

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA



VNiVERSIDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

-TESIS DOCTORAL-

PAI-1: UN POTENCIAL BIOMARCADOR PARA EL
DIAGNÓSTICO ETIOPATOLÓGICO
DEL DAÑO RENAL AGUDO

Memoria presentada por
María Paniagua Sancho
para optar al Grado de Doctor
por la Universidad de Salamanca

María Paniagua Sancho
Salamanca a 10 de febrero de 2022

EL DOCTOR **D. JOSÉ CARLOS MARTÍNEZ SALGADO**, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA, Y EL DOCTOR **D. FRANCISCO J. LÓPEZ HERNÁNDEZ**, INVESTIGADOR DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE SALAMANCA (IBSAL) Y PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA.

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo, titulado **“PAI-1: UN POTENCIAL BIOMARCADOR PARA EL DIAGNÓSTICO ETIOPATOLÓGICO DEL DAÑO RENAL AGUDO”**, presentado por la graduada en Biología Dña. María Paniagua Sancho para optar al Grado de Doctor, ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca, consideran que cumple las condiciones necesarias y autorizan 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 10 de febrero de 2022.

Dr. D. José Carlos Martínez Salgado

Dr. D. Francisco J. López Hernández

Esta Tesis Doctoral ha sido financiada con el proyecto del Ministerio de Economía y Competitividad, **“Desarrollo de un prototipo de sistema multiplex por citometría de flujo para un novedoso diagnóstico etiopatogénico multiparamétrico del daño renal agudo”**. Convocatoria de Proyectos de Desarrollo Tecnológico en Salud (2015/2017).

A mi familia

"Si caminas solo, irás más rápido.
Si caminas acompañado, llegarás más lejos"

Proverbio Chino

ÍNDICES

ÍNDICES	I
Índice de figuras	VII
Índice de tablas	IX
ABREVIATURAS	XI
INTRODUCCIÓN	1
1. EL DAÑO RENAL AGUDO	3
1.1 Epidemiología y repercusión económica	3
1.2 Etiopatogenia	5
1.2.1 DRA prerrenal	6
1.2.2 DRA renal o intrínseco	7
1.2.3 DRA posrenal	10
2. DRA INDUCIDO POR EL CISPLATINO	11
2.1 Nefrotoxicidad	11
2.2 Fisiopatología del DRA inducido por el cisplatino	12
2.2.1 Lesión tubular proximal causada por el cisplatino	12
2.2.2 Lesión vascular	17
2.2.3 Lesión glomerular	18
2.2.4 Lesión intersticial	18
3. DRA INDUCIDO POR LA ISQUEMIA	19
3.1 Alteraciones hemodinámicas	19
3.2 Lesión endotelial y vascular	20
3.3 Lesión tubular	22
4. DIAGNÓSTICO DEL DRA	23
4.1 Criterios diagnósticos del DRA	23
4.2 Limitaciones en el diagnóstico del DRA	25
5. PERSPECTIVAS EN EL DIAGNÓSTICO DEL DRA	28
5.1 Biomarcadores urinarios de DRA	28
5.1.1 Limitaciones de los biomarcadores urinarios de DRA	34
5.2 Las “ómicas” como método de búsqueda de biomarcadores de DRA	34
6. VESÍCULAS EXTRACELULARES URINARIAS Y DRA	37

6.1 Tipos de vesículas extracelulares	38
6.2 Biogénesis de las vesículas extracelulares	39
6.2.1 Mecanismos de la biogénesis y la liberación de los exosomas	39
6.2.2 Mecanismos de la biogénesis y la liberación de las microvesículas	41
6.3 Contenido de las vesículas extracelulares	42
6.4 Vesículas extracelulares como fuente de biomarcadores de DRA	43
OBJETIVOS	47
MATERIALES Y MÉTODOS	51
1. MÉTODOS	53
2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	53
2.1 Mantenimiento y manipulación de los animales	53
2.2 Modelos experimentales de DRA	54
2.2.1 DRA tóxico inducido por el cisplatino	54
2.2.2 DRA inducido por la I/R	55
2.3 Sistema de perfusión renal <i>in situ</i>	57
2.4 Diseño experimental	58
3. TÉCNICAS EXPERIMENTALES IN VIVO	61
3.1 Recogida y procesamiento de la orina de 24 horas: jaulas metabólicas	61
3.2 Recogida y procesamiento de las muestras de sangre	62
3.3 Perfusión y recogida de órganos	62
4. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS	63
4.1 Medida de la creatinina en el plasma y la orina. Aclaramiento de creatinina	63
4.2 Determinación de la urea plasmática	65
4.3 Medida del INR en sangre	65
4.4 Medida de la concentración de proteínas en la orina	66
5. AISLAMIENTO DE VESÍCULAS URINARIAS	67
5.1 Método de aislamiento por precipitación	67
5.2 Método de aislamiento por cromatografía de exclusión por tamaño	68
6. NANOSIGHT	69
7. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN	69
8. NANOPROTEÓMICA	70

8.1 Lisado de las VE y determinación de la concentración de proteínas	70
8.2 Preparación de la muestra y electroforesis	70
8.3 Tinción con azul de Coomassie	71
8.4 Digestión de las proteínas contenidas en el gel de acrilamida	72
8.5 Análisis por LC-MS/MS	73
9. INGENUITY PATHWAY ANALYSIS (IPA)	73
10. CULTIVOS CELULARES	74
10.1 Línea celular inmortalizada de células epiteliales renales de rata	74
10.2 Técnicas básicas de cultivos celulares	75
10.3 Tratamiento con cisplatino	76
10.3.1 Ensayo de viabilidad celular	76
10.3.2 Ensayo de muerte celular	77
11. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOT	78
11.1 Obtención de los extractos de proteínas	78
11.2 Determinación de la concentración de proteínas	79
11.3 Preparación de las muestras, electroforesis y transferencia	80
11.4 Bloqueo e incubación con los anticuerpos	81
11.5 Revelado	82
12. ANÁLISIS DEL NIVEL DE EXPRESIÓN GÉNICA: PCR A TIEMPO REAL	82
12.1 Extracción del ARN del tejido renal	83
12.2 Obtención del ADNc	84
12.3 Diseño de los cebadores	84
12.4 PCR a tiempo real	85
13. ANÁLISIS HISTOLÓGICO	86
13.1 Tinción con hematoxilina y eosina	87
14. ESTUDIO CON PACIENTES DE DRA	88
14.1 ELISA	89
14.2 Excreción urinaria de NAG	91
15. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	92
16. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS	93
16.1 Tabla 7. Reactivos y productos utilizados	93
16.2 Tabla 8. Equipos y aparatos utilizados	96
16.3 Tabla 9. Programas informáticos utilizados	97

RESULTADOS	99
BLOQUE I: MODELOS EXPERIMENTALES DE DRA	101
1. EL CISPLATINO Y LA ISQUEMIA PRODUCEN DRA	101
1.1 Caracterización funcional del DRA	101
1.2 Caracterización histológica del DRA	105
BLOQUE II: IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES VESICULARES URINARIOS DE DRA	108
2. CARACTERIZACIÓN DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES URINARIAS	108
2.1 Identificación de las VE urinarias según su tamaño	108
2.2 Análisis morfológico de las VE urinarias	110
3. ANÁLISIS NANOPROTEÓMICO DE LAS VESÍCULAS URINARIAS	112
4. COMPROBACIÓN DE LA PRESENCIA DEL PAI-1 EN LAS VE URINARIAS DE RATAS INDIVIDUALES	118
4.1 Caracterización de VE urinarias de ratas individuales	118
4.2 Presencia del PAI-1 en VE urinarias	121
BLOQUE III: ESTUDIO DEL ORIGEN DEL PAI-1	123
5. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL PAI-1 EN EL TEJIDO RENAL, LA ORINA Y EL PLASMA	123
6. EL PAI-1 APARECE EN LA ORINA DURANTE LA PERFUSIÓN RENAL <i>IN SITU</i>	126
7. LAS CÉLULAS EPITELIALES DEL TÚBULO PROXIMAL SECRETAN PAI-1	128
7.1 Los niveles urinarios del PAI-1 no están relacionados la una alteración sistémica de la coagulación en el DRA	133
8. EL PAI-1 URINARIO EN PACIENTES CON DRA	139
DISCUSIÓN FINAL	146
CONCLUSIONES	156
BIBLIOGRAFÍA	160
ANEXOS	205

Índice de figuras

Figura 1. Representación del espectro clínico del síndrome de DRA	5
Figura 2. Tipos de DRA y sus causas	6
Figura 3. Mecanismos patológicos implicados en el DRA inducido por el cisplatino	15
Figura 4. Complejidad de los sistemas biológicos	36
Figura 5. Biogénesis de las vesículas extracelulares	41
Figura 6. Representación esquemática del sistema de perfusión <i>in situ</i> con Krebs-dextrano	57
Figura 7. Diseño experimental de la inducción de DRA por el cisplatino y la isquemia-reperfusión	60
Figura 8. Jaula metabólica individual	62
Figura 9. Etapas del proceso de aislamiento de las VE urinarias por el método de precipitación	67
Figura 10. Aspecto de los geles de acrilamida después de la tinción con azul de Coomassie	72
Figura 11. Células epiteliales renales NRK-52E en cultivo	74
Figura 12. Representación de los pasos generales de la técnica de <i>Western blot</i>	80
Figura 13. Imágenes representativas de la zona cortico-medular y medular externa teñidas con hematoxilina y eosina	87
Figura 14. Representación esquemática de la técnica ELISA	90
Figura 15. Evolución de la concentración de creatinina plasmática	102
Figura 16. Evolución de la urea plasmática	103
Figura 17. Evolución de los valores de aclaramiento de creatinina	104
Figura 18. Evolución de la proteinuria	105
Figura 19. Caracterización histológica de los modelos experimentales de DRA	106
Figura 20. Concentración y distribución de los tamaños de las VE urinarias	110
Figura 21. Imágenes representativas de las VE urinarias	111
Figura 22. Datos obtenidas del análisis nanoproteómico de las VE	112
Figura 23. Vía de la coagulación	117

Figura 24. Representación gráfica de la concentración y distribución de los tamaños de las VE urinarias procedentes de animales individuales del grupo control ____	119
Figura 25. Representación gráfica de la concentración y distribución de los tamaños de las VE urinarias procedentes de animales individuales tratados con cisplatino ____	120
Figura 26. Análisis de PAI-1 en las VE urinarias durante un DRA_____	121
Figura 27. Expresión de PAI-1 en el tejido renal durante un DRA _____	123
Figura 28. Niveles urinarios de PAI-1 durante un DRA _____	124
Figura 29. Niveles plasmáticos de PAI-1 durante un DRA _____	125
Figura 30. Excreción de PAI-1 en la orina tras la perfusión renal <i>in situ</i> con Krebs-dextrano _____	127
Figura 31. Análisis de la viabilidad celular tras el tratamiento con cisplatino_____	130
Figura 32. Apoptosis de células epiteliales de túbulo proximal tras el tratamiento con cisplatino _____	131
Figura 33. Análisis de la expresión de PAI-1 intracelular y en medio de cultivo ____	132
Figura 34. Procesos en los que participa PAI-1 _____	133
Figura 35. Valores de INR de ratas controles y tratadas con cisplatino_____	134
Figura 36. Evaluación de la coagulación en las estructuras renales mediante la tinción con hematoxilina y eosina _____	135
Figura 37. Regulación de la migración y adhesión celular mediada por PAI-1____	137
Figura 38. Características y etiologías del DRA de los pacientes que participaron en el estudio _____	139
Figura 39. Niveles urinarios de PAI-1 en pacientes controles y con DRA _____	140
Figura 40. Correlación de los niveles urinarios de PAI-1 y otros biomarcadores de daño renal _____	142
Figura 41. Esquema de los principales resultados obtenidos en este trabajo de investigación. _____	144
Figura 42. Esquema de los posibles mecanismos implicados en la presencia de PAI-1 en la orina durante un DRA_____	154

Índice de tablas

Tabla 1. Criterios RIFLE, AKIN, KDIGO para el diagnóstico del DRA _____	24
Tabla 2. Biomarcadores de DRA_____	33
Tabla 3. Anticuerpos primarios utilizados en el <i>Western Blot</i> _____	81
Tabla 4. Anticuerpos secundarios utilizados en el <i>Western Blot</i> _____	82
Tabla 5. Cebador de diseño propio y condiciones empleadas en la qPCR _____	85
Tabla 6. Resumen de los kits de ELISA utilizados_____	89
Tabla 7. Reactivos y productos utilizados _____	92
Tabla 8. Equipos y aparatos utilizados_____	95
Tabla 9. Programas informáticos utilizados _____	96
Tabla 10. Principales vías canónicas en las que están involucradas las proteínas identificadas en las VE urinarias durante un DRA causado por cisplatino _____	113
Tabla 11. Principales vías canónicas en las que están involucradas las proteínas identificadas en las VE urinarias durante un DRA causado por cisplatino o un antibiótico potencialmente nefrotóxico _____	114
Tabla 12. Proteínas identificadas en las VE urinarias tras el tratamiento con cisplatino que están relacionadas con el sistema de coagulación _____	115
Tabla 13. Proteínas identificadas en las VE urinarias tras el tratamiento con cisplatino y con un antibiótico potencialmente nefrotóxico, que están relacionadas con el sistema de coagulación_____	116
Tabla 14. Datos de concentración y tamaño de las VE urinarias que proceden de la orina de animales individuales del grupo control _____	118
Tabla 15. Datos de concentración y tamaño de las VE urinarias que proceden de la orina de animales individuales tratados con CDDP _____	119

ABREVIATURAS

A

ADAMTS-1	Metaloproteasa (del inglés <i>A Disintegrin And Metalloproteinase</i>)
ADQI	Iniciativa para la Calidad de la Diálisis Aguda (del inglés <i>Acute Dialysis Quality Initiative</i>).
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AKIN	Red de lesión renal aguda (del inglés <i>Acute Kidney Injury Network</i>)
ALP	Fosfatasa alcalina (del inglés <i>Alkaline Phosphatase</i>)
APS	Persulfato de amonio (del inglés <i>Ammonium PerSulfate</i>)
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ASN	Análisis de seguimiento de nanopartículas
ATP	Adenosintrifosfato (del inglés <i>Adenosin TriPhosphate</i>)

B

B	Basal
BSA	Albúmina de suero bovino (del inglés <i>Bovine Serum Albumin</i>)

C

CDDP	Cisplatino
ClCr	Aclaramiento de Creatinina (del inglés <i>Clearance of Creatinine</i>)
Conc	Concentración
ConcP	Concentración de proteínas
Cryo-EM	Del inglés <i>Cryogenic Electron Microscopy</i>
CrP	Creatinina Plasmática
CrU	Creatinina Urinaria
Ct	Del inglés <i>Cycle threshold</i>
Ctr1	Transportador de cobre 1 (del inglés <i>Cooper Transporter1</i>)

D

DAMP	Patrones moleculares asociados al peligro (del inglés <i>Damage Associated Molecular Patterns</i>)
DRA	Daño renal agudo

ABREVIATURAS

DMSO	Dimetil Sulfoxido
DO	Densidad óptica

E

EMM	Error estándar de la media
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción enzimática (del inglés <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
ERC	Enfermedad renal crónica
ESCRT	Complejos de clasificación endosomal necesarios para el transporte (del inglés <i>Endosomal Sorting Complexes Required For Transport</i>).

F

FAK	Proteínas quinasas de adhesión focal (del inglés <i>Focal Adhesión Kinase</i>)
FU	Flujo urinario

G

GGT	Gamma Glutamil Transpeptidasa
GM2AP	Proteína activadora del gangliósido M2 (del inglés <i>Ganglioside M2 Activator Protein</i>)
GST	Glutation S-Transferasa

H

HRP	Peroxidasa de rábano picante (del inglés, <i>HorseRadish Peroxidase</i>)
-----	---

I

ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1 (del inglés <i>InterCellular Adhesion Molecule-1</i>)
IGFBP-7	Factor de crecimiento insulínico tipo 7 (del inglés <i>Insulin-like Growth Factor-Binding Protein-7</i>)

IL	Interleuquina
ILV	Vesículas intraluminales (del inglés <i>Intraluminal Vesicles</i>)
INR	Del inglés <i>Innternational Normalized Ratio</i>
i.p.	Intraperitoneal
I/R	Isquemia Reperfusión
ISEV	Del inglés <i>Society for Extracellular Vesicles</i>
ISI	Índice de sensibilidad internacional

K

KDa	Kilodalton
KDIGO	Del inglés <i>Kidney Disease: Improving Global Outcomes</i>
KIM-1	Molécula asociado a daño -1 (del inglés <i>Kidney Injury Molecule-1</i>)

L

LC-MS/MS	Cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (del inglés <i>Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry</i>)
L-FABP	Proteína hepática fijadora de ácidos grasos (de sus siglas en inglés <i>Liver-Fatty Acid Binding Protein</i>)
LPR1	Proteína 1 relacionada con el receptor de baja densidad (del inglés <i>Low density Lipoprotein Receptor-related protein 1</i>)

M

MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógeno (del inglés <i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>)
MATE	Proteínas de extrusión multiantimicrobiana (del inglés <i>Multidrug And Toxin Extrusion</i>)
MDRD	Del inglés <i>Modification of Diet in Renal Disease</i>
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos 1 (del inglés <i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>)
MEC	Matriz extracelular
MLCK	Quinasa de cadena ligera de miosina (del inglés <i>Myosin Light Chain Kinase</i>)
MS	Espectrometría de masas (del inglés <i>Mass Spectrometry</i>)

MRP	Proteínas asociadas a la resistencia a múltiples fármacos (del inglés <i>Multidrug Resistance Protein</i>)
MV	Microvesículas
MVB	Cuerpo multivesicular (del inglés <i>Multivesicular Body</i>)

N

NaCl	Cloruro Sódico
NAG	N-Acetyl-beta-D-Glucosaminidasa
NGAL	Lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (del inglés Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin)
NK	Del inglés, <i>Natural Killer</i>
NTA	Necrosis tubular aguda

O

OCT	Transportador de cationes orgánicos
-----	-------------------------------------

P

PAI-1	Inhibidor del activador de plasminógeno (del inglés <i>Plasminogen Activator Inhibitor-1</i>)
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino (del inglés <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PVDF	Difluoruro de polivinilideno (del inglés <i>polyvinylidene fluoride</i>)

Q

qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>)
------	---

R

RE	Retículo endoplasmático
RFR	Reserva funcional renal
RIFLE	Del inglés <i>Risk, Injury, Failure, Loss and End-stage renal disease</i>

ROS	Especies reactivas de oxígeno (del inglés <i>Reactive Oxygen Species</i>)
RT-PCR	Transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>)

S

SDS	Dodecil sulfato sódico (del inglés <i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>)
SEA	Servicio de experimentación animal
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaño (del inglés <i>Size Exclusion Chromatography</i>)

T

TCP-1	Del inglés <i>Tailless Complex Polypeptide</i>
TEM	Microscopía electrónica de transmisión (del inglés <i>Transmission Electron Microscopy</i>)
TFG	Tasa de filtración glomerular
TFGe	Tasa de filtración glomerular estimada
TGF- β 1	Factor de crecimiento transformante β 1 (del inglés <i>Transforming Growth Factor alpha</i>)
THP	Proteína de <i>Tamm-Horsfall</i> (del inglés <i>Tamm-Horsfall Protein</i>)
TIMP-2	Inhibidor tisular de la metaloproteinasa-2 (del inglés <i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2</i>)
TLR	Receptor tipo Toll (del inglés <i>Toll-Like Receptor</i>)
TMB	Tetrametilbencidina
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α (del inglés <i>Factor Necrosis Tumoral α</i>)
TP	Tiempo de protrombina
tPA	Activador tisular del plasminógeno (del inglés <i>Tissue-type Plasminogen Activator</i>)

U

UCI	Unidad de cuidados intensivos
UU. AA	Unidades arbitrarias
UI	Unidades Internacionales

uPA Activador del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (del inglés *Urokinase-type Plasminogen Activator*)

uPAR Receptor del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (del inglés *Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor*)

V

VCAM-1 Molécula de adhesión de células vasculares- 1 (del inglés *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*)

VE Vesícula extracelular

VEGF Factor de crecimiento endotelial vascular (del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*)

VRAC Canales de aniones regulados por volumen (del inglés *Volume-Regulated Anion Channels*)

4 PL Del inglés, *Four Parametric Logistic*

INTRODUCCIÓN

Los riñones tienen un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis del medio interno. Su función principal es la excretora, necesaria para eliminar los compuestos de desecho derivados del metabolismo o los productos extraños, como fármacos o tóxicos, junto con la regulación del equilibrio hídrico y electrolítico de los líquidos corporales (Guyton y Hall, 2016).

