79 muestra los niveles de excreción urinaria de TCP-1. Según el comportamiento de esta proteína en el grupo C+M se afirma que TCP-1 es reabsorbido y endocitado al interior celular por megalina cubilina. De esta forma, en condiciones fisiológicas cuando se inhibe el transportador, los niveles urinarios de TCP-1 se incrementan. Estos niveles se mantienen invariables en los animales sometidos a la isquemia renal. La administración del maleato sódico en los animales tratados con la gentamicina y el cisplatino provoca una disminución en la excreción urinaria de TCP-1 difícil de explicar.

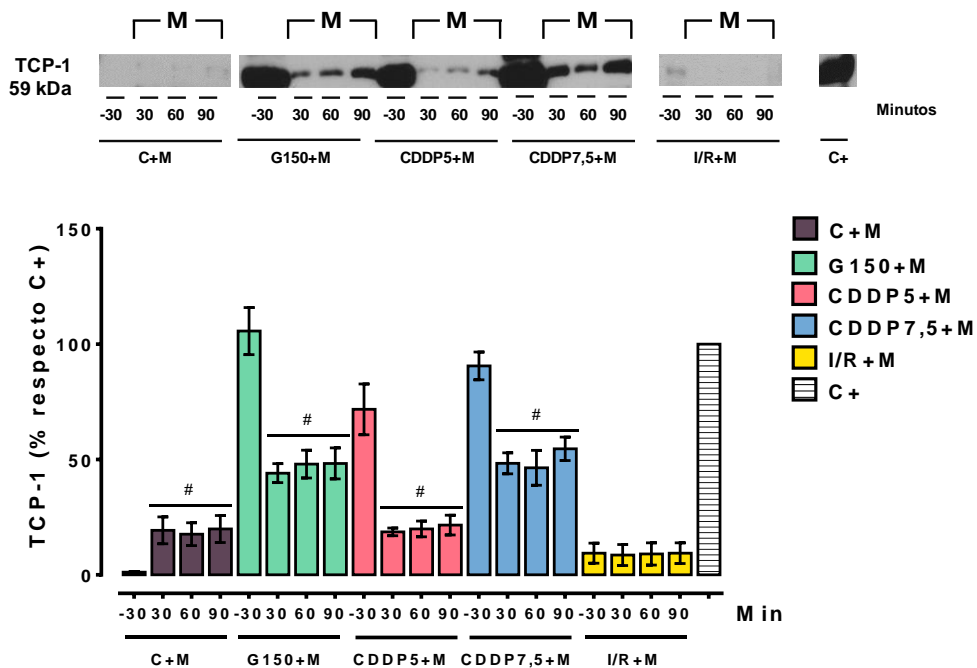


Figura 79. Nivel urinario de TCP-1 tras la administración de maleato sódico en los diferentes modelos de DRA. TCP-1: del inglés *tailless complex polypeptide 1*. Imagen representativa de la presencia de TCP-1 en la orina de los animales del estudio. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (EEM). Control + maleato (C+M, n=3), gentamicina 150 mg/kg/día + maleato (G150+M, n=4), cisplatino 5 mg/kg + maleato (CDDP5+M, n=4), cisplatino 7,5 mg/kg + maleato (CDDP7,5+M, n=6), isquemia-reperfusión 60 minutos + maleato (I/R+M, n=5). #p<0,05: respecto a la muestra previa a la inyección del maleato sódico (-30) del mismo grupo.

6.6 Reg IIIb

La excreción urinaria de Reg IIIb se incrementa tras la administración del inhibidor de maleato sódico en ratas sanas (figura 80). Además, como ocurría en varios marcadores estudiados con anterioridad, parece que el daño producido por el nefrotóxico cisplatino a dosis 5 y el producido por la isquemia renal no son suficientes para inhabilitar por completo todos los transportadores, por lo que la administración del inhibidor provoca un incremento de la excreción urinaria de Reg IIIb en estos

animales. No así en los animales tratados con gentamicina y cisplatino 7,5 mg/kg donde la excreción urinaria de Reg IIIb se mantiene constante y en niveles similares a los previos a la administración del maleato sódico.

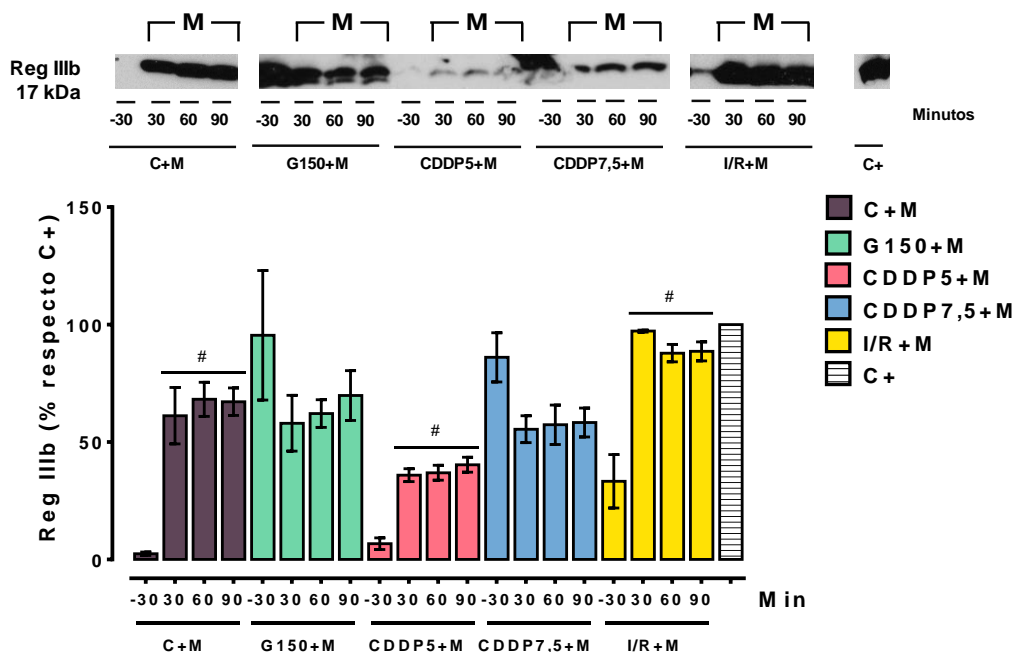


Figura 80. Nivel urinario de Reg IIIb tras la administración de maleato sódico en los diferentes modelos de DRA. Reg IIIb: Proteína 3- β derivada de islote regenerador. Imagen representativa de la presencia de Reg IIIb en la orina de los animales del estudio. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (EEM). Control + maleato (C+M, n=3), gentamicina 150 mg/kg/día + maleato (G150+M, n=4), cisplatino 5 mg/kg + maleato (CDDP5+M, n=4), cisplatino 7,5 mg/kg + maleato (CDDP7,5+M, n=6), isquemia-reperfusión 60 minutos + maleato (I/R+M, n=5). #p<0,05: respecto a la muestra previa a la inyección del maleato sódico (-30) del mismo grupo.

6.7 GM2AP

En estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio se observó que tras la administración de un bolo de maleato sódico en ratas sanas se producía un incremento de la excreción urinaria de GM2AP (Quiros y cols., 2010b). Además, los

valores invariables de la excreción urinaria de GM2AP después de la administración de maleato sódico en los animales tratados con gentamicina nos indican que el GM2AP compete con la gentamicina por los receptores de megalina. Nuestros resultados concuerdan con estudios similares de maleato con aminoglucosidos (Nagai, Tanaka, Nakanishi, Murakami, & Takano, 2001). Finalmente, el daño producido por el cisplatino 5 y la isquemia renal no son lo suficientemente grande como para inhibir o destruir todos los transportadores de megalina, por lo que la administración del maleato sódico provoca un incremento de la excreción urinaria. Por otro lado, este daño si es suficiente cuando la dosis utilizada de cisplatino es de 7,5, ya que como se observa la administración de maleato sódico no provoca una mayor excreción urinaria.

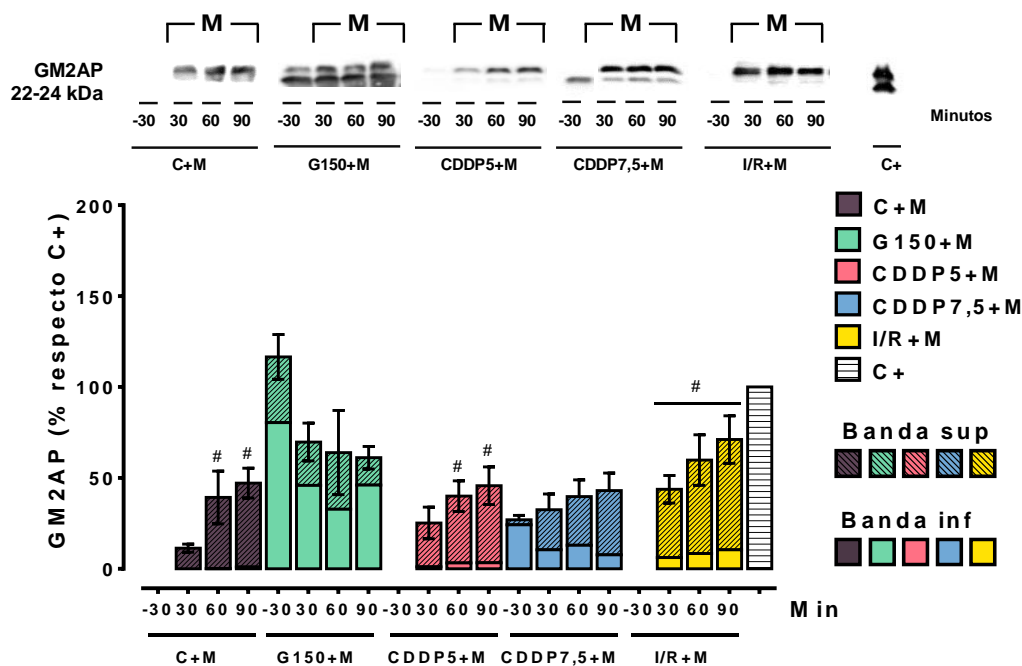


Figura 81. Nivel urinario de GM2AP tras la administración de maleato sódico en los diferentes modelos de DRA. GM2AP: proteína activadora del gangliósido M2. Imagen representativa de la presencia de GM2AP en la orina de los animales del estudio. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (EEM). Control + maleato (C+M, n=3), gentamicina 150 mg/kg/día + maleato (G150+M, n=4), cisplatino 5 mg/kg + maleato (CDDP5+M, n=4), cisplatino 7,5 mg/kg + maleato (CDDP7,5+M, n=6), isquemia-reperfusión 60 minutos + maleato (I/R+M, n=5). #p<0,05: respecto a la muestra previa a la inyección del maleato sódico (-30) del mismo grupo.

Se ha querido separar la información que otorgan cada una de las dos bandas del GM2AP (la correspondiente a 22 kDa y la correspondiente a 24 kDa). Si se observa con detenimiento, tras la inyección del maleato sódico la banda que predomina es la superior, mientras que en situaciones de DRA la banda que predomina es la inferior. Esta información puede ser útil para diferenciar cuando el daño renal es generalizado o es causa de un defecto en la reabsorción tubular, situaciones que pueden converger, pero la una no tiene por qué dar la otra.

De este apartado se extraen las siguientes conclusiones parciales.

- NGAL, PAI-1, t-gelsolina, TCP-1, Reg IIIb y GM2AP son marcadores que en condiciones fisiológicas se reabsorben principalmente por el transportador endocítico megalina cubilina. Sin embargo, KIM-1 es un marcador transmembrana que no se reabsorbe por este transportador.
- La gentamicina compite de forma competitiva con t-gelsolina, Reg IIIb y GM2AP por los transportadores megalina.
- El daño provocado por la dosis de 5 mg/kg de cisplatino no es suficiente para inhabilitar la gran mayoría de los transportadores megalina, es decir, el daño provocado por la dosis de 7,5 mg/kg es mayor que el daño que produce la dosis de 5 mg/kg. En este sentido la excreción urinaria de GM2AP, t-gelsolina y Reg IIIb es dependiente de la dosis de cisplatino. Este asunto lo trataremos en los resultados del apartado 7.1.

7. GM2AP como marcador diferencial de daño tubular cortical

De lo expuesto hasta ahora, se sabe que el GM2AP es un marcador para diferenciar el DRA inducido por tóxicos del DRA inducido por eventos dañinos. Dentro del DRA inducido por tóxicos, la excreción urinaria del GM2AP es positiva en los modelos animales tratados con Gentamicina y Nitrato de Uranilo, y negativa en los tratados con cisplatino a dosis de 5 mg/kg. Esta situación es útil para poder utilizar a GM2AP como un marcador diferencial de DRA.

Sin embargo, en estudios previos se ha comprobado como la excreción urinaria de GM2AP depende en gran medida de la dosis de cisplatino utilizada, por eso se quiso profundizar en este aspecto.

7.1 La excreción urinaria de GM2AP depende de la dosis del cisplatino

El cisplatino en la actualidad sigue siendo uno de los fármacos antineoplásicos más ampliamente utilizado por su potente eficacia antitumoral (Wang & Lippard, 2005). Su nefrotoxicidad es acumulativa y dependiente de la dosis. Esta es, por tanto, su principal limitación terapéutica (Tsang y cols., 2009) y a pesar de las intensas medidas profilácticas encaminadas a proteger las complicaciones renales, aproximadamente un 20-30% de los pacientes hospitalizados tratados con cisplatino padecía fallo renal agudo (Kuriakose & Kurup, 2008).

En este contexto, con los estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio y con los resultados expuestos anteriormente, se quiso profundizar en el estudio del GM2AP. Para llevar a cabo este estudio, se trataron 3 grupos experimentales de animales con diferentes dosis: 5 mg/kg, 7,5 mg/kg y 10 mg/kg. Ya se analizó en previas caracterizaciones de la función renal que las dosis de 5 y 7,5 mg/kg eran nefrotóxicas, por lo que es lógico pensar que una mayor dosis, 10 mg/kg, también lo es. Sin embargo, se caracterizó la función renal, para ver cuán diferentes o semejantes eran estos valores.

7.1.1 Efecto de diferentes dosis del cisplatino en la función renal

La figura 82 muestra que los niveles de creatinina plasmática (panel a) y los niveles de la fracción excretada de glucosa (panel c) están incrementados en los animales tratados con las tres dosis diferentes de cisplatino respecto al grupo control. Por otro lado, el aclaramiento de creatinina (panel b), como cabría esperar, disminuye drásticamente (hasta 54 veces respecto a su valor basal). Sin embargo, entre los tres grupos experimentales tratados con cisplatino no se encuentran diferencias en ninguno de estos valores en el día de máximo daño renal. Se concluye que, según estos marcadores tradicionales, las tres dosis de cisplatino originan el mismo daño en los riñones de los animales de experimentación, o dicho de otra forma, estos marcadores tradicionales no son capaces de diferenciar distintos grados de daño tisular, si los hubiere, provocados por las diferentes dosis de cisplatino.

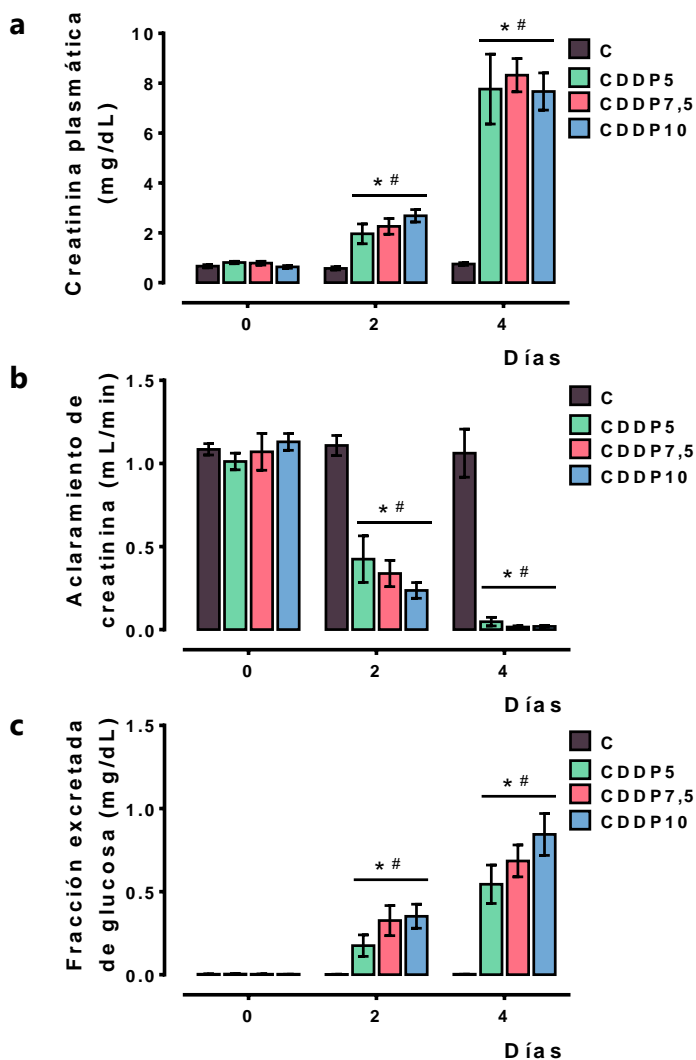


Figura 82. Evolución de la creatinina plasmática (a), aclaramiento de creatinina (b) y fracción excretada de glucosa (c) a lo largo del tiempo tras diferentes dosis de cisplatino. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (EEM). Control (C, n=5), cisplatino 5 mg/kg (CDDP5, n=5), cisplatino 7,5 mg/kg (CDDP7,5, n=5), cisplatino 10 mg/kg (CDDP10, n=5). * $p < 0,05$: respecto grupo C mismo día; # $p < 0,05$: respecto a la muestra basal del grupo.

Estudio histológico renal

En el panel a de la figura 83, las 3 dosis de cisplatino provocan diferentes grados de daño tisular. Sin embargo, estas diferencias se restringen a la zona de la corteza externa, donde se puede comprobar que la dosis de 5 mg/kg apenas causa una ligera vacuolización de las células tubulares, antesala de la necrosis. En esta misma zona, para la dosis de 7,5 mg/kg se puede observar una necrosis tubular aguda que alcanza un valor de 15 de un máximo de 30, mientras que en la dosis de 10 mg/kg observamos una zona cortical externa completamente necrosada con un valor de 23 (panel b). Sin embargo, a nivel de la médula externa no existen diferencias entre los 3 grupos, la NTA es muy notoria con unos valores de 28 sobre un máximo de 30 (panel c).

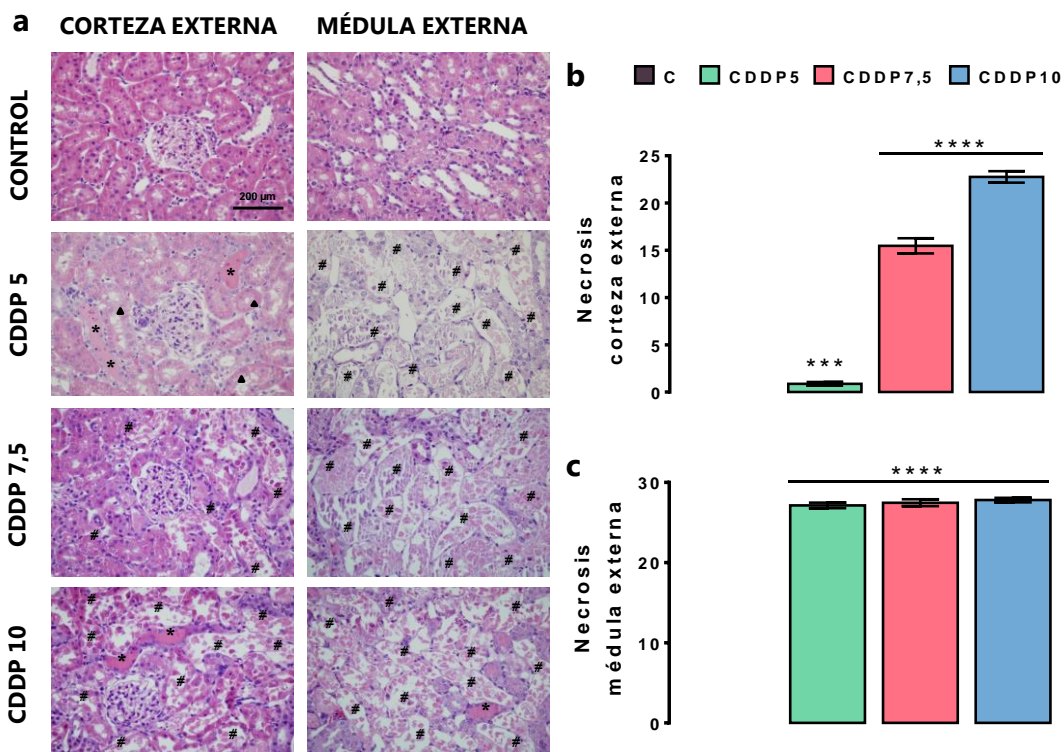


Figura 83. Imágenes representativas (400X) de cortes histológicos de la zona cortical y medular externa con hematoxilina y eosina según las dosis de cisplatino (a), cuantificación de la necrosis celular de la corteza externa (b) y de la médula externa (c) el día 4. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media

(EEM). Control (C, n=3), cisplatino 5 mg/kg (CDDP5, n=3), cisplatino 7,5 mg/kg (CDDP7,5, n=3), cisplatino 10 mg/kg (CDDP10, n=3). Los * simbolizan cilindros hialinos o casts, los triángulos señalan fenómenos de vacuolización y las # representan desepitelización y NTA. *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$: respecto grupo C.

Sin embargo, mediante el estudio de hematoxilina eosina es difícil diferenciar entre las células muertas por apoptosis de las muertas por necrosis. Para ello se utilizó la inmunofluorescencia con homodímero de etidio. Recordamos que este compuesto es un fluorocromo nuclear con alta afinidad por el ADN y baja permeabilidad de membrana, lo que significa que únicamente se adhiere a células que han sufrido necrosis (marcadas en rojo) y no apoptosis o células que estén vivas (Edwards y cols., 2007).