1. EL DAÑO RENAL AGUDO

El daño renal agudo (DRA) es un síndrome asociado con diversas etiologías y procesos fisiopatológicos que conducen a una disminución abrupta de la función renal (Hoste *et al.*, 2018). Además de la acumulación de productos de desecho (creatinina, urea y otros productos nitrogenados), de la alteración de la homeostasis de electrolitos y de la retención de fluidos, puede inducir disfunción de órganos distantes (Lee *et al.*, 2018). Este síndrome tiene mayor incidencia en pacientes críticamente enfermos y se asocia con un aumento significativo de la morbilidad y la mortalidad, de la estancia hospitalaria y de los costes asociados.

1.1 Epidemiología y repercusión económica

El DRA abarca una multitud de escenarios clínicos (Figura 1) y etiologías que se asocian con hospitalizaciones e ingresos en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI). Esto se debe a la alta frecuencia de factores de riesgo que tienen los pacientes hospitalizados, como por ejemplo: la exposición a fármacos nefrotóxicos, la isquemia, la cirugía mayor, la sepsis o la exposición a medios de contraste yodados entre otros (Finlay *et al.*, 2013). Aunque este síndrome afecta con mayor frecuencia a la población anciana (Bagshaw *et al.*, 2007), se presenta en personas de todas las edades, incluso en los niños. Una revisión sistemática relativamente reciente mostró que la incidencia del DRA durante el periodo de hospitalización fue de un 21,6 % entre los adultos y un 33,7 % entre los niños (Susantitaphong *et al.*, 2013). En pacientes de la UCI, la incidencia supera el 50 % (Hoste *et al.*, 2015; Al-Jaghbeer *et al.*, 2018).

La epidemiología del DRA difiere entre países desarrollados y subdesarrollados. Esto se debe a las diferencias en la demografía, la economía, la geografía y el tipo de comorbilidades. En países con ingresos bajos, la epidemiología no está bien descrita por la baja disponibilidad de recursos y la inadecuada infraestructura de salud que se asocia a un peor reconocimiento y tratamiento de la enfermedad (Hoste *et al.*, 2018). La incidencia del DRA ha ido aumentando durante las últimas décadas junto con el envejecimiento de las poblaciones. Este aumento se puede atribuir a numerosos factores, como las características del paciente (vejez, raza, proteinuria, diabetes mellitus) y, a ciertas complicaciones (la hipertensión, la sobrecarga de líquidos, las enfermedades cardiovasculares, la enfermedad renal crónica preexistente) e interacciones terapéuticas (cirugías mayores, quimioterapia, etc.) (Negi *et al.*, 2018).

Este síndrome tiene importantes consecuencias para la salud. Para su manejo se dispone de tratamientos específicos según la causa subyacente del daño, y de tratamientos de apoyo para prevenir y controlar las complicaciones que en los casos graves incluyen la diálisis y el reemplazo renal. A corto plazo, entre el 4 y el 6 % de los pacientes necesitan diálisis tras un DRA, y este porcentaje aumenta hasta el 13 % en los pacientes de la UCI (Dennen, Douglas y Anderson, 2010). A pesar de los avances, la tasa de mortalidad en pacientes que requieren terapia de reemplazo renal sigue siendo aproximadamente del 50 % (Levey y James, 2017). Es importante destacar que un episodio de DRA no solo está asociado con efectos adversos a corto plazo, sino que también tiene efectos negativos a largo plazo sobre la salud y supervivencia del paciente (Hoste *et al.*, 2018). La mortalidad global de los pacientes según el estudio de (Susantitaphong *et al.*, 2013) fue del 23 % (23,9 % en los adultos y 13,8 % en los niños). Por su parte los enfermos de la UCI que desarrollan esta enfermedad tienen una mortalidad del 40 al 60 % (Uchino *et al.*, 2006, 2010; Selby *et al.*, 2012).

La repercusión económica directamente asociada a este síndrome, se estima en el 1 % del presupuesto sanitario total y en el 5 % del gasto hospitalario total (Chertow *et al.*, 2005; Vandijck *et al.*, 2014). Este coste deriva fundamentalmente del tiempo de estancia prolongada de los pacientes en el hospital, de una monitorización más constante y personalizada y fundamentalmente de la diálisis. Casi el 50 % de los pacientes hospitalizados con DRA requieren algún tipo de atención posthospitalaria,

de los cuales al 27% se les presta atención médica prolongada y el 22 % recibe atención domiciliaria (Chertow *et al.*, 2005).

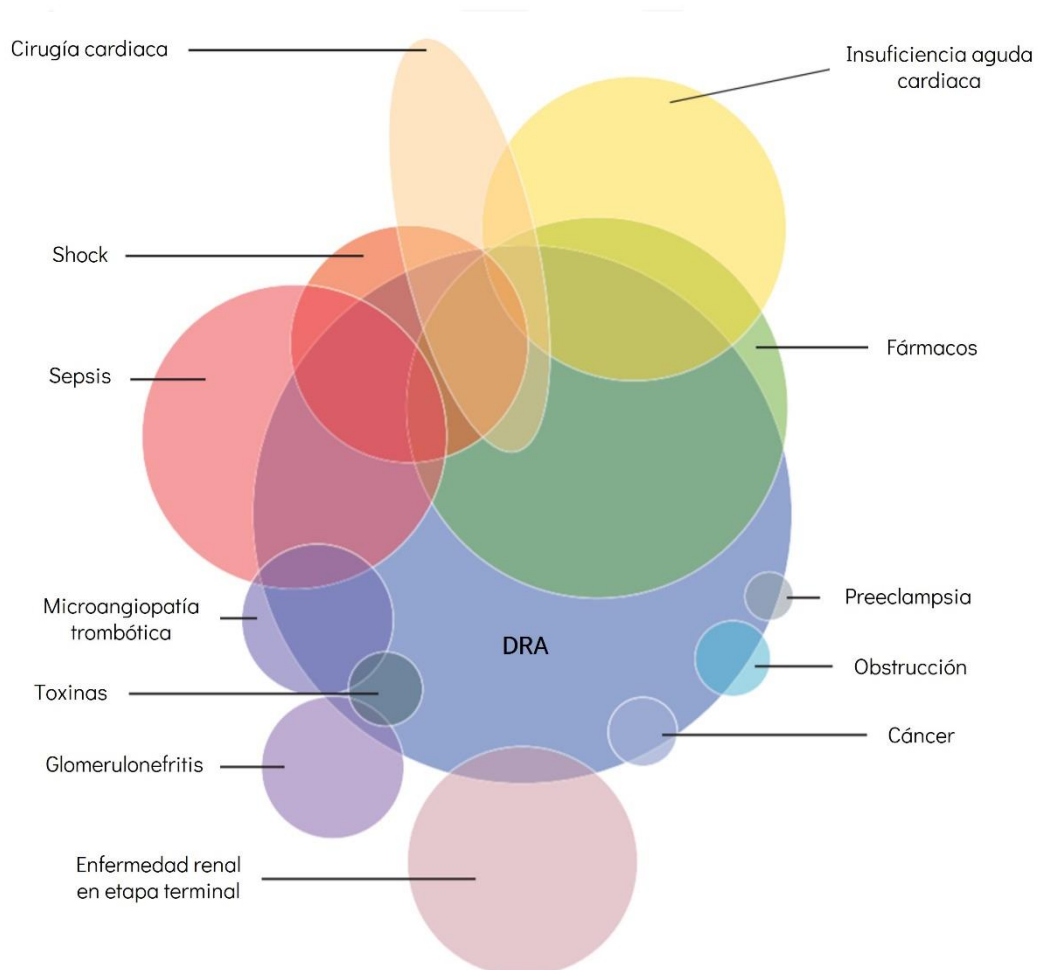


Figura 1. Representación del espectro clínico del síndrome de DRA. El daño renal agudo (DRA) se puede desarrollar como consecuencia de diferentes condiciones patológicas que pueden conducir o no un DRA, dependiendo del equilibrio entre la susceptibilidad del paciente y la intensidad de la exposición al daño (Ronco, Bellomo y Kellum, 2019).

1.2 Etiopatogenia

La gravedad de la lesión renal depende de la duración, la gravedad del daño inicial y de los posibles episodios recurrentes (Basile, Anderson y Sutton, 2012; Farrar,

2018). La lesión se puede iniciar por diferentes causas que se clasifican en prerrenales, renales o intrínsecas y posrenales (Figura 2). Las más comunes son las alteraciones prerrenales, que representan del 55 al 70 % de los casos totales (Rahman, Shad y Smith, 2012) seguidas de las intrínsecas, que suponen el 25 % de los casos de DRA.

El DRA prerrenal se origina por una disminución de la perfusión renal, entre las causas se incluyen hipovolemia e hipotensión. El daño intrínseco o renal se asocia con un daño a nivel tubular, glomerular, intersticial o vascular (Basile, Anderson y Sutton, 2012). En el caso del daño posrenal es una obstrucción de las vías urinarias quien origina la afectación.

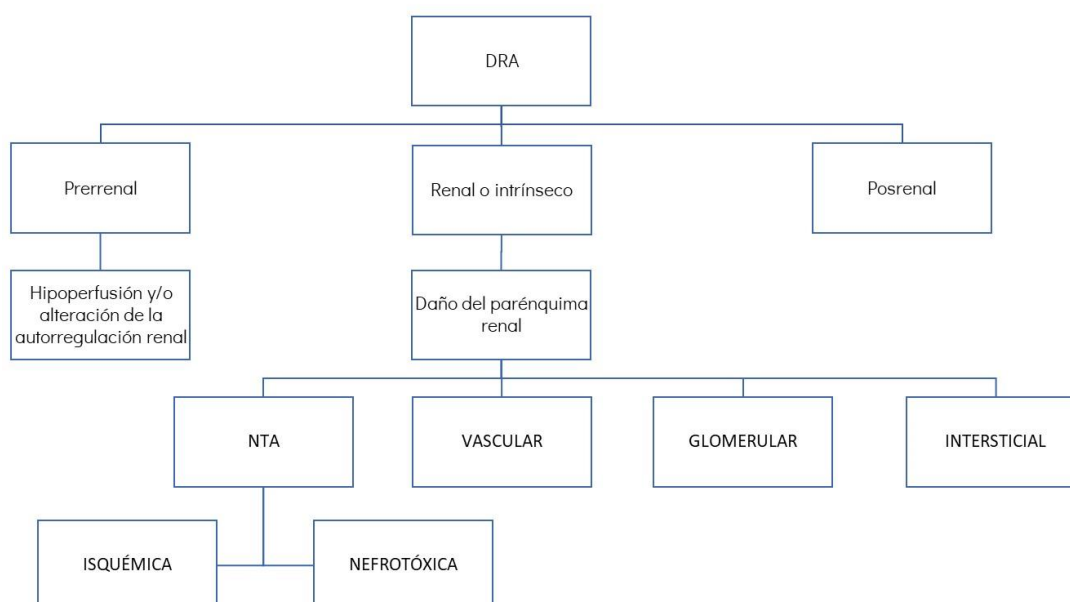


Figura 2. Tipos de DRA y sus causas. Imagen adaptada (Tenorio Cañamás et al., 2010). DRA: daño renal agudo; NTA: necrosis tubular aguda.

1.2.1 DRA prerrenal

Este tipo de daño engloba del 55 al 60 % de los casos totales de DRA (Basile, Anderson y Sutton, 2012). La disminución del flujo sanguíneo de la perfusión renal

puede estar causada por problemas cardíacos, vómitos, diarrea e insuficiencia hepática (Siew y Davenport, 2015). Una tasa de filtración glomerular (TFG) normal está directamente relacionada con una perfusión renal adecuada. Los riñones reciben hasta el 25 % del gasto cardíaco, lo que se traduce en 1200 mL/min de flujo sanguíneo, y si este flujo se ve comprometido puede conducir a un daño renal (Martin, 2010).

Dentro del DRA prerrenal destaca el inducido por la sepsis. Según un estudio multicéntrico (Hoste *et al.*, 2015), de todos los pacientes críticamente enfermos que sufren este síndrome (que son el 57 % del total), en el 50% de ellos la sepsis es el factor desencadenante más frecuente (Uchino *et al.*, 2005). Este fenómeno se caracteriza por una inflamación sistémica causada por una infección que puede provocar insuficiencia multiorgánica e hipoxia celular y tisular. Las consecuencias son una disminución del flujo sanguíneo renal, isquemia, disminución de la TFG y necrosis celular (Farrar, 2018).

1.2.2 DRA renal o intrínseco

Se produce por una lesión de las estructuras renales y representa alrededor del 25 % de los casos totales de DRA (Basile, Anderson y Sutton, 2012). i. La afectación glomerular puede producirse por una glomerulonefritis aguda que podría tener como origen una enfermedad sistémica como la sarcoidosis o el lupus eritematoso sistémico ii. Por otra parte, el daño intersticial puede instaurarse por las terapias con medicamentos, reacciones alérgicas, infección, etc. iii. Con relación a la lesión tubular, su origen puede ser isquémico o nefrotóxico. La isquemia se produce por una disminución del flujo sanguíneo que llega a los riñones, mientras que la nefrotoxicidad se manifiesta por la exposición a agentes nefrotóxicos entre los que se incluyen ciertos antibióticos, medios de contraste yodados y fármacos como el cisplatino (Bellomo, Kellum y Ronco, 2012). iv. El deterioro a nivel vascular puede estar causado por trastornos como la hipertensión maligna, la enfermedad ateroembólica, o el síndrome urémico hemolítico.

Según la *National Kidney Foundation*, la exposición a medios de contraste yodados origina en el 5-40 % de los pacientes un DRA intrínseco, siendo la tercera causa adquirida más común en el hospital (Contrada, 2016). Los compuestos yodados se utilizan para mejorar la visibilidad de los vasos sanguíneos en pruebas de

diagnóstico. En la mayoría de los casos en los que se produce una lesión renal a causa de la exposición a estas sustancias, el daño es reversible, la función renal regresa a su estado normal en 1 a 3 semanas tras la exposición. Sin embargo, en ocasiones los medios de contraste causan vasodilatación, seguida de una vasoconstricción prolongada, que produce una disminución del flujo sanguíneo renal además de una toxicidad tubular directa y una consecuente necrosis tubular aguda (NTA) (Honicker y Holt, 2016).

Características de la NTA

La NTA implica el deterioro del epitelio tubular. Los daños asociados a este trastorno debido a la isquemia y a los tóxicos, como se ha observado en la mayoría de los modelos animales (Mingeot-Leclercq y Tulkens, 1999; Lieberthal y Nigam, 2000; Sharfuddin y Molitoris, 2011) son más evidentes en el túbulo proximal.

Las principales alteraciones que se producen en las células tubulares durante una NTA son las siguientes: i. Pérdida rápida de la integridad del citoesqueleto y la polaridad celular que implica el desprendimiento del borde en cepillo del túbulo proximal (Solez, Morel-Maroger y Sraer, 1979; Sutton y Molitoris, 1998). ii. Redistribución de las moléculas de adhesión y otras proteínas de membrana como la bomba Na^+/K^+ -ATPasa y β -integrinas causada por la pérdida de la polaridad; también se produce una reubicación de la actina de la membrana celular apical a la lateral (Molitoris, Dahl y Geerdes, 1992; Gailit *et al.*, 1993; Brown, Lee y Bonventre, 1997; Zuk *et al.*, 1998). iii. Alteración de las interacciones célula-célula en uniones adherentes y estrechas. iiiii. Desprendimiento de las células tubulares de la membrana basal, dejando a ésta como única barrera entre el filtrado y el intersticio peritubular. El aumento de la permeabilidad resulta en una fuga de filtrado glomerular desde la luz tubular hacia el intersticio, donde las células y los desechos que se desprenden de la membrana basal se combinan con proteínas presentes en la luz tubular como la THP (de sus siglas en inglés *Tamm-Horsfall Protein*) y fibronectina (Zuk, Bonventre y Matlin, 2001) para formar cilindros que pueden obstruir el túbulo, aumentando la presión intratubular.