La figura 84 muestra las células tubulares que han sufrido necrosis como consecuencia de la administración de cisplatino teñidas en rojo y los núcleos de las células sanas teñidos en azul, de la zona cortical externa (panel a). Se observa que el porcentaje de células que han sufrido necrosis se incrementa a medida que se incrementa la dosis de cisplatino, panel b. Los resultados de la médula externa no se muestran, pero el porcentaje de células necrosadas a consecuencia de los diferentes tratamientos con cisplatino no varía.

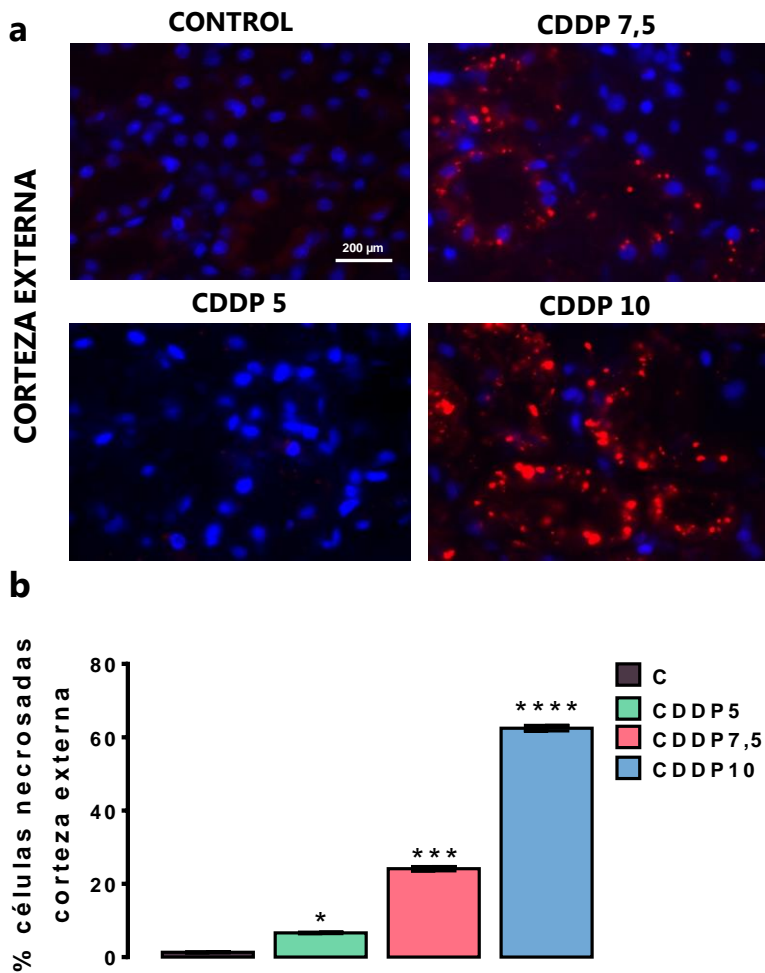


Figura 84. Imágenes representativas (400X) de la zona cortical externa mediante inmunofluorescencia según las dosis de cisplatino (a), cuantificación de la necrosis celular de la corteza externa (b) el día 4. En azul los núcleos de células sanas (tinción DAPI), en rojo ADN de células necrosadas (tinción con Homodímero de etidio). Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (EEM). Control (C, n=3), cisplatino 5 mg/kg (CDDP5, n=3), cisplatino 7,5 mg/kg (CDDP7,5, n=3), cisplatino 10 mg/kg (CDDP10, n=3). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$: respecto grupo C.

7.1.2 Excreción urinaria de GM2AP, t-gelsolina y Reg IIIb

Hasta ahora se ha estudiado que los marcadores tradicionales como creatinina plasmática, aclaramiento de creatinina o la fracción de excreción de glucosa, no son capaces de diagnosticar las diferentes intensidades de daño tisular provocado por las tres dosis de cisplatino. En este sentido, la excreción urinaria de GM2AP sí está condicionada por la dosis de cisplatino administrada. La excreción urinaria de GM2AP se incrementa a medida que incrementamos la dosis tóxica de cisplatino (figura 85), de esta forma cuando se administra la dosis de 5 mg/kg GM2AP no se detecta en la orina de las ratas, con la dosis de 7,5 mg/kg la excreción urinaria de GM2AP alcanza valores del 38% el día de máximo daño renal, mientras que con la dosis de 10 mg/kg estos valores se incrementan hasta el 50%.

En este contexto, es lógico pensar que al menos en este modelo experimental, la excreción urinaria de GM2AP indica un daño por necrosis tubular aguda de la corteza renal externa. Dicho de otra forma, el marcador urinario GM2AP se ajusta mucho mejor a la realidad del daño tisular provocado por el cisplatino que los marcadores tradicionales. Aun así, se quiso ahondar más en este aspecto y los resultados se reflejan en el apartado 7.2.

Por otro lado, recordamos que en el Bloque I se concluyó que la proteína GM2AP era un marcador urinario utilizado para diferenciar las diferentes etiologías tóxicas de DRA. Esto se basaba en que en los modelos DRA inducidos por gentamicina y nitrato de uranilo, GM2AP se excretaba en la orina mientras que en el modelo de cisplatino 5 no se excretaba. En este momento, se sabe que GM2AP es un marcador específico de las situaciones etiológicas de gentamicina, nitrato de uranilo y dosis altas de cisplatino.

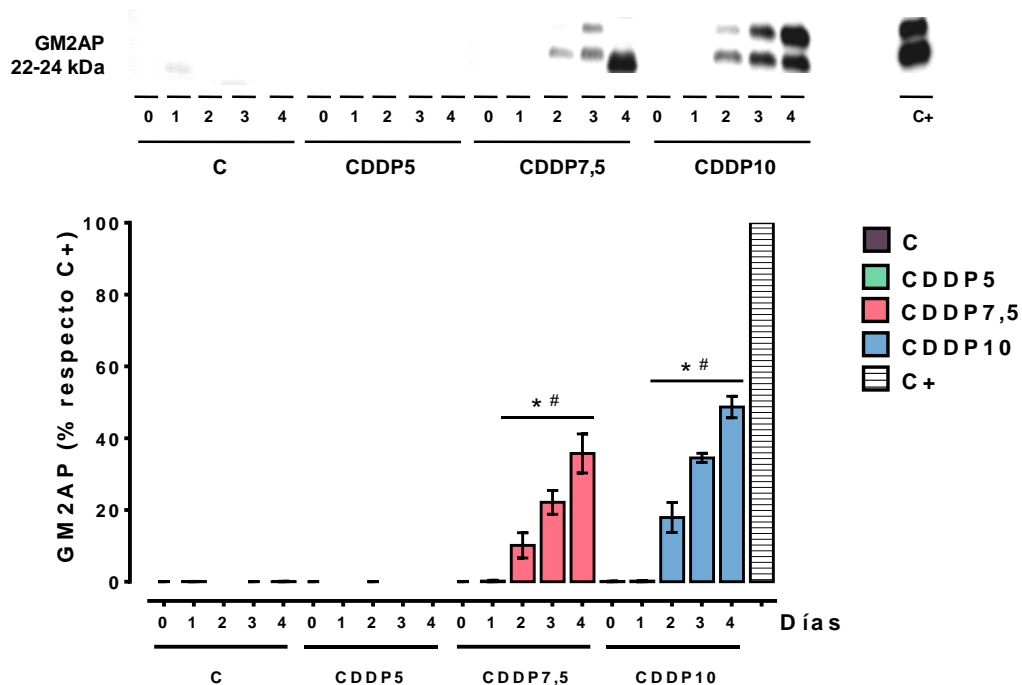


Figura 85. Nivel urinario de GM2AP según las dosis de cisplatino. GM2AP: Proteína activadora del gangliósido M2. Imagen representativa de la presencia de GM2AP en la orina de los animales del estudio. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (EEM). Control (C, n=5), cisplatino 5 mg/kg (CDDP5, n=5), cisplatino 7,5 mg/kg (CDDP7,5, n=5), cisplatino 10 mg/kg (CDDP10, n=5). * $p < 0,05$: respecto grupo C mismo día; # $p < 0,05$: respecto a la muestra basal del grupo.

Esta misma información la aportan otros marcadores como t-gelsolina y Reg IIIb, figura 86.

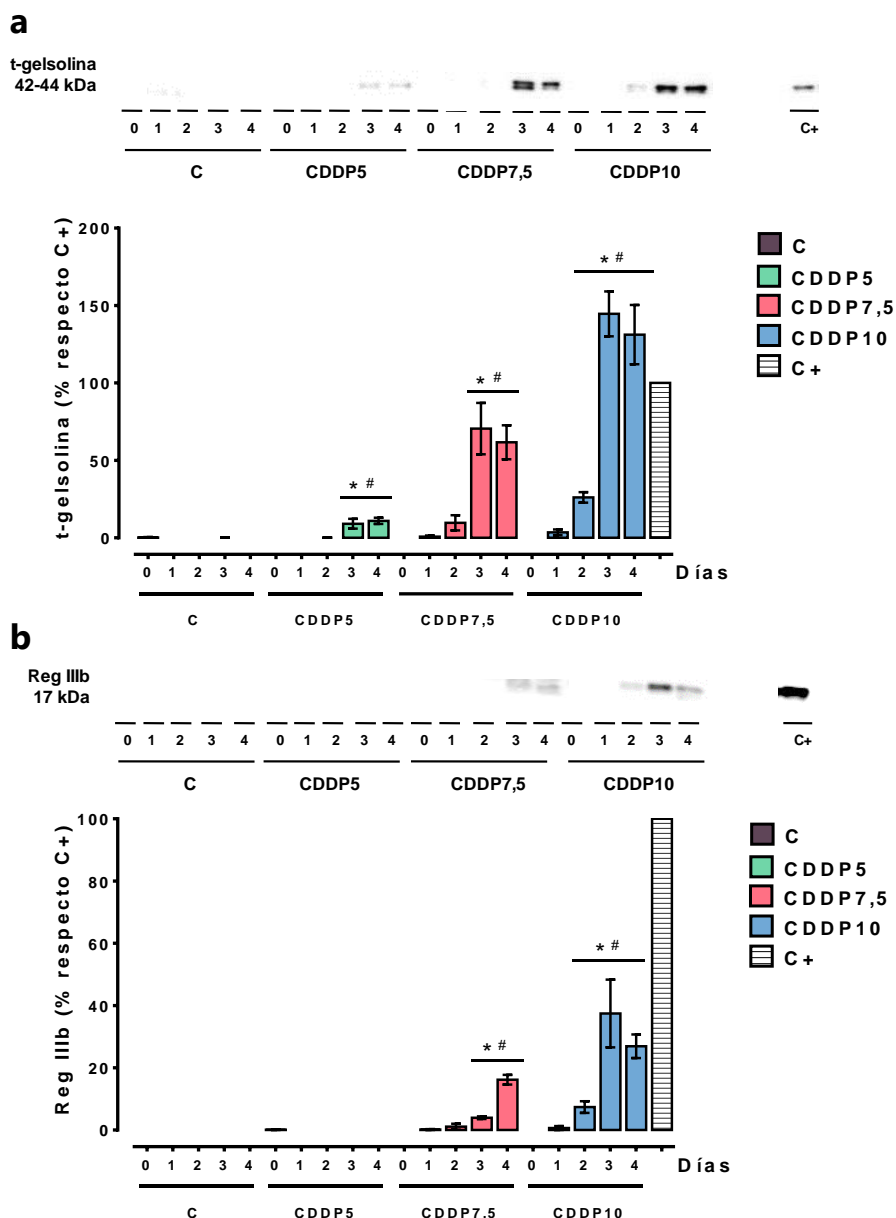


Figura 86. Nivel urinario de t-gelsolina (a) y Reg IIIb (b) según las dosis de cisplatino.

Reg IIIb: Proteína 3-β derivada de islote regenerador. Imagen representativa de la presencia de t-gelsolina y Reg IIIb en la orina de los animales del estudio. Los datos representan la media ± el error estándar de la media (EEM). Control (C, n=5), cisplatino 5 mg/kg (CDDP5, n=5), cisplatino 7,5 mg/kg (CDDP7,5, n=5), cisplatino 10 mg/kg (CDDP10, n=5). *p<0,05: respecto grupo C mismo día; #p<0,05: respecto a la muestra basal del grupo.

Sin embargo, esta información no la aportan otros marcadores de daño renal como TCP-1. La excreción urinaria de TCP-1 no varía en función de las diferentes dosis de cisplatino.

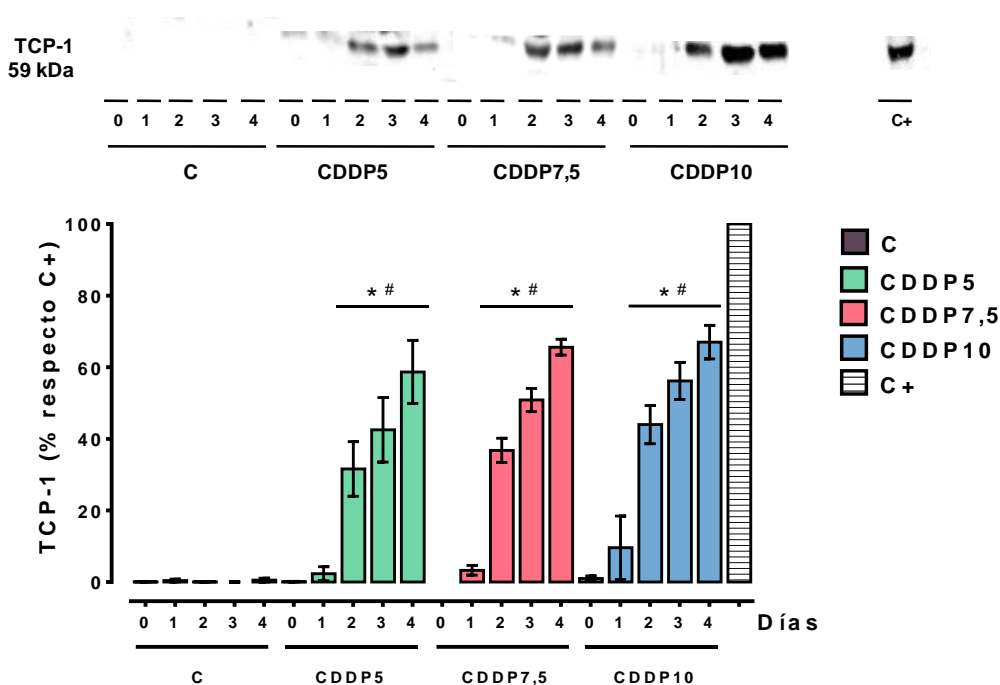


Figura 87. Nivel urinario de TCP-1 según las dosis de cisplatino. TCP-1: *Tailles complex polypeptide 1*. Imagen representativa de la presencia de TCP-1 en la orina de los animales del estudio. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (EEM). Control (C, n=5), cisplatino 5 mg/kg (CDDP5, n=5), cisplatino 7,5 mg/kg (CDDP7,5, n=5), cisplatino 10 mg/kg (CDDP10, n=5). * $p < 0,05$: respecto grupo C mismo día; # $p < 0,05$: respecto a la muestra basal del grupo.

De estos resultados se obtienen las siguientes conclusiones parciales:

- GM2AP, t-gelsolina y Reg IIIb son mejores marcadores de daño renal que los marcadores tradicionales como son la creatinina plasmática y aclaramiento de creatinina.

- GM2AP y Reg IIIb son marcadores diferenciales que aparecen en la orina cuando existe un DRA inducido por Gentamicina, NU y/o cisplatino a dosis altas.

8. El origen de NGAL, KIM-1 y NAG urinarios es plasmático y no renal.

Los incrementos de NGAL, KIM-1 y NAG urinarios se correlacionan con un descenso en la filtración glomerular y con un incremento en la degeneración del parénquima renal (Chaudhary y cols., 2010; Mori y cols., 2005). Bajo estas circunstancias, se cree en general que el aumento de estos marcadores en la orina es consecuencia del aumento de la expresión en los compartimentos renales dañados principalmente en el asa de Henle y en los túbulos colectores (Prasad Devarajan, 2008a). Los incrementos de estos marcadores en el tejido renal se vierten directamente a la orina por su estrecho y directo contacto.

Sin embargo, nosotros defendemos que el origen de los incrementos urinarios de NGAL y KIM-1 en los animales de nuestro modelo no es del parénquima renal, sino que provienen de la sangre. Las proteínas se filtran libremente desde la sangre, pero no se reabsorben en los túbulos proximales y por tanto aparecen en la orina.

8.1 NGAL y KIM-1 están incrementados en los modelos animales de nefrotoxicidad e isquemia

8.1.1 Marcadores en el tejido renal evaluados por PCR, ELISA y WB

Con el objetivo de evaluar el origen urinario de NGAL y KIM-1, se utilizaron dos modelos animales de DRA inducido por fármacos a dosis tóxicas: gentamicina 150 mg/kg/día y cisplatino 5 mg/kg y un modelo animal de daño por isquemia caliente de 60 minutos. El tratamiento con estos tóxicos y la isquemia, produjeron en los animales incrementos de creatinina y urea plasmática y disminución del aclaramiento de creatinina, datos no mostrados, de acuerdo con lo expuesto anteriormente.

Bajo estas circunstancias, en el momento de máximo daño renal, los niveles de NGAL renal determinados por ELISA son significativamente mayores en los tres

modelos de DRA que en los encontrados en el grupo control (figura 88 panel a). Además, en los animales tratados con gentamicina o sometidos a isquemia encontramos que los niveles de KIM-1 renal determinados por Western blot también son mayores que los encontrados en su grupo control (panel b). Finalmente, la expresión génica de ambas proteínas también se incrementa en los riñones de los animales con DRA (panel c).

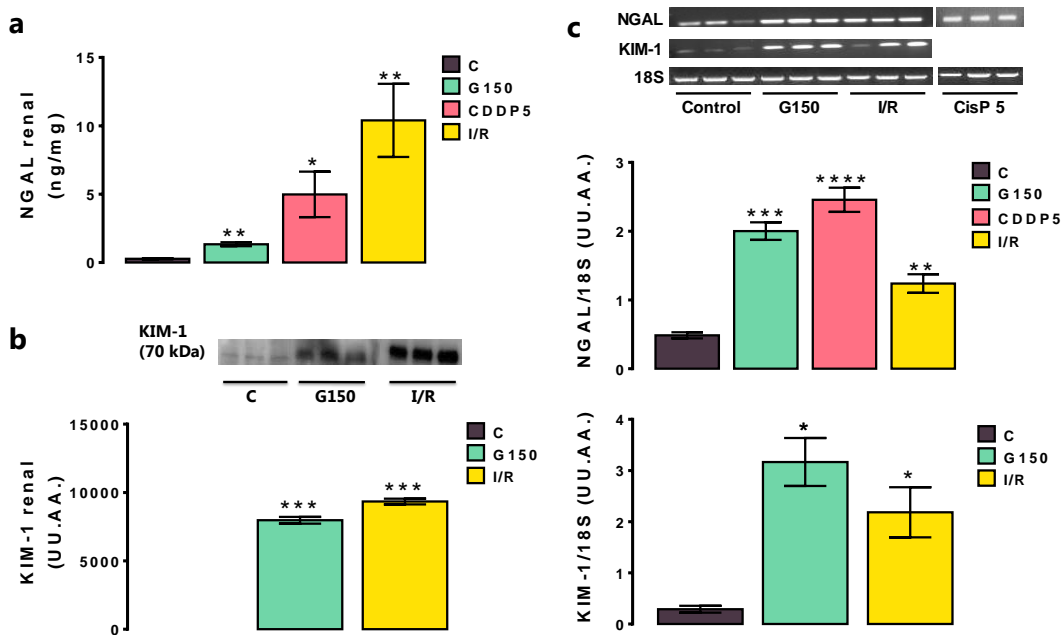


Figura 88. Nivel de NGAL y KIM-1 en el riñón de los diferentes grupos experimentales. NGAL renal cuantificado por ELISA (a), KIM-1 renal determinado por Western blot (b) y expresión génica de NGAL y KIM-1 por PCR (c) en extractos renales en el momento de máximo daño renal. NGAL: lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos. KIM-1: molécula de lesión renal 1. Imágenes representativas de la presencia de NGAL, KIM-1 y 18S (como control de carga) renales por Western blot y PCR. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (EEM). Control (C, n=3), gentamicina 150 mg/kg/día (G150, n=3), cisplatino 5 mg/kg (CDDP5, n=3) e isquemia-reperfusión 60 minutos (I/R, n=3). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$: respecto grupo C.

8.1.2 Marcadores en el tejido renal evaluados por inmunohistoquímica

En estudios histológicos con hematoxilina eosina, mostrados anteriormente, se comprobó que estos tres eventos de daño renal provocaban un grado similar de daño en el parénquima renal en forma de necrosis tubular aguda. Sin embargo, la gentamicina afectaba principalmente a la zona de la corteza externa mientras que el cisplatino 5 mg/kg e isquemia renal afectaban principalmente a la médula externa. En estas circunstancias, NGAL y KIM-1 se expresan en los compartimentos tubulares principalmente de las zonas descritas en cada modelo mientras que en el grupo control no se expresan, observado por estudios histológicos de inmunohistoquímica (figura 89).

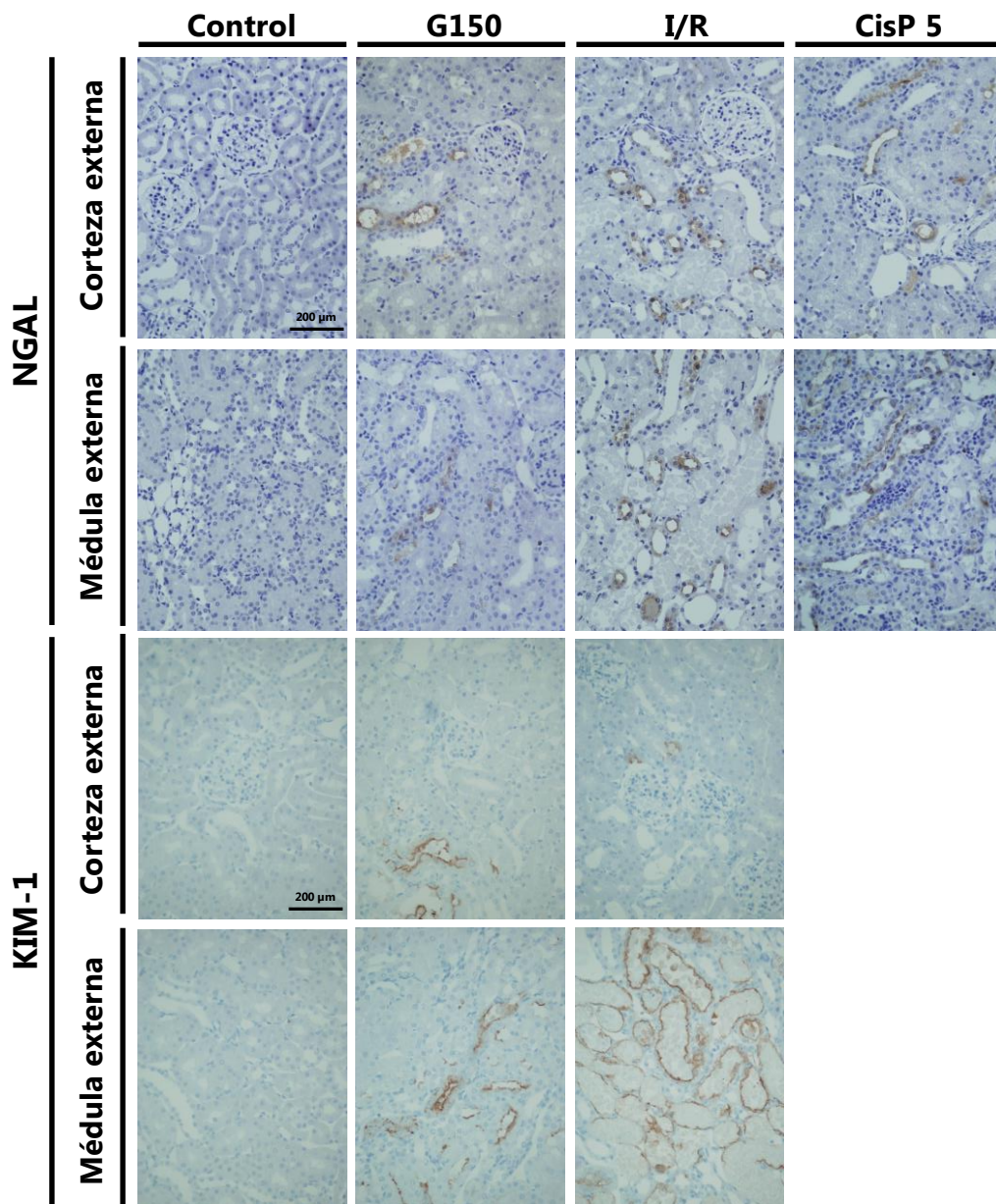


Figura 89. Imágenes representativas (400X) de inmunohistoquímica de la corteza renal externa e interna teñidas con anti-NGAL y anti-KIM-1. Control (C, n=3), gentamicina 150 mg/kg/día (G150, n=3), cisplatino 5 mg/kg (CDDP5, n=3) e isquemia-reperfusión 60 minutos (I/R, n=3),

8.1.3 Marcadores en la orina y en el plasma

En condiciones basales el plasma contiene una baja cantidad de NGAL que es filtrado libremente a través de la barrera glomerular y reabsorbido posteriormente en el túbulo proximal donde es degradado en los lisosomas. En un riñón dañado, la expresión de esta proteína se encuentra aumentada en las células tubulares dañadas de la nefrona, lo que se traduce en un aumento significativo de esta proteína en la orina (Paragas y cols., 2012). Estos resultados están de acuerdo con lo observado en nuestros experimentos (figura 90). Los tres modelos de DRA tienen niveles plasmáticos superiores a los niveles encontrados en los animales del grupo control (panel a) y esto se traduce en una mayor excreción urinaria en el momento de máximo daño renal (panel b). Además, en los modelos animales de gentamicina e isquemia la excreción urinaria de KIM-1 estaba incrementada respecto al grupo control el día de máximo daño renal (panel c).

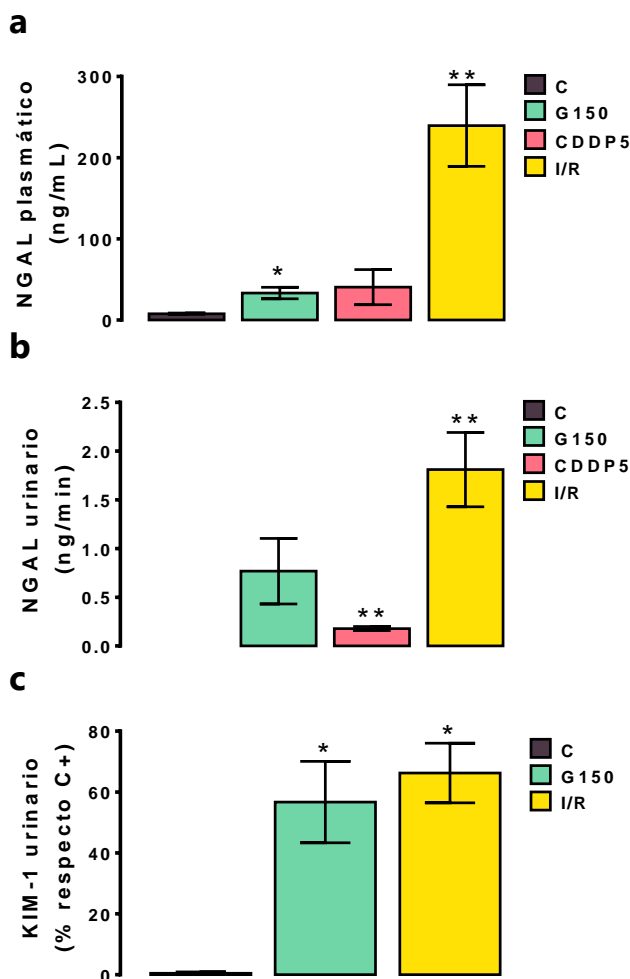


Figura 90. Nivel de NGAL y KIM-1 en la orina y el plasma de los diferentes grupos experimentales. NGAL urinario (a) y NGAL plasmático (b) cuantificados por ELISA, KIM-1 urinario determinado por Western blot (c) en el momento de máximo daño renal. NGAL: lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos. KIM-1: molécula de lesión renal 1. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (EEM). Control (C, n=3), gentamicina 150 mg/kg/día (G150, n=3), cisplatino 5 mg/kg (CDDP5, n=3) e isquemia-reperfusión 60 minutos (I/R, n=3). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$: respecto grupo C.

8.2 NGAL y KIM-1 desaparecen de la orina durante la perfusión renal *in situ* con Krebs

Para dilucidar la procedencia de estas proteínas, se decidió realizar un sistema de perfusión renal en estos animales con una solución salina libre de proteínas denominada solución Krebs-dextrano. Como control del experimento se realizó en esos mismos animales el sistema de perfusión, pero esta vez con su propia sangre, para descartar un posible artefacto experimental.

En las figuras 91 y 92 se aprecia que cuando los riñones de las ratas tratadas con gentamicina, cisplatino, o sometidas a una isquemia eran perfundidos con la solución isotónica Krebs-dextrano, NGAL y KIM-1 no se excretaban en la orina de ninguno de los grupos. Estos resultados apoyan la idea de que los marcadores observados en la orina de las ratas provienen de la sangre y no del tejido renal. Por tanto, la aparición en la orina es el resultado de una alteración intrínseca en el manejo tubular y muy probablemente de un defecto en la reabsorción. Como control de los experimentos de perfusión, los riñones de las ratas se perfundieron con su propia sangre a través de un catéter que conectaba su arteria carótida con la arteria renal. Los grupos experimentales con DRA excretaban todavía ambos marcadores en la orina mientras que el grupo control no lo hacía. Estos resultados confirman que los resultados obtenidos del sistema de perfusión renal no se deben a un artefacto experimental.

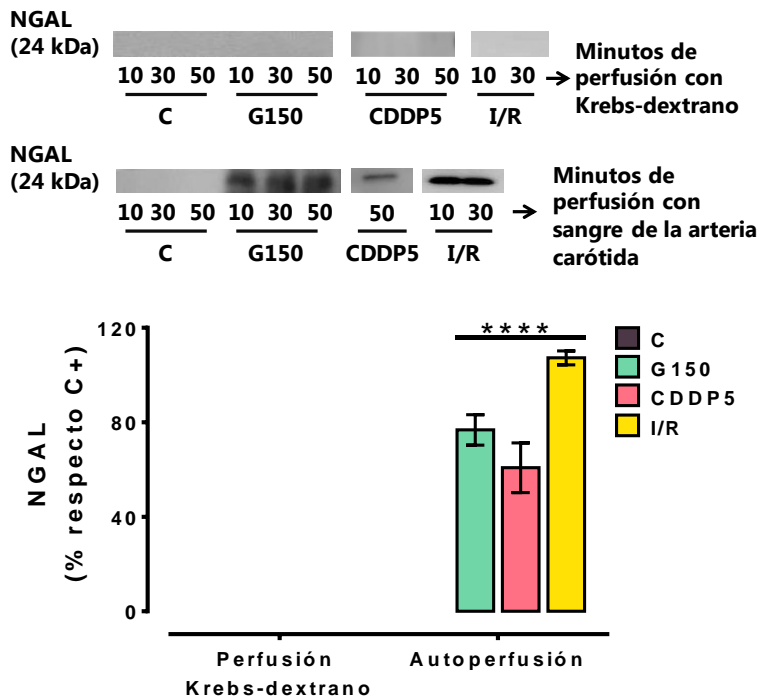


Figura 91. Nivel de NGAL urinario tras la perfusión renal con Krebs-dextrano y la autoperfusión de los diferentes grupos experimentales. NGAL: lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos. Imagen representativa de la presencia de NGAL en la orina de los animales del estudio. Los datos representan la media ± el error estándar de la media (EEM). Control (C, n=3), gentamicina 150 mg/kg/día (G150, n=3), cisplatino 5 mg/kg (CDDP5, n=3) e isquemia-reperfusión 60 minutos (I/R, n=3). ****p<0,0001: respecto muestra perfusión Krebs-dextrano mismo grupo.

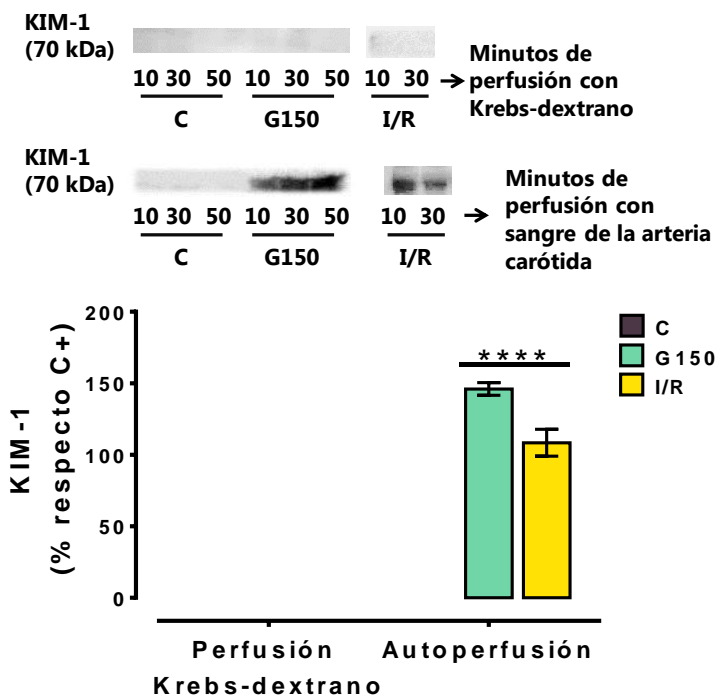


Figura 92. Nivel de KIM-1 urinario tras la perfusión renal con Krebs-dextrano y la autoperfusión de los diferentes grupos experimentales. KIM-1: molécula de lesión renal 1. Imagen representativa de la presencia de KIM-1 en la orina de los animales del estudio. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (EEM). Control (C, n=3), gentamicina 150 mg/kg/día (G150, n=3) e isquemia-reperfusión 60 minutos (I/R, n=3). ****p<0,0001: respecto muestra perfusión Krebs-dextrano mismo grupo.

Estos mismos resultados los obtuvimos en los modelos animales de DRA inducidos por la gentamicina y con la isquemia renal. Tras analizar los niveles urinarios de NAG durante la perfusión con Krebs-dextrano, NAG desaparecía, mientras que cuando se reestablecía el flujo sanguíneo mediante la autoperfusión, NAG aparecía en el grupo de gentamicina, no así en los animales con isquemia (figura 93), pues en estos animales ya vimos en el bloque I en el momento de máximo daño renal no tenían incrementada la excreción urinaria de NAG.

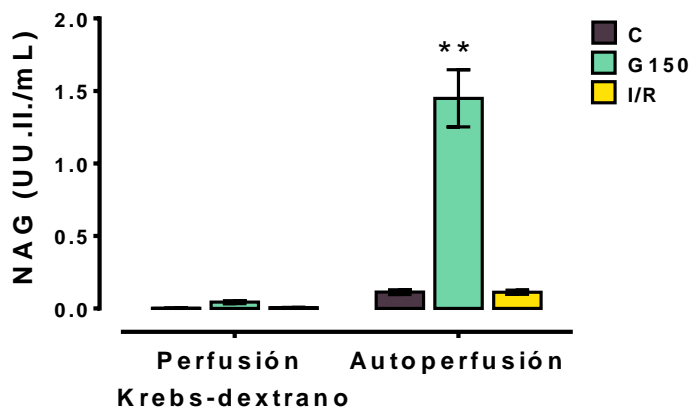


Figura 93. Nivel de NAG urinario tras la perfusión renal con Krebs-dextrano y la auto-perfusión de los diferentes grupos experimentales. NAG: N-acetil- β -D-glucosaminidasa. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (EEM). Control (C, n=3), gentamicina 150 mg/kg/día (G150, n=3) e isquemia-reperfusión 60 minutos (I/R, n=3). **** $p < 0,0001$: respecto muestra perfusión Krebs-dextrano mismo grupo.

Los resultados obtenidos hasta ahora son similares a los obtenidos por nuestro laboratorio en experimentos realizados en ratas Wistar hembra. En dicho trabajo el tratamiento nefrotóxico con gentamicina (150 mg/kg/día), durante 6 días provocaba la excreción urinaria de t-gelsolina. Tras sustituir el flujo sanguíneo por la solución Krebs, t-gelsolina desaparecía de la orina, lo que indica que proviene de la sangre (Ferreira y cols., 2011b).

Sin embargo, el origen de TCP-1 es renal. En la figura 94 se observa que cuando los riñones de las ratas con DRA son perfundidos con Krebs-dextrano, TCP-1 se sigue excretando a la orina. La hipótesis que se plantea es que ante un daño la expresión génica de TCP-1 se incrementa en las células tubulares, y debido al estrecho contacto con el lumen tubular se vierte directamente a la orina.

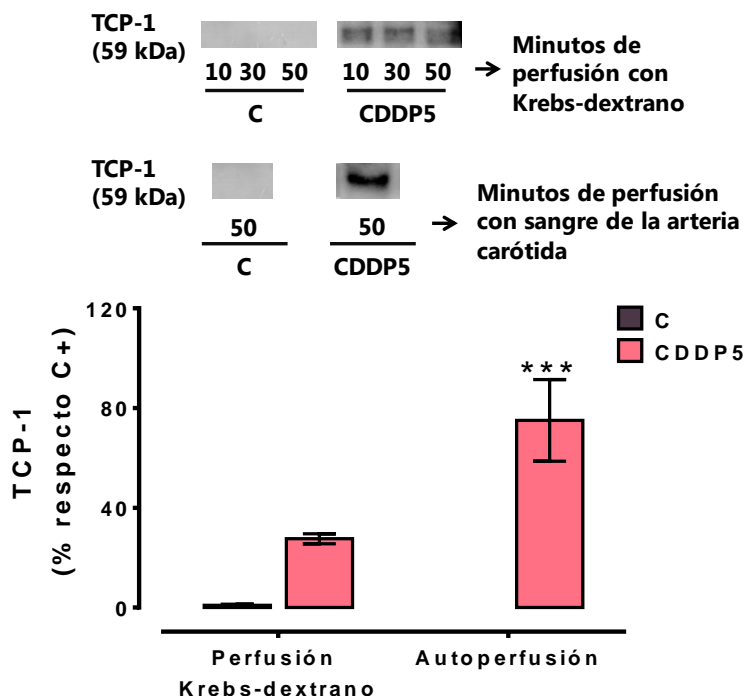


Figura 94. Nivel de TCP-1 urinario tras la perfusión renal con Krebs-dextrano y la autoperfusión de los diferentes grupos experimentales. TCP-1: del inglés *tailless complex polypeptide 1*. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (EEM). Control (C, n=3), cisplatino 5 mg/kg (CDDP5, n=3). *** $p < 0,001$: respecto muestra perfusión Krebs-dextrano mismo grupo.

Lo mismo ocurre con Reg IIIb. En resultados obtenidos por nuestro laboratorio la perfusión renal con Krebs en ratas tratadas con gentamicina a dosis tóxicas, la presencia urinaria de Reg IIIb se mantenía, lo que indica que al menos una parte de Reg IIIb proviene directamente del tejido renal (Ferreira y cols., 2011b).

8.3 NGAL reaparece en la orina de ratas con DRA, y no de ratas controles, cuando se perfunde los riñones con Krebs que contiene NGAL exógeno

Para dar más peso a este concepto, se añadió NGAL de rata a la solución de perfusión de Krebs-dextrano. Cuando se perfundieron los riñones de las ratas con

DRA y de las ratas control con la solución de Krebs-dextrano que contenía NGAL, esta proteína reapareció en niveles altos en la orina de los animales con DRA, mientras que sólo lo hizo mínimamente en la orina de los animales control (figura 95).

La concentración de NGAL en la solución de Krebs-dextrano se valoró en experimentos piloto para tener un exceso mínimo de NGAL más allá de la capacidad de reabsorción normal de los túbulos. Este resultado indica además que la manipulación renal defectuosa de NGAL en ratas con DRA es responsable de su mayor excreción urinaria. Debido a que en estos animales la tasa de filtración glomerular está disminuida, solo se pueden invocar alteraciones tubulares para explicar el aumento de la excreción urinaria de NGAL. Y debido a que no se sabe que las proteínas generalmente son secretadas por los túbulos al ultrafiltrado, es probable que la reabsorción defectuosa sea la causa del aumento de la excreción.

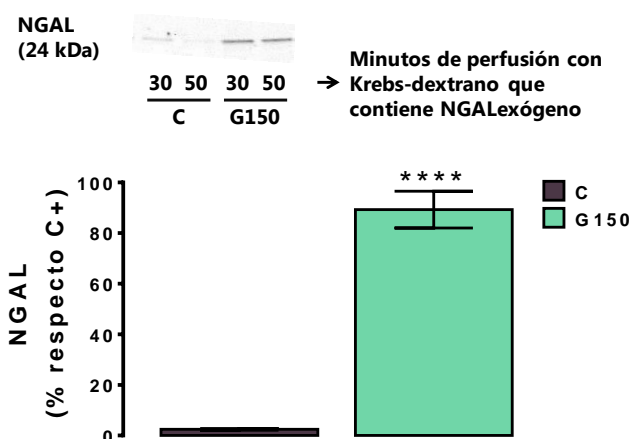


Figura 95. Nivel de NGAL urinario tras la perfusión renal con Krebs-dextrano que contiene NGAL exógeno. NGAL: lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos. Imagen representativa de la presencia de NGAL en la pseudo-orina de los animales del estudio. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (EEM). Control (C, n=3) y gentamicina 150 mg/kg/día (G150, n=3). ****p<0,0001: respecto grupo C.

8.4 NGAL se detecta en el efluente de la vena renal durante la perfusión con Krebs en ratas con DRA, pero no en el de los controles

Debido a que NGAL está sobrepresado por los riñones con DRA, pero no se desprende al ultrafiltrado, planteamos la hipótesis de que NGAL podría liberarse desde el lado basolateral de las células del túbulo hacia el sistema venoso renal y, por lo tanto, a la circulación sistémica. Cuando analizamos NGAL en el efluente de la vena renal en riñones que han sido perfundidos con Krebs-dextrano, observamos que los riñones con DRA liberan niveles elevados de NGAL a través de la vena renal, mientras que esta proteína es indetectable en el efluente venoso de las ratas control (figura 96 panel a). Cuando los efluentes de la vena renal perfundidos con Krebs-dextrano se utilizaron para perfundir los riñones con DRA y controles, NGAL apareció en la orina de ratas con DRA, pero no en la orina de las ratas de control (panel b).

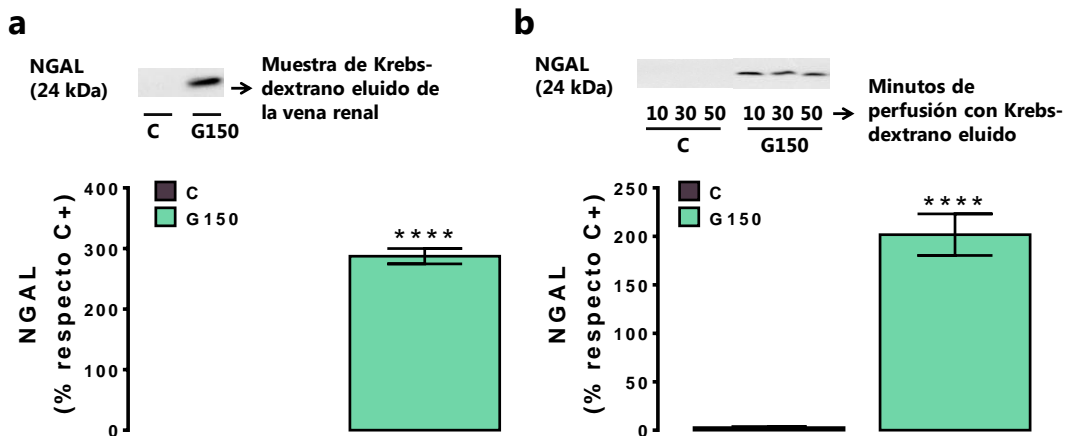


Figura 96. Nivel de NGAL en las muestras de Krebs-dextrano eluido de la vena renal y de NGAL urinario tras la perfusión renal con Krebs-dextrano eluido. NGAL: lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos. Imagen representativa de la presencia de NGAL en las muestras de Krebs-dextrano eluido y en la pseudo-orina de los animales del estudio. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (EEM). Control (C, n=3) y gentamicina 150 mg/kg/día (G150, n=3). **** $p < 0,0001$: respecto grupo C.