La NTA afecta principalmente a las células del túbulo proximal debido a su susceptibilidad al daño. En esta región de la nefrona se realizan funciones de

reabsorción, tanto isoosmótica como mediada por receptores, y de secreción, por lo que en ella tienden a acumularse los tóxicos de forma significativa. No obstante, también pueden verse afectadas las células epiteliales de la parte gruesa ascendente del asa de Henle y las del túbulo distal. En cambio, las células que revisten el túbulo colector no suelen verse afectadas (Sharfuddin y Molitoris, 2011). Además del daño tubular, la NTA en función de su magnitud puede causar lesiones a nivel vascular, glomerular y en el intersticio. Así, durante este fenómeno también es frecuente observar edema intersticial, acumulación de leucocitos en el intersticio o congestión de los capilares tubulares (principalmente de la médula externa) que a su vez potencia el daño tubular (Basile, Anderson y Sutton, 2012).

Fases de la NTA

Dentro de la NTA se pueden distinguir las siguientes fases (Bonventre y Zuk, 2004; Tenorio Cañamás *et al.*, 2010; Hanif, Bali y Ramphul, 2021):

- I. **Fase de exposición:** tiene lugar una agresión hemodinámica que ocurre cuando disminuye el flujo sanguíneo renal o la exposición a un tóxico. Aún se mantiene la integridad celular.

- II. **Fase de iniciación:** este periodo se establece entre la exposición al agente etiológico y el comienzo del daño renal que aún no se ha instaurado totalmente. Por ello la NTA aún puede evitarse, especialmente si se restaura el flujo sanguíneo renal cuando la causa es isquémica o cuando se retira el tóxico. Se produce daño celular (pérdida del borde en cepillo y desprendimiento de las células al lumen tubular), disminución brusca de la TFG e incremento de los niveles plasmáticos de creatinina y urea.

- III. **Fase de extensión:** comienza a producirse una respuesta inflamatoria, con liberación de citoquinas y quimiocinas, y una hipoxia continuada como consecuencia de la reducción del flujo renal. Ambos eventos son más pronunciados en la unión cortico-medular y en la médula externa, donde puede haber también muerte celular. Durante esta fase la TFG continúa disminuyendo. Las células tubulares de la corteza externa empiezan a regenerarse (Bonventre y Zuk, 2004).

- IV. **Fase de mantenimiento:** las lesiones del túbulo renal están establecidas. La TFG se estabiliza en un nivel muy por debajo de lo normal, dependiendo de la intensidad del daño inicial y la producción de orina es baja o ausente. A pesar de que la oliguria (o anuria) es una de las señales clínicas de la NTA, en algunos pacientes no se produce y se denomina NTA no oligúrica, como en el caso del DRA producido por nefrotoxinas, que es típicamente no oligúrica. Se inicia la reparación celular, hay apoptosis, migración y proliferación celular para recuperar la integridad tisular y funcional. La función celular mejora lentamente a medida que las células se reparan y reorganizan.
- V. **Fase de recuperación:** se trata de la continuación de la fase de mantenimiento. Se caracteriza por poliuria y por una normalización gradual de la TFG, sin embargo, cuando la NTA es demasiado grave y se desencadena una disfunción multiorgánica la regeneración del tejido renal puede verse gravemente afectada impidiendo la recuperación de la función renal. En ausencia de este escenario, 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 las uniones estrechas en las células dañadas, la eliminación de células tubulares por apoptosis y de los cilindros intratubulares mediante el restablecimiento del flujo de líquido tubular, además de la regeneración de las células epiteliales renales (Abuelo, 2007).

1.2.3 DRA posrenal

Esta forma de DRA se produce por la obstrucción aguda del flujo urinario y es la responsable de al menos el 5 % de los casos de los casos totales (Basile, Anderson y Sutton, 2012). La obstrucción se caracteriza por un aumento en la presión intratubular, una disminución de la producción de orina (oliguria o anuria), dolor abdominal, dificultad para orinar, hematuria e hipertensión. Entre sus principales causas se encuentran los cálculos o coágulos renales y algunos tipos de tumores en algunas estructuras del sistema renal que obstruyen las vías urinarias (Farrar, 2018).

2. DRA INDUCIDO POR EL CISPLATINO

El cisplatino (*cis*-diaminedicloroplatino o CDDP) es un derivado inorgánico del platino que fue descrito por primera vez por Michele Peyrone en 1845. Sin embargo, no fue hasta más de 100 años después cuando se aprobó para uso clínico por sus propiedades antitumorales (Wang, 1983). Actualmente se utiliza como agente quimioterapéutico individual o en terapia combinada para el tratamiento de una amplia variedad de tumores sólidos, incluidos los tumores de ovario, cuello uterino, mama, esófago, vejiga, cabeza y cuello y de células germinales testiculares (McSweeney *et al.*, 2021).

Desafortunadamente, su uso clínico está limitado por sus graves efectos secundarios como la supresión de la médula ósea, la neuropatía periférica, la ototoxicidad, la anafilaxia y la nefrotoxicidad que obligan a reducir la dosis o a retirar el fármaco. La continua exposición de los riñones a este fármaco, ya que son su principal vía de excreción, explica que una dosis única de cisplatino (50-100 mg/m²) cause que aproximadamente un tercio de los pacientes sufran nefrotoxicidad (Lebwohl y Canetta, 1998; Shiraishi *et al.*, 2000).

2.1 Nefrotoxicidad

La nefrotoxicidad causada por el cisplatino se debe a una función tubular alterada, una disminución de la TFG y un daño renal (Sánchez-González *et al.*, 2011). La captación de este fármaco por las células epiteliales del túbulo proximal es el punto de partida de sus efectos tóxicos a nivel tubular. Su acumulación en estas células produce NTA, que es la forma más prevalente de daño causada por cisplatino (Miller *et al.*, 2010). A consecuencia de la lesión epitelial, se produce una rápida disminución de la actividad de los mecanismos excretores del riñón (Bellomo, Kellum y Ronco, 2012), lo que aumenta la acumulación de productos de desecho producidos por el metabolismo (Lameire, Biesen y Vanholder, 2008; Bellomo, Kellum y Ronco, 2012).

La incidencia del DRA nefrotóxico es difícil de estimar debido a la variabilidad de las poblaciones de pacientes y los criterios de clasificación. Sin embargo, contribuye alrededor del 8-60 % de los casos de DRA que se adquirieron en el hospital

(Schetz *et al.*, 2005). En un estudio epidemiológico multicéntrico realizado en pacientes críticamente enfermos se observó que la nefrotoxicidad por fármacos es responsable del 19 % de los casos de DRA (Uchino *et al.*, 2005).

2.2 Fisiopatología del DRA inducido por el cisplatino

Aunque se trata de un proceso complejo, la fisiopatología del DRA inducido por el cisplatino se puede agrupar principalmente en cuatro tipos de lesiones. i. La lesión tubular, producida por una afectación directa de las células epiteliales de algunos segmentos de la nefrona. ii. La lesión vascular, provocada por una disminución del flujo renal sanguíneo. iii. La lesión glomerular, menos frecuente que en otras nefropatías. iiiii. Y la lesión intersticial, secundaria al tratamiento con cisplatino a largo plazo y la fibrosis, ambas manifestaciones renales crónicas características de este tipo de daño renal que puede evolucionar a enfermedad renal crónica (ERC) (Sánchez-González *et al.*, 2011).

Con relación a los procesos fisiopatológicos, los mecanismos moleculares clave implicados en los efectos adversos del cisplatino (Figura 3) incluyen captación y acumulación celular, inflamación, estrés oxidativo, estrés del retículo endoplasmático (RE), disfunción mitocondrial, necrosis y apoptosis. Aunque su mecanismo principal está relacionado con la síntesis y reparación de las lesiones del ADN (ácido desoxirribonucleico), provocando la detención del ciclo celular (Ghosh, 2019), también induce la disfunción de algunos orgánulos citoplasmáticos, en concreto, del RE y de las mitocondrias (Florea y Büsselberg, 2011). Como la mayoría de los metales, también promueve la generación de especies reactivas de oxígeno, condiciona a la proteína supresora de tumores p53, induce la apoptosis a través de la vía intrínseca mediante la interacción de receptores de muerte y caspasas e inflige daño celular a causa de la inflamación (Manohar y Leung, 2017).

2.2.1 Lesión tubular proximal causada por el cisplatino

Debido a su bajo peso molecular y a no tener carga, el glomérulo filtra libremente el cisplatino (Safirstein, Miller y Guttenplan, 1984), secretándose a continuación activamente a la orina. La entrada de este compuesto a los túbulos proximales está mediada por difusión pasiva y por transportadores de entrada

(Kröning, Lichtenstein y Nagami, 2000) como: los transportadores de entrada de cationes orgánicos (OCT de sus siglas en inglés *Organic Cation Transporter*), el transportador de cobre 1 (Ctr1 de sus siglas en inglés *Cooper Transporter 1*) (Ciarimboli, 2012) y los canales de aniones regulados por volumen (VRAC de sus siglas en inglés *Volume-Regulated Anion Channels*) (Planells-Cases *et al.*, 2015). Mientras que en su eliminación a la orina están implicados transportadores de salida como ATPasas transportadoras de cobre de tipo P (Samimi *et al.*, 2004), proteínas asociadas a la resistencia a múltiples fármacos (MRP de sus siglas en inglés *Multidrug Resistance Protein*) y proteínas de extrusión multiantimicrobiana (MATE de sus siglas en inglés *Multidrug And Toxin Extrusion*) (Ciarimboli, 2012; Harrach y Ciarimboli, 2015; Estrela *et al.*, 2017). En condiciones fisiológicas, todos estos transportadores se encuentran distribuidos en los túbulos proximales y distales de la nefrona (Pabla *et al.*, 2009) pero cuando las células tubulares se exponen a este compuesto se produce su sobreexpresión (Estrela *et al.*, 2017).

Una vez que el cisplatino entra en las células, se transforma en una nefrotoxina (Miller *et al.*, 2010) que ejerce efectos que culminan en apoptosis o necrosis mediante diferentes mecanismos.

Daño en el ADN

El daño que produce el cisplatino en el ADN de las células tumorales es similar al que causa en las células renales. Una vez que entra en la célula, sus complejas interacciones con el entorno celular lo convierten en un compuesto con alta afinidad por el ADN (Wang y Lippard, 2005), formando enlaces cruzados con las bases de purina. Esta acción bloquea la síntesis y replicación del material genético y ocasiona la parada del ciclo celular, desencadenando un proceso de apoptosis. Además de afectar al ADN nuclear, este compuesto ejerce su efecto citotóxico en el ADN mitocondrial (Jamieson y Lippard, 1999).

Disfunción mitocondrial

Una de las dianas citosólicas más importantes de la citotoxicidad del cisplatino son las mitocondrias. Este compuesto cargado positivamente se acumula preferentemente dentro de las mitocondrias cargadas negativamente que, además,

tienen mecanismos menos eficientes de reparación del ADN y por tanto, son más susceptibles al daño (Olivero *et al.*, 1997).

La disfunción mitocondrial produce numerosos efectos generalizados. Tiene lugar la caída de la síntesis de ATP (Adenosín-5-trifosfato de sus siglas en inglés *Adenosin-5-TriPhosphate*) que obliga a la célula estresada a funcionar en modo de inanición, y una activación de la apoptosis mediada por caspasa. Esta combinación de eventos ocasiona una peroxidación lipídica de las membranas celulares, una lesión hipóxica sobre la vasculatura local y la interrupción del proceso de síntesis de ATP que conduce a la producción de radicales libres o especies reactivas de oxígeno (ROS de sus siglas en inglés *Reactive Oxygen Species*) (Isnard-Bagnis *et al.*, 2005). Se ha demostrado la relación entre la sensibilidad celular, la muerte celular inducida por cisplatino y la densidad mitocondrial de la célula (Qian *et al.*, 2005). Este hallazgo resulta interesante ya que las células del túbulo proximal tienen mayor densidad de mitocondrias en comparación con el resto de los túbulos, y es precisamente en esta zona de la nefrona donde se observa comúnmente un mayor daño inducido por este compuesto (Manohar y Leung, 2017).

Estrés oxidativo

En condiciones fisiológicas, existe un equilibrio entre la producción de ROS y el sistema de defensa antioxidante de las células (Wang *et al.*, 2016). Pero cuando el cisplatino entra en la célula, se convierte en una forma altamente reactiva que genera ROS, agota los sistemas antioxidantes y estimula la acumulación de la peroxidación lipídica renal.

La afectación de la cadena respiratoria mitocondrial y el sistema del citocromo P450 conduce a la producción de ROS (Baliga *et al.*, 1998; Sancho-Martínez *et al.*, 2012). La sobreproducción de este tipo de moléculas reactivas va acompañada de un deterioro del sistema de defensa antioxidante como la superóxido dismutasa, la catalasa, el glutatión o la glutatión peroxidasa (Hannemann, Duwe y Baumann, 1991; Yasuyuki, Takahiro y Yoshio, 1992; Antunes, Darin y Bianchi, 2000; Kadikoylu *et al.*, 2004). Existen evidencias de que el estrés nitrosativo también está involucrado en este mecanismo. Los efectos celulares de las ROS son amplificadas por la producción masiva de óxido nítrico y en consecuencia,

se produce disfunción celular y la generación de las señales intracelulares que activan las vías apoptóticas causando la lesión y muerte de las células renales (Sánchez-González *et al.*, 2011).

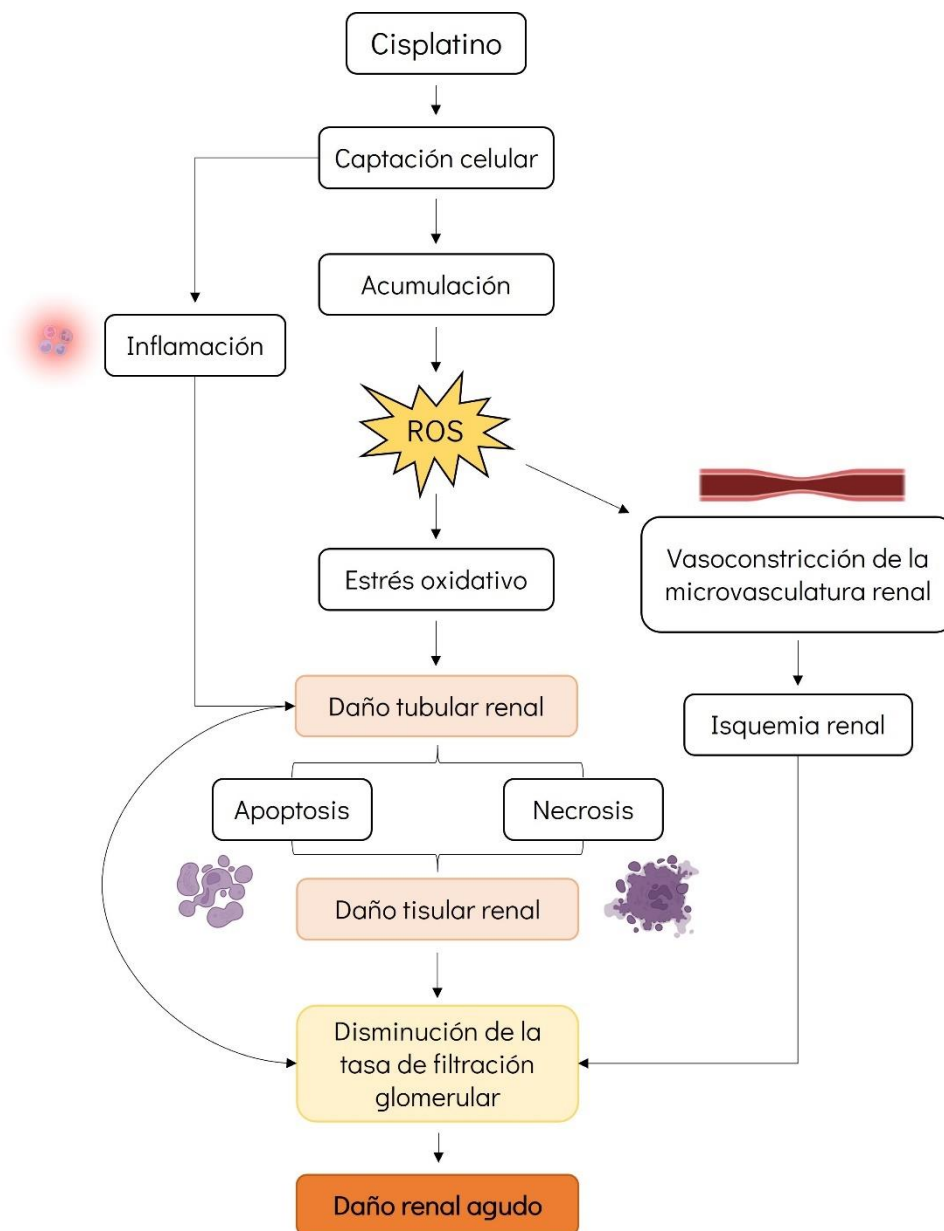


Figura 3. Mecanismos patológicos implicados en el DRA inducido por el cisplatino. DRA: daño renal agudo; ROS: especies reactivas de oxígeno de sus siglas en inglés Reactive Oxygen Species. Imagen adaptada de (McSweeney *et al.*, 2021).

Muerte celular

Las células renales pueden sufrir dos tipos de muerte celular: necrosis o apoptosis. Inicialmente se creyó que la necrosis era el único mecanismo responsable del daño renal causado por el cisplatino. Sin embargo, se demostró que la apoptosis también desempeñaba un papel importante en este proceso (Lieberthal, Triaca y Levine, 1996). Esta nefropatía se ha relacionado con dos vías principales de apoptosis. La vía intrínseca, que involucra a algunos orgánulos celulares como las mitocondrias, el RE o los lisosomas (Mandic *et al.*, 2003; Cullen *et al.*, 2007; Ivanova *et al.*, 2008). Y la vía extrínseca, que implica la activación de receptores de muerte en respuesta a la unión del ligando. Ambas vías conducen a la activación de caspasas (Pabla y Dong, 2008).

Inflamación

La inflamación es uno de los mecanismos fisiopatológicos con mayor relevancia en el daño renal producido por el cisplatino (Furuichi, Kaneko y Wada, 2009; Yuping Zhang *et al.*, 2020).

El cisplatino activa la fosforilación y en consecuencia, la translocación del factor de transcripción nuclear-kappa B al núcleo (Sung *et al.*, 2008). Este hecho promueve la transcripción de genes específicos que codifican mediadores inflamatorios, promotores de las respuestas inmune, proliferativa, antiapoptótica e inflamatoria (Aggarwal *et al.*, 2004). Este acontecimiento conduce a un aumento de la expresión del factor de necrosis tumoral α (TNF- α de sus siglas en inglés *Tumoral Necrosis Factor α*), entre otros, en las células tubulares renales. El TNF- α es una importante citoquina que está involucrada en la inflamación sistémica y en la respuesta de fase aguda inducida por el cisplatino (Ramesh y Reeves, 2002). Además de provocar la muerte de las células tubulares y daño tisular, se sabe que coordina la activación de una gran red de citoquinas proinflamatorias como interleuquina-1 β , 4, 6 (IL-1 β , IL-4, IL-6), del factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β 1 de sus siglas en inglés *Transforming Growth Factor- β 1*) y de la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1 de sus siglas en inglés *Monocyte Chemoattractant Protein-1*). Además, induce la expresión de moléculas de adhesión que incluyen la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1 de sus siglas en inglés *InterCellular Adhesion Molecule-1*), la

molécula de adhesión de células vasculares-1 (VCAM-1 de sus siglas en inglés *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) y la E-selectina, promoviendo así la afluencia de células inflamatorias en el tejido dañado (Ramesh y Reeves, 2002; Zhang *et al.*, 2007; Mukhopadhyay *et al.*, 2010).

La respuesta del sistema inmunológico durante la nefrotoxicidad del cisplatino está mediada por **receptores tipo Toll** (TLR de sus siglas en inglés *Toll Like Receptors*). Uno de los ligandos activadores de estos receptores son los patrones moleculares asociados al daño (DAMP de sus siglas en inglés *Damage-Associated Molecular Pattern Molecules*) (Patel, 2018). Se trata de alarminas inmunogénicas nucleares o citoplasmáticas endógenas que son liberadas por células dañadas, estresadas y necróticas para restaurar el equilibrio homeostático (Midwood y Piccinini, 2010; Patel, 2018). La activación de los TLR promueve la producción de moduladores inflamatorios, incluidas citoquinas, quimiocinas, interferones y moléculas de adhesión que promueven la respuesta inflamatoria (Ramesh y Reeves, 2002; Kono y Rock, 2008; Gluba *et al.*, 2010).

Los **Receptores tipo Toll** son glicoproteínas transmembrana de tipo I que actúan como sensores de reconocimiento, identificando patrones moleculares presentes en la superficie de patógenos o que son liberados por tejido necrótico (Aderem y Ulevitch, 2000; Akira, Uematsu y Takeuchi, 2006). Se expresan en tejidos inmunes y no inmunes, incluido el tejido renal (Zarembek y Godowski, 2002).

2.2.2 Lesión vascular

La lesión vascular que se produce en la nefropatía inducida por el cisplatino es a causa de un daño a nivel vascular junto con una vasoconstricción que derivan de una disfunción endotelial y una regulación vascular alterada. El cisplatino puede tener efectos tóxicos directos sobre el endotelio vascular y provocar un daño microvascular que cause la disminución del flujo renal sanguíneo y en consecuencia una reducción de la TFG y daño hipóxico tubular (Winston y Safirstein, 1985).

La disfunción endotelial desempeña un importante papel en las fases de extensión y mantenimiento del DRA (Molitoris y Sutton, 2004). La lesión vascular induce una secuencia de eventos en el endotelio que conlleva a una vasodilatación

reducida, un estado proinflamatorio y unas propiedades protrombóticas que implican alteraciones en la microvasculatura renal con vasoconstricción asociada que contribuye a la disminución del flujo sanguíneo renal. También fruto de esta lesión, se produce una sobreexpresión de moléculas de adhesión y la posterior unión de leucocitos al endotelio que conducen a una congestión vascular e infiltración de leucocitos en el espacio intersticial (Luke, Vadiiei y Lopez-Berestein, 1992). A su vez, la congestión vascular promueve la lesión y la hinchazón de las células endoteliales. Esta obstrucción impide el paso del flujo sanguíneo, lo que contribuye a la producción de vasoconstrictores locales y reducción del suministro de metabolitos y oxígeno a las células tubulares. Además, el cisplatino también altera la respuesta del endotelio vascular renal a las sustancias vasoactivas (Dos Santos *et al.*, 2012).

2.2.3 Lesión glomerular

Este tipo de lesión es menos común que la vascular y la tubulointersticial ya que ocurre tras una alta exposición al fármaco. El cisplatino puede dañar las células glomerulares directamente y alterar la histología glomerular y la permeabilidad causando proteinuria. Las alteraciones estructurales se pueden encontrar en todos los componentes glomerulares: capilares glomerulares, incluyendo sus células endoteliales; membrana basal, podocitos epiteliales, células mesangiales y células parietales de la cápsula de Bowman (Kohn *et al.*, 2002). La lesión glomerular inducida por el cisplatino se caracteriza por una marcada caída de la TFG que se asocia con la disminución del coeficiente de ultrafiltración y el aumento de la resistencia vascular renal (Dos Santos *et al.*, 1991) sugiriendo una vasoconstricción preglomerular (Winston y Safirstein, 1985; Safirstein *et al.*, 1986).

2.2.4 Lesión intersticial

El tratamiento a largo plazo con cisplatino puede provocar una lesión tubulointersticial y en algunos casos glomeruloesclerosis, que puede conducir al desarrollo de la ERC (Martínez *et al.*, 2009). Los cambios que se observan tras un DRA grave incluyen atrofia tubular por destrucción del epitelio tubular, glomérulos y vasos, y edema túbulo intersticial por la infiltración de células inflamatorias. El mecanismo fisiopatológico que contribuye al desarrollo de la fibrosis intersticial renal no está

directamente relacionado con los efectos primarios del cisplatino (Yamate *et al.*, 2002).

3. DRA INDUCIDO POR LA ISQUEMIA

La isquemia-reperfusión (I/R) es una causa común de DRA (Lio *et al.*, 1996; Mehta *et al.*, 2004; Thadhani, Pascual y Bonventre, 2009). Se produce por un desajuste entre el suministro y la demanda de nutrientes y oxígeno tisular debido a causas prerrenales o vasoconstricción y a la acumulación de sustancias que obstruyen la microvasculatura intrarrenal (Le Dorze *et al.*, 2009). Como resultado de este desequilibrio, las células epiteliales tubulares sufren una lesión y, si es grave, se puede producir NTA. Existen muchos estados fisiopatológicos y medicamentos que pueden contribuir a la isquemia generalizada o localizada, como por ejemplo la sepsis, la hipertensión, el síndrome hepatorenal, la depleción del volumen intravascular causado por hemorragias, cirrosis, peritonitis; fármacos como la ciclosporina, AINEs (antiinflamatorios no esteroideos) entre muchos otros (Bonventre y Yang, 2011).

La isquemia produce un daño inflamatorio grave, una disminución del transporte activo dependiente de ATP con pérdida de los gradientes iónicos que determinan la polaridad del epitelio tubular, la activación descontrolada de sistemas enzimáticos nocivos como las fosfolipasas y las proteasas, estrés oxidativo por la sobreproducción de ROS y alteraciones en el citoesqueleto. Todos estos fenómenos son responsables de una cascada de eventos bioquímicos que conducen a la disfunción e incluso muerte celular (Belzer, 1988). La fisiopatología celular del daño renal asociado a la isquemia es un proceso dinámico donde hay componentes principales que implican alteraciones hemodinámicas, inflamación y lesión de las células endoteliales y epiteliales.

3.1 Alteraciones hemodinámicas

La vasoconstricción preglomerular persistente puede resultar en una TFG deteriorada. Una de las causas de esta vasoconstricción podría ser la retroalimentación túbulo-glomerular como resultado de la detección, por parte de la

mácula densa, de la liberación anormal de solutos a la nefrona distal. El aumento de solutos se debe a la pérdida de la polaridad de las células del túbulo proximal que conduce a una reabsorción deficiente de sodio por parte de las zonas lesionadas (Blantz et al., 2007). Esta retroalimentación contribuye a la reducción del filtrado glomerular y, por tanto, de la TFG, pero no afecta lo suficiente como para explicar el daño en las células tubulares.

3.2 Lesión endotelial y vascular

Las células endoteliales y del músculo liso de la microcirculación renal juegan un papel crítico en la fisiopatología del DRA. En muchas ocasiones, la disminución del flujo sanguíneo renal total no explica por completo la reducción de la TFG durante un episodio de DRA, cobrando mayor relevancia las alteraciones de zonas concretas del riñón (Bonventre y Weinberg, 2003; Le Dorze *et al.*, 2009; Schrier y Wang, 2009). Según se ha observado en modelos animales de DRA isquémico, el flujo sanguíneo que llega a la médula externa se reduce de manera desproporcionada con respecto a la reducción de la perfusión renal total (Karlberg *et al.*, 1983; Mason, Torhorst y Welsch, 1984) y probablemente, ocurra lo mismo en humanos después de una lesión renal isquémica (Bonventre y Yang, 2011).

Las células endoteliales son determinantes en el mantenimiento del tono vascular, en la función de los leucocitos y en la capacidad de respuesta del músculo liso (Sprague y Khalil, 2009). Cuando el endotelio se lesiona por un daño isquémico, las arteriolas del riñón se contraen en respuesta al aumento de los niveles tisulares de diversos factores (Brooks, 1996; Conger, 1997; Kurata *et al.*, 2005; da Silveira *et al.*, 2010). Y además, se produce una disminución de la vasodilatación en respuesta a la acetilcolina, bradicinina y óxido nítrico (Conger, 1983; Kwon, Hong y Ramesh, 2009). La vasoconstricción se amplifica debido, en parte, a la disminución en la síntesis de óxido nítrico y otras sustancias vasodilatadoras (Kwon, Hong y Ramesh, 2009) por parte de la célula endotelial dañada. Estos efectos sobre las arteriolas aumentan gracias a citoquinas vasoactivas, como TNF- α , varias interleuquinas y la endotelina, generadas como resultado del aumento de leucocitos adheridos al endotelio y la consiguiente activación leucocitaria que son características de la lesión isquémica (Bonventre y Zuk, 2004). El conjunto de estos fenómenos de vasoconstricción de los pequeños vasos y la activación del sistema de coagulación

por parte del sistema inflamatorio compromete la microcirculación renal produciéndose una isquemia de la zona, especialmente en la médula externa.

A estos fenómenos se le añade que el número de vasos sanguíneos de la médula externa disminuye después de la isquemia, potenciado por la regulación a la baja de factores angiogénicos como el VEGF (de sus siglas en inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*) y la regulación a la alza de los inhibidores del mismo proceso como las metaloproteasas ADAMTS-1 (de sus siglas en inglés *A Disintegrin And Metalloproteinase*) (Basile, 2007; Basile *et al.*, 2008) asociados con una hipoxia crónica (Basile, 2007). Este hecho conduce a un aumento de la lesión tubular y a la fibrosis tubulointersticial. Los vasos restantes pueden tener el flujo sanguíneo comprometido por la inflamación de las células endoteliales.

Inflamación

Tanto la respuesta inmunológica innata como la adaptativa contribuyen de manera importante a la patología de la lesión isquémica. El componente innato es responsable de la respuesta temprana a la lesión de una manera no específica. Mientras que el componente adaptativo, activado por antígenos específicos, se inicia horas después de la lesión y dura varios días.

El epitelio tubular participa activamente en la respuesta inflamatoria renal. Además de generar citoquinas proinflamatorias (Bonventre y Zuk, 2004), también expresa receptores tipo Toll, mencionados en el DRA inducido por el cisplatino, receptores del complemento y moléculas coestimuladoras que regulan la actividad de los linfocitos T. Los TLR se sobreexpresan en las células epiteliales de los túbulos renales durante el DRA (Jang *et al.*, 2009) y su activación inicia una respuesta proinflamatoria marcada por la liberación de citoquinas que atraen a las células inflamatorias.

Los neutrófilos, los monocitos y macrófagos, las células dendríticas y las células T intervienen de manera importante en la lesión y reparación renal isquémica (Day *et al.*, 2005; John y Nelson, 2007; Linfert, Chowdhry y Rabb, 2009; Lee *et al.*, 2011). Los neutrófilos se adhieren al endotelio activado (Solez, Morel-Maroger y Sraer, 1979; Kelly *et al.*, 1996; Awad *et al.*, 2009), concretamente a la red capilar peritubular

de la médula externa, minutos después de la reperfusión, y producen proteasas, mieloperoxidasa, ROS y citoquinas que aumentan la permeabilidad vascular y reducen la integridad de las células epiteliales y endoteliales tubulares (Jang y Rabb, 2009), lo que agrava la lesión renal (Awad *et al.*, 2009). El sistema del complemento también contribuye a la inflamación después del daño isquémico en el riñón (Thurman *et al.*, 2005) regulando al alza la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales (Homeister y Lucchesi, 2003).

3.3 Lesión tubular

En periodos cortos de isquemia las células del epitelio tubular pierden su polaridad (Lieberthal y Nigam, 1998), pero tras un periodo más sostenido sufren NTA. La zona del riñón más afectada por este fenómeno es la médula externa, donde se encuentra el segmento S3 del túbulo proximal, ya que es una zona que está muy oxigenada en condiciones fisiológicas.

La lesión poco severa del epitelio tubular produce cambios en la reabsorción de sodio y en la permeabilidad celular. La lesión subletal inducida por el agotamiento de ATP está marcada por alteraciones en el citoesqueleto que conllevan a la interrupción de las uniones célula-célula y a cambios en la expresión y distribución de moléculas de adhesión celular (Brown, Lee y Bonventre, 1997; Molitoris y Marrs, 1999). La pérdida de las uniones entre células son las responsables tanto de la alteración de la polaridad como del aumento de la permeabilidad que resulta en una posterior fuga del filtrado glomerular. El cambio en la polaridad celular causa una orientación incorrecta de las proteínas de membrana y con ello, una alteración en el transporte de moléculas (Alejandro *et al.*, 1995). Además, la interferencia entre la adhesión célula-célula y matriz-célula posibilita que las células epiteliales viables se arrojen al lumen tubular (Molitoris y Marrs, 1999) y se produzca la agregación celular que contribuye a la obstrucción y por extensión a la disminución de la TFG.

El agotamiento prolongado de ATP provoca muerte celular, especialmente cuando hay otras influencias tóxicas como ROS, presentes en la zona de la lesión (Lieberthal, Triaca y Levine, 1996). La falta de ATP afecta a muchos procesos celulares, incluida la síntesis de proteínas, la lipogénesis y el transporte de membranas (Bonventre *et al.*, 1993). El aumento de la concentración de calcio libre debido a la

afectación mitocondrial promueve la activación de proteasas y fosfolipasas que contribuyen a la alteración del citoesqueleto y perjudica al metabolismo energético mitocondrial (Thadhani, Pascual y Bonventre, 2009).

4. DIAGNÓSTICO DEL DRA

A lo largo de los años se han aplicado diferentes definiciones de DRA (Ricci *et al.*, 2006). La falta de consenso ha sido un impedimento para establecer un sistema de diagnóstico y de clasificación estandarizado, pero en 2004 se instauraron varios criterios que han ido evolucionando hasta la actualidad y que han ayudado a lograr un manejo más eficiente de la enfermedad. Según estas guías, el diagnóstico en pacientes se basa en la concentración de creatinina plasmática (CrP) y la diuresis.

4.1 Criterios diagnósticos del DRA

La primera definición de DRA la estableció el Grupo de Iniciativa para la Calidad de la Diálisis Aguda (ADQI de sus siglas en inglés *Acute Dialysis Quality Initiative*) en 2004. En consenso, ADQI fundó los criterios de Riesgo, Lesión, Fallo, Pérdida y Enfermedad renal en etapa terminal (**RIFLE** de sus siglas en inglés *Risk, Injury, Failure, Loss and End-stage renal disease*), que se identificaron como categorías dentro de un DRA. El diagnóstico y la gravedad de la estadificación se basaron en el nivel de CrP y en una disminución en la producción de orina por kilogramo de peso corporal durante un período de tiempo específico (7 días) (Bellomo *et al.*, 2004). Esta clasificación fue concebida para describir la gravedad y pronosticar el DRA, no tenía como objetivo predecir la mortalidad o los eventos adversos (Ricci y Romagnoli, 2018).

En 2007, los criterios de clasificación RIFLE evolucionaron a los conocidos como criterios de la Red de lesiones renales agudas (**AKIN** de sus siglas en inglés *Acute Kidney Injury Network*). En esta guía se eliminó la etapa de “Pérdida” y “Enfermedad renal en etapa terminal” y se dió paso a una clasificación que constaba de 3 etapas de gravedad creciente (1, 2 y 3). El marco temporal también se modificó, en este caso el diagnóstico tenía que realizarse en 48h para cumplir con los criterios establecidos (Mehta *et al.*, 2007).