Partimos de que las ratas de nuestros modelos de daño renal agudo excretan NGAL y KIM-1 urinario y, de nuestros resultados, se concluye que el origen de estas proteínas es plasmático, ya que cuando los riñones son perfundidos con Krebs-dextrano, dejan de aparecer en la orina, y, cuando esos mismos riñones se perfunden con su propia sangre, las ratas excretan NGAL y KIM-1 en la orina. Todos estos experimentos nos informan que hay una alteración intrínseca en el manejo tubular de esta proteína en ratas, probablemente por un defecto en la reabsorción tubular.

Finalmente, de acuerdo con los resultados obtenidos en el apartado 6.1, cuando se administraba un bolo de maleato sódico vía intravenosa en ratas normales (control), NGAL aparecía rápidamente en la orina. Este resultado nos indica que la inhibición de la recaptación tubular de NGAL da como resultado su excreción urinaria en nuestras ratas, de manera congruente con el concepto de que, en nuestros modelos de DRA, el NGAL urinario resulta de su reabsorción tubular defectuosa. Pero, lo que es más interesante, el análisis histológico del tejido renal y la tinción con NGAL mediante inmunohistoquímica revelan que después de la administración de maleato no hay daño tisular ni expresión de NGAL en el tejido renal (figura 97).

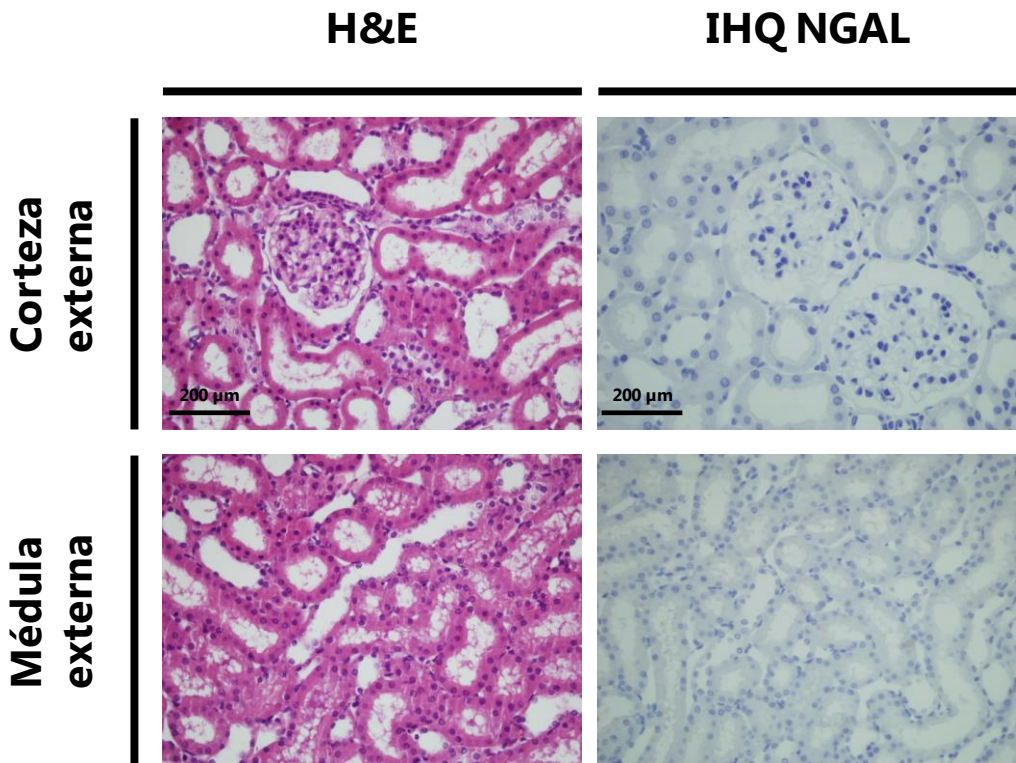


Figura 97. Imágenes representativas (400X) de cortes histológicos de la zona cortical externa e interna con hematoxilina y eosina, y de inmunohistoquímica teñidas con anti-NGAL en ratas control. NGAL: lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos. H&E: hematoxilina y eosina. IHQ: inmunohistoquímica. Control (C, n=3).

De todo esto podemos obtener la siguiente conclusión parcial:

- NGAL urinario no es un marcador de lesión de las estructuras tubulares renales, sino que la aparición de este marcador nos indica la existencia de un defecto en la reabsorción de los túbulos proximales.

“Lo importante en la ciencia no es tanto
obtener nuevos datos, sino descubrir nuevas
formas de pensar sobre ellos.”

William Lawrence Bragg

Discusión general

El daño renal agudo es un tipo de lesión de gravedad clínica en el que la función excretora renal se reduce súbitamente, de forma que los riñones son incapaces de depurar la sangre de los fármacos, tóxicos y productos de desecho del metabolismo. Aproximadamente el 25 % de los 100 fármacos más utilizados en las unidades de cuidados intensivos son potencialmente nefrotóxicos (Taber & Mueller, 2006c). La gentamicina, el cisplatino o los procedimientos quirúrgicos que conllevan una isquemia renal provocan una lesión renal. Dependiendo de la dosis en el caso de los fármacos nefrotóxicos, o de la duración de la hipoxia, la lesión renal se manifiesta como una mera pérdida del borde en cepillo de las células epiteliales del túbulo proximal en los casos más leves, que compromete la reabsorción, hasta una necrosis tubular aguda, nuestro caso de estudio, que produce una oclusión tubular por taponamiento debido al acúmulo de material procedente de la destrucción tisular (Nakakuki y cols., 1996). La disminución de la reabsorción tubular desencadena un mecanismo de compensación que reduce drásticamente la filtración glomerular para evitar la pérdida masiva de agua y electrolitos.

En este trabajo se parte de que la gentamicina, el cisplatino y el nitrato de uranilo a dosis nefrotóxicas, la isquemia renal y la sepsis dan lugar a modelos animales experimentales de DRA de tipo renal o intrínseco con necrosis tubular aguda, con distintas etiopatologías. Los 5 grupos presentan niveles de creatinina y urea plasmáticas elevados, TFG disminuida, niveles de proteinuria elevados (a excepción del grupo experimental de sepsis) y cocientes CrU/CrP con valores inferiores a 15, indicativos de NTA. Esta necrosis se localiza en la zona cortical externa en el modelo de gentamicina, y en la médula externa en los modelos del cisplatino, el nitrato de uranilo, la isquemia y la sepsis. Por otro lado, la triple terapia que produce el DRA conocido como Triple Whammy es un modelo animal de DRA de tipo pre-renal. Presenta niveles altos de CrP y bajos de TFG y sin embargo, no presenta proteinuria, ni aumento de la EFNa, ni daños en las estructuras del riñón. Por tanto, se concluye que son 6 modelos animales adecuados para estudiar marcadores urinarios candidatos a formar parte de la huella proteica que informen sobre la etiología y aspectos fisiopatológicos para poder delimitar el diagnóstico del daño renal agudo.

1. Hacia un nuevo sistema de diagnóstico precoz y etiológico del DRA

Sección eliminada por sostener datos susceptibles de ser incluidos en una solicitud de patente.

2. NGAL y KIM-1 urinarios vienen de la sangre y no del tejido renal: cambio en su significado diagnóstico

En conjunto, nuestros resultados indican que, en diferentes tipos de daño renal agudo experimental en ratas, el aumento de la excreción urinaria de NGAL y KIM-1 es consecuencia de su disminución de la reabsorción tubular, más que de su eliminación directa de las células del túbulo al ultrafiltrado.

En condiciones fisiológicas, los niveles de NGAL y KIM-1 en plasma son bajos. NGAL y KIM-1 circulante se filtran libremente a través de los glomérulos renales ya que son unas proteínas de bajo peso molecular y con carga positiva por lo que se reabsorben completamente en el túbulo proximal (figura 100) (Schmidt-Ott, 2011).

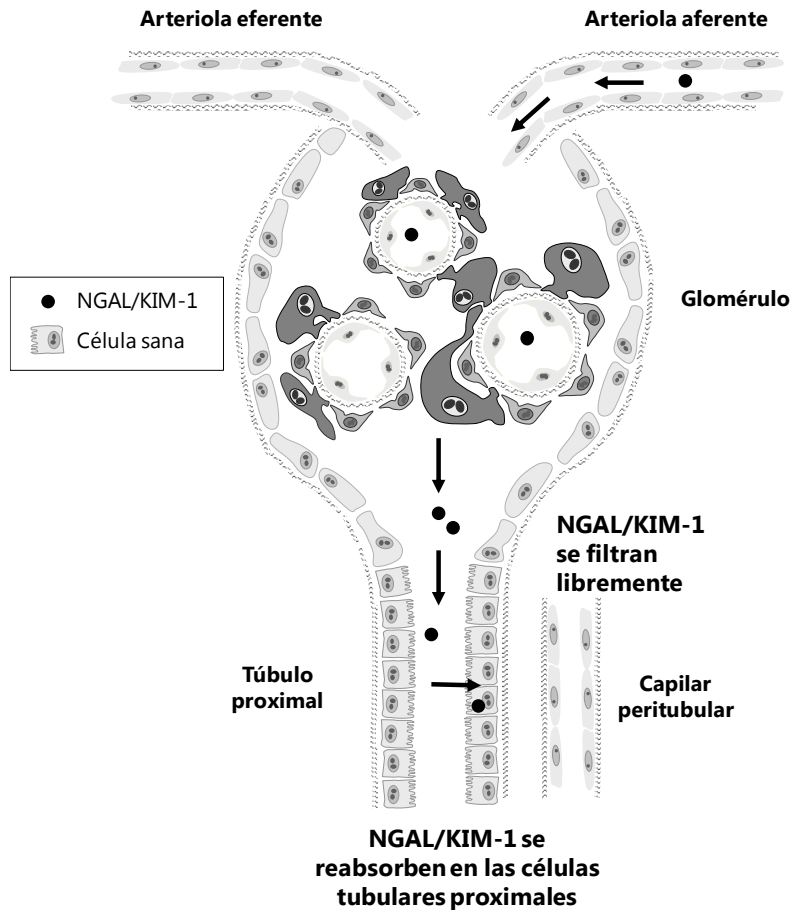


Figura 100. En condiciones fisiológicas NGAL y KIM-1 son reabsorbidos por las células del túbulo proximal. NGAL: lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos. KIM-1: molécula de lesión renal 1.

Hasta ahora, la aparición de NGAL y KIM-1 en la orina de los animales y pacientes con DRA se ha atribuido a su expresión aumentada en el compartimento tubular de los riñones debido al daño y a su eliminación directa desde las células del túbulo hacia la orina (E. Singer y cols., 2013). De acuerdo con esta idea, se establece que estos marcadores informan sobre el estado de lesión del compartimento tubular renal. Sin embargo, esta presunta conexión entre el aumento de la expresión tubular de NGAL y KIM-1 y su acceso directo a la orina ha pasado en gran medida sin el apoyo de pruebas experimentales específicas. Paragas y su grupo se dieron cuenta de esta ausencia de evidencias y se dispusieron a obtener evidencias a través de una serie de experimentos realizados sobre trasplantes cruzados de riñón entre ratones NGAL $-/-$ y de tipo salvaje. Mostraron que en ratones NGAL $-/-$ previamente

nefrectomizados, trasplantados con un riñón de ratones de tipo salvaje y posterior daño renal mediante una isquemia produjeron la excreción urinaria de NGAL; mientras en los ratones de tipo salvaje con un riñón NGAL -/- trasplantado, el daño renal no produjo aumento de NGAL urinario. Esto indicó, según ellos, que los riñones son la fuente de NGAL detectada en la orina durante el DRA. Sin embargo, estos resultados no explicaban la ruta de conexión directa entre el riñón y la orina para NGAL (Paragas y cols., 2011).

Nuestros resultados sugieren que, de hecho, los riñones secretan una mayor cantidad de NGAL durante un daño renal en ratas. NGAL y KIM-1 no se vierten directamente en la orina sino a la circulación renal, desde donde se une a la circulación periférica a través de la vena renal. Los resultados de nuestros experimentos de perfusión renal *in situ* son compatibles con el filtrado de NGAL y KIM-1 a través de la barrera de filtración glomerular y, por lo tanto, acceden al compartimento tubular. Aquí, si los túbulos están intactos (como en los animales de control), NGAL y KIM-1 se reabsorben y no llegan a la orina final. Sin embargo, si los túbulos están dañados o funcionalmente alterados (como en los animales que sufren DRA) estos marcadores no se reabsorben tan eficientemente, y algunos NGAL y KIM-1 alcanzan la orina final, donde se puede detectar en asociación con DRA (figura 101). Por tanto, nuestros resultados son compatibles con los hallazgos obtenidos por Paragas ya que en ausencia de otras fuentes de NGAL (como en ratones NGAL -/-), los riñones dañados arrojan NGAL a la circulación sanguínea.

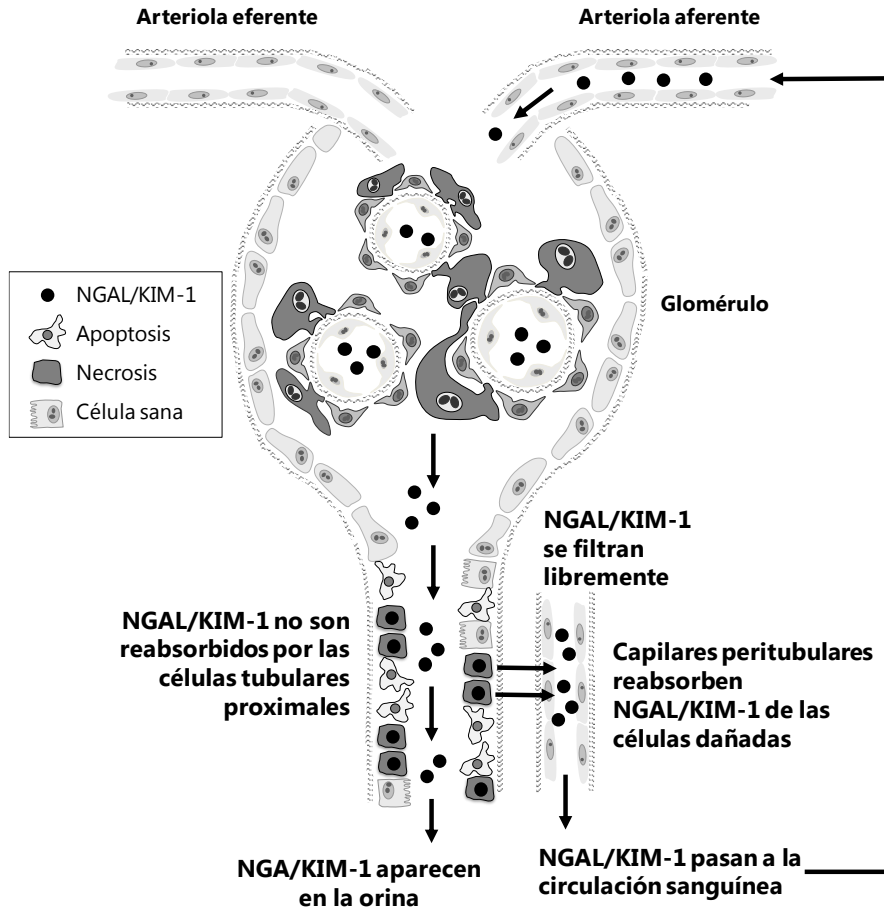


Figura 101. En situaciones de DRA NGAL y KIM-1 aparecen en la orina por un defecto en la reabsorción tubular. NGAL: lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos. KIM-1: molécula de lesión renal 1.

En este contexto, NGAL y KIM-1 podrían ser marcadores indirectos de daño renal, sin embargo, como demuestran los experimentos con el modelo de maleato sódico, también son posibles otras situaciones de alta excreción urinaria de NGAL y KIM-1 sin daño renal.

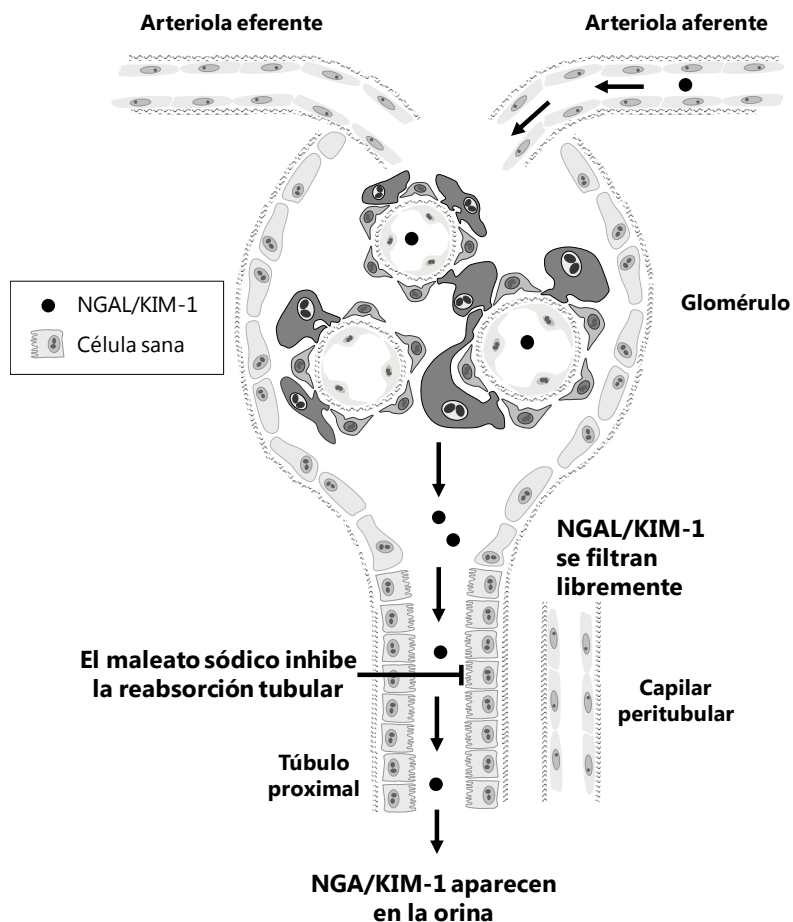


Figura 102. El maleato sódico inhibe la reabsorción tubular de NGAL y KIM-1. NGAL: lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos. KIM-1: molécula de lesión renal 1.

Este modelo cambia el significado biológico de NGAL y KIM-1 urinarios y su importancia para un diagnóstico personalizado y fisiopatológico de DRA, basado en el conocimiento de los mecanismos subyacentes. Según nuestros resultados, en el contexto del daño renal agudo, NGAL y KIM-1 ya no pueden considerarse marcadores del daño del parénquima renal, sino más probablemente marcadores de reabsorción tubular defectuosa, ya que estas dos condiciones pueden coexistir, aunque no necesariamente. Mientras que la reabsorción defectuosa puede ser causada por daño tubular, no todos los escenarios de daño tubular deben resultar en una excreción proporcional de NGAL, ya que las nefronas muy dañadas pueden

colapsar las vías de evacuación; la reabsorción alterada también puede ser producida por causas diferentes al daño tubular, como tensión tubular subletal o disfunción causada por fármacos (ejemplificados por nuestros experimentos con maleato sódico), desequilibrio energético o condiciones fisiopatológicas indeterminadas que alteran el transporte tubular o la homeostasis. De hecho, aunque solo desde una perspectiva teórica, Singer y cols. (2013) reconocieron que la reabsorción tubular defectuosa también podría contribuir en cierta medida a la excreción urinaria de NGAL durante el DRA. Esta nueva visión fisiopatológica puede explicar por qué el NGAL urinario aumenta significativamente en el DRA humano, especialmente en formas intrínsecas como la necrosis tubular aguda (Eugenia Singer y cols., 2011), a pesar de los hallazgos de daño tisular muy limitados que generalmente se informan en las biopsias de NTA en humanos (Heyman, Lieberthal, Rogiers, & Bonventre, 2002; Heyman, Rosenberger, & Rosen, 2011; S. Rosen & Stillman, 2008; Seymour Rosen & Samuel, 2001).

La nueva consideración de NGAL y KIM-1 urinarios como marcadores de reabsorción tubular defectuosa también puede arrojar algo de luz sobre la discrepancia que existe entre el sitio de la lesión y el sitio de expresión de NGAL y KIM-1 en las nefronas dañadas. De hecho, en los modelos de DRA en los que el sitio de la lesión se localiza en el túbulo proximal, también se ha informado de una expresión masiva de NGAL en la nefrona distal (E. Singer y cols., 2013). En nuestros modelos, no existe relación entre el área de daño y el nivel de NGAL en la orina, lo que sugiere que probablemente las alteraciones funcionales que afectan a su transporte tubular son responsables de la excreción urinaria de NGAL. NGAL es reabsorbido en los túbulos por al menos dos transportadores conocidos: el complejo megalina-cubilina en el túbulo proximal (Hvidberg y cols., 2005c) y el receptor Lipocalin-2 [24p3/lipocalina asociada a gelatinasa neutrófila (NGAL)] (24p3R) en el túbulo distal (Langelueddecke y cols., 2012). Nuestros resultados están de acuerdo con esto. El desacoplamiento de la recaptación tubular con maleato en ratas Wistar sanas normales da como resultado una excreción urinaria de NGAL alta e inmediata.

Lo más interesante de todo es que esta nueva información que nos aportan los marcadores NGAL y KIM-1 no la aportan otros marcadores como el TCP-1. Los niveles urinarios de este marcador también se incrementan tras la administración del inhibidor de los transportadores tubulares, sin embargo, en esta situación la excreción urinaria de TCP-1 en las ratas con DRA es el doble que la excreción urinaria de TCP-1 en ratas sanas. Además, cuando los riñones de las ratas con DRA son

perfundidos con la solución de Krebs-dextrano, TCP-1 sigue apareciendo en la orina. Estos resultados indican que al menos una gran parte del TCP-1 urinario proviene de las propias células tubulares, es decir de origen renal que, por contacto directo con la orina, vierten el TCP-1 al ultrafiltrado y la otra parte del TCP-1 proviene de una falta en la reabsorción. Por tanto, TCP-1 indicaría un daño tubular.