Sistema de clasificación	Criterio de CrP/CiCr	Diuresis
RIFLE		
Riesgo	Incremento de 1,5 veces los niveles de CrP o disminución de > 25 % del CiCr respecto a niveles basales	< 0,5 mL/kg/hora durante 6 horas
Lesión	Incremento de 2 veces los niveles de CrP o disminución de > 50 % del CiCr respecto a niveles basales	< 0,5 mL/kg/hora durante 12 horas
Fallo	Incremento de 3 veces los niveles de CrP, disminución de > 75 % del CiCr respecto a niveles basales o CrP \geq 4 mg/dL	\leq 0,3 mL/kg/hora durante 24 horas o anuria durante 12 horas
AKIN		
Estadio 1	Incremento de CrP \geq 0,3 mg/dL o 1,5-2 veces con respecto al valor basal	< 0,5 mL/kg/hora durante 6 hora
Estadio 2	Incremento > de 2-3 veces la CrP respecto a los niveles basales	< 0,5 mL/kg/hora durante 12 horas
Estadio 3	Incremento de CrP > de 3 veces con respecto a niveles basales o CrP \geq 4 mg/dL con un aumento agudo de al menos 0,5 mg/dL o necesidad de TRR	< 0,3 mL/kg/hora durante 24 horas o anuria durante \geq 12 horas
KDIGO		
Estadio 1	Incremento de CrP \geq 0,3 mg/dL en 48 horas o incremento \geq 1,5 a 1,9 veces respecto al valor basal en 7 días	< 1 mL/kg/hora durante 24 horas
Estadio 2	Incremento de la CrP > 2,0- 2,9 veces con respecto al nivel basal	< 0.5 mL/kg/hora durante \geq 24 horas
Estadio 3	Incremento de la CrP > 3,0 veces con respecto al valor basal, CrP \geq 2,5 mg/dL o inicio de la TRR	<0.3 mL/kg/hora durante 24 horas

Tabla 1. Criterios RIFLE, AKIN y KDIGO para el diagnóstico del DRA. CiCr: Aclaramiento de creatinina; CrP: creatinina plasmática; TFG: tasa de filtración glomerular; TRR: terapia de reemplazo renal. Adaptado de (Ricci y Romagnoli, 2018).

La última actualización de los criterios fue en 2012, donde el objetivo principal era fusionar las dos guías anteriores en un intento de mejorar el manejo de la enfermedad renal en un consenso de los resultados globales (**KDIGO** de sus siglas en

inglés *Kidney Disease: Improving Global Outcomes*) (Khwaja, 2012). Esta guía define el DRA como cualquiera de las situaciones recogidas en la [Tabla 1](#). Aunque la definición actual ha resultado en una evidente mejora en la identificación de manera fácil, rápida y rentable de los pacientes, su diagnóstico se sigue basando en el aumento o descenso de la CrP y en la diuresis, dos marcadores que tienen limitaciones importantes y no son específicamente renales.

4.2 Limitaciones en el diagnóstico del DRA

La creatinina plasmática

La creatinina es un producto del catabolismo del músculo (Delanaye, Cavalier y Pottel, 2017) que se excreta inalterado en la orina. Se trata del biomarcador de referencia internacional en el diagnóstico y clasificación del DRA, medido con mayor frecuencia en la práctica clínica debido a su buena relación coste-beneficio. Pero debido a sus limitaciones, sus valores deben analizarse en relación con otros parámetros como la TFG (Ricci y Romagnoli, 2018):

- I. Los niveles de CrP permanecen dentro de los valores normales hasta que se pierde aproximadamente el 60 % de la función renal o cuando la TFG es menor a 60 mL/min/1,73 m² (Ronco y Rosner, 2012). Por lo tanto, no es un marcador temprano ni tampoco preciso de la función renal cuando la TFG es > 60 mL/min/ 1,73 m².
- II. La CrP no solo se filtra, en torno al 15 % es secretada a la orina activamente por los túbulos. Este hecho conduce a una sobreestimación del aclaramiento de creatinina (CrCl) y, por tanto, de la TFG (Traynor *et al.*, 2006).
- III. Algunos fármacos inhiben la secreción tubular de creatinina, produciéndose así un aumento en los valores de CrP mientras que la TFG permanece inalterada (Van Acker *et al.*, 1993; Delanaye *et al.*, 2011; Delanaye, Cavalier y Pottel, 2017).
- IV. La creatinina es muy variable en condiciones fisiológicas. Su concentración puede verse influida por numerosos factores como el sexo del paciente, la

edad, el peso corporal, la raza, la fisiología, el metabolismo y el estado hídrico y nutricional (Rossaint y Zarbock, 2016). Esta variabilidad puede observarse por ejemplo en pacientes críticamente enfermos o ancianos con cáncer, donde sus concentraciones de CrP están relacionadas con la disminución de la masa muscular; o en pacientes que sufren una sepsis, donde se ha observado una disminución de la producción de creatinina (Doi *et al.*, 2009). Esta relación con la masa muscular, por ejemplo, explica por qué concentraciones similares de este metabolito pueden corresponder a diferentes valores de TFG en sujetos con diferentes características físicas, siendo un obstáculo para entender qué está ocurriendo realmente con la función renal en estos pacientes.

- V. Los valores de este metabolito pueden verse influidos por la dieta. Los alimentos ricos en proteínas aumentan la concentración de CrP y la TFG en los pacientes con **reserva funcional renal** preservada (Preiss *et al.*, 2016).

Reserva funcional renal (RFR) es la diferencia entre la tasa de filtración glomerular en estado de reposo y en su capacidad máxima (Palsson y Waikar, 2018).

- VI. La CrP puede estar diluida debido a la sobrecarga de fluidos corporales, dando como resultado un retraso o incluso la pérdida del diagnóstico del síndrome (Liu *et al.*, 2011).
- VII. El diagnóstico del DRA se basa en cambios de la concentración de la CrP referidos a una concentración basal. Pero en ocasiones este valor de referencia no está disponible, lo que supone un impedimento para realizar el diagnóstico (Khwaja, 2012).

Un diagnóstico rápido y fiable del DRA podría conseguirse con la medida de la TFG. A día de hoy no es posible realizar esta medida de forma directa, pero se puede determinar indirectamente mediante el aclaramiento de sustancias que se filtren libremente por el glomérulo o mediante la cuantificación de su aumento en plasma (Levey y James, 2017). A medida que la función renal disminuye, la concentración de cualquier soluto producido por el cuerpo y eliminado por filtración

glomerular, que no se reabsorba ni se secrete, aumenta en plasma. Por lo tanto, la evaluación de la concentración plasmática de dicho soluto para la estimación de la TFG es una alternativa útil. La determinación de la CrP es el método más utilizado en la práctica clínica (Endre, Pickering y Walker, 2011), por ello se utiliza para estimar la TFG aplicando ecuaciones matemáticas (Carlier *et al.*, 2015) aun teniendo en cuenta sus limitaciones.

- **La ecuación de Cockcroft y Gault** estima la TFG en base a la CrP, sexo, edad y peso corporal (Cockcroft y Gault, 1976).
- **La ecuación de Levey o fórmula MDRD** (de sus siglas en inglés *Modification of Diet in Renal Disease*) estima la TFG también en base a la CrP, sexo, peso corporal e incorpora la raza (Levey *et al.*, 1999).

Actualmente, aunque la CrP y la TFG permitan una interpretación del estado de la función renal a partir de la filtración, la información que aportan es a expensas de un daño estructural renal demasiado grande. Por ello, la TFG estimada es un marcador insensible de la función renal en muchos escenarios clínicos. Además, estas ecuaciones pueden aplicarse únicamente en pacientes con una función renal alterada de manera estable o crónica, ya que en un estado no estacionario como el que se produce en el DRA, la TFG no es una medida fiable por la amplia y rápida variabilidad de los parámetros, especialmente en pacientes críticos (Sheldon, 2013).

La diuresis

La comprobación de la diuresis es una prueba fácil y económica para evaluar la función renal y por ello, una de las más utilizadas en escenarios clínicos concretos. En quirófanos o UCIs, se ha demostrado que es una medida muy útil para evaluar el riesgo de un DRA e incluso mejora la información que ofrece la CrP en algunos casos (Leedahl *et al.*, 2014). Pero desafortunadamente, en muchas condiciones clínicas, los criterios de diuresis pueden carecer de especificidad y ser demasiado abiertos como, por ejemplo:

- I. En ocasiones, los pacientes pueden ser anúricos, o en el caso de los críticamente enfermos y perioperatorios pueden tener periodos

transitorios de oliguria en ausencia de una TFG disminuida, por lo que puede resultar difícil distinguir tales episodios de un DRA (Ricci y Romagnoli, 2018).

- II. Los diuréticos se encuentran entre los fármacos que se administran con mayor frecuencia en pacientes críticos para el manejo del equilibrio hídrico. Este hecho podría revertir un diagnóstico de DRA basado únicamente en criterios de diuresis (Ricci y Romagnoli, 2018).

5. PERSPECTIVAS EN EL DIAGNÓSTICO DEL DRA

A pesar de sus limitaciones, la CrP es la medida de referencia internacional utilizada para la detección del DRA. La información que ofrece este parámetro es sobre el estado de la filtración renal, no sobre la lesión (Waikar, Betensky y Bonventre, 2009). Por tanto, además de ser un marcador poco sensible y tardío, su concentración no es capaz de diferenciar qué estructuras renales están dañadas ni en qué grado (Wagener *et al.*, 2011). Este hecho ha desencadenado la búsqueda de nuevos biomarcadores capaces de aportar información sobre los procesos que acontecen en el riñón durante un DRA.

5.1 Biomarcadores urinarios de DRA

Se define como biomarcador el cambio de un parámetro estructural, bioquímico, fisiológico o genético que indica la presencia, gravedad o progreso de una enfermedad. En el contexto del DRA, el biomarcador ideal debería presentar las siguientes características (Beker *et al.*, 2018):

- Que la fuente del biomarcador sea de fácil acceso (no invasiva o mínimamente invasiva) y que se disponga de una técnica de medición rápida y económica.
- Que sea sensible para poder establecer un diagnóstico temprano y específico y que, además, sus niveles se mantengan en el tiempo para permitir el diagnóstico.

- Que tenga valores de corte específicos, con un aumento proporcional al grado de daño que posibilite la estratificación del riesgo.
- Que esté asociado con un mecanismo biológico conocido.
- Que tenga la capacidad de predecir la evolución clínica (necesidad de diálisis, muerte, etc.) y la respuesta a la terapia.

Las dos fuentes principales de biomarcadores son la sangre y la orina. En el ámbito de las nefropatías, los marcadores urinarios tienen mayor interés ya que la orina está en contacto estrecho con la ubicación de la lesión (Srisawat y Kellum, 2020). Además, la obtención de muestras no es invasiva para el paciente y es fácil de obtener. Durante la última década, los esfuerzos se han centrado en encontrar biomarcadores urinarios capaces de detectar un daño en el epitelio tubular ya que la lesión en las células renales puede no manifestarse en un cambio funcional posterior. Algunos estudios han establecido 3 categorías:

- I. El primer grupo incluye biomarcadores que tienen bajo peso molecular y se filtran libremente en el glomérulo. En circunstancias normales, son reabsorbidos por endocitosis en los túbulos proximales, de modo que solo después de una lesión tubular se pueden detectar en la orina. A este grupo pertenecen la β 2-microglobulina (Argyropoulos *et al.*, 2017), la α 1-microglobulina (Zager, Johnson y Frostad, 2016) o cistatina C (Lagos-Arevalo *et al.*, 2015).
- II. La segunda categoría engloba biomarcadores que producen las células renales en respuesta a la lesión. Estas moléculas incluyen la lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL de sus siglas en inglés *Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin*) y la molécula de daño renal 1 (KIM-1 de sus siglas en inglés *Molecular Injury Kidney- 1*), que se expresan principalmente en células epiteliales tubulares distales y proximales, respectivamente (Ware, Johnson y Zager, 2011).
- III. El tercer conjunto de biomarcadores se expresan constitutivamente en las células epiteliales tubulares y se eliminan en la orina en respuesta

a un DRA. Destacan la enzima N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG) (Cheng *et al.*, 2014), la proteína lactato deshidrogenasa citosólica (Zager, Johnson y Becker, 2013) y la proteína del borde en cepillo, gp130 (Zager y Carpenter, 1978). Los biomarcadores recientemente descubiertos TIMP-2 (inhibidor tisular de metaloproteinasa-2 de sus siglas en inglés *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2*) e IGFBP7 (proteína de unión al factor de crecimiento de la insulina -7 de sus siglas en inglés *Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-7*) parece que también se producen de forma constitutiva pero se liberan rápidamente en respuesta al daño (Emllet *et al.*, 2017). A este grupo también pertenece la interleuquina-18, liberada por células inflamatorias que se infiltran en los riñones durante un DRA.

Aunque aún no se contemplan en las guías de diagnóstico internacionales, la implementación de biomarcadores en la práctica clínica es inminente. La proteína de unión a ácidos grasos de tipo hepático (L-FABP de sus siglas en inglés *Liver-Type Fatty Acid Binding Protein*) está aprobada para su uso en Japón. Las políticas locales dictan el uso de NGAL en Europa y la combinación de TIMP-2 e IGFBP-7 está aprobada por la FDA (del inglés *Food and Drug Administration*) en Estados Unidos (Pickering y Endre, 2016). Además, marcadores como NGAL y KIM-1 ya cuentan con sistemas de detección autorizados para el diagnóstico clínico. En el caso de la NGAL, concretamente, el sistema ARCHITECT de Abbot Diagnostics (Grenier *et al.*, 2010) y el Test™ de Bio-Porto (Hansen, Damgaard y Poulsen, 2014). Por su parte, KIM-1 cuenta con un sistema de tiras reactivas para el diagnóstico *in situ* (Sabbisetti *et al.*, 2013). Un tercer sistema diagnóstico más reciente es el *Nephrocheck*, basado en la medida de IGFBP7 y TIMP-2 (Nalesso *et al.*, 2020).

NGAL

La NGAL es una proteína de 25 kDa que se identificó originalmente en neutrófilos humanos (Kokkoris *et al.*, 2013). Se expresa en muchos tipos celulares y tejidos, incluido el renal, donde es producido por las células del túbulo distal pero también aparece en las células del túbulo proximal (Mishra *et al.*, 2004) después de su filtración y reabsorción a través del transportador megalina-cubulina (Hvidberg *et al.*, 2005; Nejat *et al.*, 2012). En la última década, se ha comprobado que la NGAL

plasmática y urinaria es un predictor temprano del DRA teniendo incluso valor pronóstico para el inicio de la diálisis y la mortalidad (Holzscheiter *et al.*, 2014).

El uso de esta proteína como biomarcador de DRA se ha probado en diferentes contextos clínicos. Se ha observado una clara utilidad en la detección precoz del DRA inducido por la nefrotoxicidad subclínica causada por el cisplatino (Bunel *et al.*, 2017; Redahan y Murray, 2017) y los medios de contraste, tanto en adultos como en niños. Además, es un buen predictor del riesgo en pacientes posquirúrgicos (Slocum, Heung y Pennathur, 2012). Sin embargo, en otros escenarios clínicos aún no hay un consenso de su utilidad debido a la disparidad de resultados obtenidos, como en el caso de los pacientes críticos (Kokkoris *et al.*, 2013; Obermüller *et al.*, 2013) o con DRA prerrenal (de Geus, Betjes y Bakker, 2012; Kokkoris *et al.*, 2013). Otro factor que parece influir en la utilidad de la NGAL es la edad. En un estudio (Slocum, Heung y Pennathur, 2012) la expresión de este biomarcador predecía un riesgo mayor en pacientes adultos a desarrollar DRA que en niños, lo que sugiere que está relacionada con la edad y las comorbilidades (Slocum, Heung y Pennathur, 2012). Por tanto, el rendimiento de este biomarcador en clínica está condicionado por la complejidad a la hora de interpretar sus resultados debido a la diversidad de factores que pueden influir en él (Obermüller *et al.*, 2013).

KIM-1

La KIM-1 es una glicoproteína de membrana de tipo 1 (Bonventre, 2009), cuya expresión génica o proteica es indetectable en el riñón o la orina de individuos sanos. Pero tras una lesión isquémica o tóxica se expresa rápidamente a niveles muy altos en la membrana apical de las células del túbulo proximal (Obermüller *et al.*, 2013). En varios modelos animales de DRA se ha demostrado que la KIM-1 es un marcador muy sensible y específico de lesión renal tubular proximal (Vaidya, Ferguson y Bonventre, 2008). Por otra parte, en humanos, se cree que interviene en los procesos de regeneración y eliminación de células muertas a la luz tubular después de una lesión epitelial. Esto sugiere que su concentración urinaria podría usarse potencialmente para diferenciar entre la fase de extensión y la de recuperación de un DRA (Ichimura *et al.*, 2008; de Geus, Betjes y Bakker, 2012; Slocum, Heung y Pennathur, 2012). Por ello se ha barajado la hipótesis de que la KIM-1 podría participar en la protección renal en la etapa inicial de la lesión, pero luego podría

ejercer un papel dañino en el epitelio renal debido a la proliferación celular excesiva causada por la reparación tisular inducida por esta misma proteína.

La KIM-1 se detecta en la orina de pacientes con NTA, siendo un biomarcador útil de daño tubular y un buen predictor de resultados clínicos adversos (muerte y necesidad de diálisis) en pacientes con DRA (Ghatanatti *et al.*, 2013). Sin embargo, los niveles urinarios de esta proteína también se han encontrado elevados en otras patologías como carcinoma de células renales, lo que puede reducir su especificidad para el diagnóstico del DRA (Mijuskovic *et al.*, 2017).

IGFBP7 y TIMP-2

Ambas proteínas son denominadas biomarcadores de **detención del ciclo celular**. Durante momentos de estrés o lesión celular, el TIMP-2 y la IGFBP-7 se expresan en las células tubulares renales. En el marco de un DRA isquémico o séptico, inducen la detención del ciclo celular en la fase G₁, considerado un mecanismo clave en el DRA (Kashani *et al.*, 2013; Aregger *et al.*, 2014). Tanto la IGFBP7 como el TIMP-2 urinarios se compararon con biomarcadores como la NGAL, la KIM-1 y la IL-18 y fueron los que mejor rendimiento presentaron a nivel predictivo de la enfermedad (Cuartero *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2017; Mayer *et al.*, 2017). Estos estudios sugieren que la combinación de ambas proteínas tiene una alta capacidad diagnóstica, que mejora la toma de decisiones clínicas en la evaluación y estratificación del riesgo del DRA.

El **ciclo celular** es la sucesión de etapas por las que transcurre una célula que está proliferando. Dichas fases se denominan G₁-S-G₂ y M; las letras G significan intervalo (de sus siglas en inglés *Gap*), la S síntesis y la M mitosis. Existen puntos de control dentro del ciclo para garantizar la progresión sin fallos de este evento y, en el caso de detectar alguna anomalía, hay proteínas encargadas de la detención del ciclo celular. Se trata de un mecanismo de protección que evita que la célula continúe con su ciclo celular cuando sufre una lesión o se encuentra en un ambiente dañino, ya que su proliferación implicaría ciertos eventos como daños en el ADN (Campbell y Reece, 2007).