En perspectiva, revelar los mecanismos que conducen a la aparición de biomarcadores en los compartimentos corporales (y en muestras corporales) cambiará el enfoque conceptual del diagnóstico de DRA: desde el diagnóstico asociativo basado en biomarcadores que se correlacionan estadísticamente con las condiciones clínicas, hasta el diagnóstico fisiopatológico y personalizado (es decir, una verdadera biopsia líquida) basada en biomarcadores con significado biológico conocido.

“La conclusión es que sabemos muy poco, y no obstante es asombroso que sepamos tanto, y más sorprendente aún que tan poco conocimiento nos dé tanto poder”.

Bertrand Russell

Conclusiones

Este trabajo de investigación nos ha permitido alcanzar las siguientes conclusiones:

1. Conclusión eliminada por sostener datos susceptibles de ser incluidos en una solicitud de patente.
2. Conclusión eliminada por sostener datos susceptibles de ser incluidos en una solicitud de patente.
3. Conclusión eliminada por sostener datos susceptibles de ser incluidos en una solicitud de patente.
4. GM2AP, Reg IIIb y t-gelsolina indican, al menos en nuestros modelos experimentales, que existe un daño en la reabsorción tubular de las células proximales localizadas en la corteza externa.
5. El sistema de perfusión renal in situ es una técnica útil para dilucidar si el origen de los marcadores urinarios es renal o plasmático. Concretamente, la causa del aumento de NGAL y KIM-1 en la orina de las ratas que sufren de DRA parece ser por una alteración en el manejo tubular de estos marcadores, más que por el vertido directo desde el tejido renal dañado.

*"Las maravillas del mundo nacen de reglas
simples repetidas sin fin"*

Benoît Mandelbrot

Bibliografía

- A, M. E., & Cordero. (1998). *Fundamentos de fisiopatología*. Retrieved from http://www.margenlibros.com/libro/fundamentos-de-fisiopatologia_205912
- Abella, V., Scotece, M., Conde, J., Gómez, R., Lois, A., Pino, J., ... Gualillo, O. (2015). The potential of lipocalin-2/NGAL as biomarker for inflammatory and metabolic diseases. *Biomarkers: Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals*, 20(8), 565–71. <https://doi.org/10.3109/1354750X.2015.1123354>
- Abosaif, N. Y., Tolba, Y. A., Heap, M., Russell, J., & Nahas, A. M. El. (2005). The Outcome of Acute Renal Failure in the Intensive Care Unit According to RIFLE: Model Application, Sensitivity, and Predictability. *American Journal of Kidney Diseases*, 46(6), 1038–1048. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2005.08.033>
- Abuelo, J. G. (2007). Normotensive Ischemic Acute Renal Failure. *New England Journal of Medicine*, 357(8), 797–805. <https://doi.org/10.1056/NEJMra064398>
- Adiyanti, S. S., & Loho, T. (2012a). Acute Kidney Injury (AKI) biomarker. *Acta Medica Indonesiana*, 44(3), 246–55. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22983082>
- Adiyanti, S. S., & Loho, T. (2012b). Acute Kidney Injury (AKI) biomarker. *Acta Medica Indonesiana*, 44(3), 246–55. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22983082>
- Adiyanti, S. S., & Loho, T. (2012c). Acute Kidney Injury (AKI) biomarker. *Acta Medica Indonesiana*, 44(3), 246–55. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22983082>
- Åhlström, A., Tallgren, M., Peltonen, S., & Pettilä, V. (2004). Evolution and predictive power of serum cystatin C in acute renal failure. *Clinical Nephrology*, 62(11), 344–350. <https://doi.org/10.5414/CNP62344>
- Ahmadzadeh, A., Shahbazian, H., Safapour, N., Tulabi, M., & Zandifar, S. (2015). Comparison between the effects of one-day treatment regimen with cisplatin on renal function and various biochemical parameters in patients with gastric and lung cancer compared with two-days divided cisplatin treatment regimen. *Journal of Renal Injury Prevention*, 4(3), 87–91. <https://doi.org/10.12861/jrip.2015.17>
- Alge, J. L., & Arthur, J. M. (2015). Biomarkers of AKI: A Review of Mechanistic Relevance and Potential Therapeutic Implications. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 10(1), 147–155. <https://doi.org/10.2215/CJN.12191213>
- Amsellem, S., Gburek, J., Hamard, G., Nielsen, R., Willnow, T. E., Devuyst, O., ... Kozyraki,

- R. (2010). Cubilin Is Essential for Albumin Reabsorption in the Renal Proximal Tubule. *Journal of the American Society of Nephrology*, 21(11), 1859–1867. <https://doi.org/10.1681/ASN.2010050492>
- Arias Rodríguez, M., Aljama, P., & Hernando Avendaño, L. (2013). *Nefrología clínica*. Médica Panamericana. Retrieved from <https://www.medicapanamericana.com/Libros/Libro/4877/Hernando-Nefrologia-Clinica.html>
- Asif, A., & Epstein, M. (2004). Prevention of radiocontrast-induced nephropathy. *American Journal of Kidney Diseases: The Official Journal of the National Kidney Foundation*, 44(1), 12–24. <https://doi.org/10.1053/J.AJKD.2004.04.001>
- Aso, Y. (2007). Plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 in vascular inflammation and thrombosis. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 12, 2957–66. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17485272>
- Bae, E. H., Lee, J., Ma, S. K., Kim, I. J., Frokiaer, J., Nielsen, S., ... Kim, S. W. (2009). -Lipoic acid prevents cisplatin-induced acute kidney injury in rats. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 24(9), 2692–2700. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfp176>
- Bagshaw, S. M., & Bellomo, R. (2007). Early diagnosis of acute kidney injury. *Current Opinion in Critical Care*, 13(6), 638–644. <https://doi.org/10.1097/MCC.0b013e3282f07570>
- Bagshaw, S. M., Bellomo, R., & Kellum, J. A. (2008). Oliguria, volume overload, and loop diuretics. *Critical Care Medicine*, 36(Suppl), S172–S178. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318168c92f>
- Bagshaw, S. M., Delaney, A., Haase, M., Ghali, W. A., & Bellomo, R. (2007). Loop diuretics in the management of acute renal failure: a systematic review and meta-analysis. *Critical Care and Resuscitation: Journal of the Australasian Academy of Critical Care Medicine*, 9(1), 60–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17352669>
- Bagshaw, S. M., Uchino, S., Bellomo, R., Morimatsu, H., Morgera, S., Schetz, M., ... Beginning and Ending Supportive Therapy for the Kidney (BEST Kidney) Investigators. (2009). Timing of renal replacement therapy and clinical outcomes in critically ill patients with severe acute kidney injury. *Journal of Critical Care*, 24(1), 129–140. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2007.12.017>
- Bailly, V., Zhang, Z., Meier, W., Cate, R., Sanicola, M., & Bonventre, J. V. (2002). Shedding of Kidney Injury Molecule-1, a Putative Adhesion Protein Involved in Renal Regeneration. *Journal of Biological Chemistry*, 277(42), 39739–39748. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200562200>

- Banday, A. A., Priyamvada, S., Farooq, N., Yusufi, A. N. K., & Khan, F. (2008). Effect of uranyl nitrate on enzymes of carbohydrate metabolism and brush border membrane in different kidney tissues. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 46(6), 2080–8. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.01.048>
- Barajas, L. (1979). Anatomy of the juxtaglomerular apparatus. *The American Journal of Physiology*, 237(5), F333–43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/386808>
- Barker, C. F., & Markmann, J. F. (2013). Historical Overview of Transplantation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(4), a014977–a014977. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a014977>
- Belayev, L. Y., & Palevsky, P. M. (2014). The link between acute kidney injury and chronic kidney disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 23(2), 149–154. <https://doi.org/10.1097/01.mnh.0000441051.36783.f3>
- Belcher, J. M., & Parikh, C. R. (2011). Is it time to evolve past the prerenal azotemia versus acute tubular necrosis classification? *Clinical Journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, 6(10), 2332–4. <https://doi.org/10.2215/CJN.08570811>
- 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., & Acute Dialysis Quality Initiative workgroup, the 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 (London, England)*, 8(4), R204–12. <https://doi.org/10.1186/cc2872>
- Belzer, F. O. (1988). Immunosuppressive agents--a personal historical perspective. *Transplantation Proceedings*, 20(3 Suppl 3), 3–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3291260>
- Bergeron, M., Mayers, P., & Brown, D. (1996a). Specific effect of maleate on an apical membrane glycoprotein (gp330) in proximal tubule of rat kidneys. *The American Journal of Physiology*, 271(4 Pt 2), F908–16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8898022>
- Bergeron, M., Mayers, P., & Brown, D. (1996b). Specific effect of maleate on an apical membrane glycoprotein (gp330) in proximal tubule of rat kidneys. *The American Journal of Physiology*, 271(4 Pt 2), F908–16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8898022>

- Berliner, R. W., Kennedy, T. J., & Hilton, J. G. (1950). Effect of maleic acid on renal function. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 75(3), 791–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14808405>
- Binswanger, U. (1997). Acute Renal Failure: Changing Causes? *Kidney and Blood Pressure Research*, 20(3), 163–163. <https://doi.org/10.1159/000174132>
- Blank, M., De, A., Goodsaid, F. F., Harlow, P., Hausner, E., Jacobson-Kram, D., ... Xiao, S. (2009). Review of Qualification Data for Biomarkers of Nephrotoxicity Submitted by the Predictive Safety Testing Consortium Biomarker Qualification Review Team. FDA. Retrieved from <https://www.fda.gov/downloads/drugs/developmentapprovalprocess/drugdevelopmenttoolsqualificationprogram/ucm382536.pdf>
- Blantz, R. C., & Singh, P. (2011). Analysis of the Prerenal Contributions to Acute Kidney Injury. In *Contributions to nephrology* (Vol. 174, pp. 4–11). <https://doi.org/10.1159/000329027>
- Blázquez-Medela, A. M., García-Sánchez, O., Blanco-Gozalo, V., Quiros, Y., Montero, M. J., Martínez-Salgado, C., ... López-Hernández, F. J. (2014). Hypertension and Hyperglycemia Synergize to Cause Incipient Renal Tubular Alterations Resulting in Increased NGAL Urinary Excretion in Rats. *PLoS ONE*, 9(8), e105988. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105988>
- Block, C. A., & Schoolwerth, A. C. (2006a). CRITICAL CARE ISSUES FOR THE NEPHROLOGIST: The Epidemiology and Outcome of Acute Renal Failure and the Impact on Chronic Kidney Disease. *Seminars in Dialysis*, 19(6), 450–454. <https://doi.org/10.1111/j.1525-139X.2006.00206.x>
- Block, C. A., & Schoolwerth, A. C. (2006b). The Epidemiology and Outcome of Acute Renal Failure and the Impact on Chronic Kidney Disease. *Seminars in Dialysis*, 19(6), 450–454. <https://doi.org/10.1111/j.1525-139X.2006.00206.x>
- Bone, R. C., Sprung, C. L., & Sibbald, W. J. (1992). Definitions for sepsis and organ failure. *Critical Care Medicine*, 20(6), 724–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1597021>
- Bonventre, J. V. (2007). Diagnosis of Acute Kidney Injury: From Classic Parameters to New Biomarkers. In *Acute Kidney Injury* (Vol. 156, pp. 213–219). Basel: KARGER. <https://doi.org/10.1159/000102086>
- Bonventre, J. V. (2010). Mechanisms of Acute Kidney Injury and Repair. In *Management of Acute Kidney Problems* (pp. 13–20). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-69441-0_2

- Bonventre, J. V., & Zuk, A. (2004). Ischemic acute renal failure: An inflammatory disease? *Kidney International*, 66(2), 480–485. https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.761_2.x
- Bonventre, J. V. (2004a). Pathophysiology of ischemic acute renal failure. Inflammation, lung-kidney cross-talk, and biomarkers. *Contributions to Nephrology*, 144, 19–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15264395>
- Bonventre, J. V. (2004b). Pathophysiology of ischemic acute renal failure. Inflammation, lung-kidney cross-talk, and biomarkers. *Contributions to Nephrology*, 144, 19–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15264395>
- Bonventre, J. V., Vaidya, V. S., Schmouder, R., Feig, P., & Dieterle, F. (2010). Next-generation biomarkers for detecting kidney toxicity. *Nature Biotechnology*, 28(5), 436–440. <https://doi.org/10.1038/nbt0510-436>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>
- Brenner, B. M., & Rector, F. C. (2008). *Acute renal failure*. (6th ed.). Saunders Elsevier. Retrieved from <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=UCC.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=118577>
- Brienza, N., Giglio, M. T., Marucci, M., & Fiore, T. (2009). Does perioperative hemodynamic optimization protect renal function in surgical patients? A meta-analytic study. *Critical Care Medicine*, 37(6), 2079–2090. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181a00a43>
- Brilla, E., Schosinsky, K., ESQuNEL, M., & Chavarria, M. (1977). Cuantificación de la glucosa por el método de la O-Toluidina. *Act. Méd. Cost.*, 20, 18–23. Retrieved from <http://www.binasss.sa.cr/revistas/amc/v20n11977/art4.pdf>
- Briner, W. (2010). The toxicity of depleted uranium. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(1), 303–13. <https://doi.org/10.3390/ijerph7010303>
- Brochard, L., Abroug, F., Brenner, M., Broccard, A. F., Danner, R. L., Ferrer, M., ... ATS/ERS/ESICM/SCCM/SRLF Ad Hoc Committee on Acute Renal Failure. (2010). An Official ATS/ERS/ESICM/SCCM/SRLF Statement: Prevention and Management of Acute Renal Failure in the ICU Patient. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 181(10), 1128–1155. <https://doi.org/10.1164/rccm.200711-1664ST>
- Brown, J. R., Kramer, R. S., Coca, S. G., & Parikh, C. R. (2010). Duration of Acute Kidney

- Injury Impacts Long-Term Survival After Cardiac Surgery. *The Annals of Thoracic Surgery*, 90(4), 1142–1148. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2010.04.039>
- Brown, J. R., Kramer, R. S., MacKenzie, T. A., Coca, S. G., Sint, K., & Parikh, C. R. (2012). Determinants of acute kidney injury duration after cardiac surgery: an externally validated tool. *The Annals of Thoracic Surgery*, 93(2), 570–6. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2011.11.004>
- Brun-Buisson, C., Roudot-Thoraval, F., Girou, E., Grenier-Sennelier, C., & Durand-Zaleski, I. (2003). The costs of septic syndromes in the intensive care unit and influence of hospital-acquired sepsis. *Intensive Care Medicine*, 29(9), 1464–1471. <https://doi.org/10.1007/s00134-003-1877-x>
- 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>
- Bulacio, R. P., & Torres, A. M. (2013). Organic anion transporter 5 (Oat5) renal expression and urinary excretion in rats treated with cisplatin: a potential biomarker of cisplatin-induced nephrotoxicity. *Archives of Toxicology*, 87(11), 1953–1962. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1062-0>
- Cale, J. M., & Lawrence, D. A. (2007). Structure-function relationships of plasminogen activator inhibitor-1 and its potential as a therapeutic agent. *Current Drug Targets*, 8(9), 971–81. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17896949>
- Canaud, G., & Bonventre, J. V. (2015). Cell cycle arrest and the evolution of chronic kidney disease from acute kidney injury. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 30(4), 575–583. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfu230>
- Castrop, H., Klar, J., Wagner, C., Höcherl, K., & Kurtz, A. (2003). General inhibition of renocortical cyclooxygenase-2 expression by the renin-angiotensin system. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 284(3), F518–F524. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00338.2002>
- Cerda, J., Lameire, N., Eggers, P., Pannu, N., Uchino, S., Wang, H., ... Levin, A. (2008). Epidemiology of Acute Kidney Injury. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 3(3), 881–886. <https://doi.org/10.2215/CJN.04961107>
- Chakraborty, S., Kaur, S., Guha, S., & Batra, S. K. (2012). The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1826(1), 129–169. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.03.008>
- Charlton, J. R., Portilla, D., & Okusa, M. D. (2014a). A basic science view of acute kidney

- injury biomarkers. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 29(7), 1301–1311.
<https://doi.org/10.1093/ndt/gft510>
- Charlton, J. R., Portilla, D., & Okusa, M. D. (2014b). A basic science view of acute kidney injury biomarkers. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 29(7), 1301–1311.
<https://doi.org/10.1093/ndt/gft510>
- Chaudhary, K., Phadke, G., Nistala, R., Weidmeyer, C. E., McFarlane, S. I., & Whaley-Connell, A. (2010). The Emerging Role of Biomarkers in Diabetic and Hypertensive Chronic Kidney Disease. *Current Diabetes Reports*, 10(1), 37–42.
<https://doi.org/10.1007/s11892-009-0080-z>
- 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, L. F., & Kaye, D. (2009). Current Use for Old Antibacterial Agents: Polymyxins, Rifamycins, and Aminoglycosides. *Infectious Disease Clinics of North America*, 23(4), 1053–1075. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2009.06.004>
- 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), 3365–70.
<https://doi.org/10.1681/ASN.2004090740>
- Chertow, G. M., Lee, J., Kuperman, G. J., Burdick, E., Horsky, J., Seger, D. L., ... Bates, D. W. (2001a). Guided medication dosing for inpatients with renal insufficiency. *JAMA*, 286(22), 2839–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11735759>
- Chertow, G. M., Lee, J., Kuperman, G. J., Burdick, E., Horsky, J., Seger, D. L., ... Bates, D. W. (2001b). Guided medication dosing for inpatients with renal insufficiency. *JAMA*, 286(22), 2839–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11735759>
- 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. (2002). Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(4), 258–268.
<https://doi.org/10.1038/nrm778>
- Christensen, E. I., & Gburek, J. (2004). Protein reabsorption in renal proximal tubule?function and dysfunction in kidney pathophysiology. *Pediatric Nephrology*, 19(7), 714–721. <https://doi.org/10.1007/s00467-004-1494-0>
- Christensen, E. I., Moskaug, J. O., Vorum, H., Jacobsen, C., Gundersen, T. E., Nykjaer, A., ...

- Moestrup, S. K. (1999). Evidence for an essential role of megalin in transepithelial transport of retinol. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 10(4), 685–95. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10203351>
- Clerico, A., Galli, C., Fortunato, A., & Ronco, C. (2012). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as biomarker of acute kidney injury: a review of the laboratory characteristics and clinical evidences. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 50(9), 1505–17. <https://doi.org/10.1515/cclm-2011-0814>
- Coca, S. G., King, J. T., Rosenthal, R. A., Perkal, M. F., & Parikh, C. R. (2010). The duration of postoperative acute kidney injury is an additional parameter predicting long-term survival in diabetic veterans. *Kidney International*, 78(9), 926–933. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.259>
- Coca, S. G., Yalavarth, R., Concato, J., & Parikh, C. R. (2008a). Biomarkers for the diagnosis and risk stratification of acute kidney injury: A systematic review. *Kidney International*, 73(9), 1008–1016. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002729>
- Coca, S. G., Yalavarth, R., Concato, J., & Parikh, C. R. (2008b). Biomarkers for the diagnosis and risk stratification of acute kidney injury: A systematic review. *Kidney International*, 73(9), 1008–1016. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002729>
- Cockcroft, D. W., & Gault, M. H. (1976). Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron*, 16(1), 31–41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1244564>
- Cohen, E. P., & Lemann, J. (1991). The role of the laboratory in evaluation of kidney function. *Clinical Chemistry*, 37(6), 785–96. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2049843>
- Cousins, C., Boice Jr, J., Cooper, U. J., Lee, U. J., & Lochard, K. J. (2011). Annals of the ICRP Published on behalf of the International Commission on Radiological Protection International Commission on Radiological Protection Members of the 2010–2013 Main Commission of ICRP. Retrieved from [http://www.icrp.org/docs/P_119_JAICRP_41\(s\)_Compendium_of_Dose_Coefficients_based_on_ICRP_Publication_60.pdf](http://www.icrp.org/docs/P_119_JAICRP_41(s)_Compendium_of_Dose_Coefficients_based_on_ICRP_Publication_60.pdf)
- D'Elia, J. A., Bayliss, G., Gleason, R. E., & Weinrauch, L. A. (2016). Cardiovascular-renal complications and the possible role of plasminogen activator inhibitor: a review. *Clinical Kidney Journal*, 9(5), 705–12. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfw080>
- De, S., Kuwahara, S., & Saito, A. (2014). The endocytic receptor megalin and its associated proteins in proximal tubule epithelial cells. *Membranes*, 4(3), 333–55. <https://doi.org/10.3390/membranes4030333>
- Delanghe, J. R., & Speeckaert, M. M. (2011). Creatinine determination according to Jaffe-what does it stand for? *Clinical Kidney Journal*, 4(2), 83–86.