Además de estos, se han identificado algunos otros biomarcadores que se pueden medir en la orina de pacientes con lesión renal (Tabla 2).

Molécula	Descripción	Ubicación del daño
ALP	Enzima fosfatasa	Borde en cepillo del túbulo proximal
Calprotectina	Proteína antimicrobiana identificada en el citoplasma de los neutrófilos. Cuando es secretada por células inmunes activadas, actúa como una proteína de patrón molecular asociada al peligro	Túbulo colector
Fetulina A	Se expresa en hígado, riñón y tejido adiposo, y se secreta a la circulación. Evita la formación de calcificaciones en el músculo esquelético	Proteína contenida en exosomas. Túbulo proximal
GGT	Metabolismo del glutatión. Se encuentra en la superficie de varios tipos celulares	Borde en cepillo del túbulo proximal
GM2AP	Proteína activadora de gangliósido 2. Biomarcador de predisposición de DRA	Túbulo proximal
GST	Enzima sintetizada en el hígado y en el riñón. Responsable de detoxificación de un amplio rango de xenobióticos	Túbulo proximal y Asa de Henle
IL-18	Citoquina proinflamatoria. Regula la inmunidad innata y adaptativa. Se libera en la orina tras un daño celular tubular proximal	Túbulo proximal
L- FABP 1	Proteína citoplasmática de unión a ácidos grasos. Función antioxidante e inhibitoria del daño tubulointersticial	Túbulo proximal
NAG	Enzima lisosómica producida en las células tubulares proximales y distales; liberada en la orina después de un daño celular tubular	Túbulo proximal
PAI-1	Inhibidor del activador de plasminógeno tipo I. Inhibe la fibrinólisis	Endotelio vascular
TCP-1	Chaperonina tipo II. Posible inhibición de guanilil-ciclasa	Túbulo proximal

Tabla 2. Biomarcadores de DRA. ALP: fosfatasa alcalina (de sus siglas en inglés Alkaline Phosphatase); GGT: Gamma Glutamyl Transpeptidasa; GM2AP: Proteína activadora del gangliósido M2 (de sus siglas en inglés Ganglioside M2 Activator Protein); GST: Glutathion S-Transferasa; IL-18: Interleuquina-18; L-FABP-1: proteína hepática fijadora de ácidos grasos (de sus siglas en inglés Liver-Fatty Acid Binding Protein); NAG: N-Acetyl-beta-D-Glucosaminidasa; PAI-1: inhibidor del activador de plasminógeno-1 de sus siglas en inglés Plasminogen Activator Inhibitor -1; TCP-1:

proteína 1 del complejo T de sus siglas en inglés T-Complex Protein-1. (Zhou *et al.*, 2006; Vaidya, Ferguson y Bonventre, 2008; Townsend *et al.*, 2009; Endre *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2011; Małgorzewicz, Skrzypczak-Jankun y Jankun, 2013; Cheng *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2015; Teo y Endre, 2017).

5.1.1 Limitaciones de los biomarcadores urinarios de DRA

Se han descrito numerosos biomarcadores de DRA, pero ninguno de ellos es completamente específico este síndrome. Además, no se sabe con exactitud qué indican, ya que algunos de ellos se encuentran elevados tanto en orina como en plasma (Srisawat y Kellum, 2020). Se sabe que los niveles de NGAL o la IL-18 se elevan en las infecciones del tracto urinario y en la sepsis, independientes de un DRA (Medic *et al.*, 2016). También se ha detectado un aumento en los niveles de NGAL, KIM-1 e IL-18 en pacientes con ERC (Schrezenmeier *et al.*, 2017). Por su parte, el TIMP-2 y la IGFBP7 se han asociado con la diabetes (Bell *et al.*, 2015) y la L-FABP parece estar fuertemente relacionada con la anemia en pacientes no diabéticos (Imai *et al.*, 2015).

Durante mucho tiempo se ha creído que la mayoría de, si no todos, estos marcadores eran producidos por las células epiteliales tubulares dañadas y eliminados directamente a la orina, donde sirven como biomarcadores de daño tubular. Sin embargo, este concepto ha sido cuestionado recientemente. Se ha demostrado que el aumento del nivel urinario de NGAL (Sancho-Martínez, Blanco-Goza, *et al.*, 2020; Skrypnik *et al.*, 2020) y TIMP-2 e IGFBP7 (Johnson y Zager, 2018) no es el resultado de la secreción directa desde las células del túbulo, sino de la reducción de la reabsorción tubular de las proteínas filtradas. Estos hallazgos podrían modificar el significado fisiopatológico y diagnóstico de estas proteínas. Por lo tanto, se necesita encontrar biomarcadores que tengan un origen exclusivamente renal para que aporten un significado biológico distinto y una mejor sensibilidad para poder asociarlos a procesos biológicos concretos.

5.2 Las “ómicas” como método de búsqueda de biomarcadores de DRA

Debido al avance de las tecnologías de alto rendimiento, el enfoque basado en las “ómicas” (genómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica y metagenómica) ha ganado mucho interés en la investigación biológica (Horgan y Gynaecologist, 2011). Una de sus aplicaciones más demandadas es como fuente de

biomarcadores de diagnóstico de enfermedades (Barh, Blum y Madigan, 2016; Karahalil, 2016). En el ámbito de la lesión renal, el análisis proteómico en fluidos biológicos y en el tejido renal ha sido ampliamente utilizado para intentar solventar los problemas expuestos anteriormente (Devarajan, 2015; Dubin y Rhee, 2020). La proteómica es un análisis de alto rendimiento de la abundancia de péptidos o proteínas de una célula, fluido corporal u organismo, incluida su estructura, funciones, modificaciones e interacción con otras proteínas (Horgan y Gynaecologist, 2011).

La mayoría de las enfermedades se caracterizan por tener un amplio y complejo escenario a nivel molecular. Para comprenderlo es necesario adquirir una visión global de las proteínas y de los procesos en los que están implicadas dentro de la patogénesis. El DRA es una enfermedad de origen multifactorial en la que se busca su prevención y detección temprana basada en la identificación de un biomarcador o panel de biomarcadores. La dificultad de este hecho reside en la multitud de cambios de expresión molecular que ocurren en este síndrome por las diferentes etiologías y enfermedades asociadas (Devarajan, 2015; Marx *et al.*, 2018; Dubin y Rhee, 2020).

La complejidad de la proteómica se debe al alto número de proteínas contenidas en las muestras biológicas y al rango extendido de sus concentraciones, además de las modificaciones postraduccionales y las interacciones de las proteínas, que aumentan la complejidad de las muestras (Figura 4) y por tanto, dificulta la caracterización completa de los proteomas (Marx *et al.*, 2018). En los análisis ómicos se obtienen largas listas de moléculas difíciles de interpretar o deducir en qué procesos están involucradas, siendo una de las principales razones por las que los hallazgos experimentales rara vez puedan terminar como biomarcadores clínicos (Wallstrom, Anderson y LaBaer, 2013). Es por ello por lo que se han ido implementando bases de datos donde se agrupan etiquetas de funcionalidad y nombres de vías asociadas con proteínas individuales de estudios independientes y no relacionados, con el fin de integrar los datos obtenidos a partir de este tipo de análisis. Esta información puede ser muy útil para construir mapas y redes de vías moleculares asociados a los diferentes procesos fisiopatológicos de una enfermedad, siendo capaz de proporcionar un contexto a los datos obtenidos (Husi *et al.*, 2013). Una de las herramientas más usadas para el análisis en el campo

de la proteómica es el *software Ingenuity Pathway Analysis (IPA)* (Müller *et al.*, 2011). Se trata de una gran colección masiva de datos ómicos que permite el análisis, la integración y la interpretación de resultados derivados de experimentos ómicos (Krämer *et al.*, 2014).

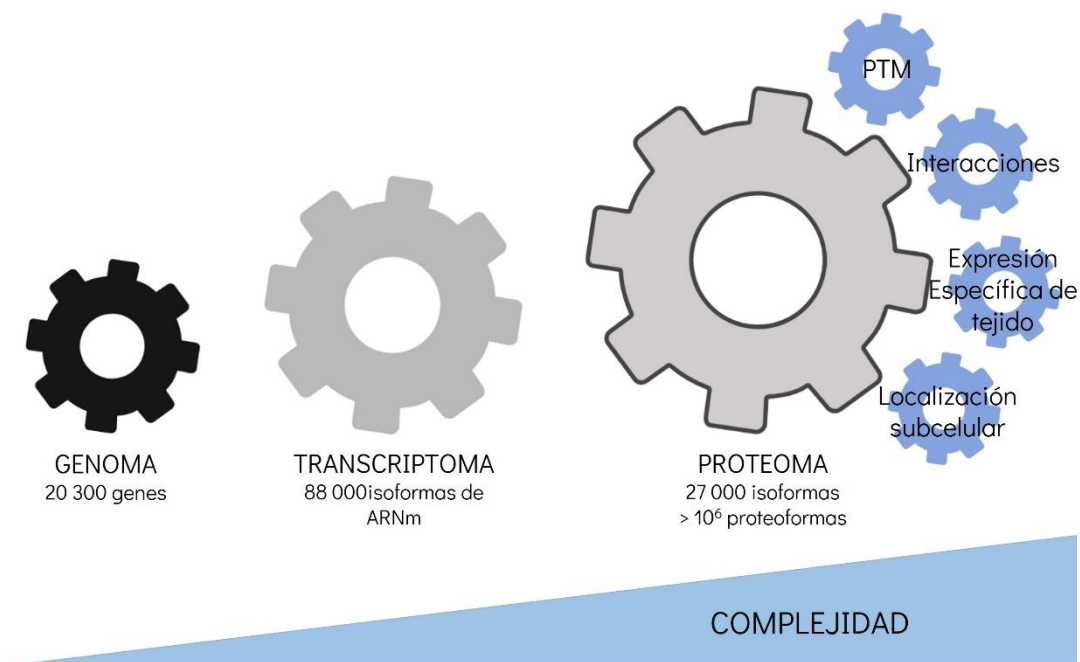


Figura 4. Complejidad de los sistemas biológicos. Se estima que el número de genes humanos que codifican proteínas es de aproximadamente 20 000. Debido al *splicing* alternativo el número de ARNm transcritos es significativamente mayor. Se ha demostrado la traducción de 18 000 proteínas (incluidas más de 27 000 isoformas). Además, el proteoma se amplifica aún más por la expresión específica de tejido, modificaciones postraduccionales, interacciones proteína-proteína y localización subcelular. Estos perfiles se modifican ante alteraciones biológicas y patológicas. ARNm: ácido ribonucleico mensajero; PTM: modificaciones postraduccionales. Imagen adaptada de (Muñoz y Heck, 2014).

En el ámbito de las enfermedades renales, la orina es el fluido más utilizado para el estudio proteómico. Esto se debe a su estrecho contacto con el riñón y su fácil acceso y disponibilidad. Sin embargo, la proteómica urinaria presenta algunos desafíos. En primer lugar, la orina es un fluido diluido que requiere concentración, y los diferentes métodos de concentración pueden dar lugar a distintos proteomas que dificultan las comparaciones. Además, su composición puede verse influida por

factores no renales como la edad, el sexo, el tiempo de recolección y la dilución. Por otra parte, la presencia de proteínas muy abundantes en la orina, como la albúmina, enmascara las proteínas que se encuentran a niveles de concentración más bajos que pueden dar información relevante. De manera que es necesaria su eliminación, pero este proceso también elimina las proteínas unidas que pueden ser de potencial importancia. Estos inconvenientes han conducido a la generación y utilización de protocolos estandarizados para la recolección, el procesamiento, la concentración y el almacenamiento de la orina de pacientes (Devarajan, 2015) con el fin de unificar y poder comparar todos los datos que se obtengan.

Actualmente, ya se han realizado estudios cuya información podría ser explotada en el ámbito clínico mediante la introducción de biomarcadores (diagnósticos, predictivos, pronósticos) y enfoques terapéuticos dirigidos. En una investigación reciente sobre el DRA, Malagrino *et al.*, identificaron más de 55 biomarcadores urinarios en un modelo de I/R renal porcina. Sin embargo, solo un biomarcador, la dipeptidil peptidasa IV, fue validado en la orina de pacientes con nefropatía diabética (Malagrino *et al.*, 2017). Este estudio respalda la premisa de que un solo biomarcador no puede explicar la complejidad del DRA y, por tanto, lo más adecuado sería generar paneles o “huellas” de biomarcadores como ya se ha hecho con algunas afectaciones renales (Verbeke *et al.*, 2021).

Aunque la orina haya sido el fluido más utilizado hasta el momento para realizar este tipo de análisis en el marco de las nefropatías, la investigación de las vesículas urinarias está cobrando mucha fuerza como fuente directa de biomarcadores procedentes de las células renales, ya que podrían aportar luz sobre los eventos fisiopatológicos que están ocurriendo en los riñones cuando se produce un DRA (Karpman, Ståhl y Arvidsson, 2017; Pomatto *et al.*, 2017).

6. VESÍCULAS EXTRACELULARES URINARIAS Y DRA

Todas las células tienen la capacidad de secretar partículas membranosas, conocidas como vesículas extracelulares (Schorey *et al.*, 2015). Aunque inicialmente se describieron como un mecanismo celular dirigido a la eliminación de compuestos innecesarios de la célula (Johnstone *et al.*, 1987), ahora se sabe que son algo más que simples portadores de desechos. El principal interés que suscita este campo se

centra en la capacidad que tienen estas vesículas para intercambiar componentes entre células, como ácidos nucleicos, lípidos o proteínas, actuando como vehículos de señalización en procesos homeostáticos celulares o como consecuencia de procesos patológicos (Karpman, Ståhl y Arvidsson, 2017). Para entender sus funciones fisiológicas y patológicas es fundamental tener un conocimiento más profundo de su biología con el fin de encontrar una aplicabilidad y un uso clínico para ellas (van Niel, D'Angelo y Raposo, 2018).

6.1 Tipos de vesículas extracelulares

Las vesículas extracelulares (VE) son un grupo heterogéneo de estructuras membranosas que se pueden clasificar en función de su biogénesis, origen celular, tamaño, morfología y contenido, incluyendo exosomas, microvesículas, cuerpos apoptóticos, micropartículas, ectosomas y oncosomas (Pol *et al.*, 2016), aunque se tiende a utilizar una clasificación más simplificada hablando principalmente de exosomas y microvesículas (MV) (Karpman, Ståhl y Arvidsson, 2017).

Las microvesículas se forman por gemación de la membrana plasmática y se liberan al espacio extracelular. Pueden tener un tamaño de entre 50-1000 nm de diámetro o incluso llegar hasta las 10 µm en el caso de los oncosomas. Los exosomas por su parte son vesículas intraluminales (ILV de sus siglas en inglés *IntraLuminal Vesicles*) que tienen un tamaño de entre 30-100 nm de diámetro. Las ILV se forman dentro de los endosomas o cuerpos multivesiculares (MVB de sus siglas en inglés *MultiVesicular Body*) por gemación hacia adentro, y se fusionan posteriormente con la membrana plasmática para liberar las vesículas formadas en su interior al medio extracelular, donde pasan a llamarse exosomas (Figura 5) (Colombo, Raposo y Théry, 2014).

Según su célula de procedencia, las VE muestran diferente composición proteica que explican sus destinos y funciones específicas. A pesar de tener diferente biogénesis, los exosomas y las microvesículas muestran una apariencia similar y, a menudo, una composición común que dificulta la determinación de su origen una vez aislados del medio extracelular o de los fluidos biológicos como suero, orina, leche materna, líquido cefalorraquídeo, ascitis maligna, líquido de lavado bronco-alveolar o saliva (Raposo y Stoorvogel, 2013).

6.2 Biogénesis de las vesículas extracelulares

Los exosomas y las microvesículas tienen una biogénesis diferente, pero ambas involucran procesos de tráfico de membranas. Aunque su formación ocurre en distintas zonas de la célula, los mecanismos intracelulares y las maquinarias de clasificación de componentes son comunes. En ocasiones, estos mecanismos compartidos también dificultan la distinción entre las diferentes subpoblaciones de vesículas (Colombo, Raposo y Théry, 2014). Su formación comienza con la preparación de la carga que contendrán y su orientación hacia la zona de origen, ya sea en la membrana plasmática (para las microvesículas) o en la membrana de los endosomas (para los exosomas), y continúa con el enriquecimiento de la carga en las vesículas mediante un mecanismo seriado de agrupación y gemación seguido de fisión y liberación de vesículas.

6.2.1 Mecanismos de la biogénesis y la liberación de los exosomas

La biogénesis de los exosomas consta de tres etapas diferentes que incluyen: la formación de vesículas endocíticas por invaginación de la membrana plasmática, la formación de los MVB por gemación hacia adentro de la membrana endosomal y finalmente, la fusión de los MVB con la membrana plasmática y la liberación de las vesículas (Batista *et al.*, 2011).

Los exosomas proceden del sistema endosómico, formándose como vesículas ILV en los MVB. El conjunto de ILV es utilizado por la célula para degradar, reciclar o secretar proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Dentro de este sistema, los endosomas se dividen en tempranos, tardíos y de reciclaje (Grant y Donaldson, 2009). Los endosomas se forman por invaginación de la membrana plasmática. Algunos de ellos pueden fusionarse con vesículas endocíticas, cuyo contenido se destina a la degradación o reciclaje (Morelli *et al.*, 2004). Otros, se transforman en endosomas tardíos (Stoorvogel *et al.*, 1991) y acumulan en su interior las ILV. Durante este proceso, las proteínas citosólicas, los ácidos nucleicos y los lípidos se incorporan a estas pequeñas vesículas. El conjunto del endosoma tardío y las vesículas formadas en su interior conforman los denominados MVB, que pueden fusionarse con el lisosoma si el contenido está destinado a la degradación, o fusionarse con la membrana celular liberando las ILV como exosomas al espacio extracelular (Grant y

Donaldson, 2009) (Figura 5). Según algunos estudios, la ruta de cada MVB probablemente esté determinada por su contenido (Morrison, Bailey y Dear, 2016).

La formación de las ILV requiere dos procesos distintos. En primer lugar, la membrana del endosoma se reorganiza de manera que se enriquece en tetraspaninas (Pols y Klumperman, 2009). Y a continuación, los complejos de clasificación endosomal necesarios para el transporte (ESCRT de sus siglas inglés *Endosomal Sorting Complexes Required For Transport*) se reclutan en el sitio de formación (Wollert y Hurley, 2010; Colombo *et al.*, 2013). Se han identificado cuatro ESCRT con diferentes funciones implicadas en este proceso: ESCRT 0, I, II y III (Henne, Buchkovich y Emr, 2011). El ESCRT 0 reconoce proteínas ubiquitinadas en el exterior de la membrana endosomal (Raiborg y Stenmark, 2009). Se ha sugerido que los ESCRT I y II son los precursores y conductores de la gemación de la membrana intraluminal; el ESCRT I es el responsable de cargar del contenido ubiquitinado en los endosomas (Katzmann, Babst y Emr, 2001) mientras que el ESCRT II comienza la gemación inversa, proceso que es completado por el ESCRT III (Henne, Stenmark y Emr, 2013) (Figura 5).

Existe una vía alternativa a los ESCRT donde las proteínas sinntenina y ALIX median en la biogénesis (Baietti *et al.*, 2012). Pero los exosomas también pueden originarse de una manera independiente a los ESCRT (Stuffers *et al.*, 2009), donde se requiere la formación de ceramida para la generación de los subdominios de membrana (Goñi y Alonso, 2009).

La liberación de las ILV al espacio extracelular es posible por la fusión de la membrana del MVB con la membrana plasmática. Se han identificado varias proteínas que pueden estar implicados en este proceso. i. Las Rab GTPasas, incluidas RAB11 y RAB35, o RAB27A y RAB27B (Hsu *et al.*, 2010). ii. Liberación independiente de las Rab

Las **Rab GTPasas** son una familia de proteínas GTPasas de la superfamilia Ras, que controlan e impulsan todos los pasos del tráfico de membrana: formación y transporte de vesículas y fusión de membranas (Stenmark, 2009).

GTPasas donde intervienen otras proteínas como la diacilglicerol quinasa α (Alonso *et al.*, 2007) o la proteína de membrana asociada a vesículas 7, que pertenece a la familia de las SNARE (Fader *et al.*, 2009).

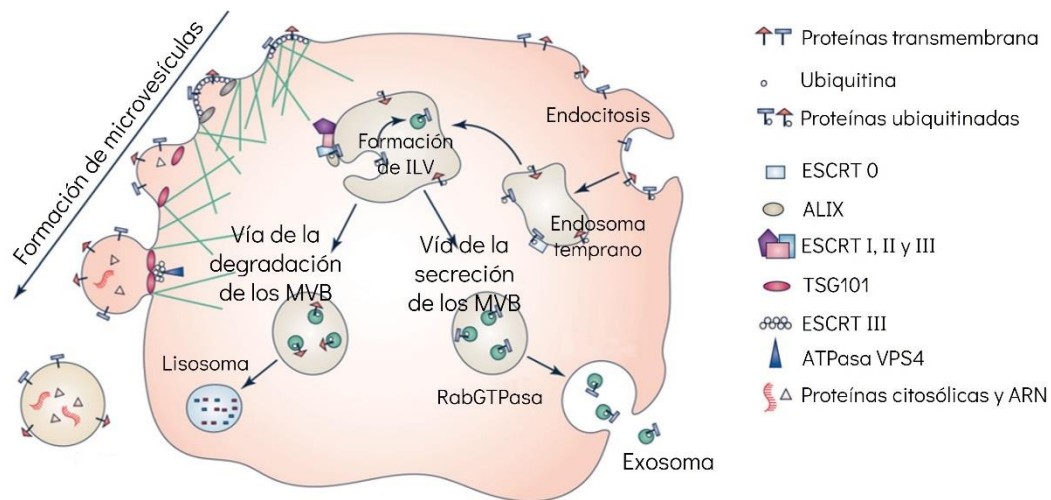


Figura 5. Biogénesis de las vesículas extracelulares. En la biogénesis de los exosomas las proteínas transmembrana se internalizan desde la superficie celular a través de la endocitosis y sus dominios citosólicos se ubiquitinizan. El ESCRT 0 reconoce la proteína ubiquitinada y posteriormente se reclutan el ESCRT I y II para iniciar la gemación inversa y formar las ILV, en esta etapa las proteínas citosólicas y ARN se incorporan al interior de las ILV. A continuación, estas se separan de la yema, después del reclutamiento de ESCRT III, por ESCRT II y ALIX. El MVB formado puede seguir una ruta de degradación o proceder a la fusión con la membrana plasmática. No todas las proteínas requieren ubiquitinación para dirigirse a las ILV, otras modificaciones posteriores a la traducción pueden resultar en el reclutamiento para incorporarse a las ILV (Moreno-Gonzalo, Villarroya-Beltri y Sánchez-Madrid, 2014). Por su parte en el ensamblaje de microvesículas, las proteínas transmembrana se agrupan en microdominios lipídicos. La proteína miristoilada contribuye a la curvatura de la membrana. La subunidad TSG101 del complejo ESCRT I recluta el ESCRT III a la membrana plasmática y promueve el ensamblaje de una espiral que, finalmente es desmontada por la ATPasa VPS4. Este proceso provoca la escisión de la yema y la liberación de una población heterogénea de microvesículas. ARN: ácido ribonucleico; ESCRT: complejo de clasificación endosomal necesarios para el transporte (de sus siglas inglés Endosomal Sorting Complexes Required For Transport); ILV: vesículas intraluminales (de sus siglas en inglés IntraLuminal Vesicles); MVB: cuerpo multivesicular (de sus siglas en inglés MultiVesicular Body). Imagen adaptada de (Morrison, Bailey y Dear, 2016).

6.2.2 Mecanismos de la biogénesis y la liberación de las microvesículas

Aunque se ha profundizado menos en el estudio de la biogénesis de las microvesículas en comparación con los exosomas, se han encontrado diferentes mecanismos responsables de su formación y liberación. En general, parecen

formarse a través de la gemación y fisión hacia afuera de la membrana plasmática cuando intervienen una serie de factores, como la redistribución de fosfolípidos y la contracción de la maquinaria de actina-miosina (Akers *et al.*, 2013). Algunos factores externos también pueden influir en la liberación como por ejemplo la entrada de calcio, que favorece la redistribución de los fosfolípidos produciendo una mayor liberación de microvesículas (Pasquet, Dachary-Prigent y Nurden, 1996; Bucki *et al.*, 1998). Se han propuesto los siguientes mecanismos: i. El factor de ribosilación de ADP 6 inicia una cascada que activa la fosfolipasa D. A continuación, la quinasa regulada por la señal extracelular se recluta en la membrana plasmática, donde fosforila y activa la quinasa de cadena ligera de miosina (MLCK del inglés *Myosin Light Chain Kinase*). Finalmente, la fosforilación y activación de la cadena ligera de miosina desencadena la liberación de microvesículas (Muralidharan-Chari *et al.*, 2009). ii. El reclutamiento de TSG101 y ESCRT I a la membrana plasmática resulta en la liberación de las MV (Nabhan *et al.*, 2012) (Figura 5). iii. La hipoxia también promueve la liberación vesículas a través de la expresión de RAB22A dependiente de HIF (Wang *et al.*, 2014).

6.3 Contenido de las vesículas extracelulares

El contenido de las vesículas varía con respecto a la forma de biogénesis, el tipo de célula y las condiciones fisiológicas. En general, contienen una multitud de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, y este contenido puede ser específico en función de la vesícula y el tipo de célula. Es por ello, que desde hace unos años se está llevando a cabo una amplia investigación para caracterizar el contenido de las vesículas extracelulares y esto, ha resultado en el ensamblaje de diferentes bases de datos que recopilan la información de numerosos estudios (Abels y Breakefield, 2016).

En cuanto al contenido proteico, se ha realizado una investigación exhaustiva sobre el perfil de vesículas de diferentes tamaños y tipos celulares (Théry *et al.*, 2001; Conde-Vancells *et al.*, 2008; Gonzalez-Begne *et al.*, 2009; Graner *et al.*, 2009; Turiák *et al.*, 2011; Beckler *et al.*, 2013). Las proteínas que se encuentran comúnmente en las vesículas están relacionadas con los mecanismos responsables de la biogénesis, como ALIX o TSG101. Además, también se encuentran proteínas responsables de su formación y liberación como RAB27A, RAB11B y ARF6 y algunas tetraspaninas como CD63, CD81 y CD9. Pero además, se han identificado proteínas relacionadas con

procesos como la coagulación y la trombosis, la angiogénesis, la modulación inmunitaria y la inflamación, así como proteínas involucradas en la transducción de señales vinculada a la comunicación celular (Ståhl *et al.*, 2019). Sin embargo, hay muchas discrepancias entre los diferentes conjuntos de datos debido a las variaciones en las técnicas de aislamiento y los diferentes tipos de células de los que provienen las vesículas. Por tanto, es evidente que se requiere la estandarización de las técnicas de aislamiento y del análisis para dilucidar la composición proteica de los diferentes subtipos de vesículas extracelulares así como las señales que enriquecen las proteínas que contienen (Théry *et al.*, 2001).

6.4 Vesículas extracelulares como fuente de biomarcadores de DRA

Las VE participan tanto en procesos fisiológicos como fisiopatológicos, y contienen una amplia y heterogénea gama de moléculas que reflejan las condiciones de la célula de la que provienen (Kalra *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2015), es por ello que en los últimos años se han investigado como potenciales biomarcadores de enfermedades (Zhou *et al.*, 2006). Además, la membrana que las envuelve protege el material que transportan de la degradación enzimática, lo que hace que sean portadores estables (Boukouris y Mathivanan, 2015). Los estudios indican que las células modulan su contenido en respuesta al estrés extracelular, incluidas las infecciones, la hipoxia, el estrés oxidativo y otras afecciones celulares que alteran su composición (Lancaster y Febbraio, 2005; Eldh *et al.*, 2010; Pegtel *et al.*, 2010; de Jong *et al.*, 2012).

Durante los procesos fisiológicos y patológicos renales las VE son secretadas por casi todos los tipos de células renales, incluidas las células epiteliales glomerulares, los podocitos, las células epiteliales proximales y distales y las células del túbulo colector (Miranda *et al.*, 2010). Por tanto, se espera que las vesículas que aparezcan en la orina procedan exclusivamente de las células renales, ya que en condiciones fisiológicas las VE sanguíneas no pueden atravesar la membrana basal glomerular debido a su tamaño (Pisitkun, Shen y Knepper, 2004), y por tanto, que en patologías renales sin afectación glomerular que altere esta barrera tampoco ocurra. De forma que las vesículas que aparezcan en la orina tras un daño renal tóxico o isquémico tendrán un origen renal. El estudio de su composición ayudaría a esclarecer qué procesos están ocurriendo en las células de las nefronas y poder

comprender así los mecanismos implicados en la fisiopatología del daño renal con el fin de realizar diagnósticos más personalizados o con fines terapéuticos.

En la actualidad ya se ha analizado el perfil molecular de estas partículas después de un daño renal con el objetivo de encontrar biomarcadores para la detección precoz del mismo. Uno de los estudios identificó mediante el análisis proteómico la Fetuina A. Los niveles de esta proteína en la fracción exosomal urinaria de roedores y humanos se encontraron elevados antes del incremento de la CrP después de sufrir un daño renal inducido por cisplatino (Zhou *et al.*, 2006). El mismo grupo informó que el aumento del factor de transcripción 3 (ATF3) en vesículas era más temprano que la CrP en modelos animales y en pacientes de la UCI con DRA, lo que indica que puede ser un biomarcador útil para el diagnóstico precoz del síndrome (Zhou *et al.*, 2008). En el caso de la lesión renal inducida por sepsis, el ATF3 es incluso mejor que NGAL según los resultados obtenidos por Panich *et al.*, (Panich *et al.*, 2017). Por otro lado, la isoforma 3 del intercambiador de Na^+/H^+ exosomal parece ser un potencial biomarcador, ya que puede ayudar a diferenciar entre la NTA, la hiperazoemia prerrenal u otras causas de DRA. Por tanto, el conocimiento de la composición de las VE urinarias o la identificación de cambios en esta después de un DRA, podrían ser útiles para asociar patrones moleculares con la lesión de forma que además de detectar el síndrome se pueda saber su causa.

OBJETIVOS

La orina es un fluido biológico muy útil y adecuado para el diagnóstico clínico de las enfermedades renales (Bunel *et al.*, 2017). El descubrimiento de la fracción vesicular urinaria (Wiggins *et al.*, 1986) ha abierto un nuevo campo científico que ha suscitado cierto interés en el ámbito de las nefropatías. El análisis proteómico de estas partículas ha permitido su caracterización y ha evidenciado que su composición sufre alteraciones en condiciones patológicas (Pisitkun, Shen y Knepper, 2004), lo que las convierte en una fuente potencial de biomarcadores (Kowal *et al.*, 2016; Karpman, Ståhl y Arvidsson, 2017; Dubin y Rhee, 2020). A causa de su tamaño las VE no pueden filtrarse a través de la barrera de filtración intacta. Se deduce entonces, que las vesículas urinarias tienen un origen exclusivamente renal y esto les confiere la capacidad de reflejar procesos moleculares, así como condiciones fisiológicas y patológicas renales (Pisitkun, Shen y Knepper, 2004b).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nuestra hipótesis de trabajo propone que:

Cuando se produce un DRA sin afectación glomerular, las VE que se encuentran en la orina han sido secretadas por las células renales, y su contenido proteico es un reflejo de los procesos fisiopatológicos que ocurren en las células de origen durante la enfermedad. Así, es posible identificar proteínas vesiculares con potencial utilidad como biomarcadores en el diagnóstico del DRA.

Con esta hipótesis, en esta Tesis Doctoral se plantearon los siguientes objetivos:

1. Estudiar el contenido proteico de las VE urinarias en modelos experimentales de DRA, e identificar biomarcadores vesiculares de este síndrome.
2. Confirmar el origen renal de los biomarcadores seleccionados para profundizar en el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos y en el significado biológico de su aparición en la orina.
3. Estudiar en pacientes con DRA la utilidad diagnóstica de los biomarcadores identificados en la fracción vesicular urinaria.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MÉTODOS

Los materiales, productos, anticuerpos, reactivos, equipos y aparatos, y programas de ordenador utilizados para la realización de este trabajo se encuentran al final de esta sección en las [Tablas 7, 8 y 9](#).

Todos los procedimientos experimentales realizados en este trabajo de investigación se han llevado a cabo de acuerdo con los Protocolos Normalizados de Trabajo (PNTs) de nuestro grupo de investigación TRECARD (*Translational Research on Renal and Cardiovascular Diseases*).

2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para la realización de este estudio se han utilizado ratas Wistar macho de 260-300 g de peso corporal, procedentes del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca (SEA).

2.1 Mantenimiento y manipulación de los animales

Los animales se mantuvieron durante todo el experimento en las instalaciones del SEA, que cuenta con condiciones ambientales constantes de temperatura (20 °C), humedad ambiental (60 %), ciclos de luz-oscuridad cada 12 horas y sistemas de renovación y filtrado de aire. Su alimentación se ha basado en una dieta estándar con la siguiente composición: proteína bruta (17,62 % del total), materias grasas brutas (2,50 %), celulosa bruta (4,05 %), cenizas brutas (4,38 %), almidón (43,30 %), calcio (0,66 %), fósforo (0,49 %), sodio (0,14 %), lisina (0,85 %), metionina (0,29 %), vitamina A (19 900 UI/kg), vitamina D (1500 UI/kg) y vitamina E (tocoferol) (110 mg/kg).

Los animales se manejaron 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 y del Consejo de la Unión Europea, relativa a la protección de los animales utilizados para

finés científicos; la Ley 32/2007 del Estado Español, para el cuidado de los animales, 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 No 1099/2009 del Consejo de la Unión Europea.

Los animales se supervisaron diariamente durante todos los experimentos, controlando su estado de salud general, movilidad, color del pelo y peso corporal.

2.2 Modelos experimentales de DRA

2.2.1 DRA tóxico inducido por el cisplatino

En base a estudios preliminares llevados a cabo en nuestro laboratorio, para generar el modelo experimental de DRA tóxico se utilizó el cisplatino (Ferreira *et al.*, 2011; Sancho-Martínez, Sánchez-Juanes, *et al.*, 2020; Fuentes-Calvo *et al.*, 2021). Se trata de un fármaco antineoplásico nefrotóxico, pero ampliamente utilizado en el tratamiento de tumores sólidos. El cisplatino ejerce su efecto tóxico predominantemente en los túbulos proximales (Dasari y Tchounwou, 2014) aunque en ocasiones también se ven afectados los túbulos distales (Mingeot-Leclercq y Tulkens, 1999; Sharfuddin y Molitoris, 2011) cuanto mayor es la dosis.

Procedimiento experimental

Este modelo se basa en la administración de una dosis única (5 mg/kg) de cisplatino por vía intraperitoneal (i.p.). La solución se preparó en suero salino 0,9 % estéril atemperado (37 °C) a la concentración de 1,25 mg/mL, de forma que el volumen en µl a administrar se correspondiera con 4 veces el peso del animal en gramos.

Según estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación (Ferreira *et al.*, 2011; Cuesta, 2018; Sancho-Martínez, Sánchez-Juanes, *et al.*, 2020; Fuentes-Calvo *et al.*, 2021), sabemos que 4 días después de la administración de una dosis

tóxica de cisplatino se produce el momento de máximo daño renal, caracterizado por una subida en los valores de CrP y de urea plasmática. Para caracterizar el DRA se midieron los niveles de CrP.

2.2.2 DRA inducido por la I/R

El factor principal en el desarrollo de la isquemia renal es una reducción significativa en el flujo sanguíneo renal. Puede ser causado por una disminución de la presión arterial sistémica, como ocurre en el DRA prerrenal, o por una enfermedad vascular de los grandes vasos renales que implica trombosis de arteria renal, embolia, o aterosclerosis que conducen a un DRA. La isquemia de uno o ambos riñones es también un problema común experimentado durante la cirugía cardiovascular o trasplante renal que conduce a la disfunción renal y a la lesión del tejido u órgano (Bonventre y Zuk, 2004). El daño renal producido por la I/R es consecuencia de alteraciones hemodinámicas (disminución del flujo sanguíneo renal), de lesión endotelial y epitelial, y de la activación de la respuesta inmunológica e inflamatoria. La interacción compleja de estos factores fisiopatológicos impulsa y potencia el daño (Kanagasundaram, 2014).