<https://doi.org/10.1093/ndtplus/sfq211>

- Dennen, P., Douglas, I. S., & Anderson, R. (2010). Acute kidney injury in the intensive care unit: An update and primer for the intensivist. *Critical Care Medicine*, 38(1), 261–275. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181bfb0b5>
- Devarajan, P. (2006). Update on Mechanisms of Ischemic Acute Kidney Injury. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17(6), 1503–1520. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006010017>
- Devarajan, P. (2007). Proteomics for Biomarker Discovery in Acute Kidney Injury. *Seminars in Nephrology*, 27(6), 637–651. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2007.09.005>
- Devarajan, P. (2008a). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin--an emerging troponin for kidney injury. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 23(12), 3737–43. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfn531>
- Devarajan, P. (2008b). Proteomics for the Investigation of Acute Kidney Injury. In *Proteomics in Nephrology - Towards Clinical Applications* (Vol. 160, pp. 1–16). Basel: KARGER. <https://doi.org/10.1159/000125893>
- Devarajan, P. (2010). Review: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: A troponin-like biomarker for human acute kidney injury. *Nephrology*, 15(4), 419–428. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1797.2010.01317.x>
- 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., & Murray, P. (2014). Biomarkers in acute kidney injury: are we ready for prime time? *Nephron. Clinical Practice*, 127(1–4), 176–9. <https://doi.org/10.1159/000363206>
- DiPiro, J. T., Talbert, R. L., Yee, G. C., Matzke, G. R., Wells, B. G., & Posey, L. M. (2014). *Pharmacotherapy: a pathophysiologic approach*.
- Dirkes, S. (2011). Acute Kidney Injury: Not Just Acute Renal Failure Anymore? *Critical Care Nurse*, 31(1), 37–50. <https://doi.org/10.4037/ccn2011946>
- Doi, K., Leelahavanichkul, A., Yuen, P. S. T., & Star, R. A. (2009). Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. *Journal of Clinical Investigation*, 119(10), 2868–2878. <https://doi.org/10.1172/JCI39421>
- Doi, K., Noiri, E., Maeda-Mamiya, R., Ishii, T., Negishi, K., Hamasaki, Y., ... Nakamura, T. (2010). Urinary L-type fatty acid-binding protein as a new biomarker of sepsis

- complicated with acute kidney injury*. *Critical Care Medicine*, 38(10), 2037–2042. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181eedac0>
- Du, D., Xu, F., Yu, L., Zhang, C., Lu, X., Yuan, H., ... Chen, Z. (2010). The Tight Junction Protein, Occludin, Regulates the Directional Migration of Epithelial Cells. *Developmental Cell*, 18(1), 52–63. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.12.008>
- Eaton, D. C., & Pooler, J. (2006). *Fisiología renal de Vander*. McGraw-Hill Interamericana.
- Eaton, D. C., Pooler, J., & Vander, A. J. (2009). *Vander's renal physiology*. McGraw-Hill Medical.
- 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>
- Edwards, J. R., Diamantakos, E. A., Peuler, J. D., Lamar, P. C., & Prozialeck, W. C. (2007). A novel method for the evaluation of proximal tubule epithelial cellular necrosis in the intact rat kidney using ethidium homodimer. *BMC Physiology*, 7(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1472-6793-7-1>
- Eknoyan, G., Lameire, N., Barsoum, R., Eckardt, K.-U., Levin, A., Levin, N., ... Wang, H. (2004). The burden of kidney disease: Improving global outcomes. *Kidney International*, 66(4), 1310–1314. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00894.x>
- 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, Z. H., Kellum, J. A., Di Somma, S., Doi, K., Goldstein, S. L., Koyner, J. L., ... Murray, P. T. (2013). Differential Diagnosis of AKI in Clinical Practice by Functional and Damage Biomarkers: Workgroup Statements from the Tenth Acute Dialysis Quality Initiative Consensus Conference. In *Contributions to nephrology* (Vol. 182, pp. 30–44). <https://doi.org/10.1159/000349964>
- Engvall, E., & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), 871–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5135623>
- Espandiar, P., Rosenzweig, B., Zhang, J., Zhou, Y., Schnackenberg, L., Vaidya, V. S., ... Sadrieh, N. (2010). Age-related differences in susceptibility to cisplatin-induced renal toxicity. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 30(2), 172–82. <https://doi.org/10.1002/jat.1484>
- 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>

- Ferguson, M. A., Vaidya, V. S., & Bonventre, J. V. (2008). Biomarkers of nephrotoxic acute kidney injury. *Toxicology*, 245(3), 182–193. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.12.024>
- Ferguson, M. A., Vaidya, V. S., Waikar, S. S., Collings, F. B., Sunderland, K. E., Gioules, C. J., & Bonventre, J. V. (2010). Urinary liver-type fatty acid-binding protein predicts adverse outcomes in acute kidney injury. *Kidney International*, 77(8), 708–714. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.422>
- Ferreira, L., Quiros, Y., Sancho-Martínez, S. M., García-Sánchez, O., Raposo, C., López-Novoa, J. M., ... López-Hernández, F. J. (2011a). 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>
- Ferreira, L., Quiros, Y., Sancho-Martínez, S. M., García-Sánchez, O., Raposo, C., López-Novoa, J. M., ... López-Hernández, F. J. (2011b). 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>
- Fieghen, H., Wald, R., & Jaber, B. L. (2009). Renal Replacement Therapy for Acute Kidney Injury. *Nephron Clinical Practice*, 112(4), c222–c229. <https://doi.org/10.1159/000224788>
- Finco, D. R., Brown, S. A., Barsanti, J. A., Bartges, J. W., & Cooper, T. A. (1997). Reliability of using random urine samples for “spot” determination of fractional excretion of electrolytes in cats. *American Journal of Veterinary Research*, 58(11), 1184–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9361874>
- Fink, M. P., & Delude, R. L. (2005). Epithelial barrier dysfunction: a unifying theme to explain the pathogenesis of multiple organ dysfunction at the cellular level. *Critical Care Clinics*, 21(2), 177–96. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2005.01.005>
- Fishbane, S. (2008). N-acetylcysteine in the prevention of contrast-induced nephropathy. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, 3(1), 281–7. <https://doi.org/10.2215/CJN.02590607>
- Fliedl, L., Wieser, M., Manhart, G., Gerstl, M. P., Khan, A., Grillari, J., & Grillari-Voglauer, R. (2014). Controversial role of gamma-glutamyl transferase activity in cisplatin nephrotoxicity. *Altex*, 31(3), 269–278. <https://doi.org/10.14573/altex1311152>
- Friedewald, J. J., & Rabb, H. (2004). Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. *Kidney International*, 66(2), 486–491. https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.761_3.x

- Fukuda, S., Ikeda, M., Nakamura, M., Yan, X., & Xie, Y. (2009). Efficacy of oral and intraperitoneal administration of CBMIDA for removing uranium in rats after parenteral injections of depleted uranium. *Radiation Protection Dosimetry*, *133*(1), 12–19. <https://doi.org/10.1093/rpd/ncn318>
- Gáinza, F.J. & Liaño García, F. (2007). *Guías SEN -Actuación en el Fracaso Renal Agudo* (3rd ed.). Nefrología (Madr.). Retrieved from <http://www.revistanefrologia.com/es-publicacion-nefrologia-articulo-guias-sen-actuacin-en-el-fracaso-renal-agudo-X0211699507031587>
- Gallagher, S., Winston, S. E., Fuller, S. A., & Hurrell. (2008). Immunoblotting and Immunodetection. In *Current Protocols in Molecular Biology* (Vol. Chapter 10, p. Unit 10.8). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1008s83>
- Gao, Z., & Li, Y.-H. (2012). Antioxidant Stress and Anti-Inflammation of PPAR α on Warm Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury. *PPAR Research*, *2012*, 738785. <https://doi.org/10.1155/2012/738785>
- García-Criado, F. J., Eleno, N., Santos-Benito, F., Valdunciel, J. J., Reverte, M., Lozano-Sánchez, F. S., ... López-Novoa, J. M. (1998a). Protective effect of exogenous nitric oxide on the renal function and inflammatory response in a model of ischemia-reperfusion. *Transplantation*, *66*(8), 982–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9808479>
- García-Criado, F. J., Eleno, N., Santos-Benito, F., Valdunciel, J. J., Reverte, M., Lozano-Sánchez, F. S., ... López-Novoa, J. M. (1998b). Protective effect of exogenous nitric oxide on the renal function and inflammatory response in a model of ischemia-reperfusion. *Transplantation*, *66*(8), 982–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9808479>
- Gault, M. H., Longerich, L. L., Harnett, J. D., & Wesolowski, C. (1992). Predicting glomerular function from adjusted serum creatinine. *Nephron*, *62*(3), 249–56. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1436333>
- Genescà, M., Sola, A., & Hotter, G. (2006). Actin cytoskeleton derangement induces apoptosis in renal ischemia/reperfusion. *Apoptosis*, *11*(4), 563–571. <https://doi.org/10.1007/s10495-006-4937-1>
- González, E., Gutiérrez, E., Galeano, C., Chevia, C., de Sequera, P., Bernis, C., ... Grupo Madrileño De Nefritis Intersticiales. (2008). Early steroid treatment improves the recovery of renal function in patients with drug-induced acute interstitial nephritis. *Kidney International*, *73*(8), 940–946. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002776>
- Gueler, F., Gwinner, W., Schwarz, A., & Haller, H. (2004). Long-term effects of acute ischemia and reperfusion injury. *Kidney International*, *66*(2), 523–527.

https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.761_11.x

- Gupta, R., Gurm, H. S., Bhatt, D. L., Chew, D. P., & Ellis, S. G. (2005). Renal failure after percutaneous coronary intervention is associated with high mortality. *Catheterization and Cardiovascular Interventions*, *64*(4), 442–448. <https://doi.org/10.1002/ccd.20316>
- Guyton, A. C. 1919-2003, & Hall, J. E. 1946-. (2016). *Guyton & Hall, tratado de fisiología médica*. Elsevier España. Retrieved from <http://booksmedicos.me/guyton-y-hall-tratado-de-fisiologia-medica-13a-edicion/>
- Haase, M., Bellomo, R., Devarajan, P., Schlattmann, P., Haase-Fielitz, A., & NGAL Meta-analysis Investigator Group. (2009). Accuracy of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) in Diagnosis and Prognosis in Acute Kidney Injury: A Systematic Review and Meta-analysis. *American Journal of Kidney Diseases*, *54*(6), 1012–1024. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2009.07.020>
- Haase, M., Devarajan, P., Haase-Fielitz, A., Bellomo, R., Cruz, D. N., Wagener, G., ... Mertens, P. R. (2011). The Outcome of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin-Positive Subclinical Acute Kidney Injury. *Journal of the American College of Cardiology*, *57*(17), 1752–1761. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2010.11.051>
- Haase, M., Haase-Fielitz, A., Bellomo, R., Devarajan, P., Story, D., Matalanis, G., ... Dragun, D. (2009). Sodium bicarbonate to prevent increases in serum creatinine after cardiac surgery: A pilot double-blind, randomized controlled trial*. *Critical Care Medicine*, *37*(1), 39–47. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318193216f>
- Habib, R., Begum, S., Alam, G., Ali, A., Khan, I., Waseem, M., ... Salim, A. (2015). Transcription profile of genes affected in response to pathological changes in drug-induced rat model of acute kidney injury. *Renal Failure*, *37*(7), 1225–1231. <https://doi.org/10.3109/0886022X.2015.1057801>
- 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>
- Han, W. K., Waikar, S. S., Johnson, A., Betensky, R. A., Dent, C. L., Devarajan, P., & Bonventre, J. V. (2008). Urinary biomarkers in the early diagnosis of acute kidney injury. *Kidney International*, *73*(7), 863–869. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002715>
- Harrison, H. E., & Harrison, H. C. (1954). Experimental production of renal glycosuria, phosphaturia, and aminoaciduria by injection of maleic acid. *Science (New York, N.Y.)*, *120*(3120), 606–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13205194>

- Hauet, T., Baumert, H., Gibelin, H., Hameury, F., Goujon, J. M., Carretier, M., & Eugene, M. (2000). Noninvasive Monitoring of Citrate, Acetate, Lactate, and Renal Medullary Osmolyte Excretion in Urine as Biomarkers of Exposure to Ischemic Reperfusion Injury. *Cryobiology*, 41(4), 280–291. <https://doi.org/10.1006/cryo.2000.2291>
- Hauet, T., Baumert, H., Gibelin, H., Hameury, F., Goujon, J. M., Carretier, M., & Eugene, M. (2000). Noninvasive monitoring of citrate, acetate, lactate, and renal medullary osmolyte excretion in urine as biomarkers of exposure to ischemic reperfusion injury. *Cryobiology*, 41(4), 280–91. <https://doi.org/10.1006/cryo.2000.2291>
- Hawkins, R. (2011). New Biomarkers of Acute Kidney Injury and the Cardio-renal Syndrome. *The Korean Journal of Laboratory Medicine*, 31(2), 72. <https://doi.org/10.3343/kjlm.2011.31.2.72>
- Hayes, J. D., Flanagan, J. U., & Jowsey, I. R. (2005). GLUTATHIONE TRANSFERASES. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45(1), 51–88. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857>
- Heung, M., & Chawla, L. S. (2012). Predicting progression to chronic kidney disease after recovery from acute kidney injury. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 21(6), 628–634. <https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e3283588f24>
- Heyman, S. N., Lieberthal, W., Rogiers, P., & Bonventre, J. V. (2002). Animal models of acute tubular necrosis. *Current Opinion in Critical Care*, 8(6), 526–34. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12454537>
- Heyman, S. N., Rosenberger, C., & Rosen, S. (2011). Acute Kidney Injury: Lessons from Experimental Models. In *Experimental Models for Renal Diseases* (Vol. 169, pp. 286–296). Basel: KARGER. <https://doi.org/10.1159/000313957>
- Himmelfarb, J., & Hakim, R. M. (1997). The use of biocompatible dialysis membranes in acute renal failure. *Advances in Renal Replacement Therapy*, 4(2 Suppl 1), 72–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9113243>
- Hoffmann, D., Fuchs, T. C., Henzler, T., Matheis, K. A., Herget, T., Dekant, W., ... Mally, A. (2010). Evaluation of a urinary kidney biomarker panel in rat models of acute and subchronic nephrotoxicity. *Toxicology*, 277(1–3), 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2010.08.013>
- Holly, M. K., Dear, J. W., Hu, X., Schechter, A. N., Gladwin, M. T., Hewitt, S. M., ... Star, R. A. (2006). Biomarker and drug-target discovery using proteomics in a new rat model of sepsis-induced acute renal failure. *Kidney International*, 70(3), 496–506. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5001575>
- Hoste, E. A. J., & De Corte, W. (2011). Clinical Consequences of Acute Kidney Injury. In *Contributions to nephrology* (Vol. 174, pp. 56–64).

<https://doi.org/10.1159/000329236>

- Hsu, C. (2012). Yes, AKI truly leads to CKD. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 23(6), 967–9. <https://doi.org/10.1681/ASN.2012030222>
- Hsu, R. K., McCulloch, C. E., Dudley, R. A., Lo, L. J., & Hsu, C. (2013). Temporal changes in incidence of dialysis-requiring AKI. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 24(1), 37–42. <https://doi.org/10.1681/ASN.2012080800>
- Hua, S., Liu, X., Lv, S., & Wang, Z. (2017). Protective Effects of Cucurbitacin B on Acute Lung Injury Induced by Sepsis in Rats. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 23, 1355–1362. <https://doi.org/10.12659/MSM.900523>
- Husdan, H., & Rapoport, A. (1968). Estimation of creatinine by the Jaffe reaction. A comparison of three methods. *Clinical Chemistry*, 14(3), 222–38. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5637963>
- Hvidberg, V., Jacobsen, C., Strong, R. K., Cowland, J. B., Moestrup, S. K., & Borregaard, N. (2005a). The endocytic receptor megalin binds the iron transporting neutrophil-gelatinase-associated lipocalin with high affinity and mediates its cellular uptake. *FEBS Letters*, 579(3), 773–777. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.12.031>
- Hvidberg, V., Jacobsen, C., Strong, R. K., Cowland, J. B., Moestrup, S. K., & Borregaard, N. (2005b). The endocytic receptor megalin binds the iron transporting neutrophil-gelatinase-associated lipocalin with high affinity and mediates its cellular uptake. *FEBS Letters*, 579(3), 773–777. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.12.031>
- Hvidberg, V., Jacobsen, C., Strong, R. K., Cowland, J. B., Moestrup, S. K., & Borregaard, N. (2005c). The endocytic receptor megalin binds the iron transporting neutrophil-gelatinase-associated lipocalin with high affinity and mediates its cellular uptake. *FEBS Letters*, 579(3), 773–777. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.12.031>
- 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), 4135–42. <https://doi.org/10.1074/JBC.273.7.4135>
- Jensen, D., Kierulf-Lassen, C., Louise, M., Kristensen, V., Nørregaard, R., Weyer, K., ... Birn, H. (2017). Megalin dependent urinary cystatin C excretion in ischemic kidney injury in rats. *PLoS One*, 12(6), e0178796. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178796>
- Joannidis, M., Druml, W., Forni, L. G., Groeneveld, A. B. J., Honore, P. M., Hoste, E., ... Schetz, M. (2017). Prevention of acute kidney injury and protection of renal function in the intensive care unit: update 2017. *Intensive Care Medicine*, 43(6),

- 730–749. <https://doi.org/10.1007/s00134-017-4832-y>
- 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), 1136–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1137920>
- Just, A. (2006). Mechanisms of renal blood flow autoregulation: dynamics and contributions. *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 292(1), R1–R17. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00332.2006>
- Katagiri, D., Doi, K., Honda, K., Negishi, K., Fujita, T., Hisagi, M., ... Noiri, E. (2012). Combination of Two Urinary Biomarkers Predicts Acute Kidney Injury After Adult Cardiac Surgery. *The Annals of Thoracic Surgery*, 93(2), 577–583. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2011.10.048>
- Kaucsár, T., Godó, M., Révész, C., Kovács, M., Mócsai, A., Kiss, N., ... Hamar, P. (2016). Urine/Plasma Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin Ratio Is a Sensitive and Specific Marker of Subclinical Acute Kidney Injury in Mice. *PLOS ONE*, 11(1), e0148043. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148043>
- Kaushal, G. P., Basnakian, A. G., & Shah, S. V. (2004). Apoptotic pathways in ischemic acute renal failure. *Kidney International*, 66(2), 500–506. https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.761_6.x
- Kellum, J. A. (2008). Acute kidney injury. *Critical Care Medicine*, 36(Suppl), S141–S145. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318168c4a4>
- Kellum, J. A., & Hoste, E. A. J. (2008a). Acute kidney injury: Epidemiology and assessment. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 68(sup241), 6–11. <https://doi.org/10.1080/00365510802144813>
- Kellum, J. A., & Hoste, E. A. J. (2008b). Acute kidney injury: Epidemiology and assessment. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 68(sup241), 6–11. <https://doi.org/10.1080/00365510802144813>
- Kellum, J. A., Leblanc, M., & Venkataraman, R. (2008). Acute renal failure. *BMJ Clinical Evidence*, 2008. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19445797>
- Kerr, M., Bedford, M., Matthews, B., & O'Donoghue, D. (2014). The economic impact of acute kidney injury in England. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 29(7), 1362–1368. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfu016>
- Klatt, E. C., & Kumar, V. (1999). *Robbins and Cotran review of pathology* (4th ed.).
- Ko, G. J., Grigoryev, D. N., Linfert, D., Jang, H. R., Watkins, T., Cheadle, C., ... 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. *AJP: Renal*

- Physiology*, 298(6), F1472–F1483. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00619.2009>
- Koyner, J. L., Vaidya, V. S., Bennett, M. R., Ma, Q., Worcester, E., Akhter, S. A., ... Murray, P. T. (2010). Urinary Biomarkers in the Clinical Prognosis and Early Detection of Acute Kidney Injury. *Doi.org*, (12), 2154–2165. <https://doi.org/10.2215/cjn.00740110>
- Kozyraki, R., Fyfe, J., Verroust, P. J., Jacobsen, C., Dautry-Varsat, A., Gburek, J., ... Moestrup, S. K. (2001a). Megalin-dependent cubilin-mediated endocytosis is a major pathway for the apical uptake of transferrin in polarized epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(22), 12491–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.211291398>
- Kozyraki, R., Fyfe, J., Verroust, P. J., Jacobsen, C., Dautry-Varsat, A., Gburek, J., ... Moestrup, S. K. (2001b). Megalin-dependent cubilin-mediated endocytosis is a major pathway for the apical uptake of transferrin in polarized epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(22), 12491–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.211291398>
- Kramer, H. J., & Gonick, H. C. (2008). Effect of Maleic Acid on Sodium-Linked Tubular Transport in Experimental Fanconi Syndrome. *Nephron*, 10(5), 306–319. <https://doi.org/10.1159/000180202>
- Kuchulakanti, P. K., Torguson, R., Chu, W. W., Canos, D. A., Rha, S., Clavijo, L., ... Waksman, R. (2006). Impact of Chronic Renal Insufficiency on Clinical Outcomes in Patients Undergoing Percutaneous Coronary Intervention With Sirolimus-Eluting Stents Versus Bare Metal Stents. *The American Journal of Cardiology*, 97(6), 792–797. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2005.10.018>
- Kuriakose, G. C., & Kurup, M. G. (2008). Evaluation of Renoprotective Effect of *Aphanizomenon flos-aquae* on Cisplatin-Induced Renal Dysfunction in Rats. *Renal Failure*, 30(7), 717–725. <https://doi.org/10.1080/08860220802134730>
- Kurien, B. T., Everds, N. E., & Scofield, R. H. (2004). Experimental animal urine collection: a review. *Laboratory Animals*, 38(4), 333–361. <https://doi.org/10.1258/0023677041958945>
- Kwiatkowski, D. J. (1999). Functions of gelsolin: motility, signaling, apoptosis, cancer. *Current Opinion in Cell Biology*, 11(1), 103–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10047530>
- Kwon, O., Nelson, W. J., Sibley, R., Huie, P., Scandling, J. D., Dafoe, D., ... Myers, B. D. (1998). Backleak, tight junctions, and cell-cell adhesion in postischemic injury to the renal allograft. *The Journal of Clinical Investigation*, 101(10), 2054–64. <https://doi.org/10.1172/JCI772>
- La Touche, Y. D., Willis, D. L., & Dawydiak, O. I. (1987). Absorption and Biokinetics of U in

- Rats Following an Oral Administration of Uranyl Nitrate Solution. *Health Physics*, 53(2), 147–162. <https://doi.org/10.1097/00004032-198708000-00005>
- Lameire, N. H., Bagga, A., Cruz, D., De Maeseneer, J., Endre, Z., Kellum, J. A., ... Vanholder, R. (2013). Acute kidney injury: an increasing global concern. *The Lancet*, 382(9887), 170–179. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60647-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60647-9)
- Lameire, N., Van Biesen, W., & Vanholder, R. (2005). Acute renal failure. *The Lancet*, 365(9457), 417–430. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)17831-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)17831-3)
- Landoni, G., Biondi-Zoccai, G. G. L., Marino, G., Bove, T., Fochi, O., Maj, G., ... Zangrillo, A. (2008). Fenoldopam Reduces the Need for Renal Replacement Therapy and In-Hospital Death in Cardiovascular Surgery: A Meta-Analysis. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, 22(1), 27–33. <https://doi.org/10.1053/j.jvca.2007.07.015>
- Lane, B. R. (2013). Molecular markers of kidney injury. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 31(5), 682–685. <https://doi.org/10.1016/J.UROLONC.2011.05.007>
- Langelueddecke, C., Roussa, E., Fenton, R. A., Wolff, N. A., Lee, W.-K., & Thévenod, F. (2012). Lipocalin-2 (24p3/Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin (NGAL)) Receptor Is Expressed in Distal Nephron and Mediates Protein Endocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 287(1), 159–169. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.308296>
- Langenberg, C., Bagshaw, S. M., May, C. N., & Bellomo, R. (2008). The histopathology of septic acute kidney injury: a systematic review. *Critical Care (London, England)*, 12(2), R38. <https://doi.org/10.1186/cc6823>
- LEE, H. B., & HA, H. (2005). Plasminogen activator inhibitor-1 and diabetic nephropathy. *Nephrology*, 10(s2), S11–S13. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1797.2005.00449.x>
- Lerolle, N., Nochy, D., Guérot, E., Bruneval, P., Fagon, J.-Y., Diehl, J.-L., & Hill, G. (2010). Histopathology of septic shock induced acute kidney injury: apoptosis and leukocytic infiltration. *Intensive Care Medicine*, 36(3), 471–478. <https://doi.org/10.1007/s00134-009-1723-x>
- Levey, A. 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? Modification of Diet in Renal Disease Study group. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 10(11), 2426–39. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10541304>
- Li, P. K. T., Burdmann, E. A., & Mehta, R. L. (2013). Acute kidney injury: global health alert. *Kidney International*, 83(3), 372–376. <https://doi.org/10.1038/ki.2012.427>

- 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>
- Liang, K. V., Sileanu, F. E., Clermont, G., Murugan, R., Pike, F., Palevsky, P. M., & Kellum, J. A. (2016). Modality of RRT and Recovery of Kidney Function after AKI in Patients Surviving to Hospital Discharge. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, *11*(1), 30–8. <https://doi.org/10.2215/CJN.01290215>
- Liangos, O., Perianayagam, M. C., Vaidya, V. S., Han, W. K., Wald, R., Tighiouart, H., ... Jaber, B. L. (2007). Urinary N-Acetyl-beta-(D)-Glucosaminidase Activity and Kidney Injury Molecule-1 Level Are Associated with Adverse Outcomes in Acute Renal Failure. *Journal of the American Society of Nephrology*, *18*(3), 904–912. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006030221>
- Liangos, O., Tighiouart, H., Perianayagam, M. C., Kolyada, A., Han, W. K., Wald, R., ... Jaber, B. L. (2009). Comparative analysis of urinary biomarkers for early detection of acute kidney injury following cardiopulmonary bypass. *Biomarkers*, *14*(6), 423–431. <https://doi.org/10.1080/13547500903067744>
- Liangos, O., Wald, R., O’Bell, J. W., Price, L., Pereira, B. J., & Jaber, B. L. (2005a). Epidemiology and Outcomes of Acute Renal Failure in Hospitalized Patients: A National Survey. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, *1*(1), 43–51. <https://doi.org/10.2215/CJN.00220605>
- Liangos, O., Wald, R., O’Bell, J. W., Price, L., Pereira, B. J., & Jaber, B. L. (2005b). Epidemiology and Outcomes of Acute Renal Failure in Hospitalized Patients: A National Survey. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, *1*(1), 43–51. <https://doi.org/10.2215/CJN.00220605>
- Liaño, F., & Pascual, J. (1996). Epidemiology of acute renal failure: a prospective, multicenter, community-based study. Madrid Acute Renal Failure Study Group. *Kidney International*, *50*(3), 811–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8872955>
- Liu, K. D., Glidden, D. V., Eisner, M. D., Parsons, P. E., Ware, L. B., Wheeler, A., ... National Heart, Lung, and Blood Institute ARDS Network Clinical Trials Group. (2007). Predictive and pathogenetic value of plasma biomarkers for acute kidney injury in patients with acute lung injury. *Critical Care Medicine*, *35*(12), 2755–61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18074478>
- 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>

- Lopez-Novoa, J. M., Quiros, Y., Vicente, L., Morales, A. I., & Lopez-Hernandez, F. J. (2011a). New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view. *Kidney International*, 79(1), 33–45. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.337>
- Lopez-Novoa, J. M., Quiros, Y., Vicente, L., Morales, A. I., & Lopez-Hernandez, F. J. (2011b). New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view. *Kidney International*, 79(1), 33–45. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.337>
- Macedo, E., & Mehta, R. L. (2009). Prerenal failure: from old concepts to new paradigms. *Current Opinion in Critical Care*, 15(6), 467–73. <https://doi.org/10.1097/MCC.0b013e328332f6e3>
- Madsen, K. M., & Tisher, C. C. (1986a). Structural-functional relationships along the distal nephron. *The American Journal of Physiology*, 250(1 Pt 2), F1-15. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3510562>
- Madsen, K. M., & Tisher, C. C. (1986b). Structural-functional relationships along the distal nephron. *The American Journal of Physiology*, 250(1 Pt 2), F1-15. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3510562>
- Mahmood, I., & Waters, D. H. (1980). A comparative study of uranyl nitrate and cisplatin-induced renal failure in rat. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 19(4), 327–36. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7737234>
- Mahuran, D. J. (1998). The GM2 activator protein, its roles as a co-factor in GM2 hydrolysis and as a general glycolipid transport protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1393(1), 1–18. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9714704>
- Marathe, G. V., Nash, B., Haschemeyer, R. H., & Tate, S. S. (1979). Ultrastructural localization of gamma-glutamyl transpeptidase in rat kidney and jejunum. *FEBS Letters*, 107(2), 436–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/41743>
- Martínez-Salgado, C., López-Hernández, F. J., & López-Novoa, J. M. (2007a). Glomerular nephrotoxicity of aminoglycosides. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 223(1), 86–98. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.05.004>
- Martínez-Salgado, C., López-Hernández, F. J., & López-Novoa, J. M. (2007b). Glomerular nephrotoxicity of aminoglycosides. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 223(1), 86–98. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.05.004>
- Matsuo, S., Lepez-Guisa, J. M., Cai, X., Okamura, D. M., Alpers, C. E., Bumgarner, R. E., ... Eddy, A. A. (2005). Multifunctionality of PAI-1 in fibrogenesis: Evidence from

- obstructive nephropathy in PAI-1-overexpressing mice. *Kidney International*, 67(6), 2221–2238. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00327.x>
- McCullough, P. A., Stacul, F., Becker, C. R., Adam, A., Lameire, N., Tumlin, J. A., ... CIN Consensus Working Panel. (2006). Contrast-Induced Nephropathy (CIN) Consensus Working Panel: executive summary. *Reviews in Cardiovascular Medicine*, 7(4), 177–97. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17224862>
- McCullough, P. A., Wolyn, R., Rocher, L. L., Levin, R. N., & O'Neill, W. W. (1997). Acute renal failure after coronary intervention: incidence, risk factors, and relationship to mortality. *The American Journal of Medicine*, 103(5), 368–75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9375704>
- 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), 1879–87. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1824846>
- Meier, P., Ko, D. T., Tamura, A., Tamhane, U., & Gurm, H. S. (2009). Sodium bicarbonate-based hydration prevents contrast-induced nephropathy: a meta-analysis. *BMC Medicine*, 7(1), 23. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-7-23>
- Meister, A., & Tate, S. S. (1976). Glutathione and Related γ -Glutamyl Compounds: Biosynthesis and Utilization. *Annual Review of Biochemistry*, 45(1), 559–604. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.45.070176.003015>
- Melnikov, V. Y., & Molitoris, B. A. (2008). Improvements in the diagnosis of acute kidney injury. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation: An Official Publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia*, 19(4), 537–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18580009>
- Mingeot-Leclercq, M. P., & Tulkens, P. M. (1999). Aminoglycosides: nephrotoxicity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(5), 1003–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10223907>
- Mishra, J., Dent, C., Tarabishi, R., Mitsnefes, M. M., Ma, Q., Kelly, C., ... Devarajan, P. (2005). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *The Lancet*, 365(9466), 1231–1238. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)74811-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)74811-X)
- Miyahira Arakaki, J. M. (2003). Insuficiencia renal aguda. *Revista Medica Herediana*, 14(1), 36–43. Retrieved from http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2003000100006
- Moestrup, S. K., Kozyraki, R., Kristiansen, M., Kaysen, J. H., Rasmussen, H. H., Brault, D., ...

- Verroust, P. J. (1998). The intrinsic factor-vitamin B12 receptor and target of teratogenic antibodies is a megalin-binding peripheral membrane protein with homology to developmental proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(9), 5235–42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9478979>
- Molina, A., Ubeda, M., Escribese, M. M., García-Bermejo, L., Sancho, D., Pérez de Lema, G., ... Mampaso, F. (2005). Renal Ischemia/Reperfusion Injury: Functional Tissue Preservation by Anti-Activated α 1 Integrin Therapy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 16(2), 374–382. <https://doi.org/10.1681/ASN.2004070528>
- Molitoris, B. A., Levin, A., Warnock, D. G., Joannidis, M., Mehta, R. L., Kellum, J. A., ... Acute Kidney Injury Network working group. (2007). Improving outcomes of acute kidney injury: report of an initiative. *Nature Clinical Practice Nephrology*, 3(8), 439–442. <https://doi.org/10.1038/ncpneph0551>
- Molitoris, B. A., & Sutton, T. A. (2004). Endothelial injury and dysfunction: Role in the extension phase of acute renal failure. *Kidney International*, 66(2), 496–499. https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.761_5.x
- Monedero, P., García-Fernández, N., Pérez-Valdivieso, J. R., Vives, M., & Lavilla, J. (2011). Insuficiencia renal aguda Acute kidney injury. *Rev Esp Anestesiología y Reanimación*, 58, 365–374. Retrieved from <https://www.sedar.es/file/2015/11/Insuficiencia-renal-aguda.pdf>
- Mori, K., Lee, H. T., Rapoport, D., Drexler, I. R., Foster, K., Yang, J., ... Barasch, J. (2005). Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(3), 610–21. <https://doi.org/10.1172/JCI23056>
- Mueller, P. W., Price, R. G., & Finn, W. F. (1998). New approaches for detecting thresholds of human nephrotoxicity using cadmium as an example. *Environmental Health Perspectives*, 106(5), 227–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9647892>
- Murillo-Brambila, D., Núñez-Gómez, F. E., González-Sanchidrián, S., Muciño-Bermejo, M.-J., Sharma, A., & Ronco, C. (2015). Utilidad clínica de la reserva funcional renal. *Diálisis Y Trasplante*, 36(1), 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.dialis.2015.02.004>
- Murray, P. T., Mehta, R. L., Shaw, A., Ronco, C., Endre, Z., Kellum, J. A., ... Okusa, M. (2014). Current Use of Biomarkers in Acute Kidney Injury: Report and Summary of Recommendations from the 10 th Acute Dialysis Quality Initiative Consensus Conference HHS Public Access. *Kidney International*, 85(3). <https://doi.org/10.1038/ki.2013.374>
- Murugan, R., & Kellum, J. A. (2011). Acute kidney injury: what's the prognosis? *Nature Reviews Nephrology*, 7(4), 209–217. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2011.13>

- Mussap, L. C., Verlato, G., Plebani, M., Fanos, V., Neonatology, A. T. N. N. S. G., & Neonatal Nephrology Study Group of the Italian Society of Neonatology. (2002). Netilmicin Effect on Urinary Retinol Binding Protein (RBP) and N-Acetyl-Beta-D-Glucosaminidase (NAG) in Preterm Newborns with and without Anoxia. *Journal of Chemotherapy*, 14(1), 76–83. <https://doi.org/10.1179/joc.2002.14.1.76>
- Nagai, J., Tanaka, H., Nakanishi, N., Murakami, T., & Takano, M. (2001). Role of megalin in renal handling of aminoglycosides. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 281(2), F337–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11457726>
- Nakakuki, M., Yamasaki, F., Shinkawa, T., Kudo, M., Watanabe, M., & Mizota, M. (1996). Protective effect of human ulinastatin against gentamicin-induced acute renal failure in rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 74(1), 104–11. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8963945>
- Nechemia-Arbely, Y., Barkan, D., Pizov, G., Shriki, A., Rose-John, S., Galun, E., & Axelrod, J. H. (2008). IL-6/IL-6R axis plays a critical role in acute kidney injury. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 19(6), 1106–15. <https://doi.org/10.1681/ASN.2007070744>
- Negishi, K., Noiri, E., Sugaya, T., Li, S., Megyesi, J., Nagothu, K., & Portilla, D. (2007). A role of liver fatty acid-binding protein in cisplatin-induced acute renal failure. *Kidney International*, 72(3), 348–358. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002304>
- Neild, G. H. (2001). Multi-organ renal failure in the elderly. *International Urology and Nephrology*, 32(4), 559–565. <https://doi.org/10.1023/A:1014474305423>
- Nejat, M., Pickering, J. W., Devarajan, P., Bonventre, J. V., Edelstein, C. L., Walker, R. J., & Endre, Z. H. (2012a). Some biomarkers of acute kidney injury are increased in pre-renal acute injury. *Kidney International*, 81(12), 1254–1262. <https://doi.org/10.1038/ki.2012.23>
- Nejat, M., Pickering, J. W., Devarajan, P., Bonventre, J. V., Edelstein, C. L., Walker, R. J., & Endre, Z. H. (2012b). Some biomarkers of acute kidney injury are increased in pre-renal acute injury. *Kidney International*, 81(12), 1254–62. <https://doi.org/10.1038/ki.2012.23>
- Netter, F. H., & Hansen, J. T. (2003). *Atlas de anatomía humana*. Masson. Retrieved from <https://www.casadellibro.com/libro-atlas-de-anatomia-humana-3-ed/9788445812976/906113>
- Nickolas, T. L., O'Rourke, M. J., Yang, J., Sise, M. E., Canetta, P. A., Barasch, N., ... Barasch, J. (2008a). Sensitivity and specificity of a single emergency department measurement of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin for diagnosing acute kidney injury. *Annals of Internal Medicine*, 148(11), 810–9. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18519927>

- Nickolas, T. L., O'Rourke, M. J., Yang, J., Sise, M. E., Canetta, P. A., Barasch, N., ... Barasch, J. (2008b). Sensitivity and specificity of a single emergency department measurement of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin for diagnosing acute kidney injury. *Annals of Internal Medicine*, *148*(11), 810–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18519927>
- Nivy, R., Avital, Y., Aroch, I., & Segev, G. (2017). Utility of urinary alkaline phosphatase and γ -glutamyl transpeptidase in diagnosing acute kidney injury in dogs. *The Veterinary Journal*, *220*, 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.12.010>
- Noiri, E., Doi, K., Negishi, K., Tanaka, T., Hamasaki, Y., Fujita, T., ... Sugaya, T. (2009). Urinary fatty acid-binding protein 1: an early predictive biomarker of kidney injury. *AJP: Renal Physiology*, *296*(4), F669–F679. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.90513.2008>
- Oakley, A. (2011). Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug Metabolism Reviews*, *43*(2), 138–151. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.558093>
- Obermüller, N., Kunchaparty, S., Ellison, D. H., & Bachmann, S. (1996). Expression of the Na-K-2Cl cotransporter by macula densa and thick ascending limb cells of rat and rabbit nephron. *Journal of Clinical Investigation*, *98*(3), 635–640. <https://doi.org/10.1172/JCI118834>
- Ohmachi, Y., Imamura, T., Ikeda, M., Shishikura, E., Kim, E., Kurihara, O., & Sakai, K. (2015). Sodium bicarbonate protects uranium-induced acute nephrotoxicity through uranium-decorporation by urinary alkalinization in rats. *Journal of Toxicologic Pathology*, *28*(2), 65–71. <https://doi.org/10.1293/tox.2014-0041>
- Okusa, M. D., Jaber, B. L., Doran, P., Duranteau, J., Yang, L., Murray, P. T., ... Ince, C. (2013). Physiological Biomarkers of Acute Kidney Injury: A Conceptual Approach to Improving Outcomes. In *Contributions to nephrology* (Vol. 182, pp. 65–81). <https://doi.org/10.1159/000349967>
- Ostermann, M., & Joannidis, M. (2016). Acute kidney injury 2016: diagnosis and diagnostic workup. *Critical Care (London, England)*, *20*(1), 299. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1478-z>
- Ostermann, M., Philips, B. J., & Forni, L. G. (2012). Clinical review: Biomarkers of acute kidney injury: where are we now? *Critical Care*, *16*(5), 233. <https://doi.org/10.1186/cc11380>
- Padhi, S., Bullock, I., Li, L., Stroud, M., & National Institute for Health and Care Excellence (NICE) Guideline Development Group. (2013). Intravenous fluid therapy for adults in hospital: summary of NICE guidance. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, *347*, f7073.

Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24326887>

- Paller, M. S. (1992). Free radical-mediated postischemic injury in renal transplantation. *Renal Failure*, 14(3), 257–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1509158>
- Palm, C. A., Segev, G., Cowgill, L. D., LeRoy, B. E., Kowalkowski, K. L., Kanakubo, K., & Westropp, J. L. (2016). Urinary Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin as a Marker for Identification of Acute Kidney Injury and Recovery in Dogs with Gentamicin-induced Nephrotoxicity. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30(1), 200–205. <https://doi.org/10.1111/jvim.13819>
- Paragas, N., Qiu, A., Hollmen, M., Nickolas, T. L., Devarajan, P., & Barasch, J. (2012). NGAL-Siderocalin in kidney disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1823(9), 1451–1458. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.06.014>
- Paragas, N., Qiu, A., Zhang, Q., Samstein, B., Deng, S.-X., Schmidt-Ott, K. M., ... Barasch, J. (2011). The Ngal reporter mouse detects the response of the kidney to injury in real time. *Nature Medicine*, 17(2), 216–222. <https://doi.org/10.1038/nm.2290>
- Parikh, C. R., Jani, A., Melnikov, V. Y., Faubel, S., & Edelstein, C. L. (2004). Urinary interleukin-18 is a marker of human acute tubular necrosis. *American Journal of Kidney Diseases: The Official Journal of the National Kidney Foundation*, 43(3), 405–414. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14981598>
- Pavkovic, M., Riefke, B., Gutberlet, K., Raschke, M., & Ellinger-Ziegelbauer, H. (2014). Comparison of the Mesoscale Discovery and Luminex multiplex platforms for measurement of urinary biomarkers in a cisplatin rat kidney injury model. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 69(2), 196–204. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2013.11.003>
- Payen, D., & Legrand, M. (2011). Can We Identify Prerenal Physiology and Does It Matter? In *Contributions to nephrology* (Vol. 174, pp. 22–32). <https://doi.org/10.1159/000329230>
- Pedersen, P. S., Procida, K., Larsen, P. L., Holstein-Rathlou, N.-H., & Frederiksen, O. (2005). Water permeability in human airway epithelium. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 451(3), 464–473. <https://doi.org/10.1007/s00424-005-1484-5>
- Peres, L. A. B., Cunha Júnior, A. D. da, Schäfer, A. J., Silva, A. L. da, Gaspar, A. D., Scarpari, D. F., ... Oliveira, T. F. T. de. (2013a). Biomarkers of acute kidney injury. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, 35(3), 229–236. <https://doi.org/10.5935/0101-2800.20130036>
- Peres, L. A. B., Cunha Júnior, A. D. da, Schäfer, A. J., Silva, A. L. da, Gaspar, A. D., Scarpari,

- D. F., ... Oliveira, T. F. T. de. (2013b). Biomarkers of acute kidney injury. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, 35(3), 229–236. <https://doi.org/10.5935/0101-2800.20130036>
- Peres, L. A. B., Cunha Júnior, A. D. da, Schäfer, A. J., Silva, A. L. da, Gaspar, A. D., Scarpari, D. F., ... Oliveira, T. F. T. de. (2013c). Biomarkers of acute kidney injury. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, 35(3), 229–236. <https://doi.org/10.5935/0101-2800.20130036>
- Perico, N., Cattaneo, D., Sayegh, M. H., & Remuzzi, G. (2004a). Delayed graft function in kidney transplantation. *The Lancet*, 364(9447), 1814–1827. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17406-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17406-0)
- Perico, N., Cattaneo, D., Sayegh, M. H., & Remuzzi, G. (2004b). Delayed graft function in kidney transplantation. *The Lancet*, 364(9447), 1814–1827. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17406-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17406-0)
- Persson, A. E. G., Ollerstam, A., Liu, R., & Brown, R. (2004). Mechanisms for macula densa cell release of renin. *Acta Physiologica Scandinavica*, 181(4), 471–474. <https://doi.org/10.1111/j.1365-201X.2004.01320.x>
- Piazzon, N., Bernet, F., Guihard, L., Leonhard, W. N., Urfer, S., Firsov, D., ... Constan, 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>
- Porth, C. (2011). *Essentials of pathophysiology: concepts of altered health states*. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins. Retrieved from [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=FFg88IaReBwC&oi=fnd&pg=PR10&dq=essentials+of+pathophysiology+concepts+of+altered+health+states&ots=nLEjm4qKon&sig=zZxooAL0uVPyVEvL1Itbm5C9eY#v=onepage&q=essentials of pathophysiology concepts of altered health s](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=FFg88IaReBwC&oi=fnd&pg=PR10&dq=essentials+of+pathophysiology+concepts+of+altered+health+states&ots=nLEjm4qKon&sig=zZxooAL0uVPyVEvL1Itbm5C9eY#v=onepage&q=essentials+of+pathophysiology+concepts+of+altered+health+s)
- Praught, M. L., & Shlipak, M. G. (2005). Are small changes in serum creatinine an important risk factor? *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 14(3), 265–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15821421>
- Prieto-García, L., Pericacho, M., Sancho-Martínez, S. M., Sánchez, Á., Martínez-Salgado, C., López-Novoa, J. M., & López-Hernández, F. J. (2016). Mechanisms of triple whammy acute kidney injury. *Pharmacology & Therapeutics*, 167, 132–145. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.07.011>
- Quiros, Y., Blanco-Gozalo, V., Sanchez-Gallego, J. I., Lopez-Hernandez, F. J., Ruiz, J., Perez De Obanos, M. P., & Lopez-Novoa, J. M. (2016). Cardiostrophin-1 therapy prevents gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacological Research*, 107, 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.02.025>

- Quiros, Y., Ferreira, L., Sancho-Martínez, S. M., González-Buitrago, J. M., López-Novoa, J. M., & López-Hernández, F. J. (2010a). 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>
- Quiros, Y., Ferreira, L., Sancho-Martínez, S. M., González-Buitrago, J. M., López-Novoa, J. M., & López-Hernández, F. J. (2010b). 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>
- Raychowdhury, R., Niles, J. L., McCluskey, R. T., & Smith, J. A. (1989). Autoimmune target in Heymann nephritis is a glycoprotein with homology to the LDL receptor. *Science (New York, N.Y.)*, *244*(4909), 1163–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2786251>
- Regueira, T., & Andresen, M. (2010). Manipulación del transporte y consumo de oxígeno en la sepsis. *Revista Médica de Chile*, *138*(2), 233–242. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872010000200014>
- Ricci, Z., Cruz, D., & Ronco, C. (2008). The RIFLE criteria and mortality in acute kidney injury: A systematic review. *Kidney International*, *73*(5), 538–546. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002743>
- Rihal, C. S., Textor, S. C., Grill, D. E., Berger, P. B., Ting, H. H., Best, P. J., ... Holmes, D. R. (2002). Incidence and prognostic importance of acute renal failure after percutaneous coronary intervention. *Circulation*, *105*(19), 2259–64. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12010907>
- Robert, A. M., Kramer, R. S., Dacey, L. J., Charlesworth, D. C., Leavitt, B. J., Helm, R. E., ... Northern New England Cardiovascular Disease Study Group. (2010). Cardiac Surgery-Associated Acute Kidney Injury: A Comparison of Two Consensus Criteria. *The Annals of Thoracic Surgery*, *90*(6), 1939–1943. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2010.08.018>
- Rodriguez-Pena, A., Garcia-Criado, F. J., Eleno, N., Arevalo, M., & Lopez-Novoa, J. M. (2004a). Intrarenal Administration of Molsidomine, a Molecule Releasing Nitric Oxide, Reduces Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *American Journal of Transplantation*, *4*(10), 1605–1613. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2004.00560.x>
- Rodriguez-Pena, A., Garcia-Criado, F. J., Eleno, N., Arevalo, M., & Lopez-Novoa, J. M. (2004b). Intrarenal Administration of Molsidomine, a Molecule Releasing Nitric Oxide, Reduces Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *American Journal of Transplantation*, *4*(10), 1605–1613. <https://doi.org/10.1111/j.1600->

6143.2004.00560.x

- Ronco, C., Kellum, J. A., & Haase, M. (2012). Subclinical AKI is still AKI. *Critical Care (London, England)*, *16*(3), 313. <https://doi.org/10.1186/cc11240>
- Ronco, C., & Rosner, M. H. (2012). Acute kidney injury and residual renal function. *Critical Care (London, England)*, *16*(4), 144. <https://doi.org/10.1186/cc11426>
- Rosen, S., & Samuel, N. H. (2001). Difficulties in understanding human "acute tubular necrosis": Limited data and flawed animal models. *Kidney International*, *60*(4), 1220–1224. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.00930.x>
- 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>
- Salahudeen, A. K., Huang, H., Patel, P., & Jenkins, J. K. (2000). Mechanism and prevention of cold storage-induced human renal tubular cell injury. *Transplantation*, *70*(10), 1424–31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11118084>
- Sampath, S., Moran, J. L., Graham, P. L., Rockliff, S., Bersten, A. D., & Abrams, K. R. (2007). The efficacy of loop diuretics in acute renal failure: assessment using Bayesian evidence synthesis techniques. *Critical Care Medicine*, *35*(11), 2516–24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18084840>
- 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>
- Sánchez, D. J., Bellés, M., Albina, M. L., Sirvent, J. J., & Domingo, J. L. (2001). Nephrotoxicity of Simultaneous Exposure to Mercury and Uranium in Comparison to Individual Effects of These Metals in Rats. *Biological Trace Element Research*, *84*(1–3), 139–154. <https://doi.org/10.1385/BTER:84:1-3:139>
- Sancho-Martínez, S. M., López-Novoa, J. M., & López-Hernández, F. J. (2015). Pathophysiological role of different tubular epithelial cell death modes in acute kidney injury. *Clinical Kidney Journal*, *8*(5), 548–559. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfv069>
- Sancho-Martínez, S. M., Prieto, L., Blanco-Goza, V., Fontecha-Barriuso, M., Vicente-Vicente, L., Casanova, A. G., ... López-Hernández, F. J. (2015). Acute tubular necrosis: An old term in search for a new meaning within the evolving concept of acute kidney injury. *New Horizons in Translational Medicine*, *2*(4–5), 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.nhtm.2015.05.002>

- Sarafidis, P. A., Alexandrou, M. E., & Ruilope, L. M. (2017). A review of chemical therapies for treating diabetic hypertension. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 18(9), 909–923. <https://doi.org/10.1080/14656566.2017.1328054>
- Scherberich, J. E. (1990). Urinary proteins of tubular origin: basic immunochemical and clinical aspects. *American Journal of Nephrology*, 10 Suppl 1, 43–51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2256476>
- Schlieper, G., Westenfeld, R., Brandenburg, V., & Ketteler, M. (2007). VASCULAR CALCIFICATION IN PATIENTS WITH KIDNEY DISEASE: Inhibitors of Calcification in Blood and Urine. *Seminars in Dialysis*, 20(2), 113–121. <https://doi.org/10.1111/j.1525-139X.2007.00257.x>
- Schmidt-Ott, K. M. (2011). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of acute kidney injury--where do we stand today? *Nephrology Dialysis Transplantation*, 26(3), 762–764. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfr006>
- Sharfuddin, A. A., & Molitoris, B. A. (2011). Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nature Reviews Nephrology*, 7(4), 189–200. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2011.16>
- Sharma, R., Yang, Y., Sharma, A., Awasthi, S., & Awasthi, Y. C. (2004). Antioxidant Role of Glutathione S -Transferases: Protection Against Oxidant Toxicity and Regulation of Stress-Mediated Apoptosis. *Antioxidants & Redox Signaling*, 6(2), 289–300. <https://doi.org/10.1089/152308604322899350>
- Shemesh, O., Golbetz, H., Kriss, J. P., & Myers, B. D. (1985). Limitations of creatinine as a filtration marker in glomerulopathic patients. *Kidney International*, 28(5), 830–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2418254>
- Shim, W., Park, J., Ahn, S., Han, L., Jin, Q., Li, H., ... Shim, C. (2009). Testosterone-Independent Down-Regulation of Oct2 in the Kidney Medulla from a Uranyl Nitrate-Induced Rat Model of Acute Renal Failure: Effects on Distribution of a Model Organic Cation, Tetraethylammonium. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(2), 739–747. <https://doi.org/10.1002/jps.21442>
- Shinke, H., Masuda, S., Togashi, Y., Ikemi, Y., Ozawa, A., Sato, T., ... Matsubara, K. (2015). Urinary kidney injury molecule-1 and monocyte chemoattractant protein-1 are noninvasive biomarkers of cisplatin-induced nephrotoxicity in lung cancer patients. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 76(5), 989–996. <https://doi.org/10.1007/s00280-015-2880-y>
- Shokeir, A. A., Hussein, A. M., Awadalla, A., Samy, A., Abdelaziz, A., Khater, S., & Barakat, N. (2012). Protection against renal ischaemia/reperfusion injury: A comparative experimental study of the effect of ischaemic preconditioning vs. postconditioning. *Arab Journal of Urology*, 10(4), 418–424.

<https://doi.org/10.1016/j.aju.2012.08.003>

- Siedlecki, A., Irish, W., & Brennan, D. C. (2011a). Delayed graft function in the kidney transplant. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, *11*(11), 2279–96. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2011.03754.x>
- Siedlecki, A., Irish, W., & Brennan, D. C. (2011b). Delayed graft function in the kidney transplant. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, *11*(11), 2279–96. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2011.03754.x>
- Siew, E. D., & Himmelfarb, J. (2013). The inexorable rise of AKI: can we bend the growth curve? *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, *24*(1), 3–5. <https://doi.org/10.1681/ASN.2012111115>
- Siew, E. D., Ware, L. B., & Ikizler, T. A. (2011). Biological markers of acute kidney injury. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, *22*(5), 810–20. <https://doi.org/10.1681/ASN.2010080796>
- Silacci, P., Mazzolai, L., Gauci, C., Stergiopoulos, N., Yin, H. L., & Hayoz, D. (2004). Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *61*(19–20), 2614–23. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4225-6>
- Simpson, A. J., Booth, N. A., Moore, N. R., & Bennett, B. (1991). Distribution of plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in tissues. *Journal of Clinical Pathology*, *44*(2), 139–43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1864986>
- Singer, E., Elger, A., Elitok, S., Kettritz, R., Nickolas, T. L., Barasch, J., ... 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/10.1038/ki.2011.41>
- Singer, E., Markó, L., Paragas, N., Barasch, J., Dragun, D., Müller, D. N., ... Schmidt-Ott, K. M. (2013). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: pathophysiology and clinical applications. *Acta Physiologica*, *207*(4), 663–672. <https://doi.org/10.1111/apha.12054>
- Singri, N., Ahya, S. N., & Levin, M. L. (2003). Acute renal failure. *JAMA*, *289*(6), 747–51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12585954>
- Sinha, V., Vence, L. M., & Salahudeen, A. K. (2013). Urinary Tubular Protein-Based Biomarkers in the Rodent Model of Cisplatin Nephrotoxicity. *Journal of Investigative Medicine*, *61*(3), 564–568. <https://doi.org/10.2310/JIM.0b013e31828233a8>

- Sinning, J.-M., Ghanem, A., Steinhäuser, H., Adenauer, V., Hammerstingl, C., Nickenig, G., & Werner, N. (2010). Renal Function as Predictor of Mortality in Patients After Percutaneous Transcatheter Aortic Valve Implantation. *JACC: Cardiovascular Interventions*, 3(11), 1141–1149. <https://doi.org/10.1016/j.jcin.2010.09.009>
- Sirota, J. C., Klawitter, J., & Edelstein, C. L. (2011a). Biomarkers of Acute Kidney Injury. *Journal of Toxicology*, 2011, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2011/328120>
- Sirota, J. C., Klawitter, J., & Edelstein, C. L. (2011b). Biomarkers of acute kidney injury. *Journal of Toxicology*, 2011, 328120. <https://doi.org/10.1155/2011/328120>
- Smith, M. P. W., Banks, R. E., Wood, S. L., Lewington, A. J. P., & Selby, P. J. (2009). Application of proteomic analysis to the study of renal diseases. *Nature Reviews Nephrology*, 5(12), 701–712. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2009.183>
- Soni, S. S., Cruz, D., Bobek, I., Chionh, C. Y., Nalesso, F., Lentini, P., ... Ronco, C. (2010). NGAL: a biomarker of acute kidney injury and other systemic conditions. *International Urology and Nephrology*, 42(1), 141–150. <https://doi.org/10.1007/s11255-009-9608-z>
- Spinardi, L., & Witke, W. (2007). Gelsolin and diseases. *Sub-Cellular Biochemistry*, 45, 55–69. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18193634>
- Star, R. A. (1998). Treatment of acute renal failure. *Kidney International*, 54(6), 1817–1831. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1998.00210.x>
- Stevens, L. A., & Levey, A. S. (2005). Measurement of Kidney Function. *Medical Clinics of North America*, 89(3), 457–473. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2004.11.009>
- Storm, T., Emma, F., Verroust, P. J., Hertz, J. M., Nielsen, R., & Christensen, E. I. (2011). A Patient with Cubilin Deficiency. *New England Journal of Medicine*, 364(1), 89–91. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1009804>
- Sun, J., Yin, A., Zhao, F., Zhang, W., Lv, J., & Lv, J. (2017). Protection of tubular epithelial cells during renal injury via post-transcriptional control of BMP7. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 435(1–2), 141–148. <https://doi.org/10.1007/s11010-017-3063-4>
- Sundberg, A. G., Appelkvist, E. L., Bäckman, L., & Dallner, G. (1994). Urinary pi-class glutathione transferase as an indicator of tubular damage in the human kidney. *Nephron*, 67(3), 308–16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7936021>
- Susantitaphong, P., Cruz, D. N., Cerda, J., Abulfaraj, M., Alqahtani, F., Koulouridis, I., ... 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), 1482–93.
<https://doi.org/10.2215/CJN.00710113>
- Sutherland, S. M., Byrnes, J. J., Kothari, M., Longhurst, C. A., Dutta, S., Garcia, P., & Goldstein, S. L. (2015). Article AKI in Hospitalized Children: Comparing the pRIFLE, AKIN, and KDIGO Definitions. *Clin J Am Soc Nephrol*, 10, 554–561.
<https://doi.org/10.2215/CJN.01900214>
- Taber, S. S., & Mueller, B. A. (2006a). Drug-Associated Renal Dysfunction. *Critical Care Clinics*, 22(2), 357–374. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2006.02.003>
- Taber, S. S., & Mueller, B. A. (2006b). Drug-Associated Renal Dysfunction. *Critical Care Clinics*, 22(2), 357–374. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2006.02.003>
- Taber, S. S., & Mueller, B. A. (2006c). Drug-Associated Renal Dysfunction. *Critical Care Clinics*, 22(2), 357–374. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2006.02.003>
- Taguchi, T., Nazneen, A., Abid, M. R., & Razzaque, M. S. (2005). Cisplatin-Associated Nephrotoxicity and Pathological Events. In *Cellular Stress Responses in Renal Diseases* (Vol. 148, pp. 107–121). Basel: KARGER.
<https://doi.org/10.1159/000086055>
- Taulan, M., Paquet, F., Argiles, A., Demaille, J., & Romey, M.-C. (2006). Comprehensive analysis of the renal transcriptional response to acute uranyl nitrate exposure. *BMC Genomics*, 7(1), 2. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-2>
- Tenorio, M. T., Galeano, C., Rodríguez, N., & Liaño, F. (2010). Diagnóstico diferencial de la insuficiencia renal aguda. *Sociedad Española de Nefrología*, 3(2), 16–32.
<https://doi.org/10.3265/NefroPlus.pre2010.Jul.10548>
- Thakar, C. V., Christianson, A., Himmelfarb, J., & Leonard, A. C. (2011). Acute kidney injury episodes and chronic kidney disease risk in diabetes mellitus. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, 6(11), 2567–72.
<https://doi.org/10.2215/CJN.01120211>
- Thomas, M. E., Blaine, C., Dawnay, A., Devonald, M. A. J., Ftouh, S., Laing, C., ... Ostermann, M. (2015a). The definition of acute kidney injury and its use in practice. *Kidney International*, 87(1), 62–73. <https://doi.org/10.1038/ki.2014.328>
- Thomas, M. E., Blaine, C., Dawnay, A., Devonald, M. A. J., Ftouh, S., Laing, C., ... Ostermann, M. (2015b). The definition of acute kidney injury and its use in practice. *Kidney International*, 87(1), 62–73. <https://doi.org/10.1038/ki.2014.328>
- Torregrosa, I., Montoliu, C., Urios, A., Andrés-Costa, M. J., Giménez-Garzó, C., Juan, I., ... Miguel, A. (2015). Urinary KIM-1, NGAL and L-FABP for the diagnosis of AKI in patients with acute coronary syndrome or heart failure undergoing coronary

- angiography. *Heart and Vessels*, 30(6), 703–711. <https://doi.org/10.1007/s00380-014-0538-z>
- Torrens, C., Kelsall, C. J., Hopkins, L. A., Anthony, F. W., Curzen, N. P., & Hanson, M. A. (2009). Atorvastatin Restores Endothelial Function in Offspring of Protein-Restricted Rats in a Cholesterol-Independent Manner. *Hypertension*, 53(4), 661–667. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.122820>
- Townsend, D. R., & Bagshaw, S. M. (2008). New Insights on Intravenous Fluids, Diuretics and Acute Kidney Injury. *Nephron Clinical Practice*, 109(4), c206–c216. <https://doi.org/10.1159/000142930>
- Tsai, T.-Y., Chien, H., Tsai, F.-C., Pan, H.-C., Yang, H.-Y., Lee, S.-Y., ... Chen, Y.-C. (2017). Comparison of RIFLE, AKIN, and KDIGO classifications for assessing prognosis of patients on extracorporeal membrane oxygenation. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2017.08.004>
- Tsang, R. Y., Al-Fayea, T., & Au, H.-J. (2009). Cisplatin Overdose. *Drug Safety*, 32(12), 1109–1122. <https://doi.org/10.2165/11316640-000000000-00000>
- Tsujimura, T., Idei, M., Yoshikawa, M., Takase, O., & Hishikawa, K. (2016). Roles and regulation of bone morphogenetic protein-7 in kidney development and diseases. *World Journal of Stem Cells*, 8(9), 288. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v8.i9.288>
- Uchida, M., Miyoshi, T., & Miyamoto, Y. (2017). Pharmacological effects of a vitamin K1 2,3-epoxide reductase (VKOR) inhibitor, 3-acetyl-5-methyltetronic acid, on cisplatin-induced fibrosis in rats. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 79(9), 1507–1515. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0216>
- Uchino, S., Bellomo, R., Bagshaw, S. M., & Goldsmith, D. (2010). Transient azotaemia is associated with a high risk of death in hospitalized patients. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 25(6), 1833–1839. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfp624>
- 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.48.113006.094615>
- 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. *AJP: Renal Physiology*, 290(2), F517–F529. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00291.2005>
- Vallon, V. (2003). Tubuloglomerular feedback and the control of glomerular filtration

- rate. *News in Physiological Sciences: An International Journal of Physiology Produced Jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society*, 18, 169–74. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12869618>
- Vanmassenhove, J., Vanholder, R., Nagler, E., & Van Biesen, W. (2013). Urinary and serum biomarkers for the diagnosis of acute kidney injury: An in-depth review of the literature. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 28(2), 254–273. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfs380>
- 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>
- Vicente-Vicente, L., Quiros, Y., Pérez-Barriocanal, F., López-Novoa, J. M., López-Hernández, F. J., & Morales, A. I. (2010a). Nephrotoxicity of Uranium: Pathophysiological, Diagnostic and Therapeutic Perspectives. *Toxicological Sciences*, 118(2), 324–347. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq178>
- Vicente-Vicente, L., Quiros, Y., Pérez-Barriocanal, F., López-Novoa, J. M., López-Hernández, F. J., & Morales, A. I. (2010b). Nephrotoxicity of uranium: pathophysiological, diagnostic and therapeutic perspectives. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 118(2), 324–47. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq178>
- Vicente-Vicente, L., Sánchez-Juanes, F., García-Sánchez, O., Blanco-Gozalo, V., Pescador, M., Sevilla, M. A., ... Morales, A. I. (2015). Sub-nephrotoxic cisplatin sensitizes rats to acute renal failure and increases urinary excretion of fumarylacetoacetase. *Toxicology Letters*, 234(2), 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.11.033>
- Vicente-Vicente L, Quiros Y, Pérez-Barriocanal F, López-Novoa JM, López-Hernández FJ, M. A. (2011). La exposición crónica al uranio, un riesgo potencial de nefrotoxicidad. *Rev. Toxicol*, 28, 99–108. Retrieved from <http://rev.aetox.es/wp/wp-content/uploads/hemeroteca/vol28-2/2-137-1-PB.pdf>
- Vogt, L., Laverman, G. D., & Navis, G. (2010). Time for a comeback of NSAIDs in proteinuric chronic kidney disease? *The Netherlands Journal of Medicine*, 68(12), 400–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21209465>
- Voller, A. (1978). The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (theory, technique and applications). *La Ricerca in Clinica E in Laboratorio*, 8(4), 289–98. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/366726>
- Waikar, S. S., & Bonventre, J. V. (2008). Biomarkers for the diagnosis of acute kidney

injury. *Nephron. Clinical Practice*, 109(4), c192-7.
<https://doi.org/10.1159/000142928>

- Waikar, S. S., Liu, K. D., & Chertow, G. M. (2008a). Diagnosis, Epidemiology and Outcomes of Acute Kidney Injury. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 3(3), 844–861. <https://doi.org/10.2215/CJN.05191107>
- Waikar, S. S., Liu, K. D., & Chertow, G. M. (2008b). Diagnosis, Epidemiology and Outcomes of Acute Kidney Injury. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 3(3), 844–861. <https://doi.org/10.2215/CJN.05191107>
- Waikar, S. S., Liu, K. D., & Chertow, G. M. (2008). Diagnosis, epidemiology and outcomes of acute kidney injury. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, 3(3), 844–61. <https://doi.org/10.2215/CJN.05191107>
- Wald, R., Quinn, R. R., Luo, J., Li, P., Scales, D. C., Mamdani, M. M., ... University of Toronto Acute Kidney Injury Research Group. (2009). Chronic Dialysis and Death Among Survivors of Acute Kidney Injury Requiring Dialysis. *JAMA*, 302(11), 1179. <https://doi.org/10.1001/jama.2009.1322>
- Wang, D., & Lippard, S. J. (2005). Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(4), 307–320. <https://doi.org/10.1038/nrd1691>
- Westenfelder, C. (2011). Earlier diagnosis of acute kidney injury awaits effective therapy. *Kidney International*, 79(11), 1159–1161. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.19>
- Woroniecki, R., Ferdinand, J. R., Morrow, J. S., & Devarajan, P. (2003). Dissociation of spectrin-ankyrin complex as a basis for loss of Na-K-ATPase polarity after ischemia. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 284(2), F358–F364. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00100.2002>
- WPickering, J., & H, Z. (2012). The Metamorphosis of Acute Renal Failure to Acute Kidney Injury. In *Basic Nephrology and Acute Kidney Injury*. InTech. <https://doi.org/10.5772/26705>
- Yamamoto, T., Noiri, E., Ono, Y., Doi, K., Negishi, K., Kamijo, A., ... Sugaya, T. (2007). Renal L-type fatty acid--binding protein in acute ischemic injury. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 18(11), 2894–902. <https://doi.org/10.1681/ASN.2007010097>
- Yamamoto, T., Noiri, E., Ono, Y., Doi, K., Negishi, K., Kamijo, A., ... Sugaya, T. (2007). Renal L-Type Fatty Acid Binding Protein in Acute Ischemic Injury. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(11), 2894–2902. <https://doi.org/10.1681/ASN.2007010097>
- Yanai, H., Yoshida, H., Tomono, Y., Tada, N., & Chiba, H. (2006). The possible

contribution of a general glycosphingolipid transporter, GM2 activator protein, to atherosclerosis. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 13(6), 281–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17192692>

Yoshiki, N., Kubota, T., & Aso, T. (2000). Expression and localization of inducible nitric oxide synthase in human non-pregnant and early pregnant endometrium. *Molecular Human Reproduction*, 6(3), 283–287. <https://doi.org/10.1093/molehr/6.3.283>

Zhang, H., Jay Forman, H., & Choi, J. (2005). γ -Glutamyl Transpeptidase in Glutathione Biosynthesis. In *Methods in enzymology* (Vol. 401, pp. 468–483). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)01028-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)01028-1)