Procedimiento quirúrgico

Los animales se anestesiaron por vía i.p., con una mezcla de ketamina (80 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg), diluida en una solución salina estéril. Antes de iniciar la cirugía, se rasuró el abdomen del animal y se le colocó sobre una plancha metálica, previamente colocada encima de una almohadilla que **aplicaba calor**, en posición decúbito supino y se inmovilizó al animal fijando con esparadrappo las cuatro extremidades. Se desinfectó la zona previamente rasurada con alcohol 96° y povidona yodada (Betadine®). Este proceso se realizó en condiciones asépticas.

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

Antes de iniciar la cirugía, se determinó la profundidad de la anestesia comprobando la ausencia de reflejos en el animal. Se realizó una laparotomía media con un corte en la línea alba de unos 3-4 cm, a la altura del pedículo renal izquierdo.

La capa muscular se levantó con unas pinzas para crear un espacio entre la misma y el mesenterio que, con unos bastoncillos de algodón humedecidos con suero salino estéril, se apartó cuidadosamente para que el pedículo renal del riñón izquierdo quedara expuesto. El mesenterio del animal se mantuvo cubierto con gasas humedecidas en solución salina atemperada (37 °C) para evitar la deshidratación. El pedículo renal se diseccionó y se eliminó el tejido adiposo que lo rodeaba, con el fin de exponer los vasos sanguíneos. Se procedió a inducir el daño isquémico mediante pinzamiento de la arteria y vena renal durante 60 minutos. Se **controló la temperatura corporal** cada 10 minutos, que se mantuvo durante todo el procedimiento alrededor de los 37 °C. Cinco minutos antes de finalizar la isquemia, se realizó la nefrectomía contralateral. Se ligó el pedículo renal y uréter derecho (con suturas absorbibles 4/0 y 6/0 respectivamente) y se extrajo el riñón al seccionar los vasos y el uréter. Trascorridos los 60 minutos se retiró la pinza vascular y se estimuló el pedículo del riñón izquierdo con bastoncillos humedecidos con suero salino hasta que se confirmó visualmente la reperusión total del riñón. Para finalizar el procedimiento se suturó el abdomen de las ratas con suturas no absorbibles 4/0.

El **control de la temperatura** corporal durante la isquemia es un aspecto muy importante para la reproducibilidad de los experimentos. Se ha observado que una temperatura corporal más alta con respecto al rango de normalidad (alrededor de 37 °C) durante la isquemia se relaciona con un mayor daño. Por el contrario, la hipotermia es un factor de protección (Delbridge *et al.*, 2007).

Se dejó a los animales con suministro de calor hasta su completa recuperación (unas 5-6 horas) y se administró el analgésico buprenorfina a una dosis de 0,03 mg/kg por vía subcutánea.

2.3 Sistema de perfusión renal *in situ*

Procedimiento de la perfusión renal con Krebs-dextrano

Los animales se anestesiaron con una mezcla de ketamina (80 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg) diluida en solución salina estéril vía i.p. y se colocaron sobre una tabla de microcirugía calefactada en posición 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. Esta técnica se realizó en condiciones asépticas.

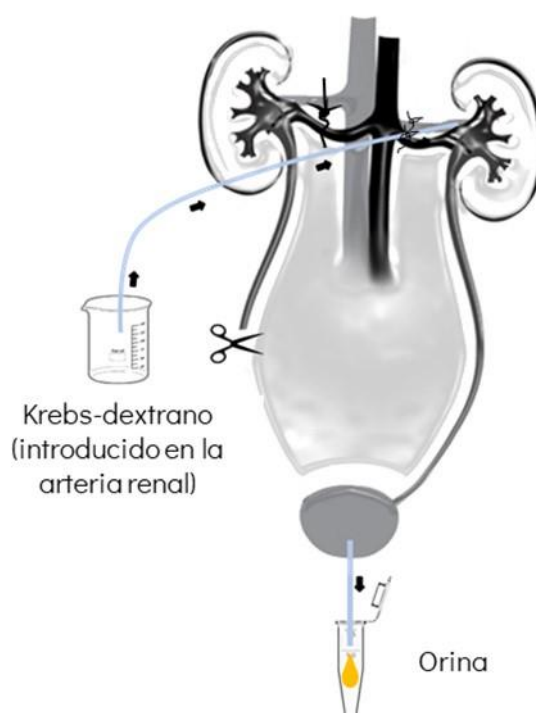


Figura 6. Representación esquemática del sistema de perfusión renal in situ con Krebs-dextrano.

Vía laparotomía media se abordó el espacio retroperitoneal, y se realizó la disección e identificación del pedículo vascular del riñón izquierdo. Cuidadosamente, se procedió a canular la vejiga urinaria para dejar que se estabilizase, ya que al introducir la cánula se pueden producir pequeños cortes en los vasos sanguíneos de la vejiga pudiendo contaminar la muestra con sangre. El riñón derecho se ligó (tanto

el pedículo renal como el uréter) para asegurarnos que la orina recogida viniese en su totalidad del riñón perfundido. A continuación, se disecaron y separaron la arteria renal de la vena renal del riñón izquierdo y una vez aisladas se procedió a la canulación de la arteria renal. Una vez “canulada” la arteria se procedió a la perfusión con Krebs-dextrano oxigenado y atemperado (37 °C) [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 una velocidad de 3 mL/min con a una bomba de perfusión.

Rápidamente, se procedió a realizar una venotomía renal para permitir que el Krebs-dextrano saliera del riñón y no se dañara el endotelio renal. Se mantuvo la perfusión durante 60 minutos y se recogieron fracciones urinarias directamente de la cánula colocada en la vejiga urinaria cada 10 minutos, tanto 20 minutos antes como durante la perfusión con Krebs-dextrano. El esquema de este proceso está representado en la [Figura 6](#).

2.4 Diseño experimental

Sabemos que el cisplatino a una dosis tóxica de 5 mg/kg produce, 4 días después de su administración, el punto de mayor daño renal. Por otro lado, 24 horas después de una isquemia de 60 minutos con nefrectomía contralateral, se observa un daño renal evidente. En ambos casos el daño se evalúa con la medida de la CrP. En función de estos datos, se establecieron los siguientes grupos experimentales con su correspondiente diseño experimental ([Figura 7](#)):

- **Grupo control** (n=22): Animales a los que se les administró una dosis única de NaCl 0,9 % vía i.p., por ser el vehículo en el que va disuelto el cisplatino.
 - Basal (n=22): Estudios realizados en el día 0 del experimento.
 - Día 4 (n=22): Estudios realizados en el día 4 del experimento.
 - n=6 animales se utilizaron para los estudios de perfusión renal *in situ* con Krebs-dextrano.
 - n=16 animales se sacrificaron en este punto temporal para la extracción de los riñones.

- **Grupo Cisplatino (CDDP):** Animales a los que se les administró una dosis única de cisplatino a 5 mg/kg vía i.p. Estas ratas se utilizaron para el estudio de dos puntos temporales en la evolución del DRA tóxico.
 - Basal (n=21): Estudios realizados en el día 0 del experimento.
 - Día 4 (n=21): Estudios realizados en día 4 de estudio, día de máximo daño renal.
 - n=3 animales se utilizaron para los estudios de perfusión renal *in situ* con Krebs-dextrano.
 - n= 18 animales se sacrificaron en este punto para la extracción de los riñones.

- **Grupo isquemia-reperfusión (I/R):** Animales a los que se les realizó una isquemia de 60 minutos y una reperfusión posterior, con nefrectomía contralateral. Estas ratas se utilizaron para el estudio de dos puntos temporales en la evolución del DRA de tipo isquémico:
 - Basal (n=6): Estudios realizados en el día 0 del experimento.
 - Día 1 (n=6): Estudios realizados en el día 1 de estudio, día de la instauración del DRA.
 - n=3 animales se utilizaron para los estudios de reperfusión renal perfusión renal *in situ* con Krebs-dextrano.
 - n=3 animales se sacrificaron en este punto para la extracción de los riñones.

Se recogieron muestras de orina y plasma del grupo control y CDDP en los puntos de estudio: día 0 y 4, y del grupo I/R los días 0 y 1 (Figura 7.a).

En la parte inferior del esquema del diseño experimental (Figura 7.b) se representan los tiempos de recogida de la muestra de pseudo orina procedente de la vejiga durante el proceso de perfusión renal con Krebs-dextrano. Se comenzó a recoger muestras en el tiempo -20 minutos, que se corresponde con la estabilización de la vejiga. Con este procedimiento se comprueba que el circuito renal queda limpio de la orina que contenga en ese momento y que la vejiga está bien “canulada”, ya

que, si no es así, la muestra estará contaminada con sangre. A partir del tiempo 0 y hasta el minuto 60 se recogieron las fracciones urinarias, cada 10 minutos, para su posterior análisis por *Western blot*.

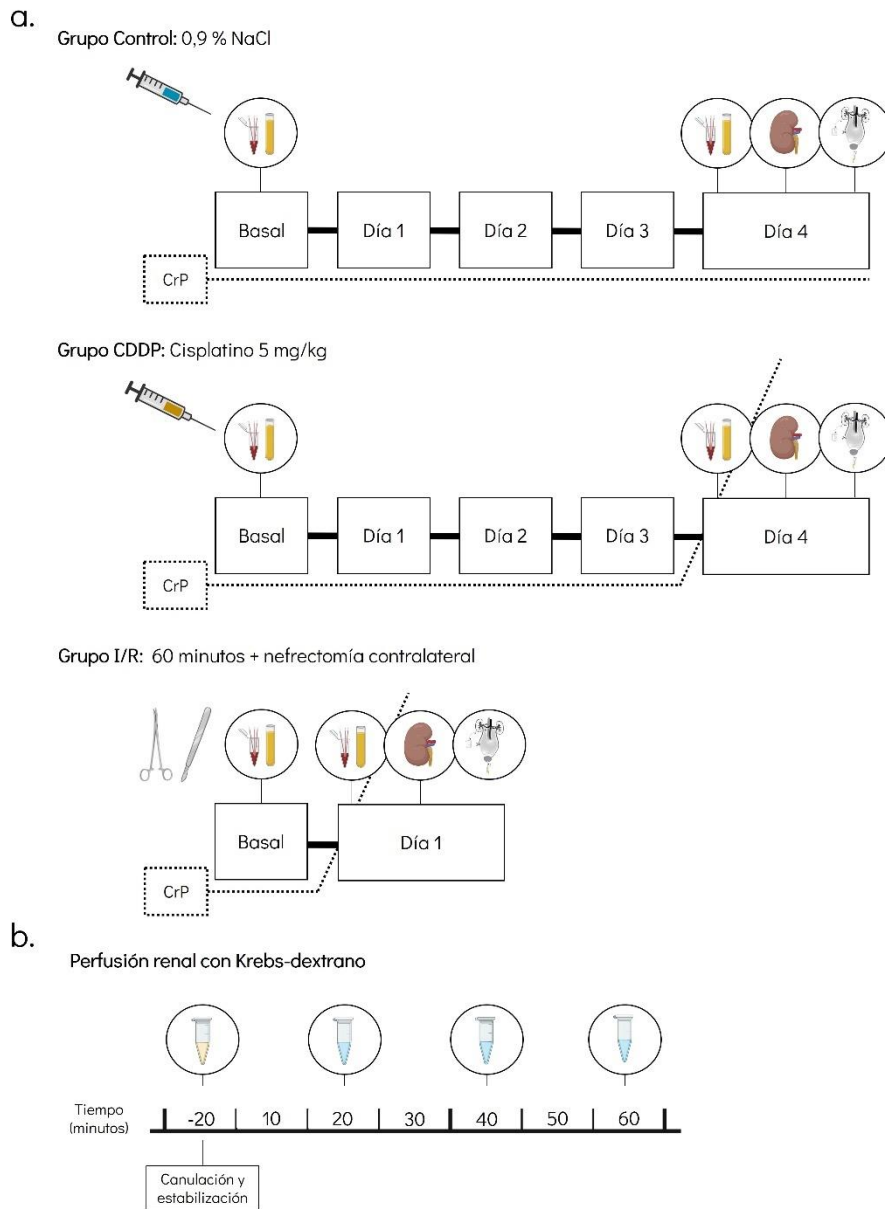


Figura 7. a. Diseño experimental de la inducción de DRA por el cisplatino y la isquemia-reperfusión. Se indican los puntos de recogida de muestras y los procedimientos realizados en el punto final de los experimentos: el riñón representa el sacrificio de los animales y la obtención de

muestras de tejido renal. Además, se representa la evolución esperada de la creatinina plasmática en los diferentes modelos de DRA y en el grupo control. CDDP: Cisplatino; CrP: creatinina plasmática; DRA: Daño renal agudo; I/R: Isquemia-reperfusión. **b. Esquema de los tiempos de recogida durante la perfusión renal con Krebs-dextrano.**

3. TÉCNICAS EXPERIMENTALES IN VIVO

3.1 Recogida y procesamiento de la orina de 24 horas: jaulas metabólicas

Para la recogida individual de la orina de 24 horas se utilizaron jaulas metabólicas (Figura 8). Este tipo de jaula permite separar la orina de las heces del animal (Kurien, Everds y Scofield, 2004). Los animales se sitúan en un habitáculo de policarbonato transparente donde disponen de comida y bebida, en este caso, *ad libitum*. El suelo del habitáculo es de rejilla, permitiendo la caída de las heces, por gravedad, a un colector; y la adhesión de la orina a la pared de un embudo que vierte el líquido recolectado a otro colector. La estancia en este tipo de estructuras es estresante para los animales ya que no pueden desarrollar su comportamiento habitual y están aislados. De forma que se realizó un periodo de acostumbramiento de 24 horas antes de la recogida de las muestras con el fin de conseguir que el animal se familiarizase con este tipo de jaula, minimizar su estrés y, con ello, la alteración de los resultados (Zymantiene *et al.*, 2015). Aun así, las jaulas metabólicas se deben utilizar el menor tiempo posible para evitar generar ansiedad y malestar a los animales (Sahin *et al.*, 2019) y la posible alteración de los resultados del estudio.

Para recoger la orina, se añadió 1 mL de aceite mineral al correspondiente colector para evitar su evaporación y 100 μ L de azida sódica al 0,1 % para evitar la contaminación bacteriana.

Una vez recogida la orina se procesó mediante centrifugación a 2000 x g durante 8 minutos a temperatura ambiente. Este proceso permite separar la orina del aceite mineral y otros elementos (restos de comida, pelos del animal, etc.) con los que se hubiera podido contaminar la muestra. Posteriormente, se midió el volumen de orina utilizando una pipeta graduada y se determinó el flujo urinario (FU), que se expresa como mL de orina en 24 horas. Por último, la muestra se almacenó en alícuotas a -80 °C hasta su análisis.



Figura 8. Jaula metabólica individual.

3.2 Recogida y procesamiento de las muestras de sangre

Para la extracción de sangre los animales se anestesiaron previamente por vía inhalatoria con isoflurano al 5 % para la inducción y al 2 % para el mantenimiento. Se canuló la vena caudal con un catéter de 25 G y se recogió la sangre con capilares heparinizados. A continuación, con la ayuda de una micropipeta, se vaciaron los capilares vertiendo su contenido a tubos eppendorf fríos de 1,5 mL. La sangre se centrifugó a 7000 x g durante 4 minutos a 4 °C. El plasma se conservó a -80 °C para su posterior análisis.

3.3 Perfusión y recogida de órganos

En los puntos de sacrificio indicados en la [Figura 7](#) se perfundió a los animales con suero salino 0,9 % heparinizado 5 UI/mL antes de extraer las muestras de tejido renal. La perfusión con suero salino heparinizado reemplaza la sangre contenida en los órganos del animal y limpia los tejidos facilitando así su estudio posterior.

Para llevar a cabo esta técnica se usó una bomba de perfusión ajustada a un flujo de 3 mL/min, similar al fisiológico, para evitar posibles alteraciones en el tejido de interés a consecuencia del método experimental. Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico 50 mg/kg vía i.p. y se colocaron en posición decúbito supino. Se realizó una laparotomía media y se retiró el paquete intestinal hacia un lado para dejar a la vista la zona que se iba a perfundir. Se expuso la arteria aorta y su bifurcación y se limpió de tejido conectivo y adiposo circunstante. Se introdujo un catéter, previamente heparinizado, en la ramificación femoral de la arteria aorta y se recogió sangre en un tubo previamente heparinizado.

Una vez terminada la extracción de sangre, se conectó el catéter a la bomba de perfusión. Inmediatamente después se cortaron las venas iliacas para abrir el circuito y se interrumpió el flujo sanguíneo anudando mediante ligadura la aorta y la vena suprarrenal. De esta forma se realizó la perfusión únicamente de los riñones, mejorando el resultado de la técnica y evitando consumir suero salino heparinizado innecesario. Una vez perfundidos, los riñones se decapsularon rápidamente para evitar la degradación de proteínas y del ARN. Uno de los riñones se incluyó en formaldehído al 3,7 % pH 7, para los estudios histológicos, y el otro riñón se ultracongeló en nitrógeno líquido y se conservó a -80 °C para su posterior análisis por diferentes técnicas.

4. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

4.1 Medida de la creatinina en el plasma y la orina. Aclaramiento de creatinina

La creatinina es una proteína procedente del metabolismo muscular. Se elimina vía renal por filtración glomerular, de forma que cuando disminuye la filtración se acumula en la sangre y 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. El aclaramiento de creatinina (CrCl) es un valor utilizado para estimar la TFG, debido a que la CrP no se reabsorbe y se secreta en pequeñas cantidades, por lo que la cantidad de creatinina que aparezca en la orina dependerá mayoritariamente de la filtración glomerular (Delanghe y Speeckaert, 2011).

Para determinar la concentración de la creatinina en el plasma y en la orina se utilizó el kit comercial *Quantichrom Creatinine Assay* siguiendo las recomendaciones del fabricante. Esta técnica se fundamenta en el método colorimétrico-cinético conocido como reacción de Jaffé (Husdan y Rapoport, 1968), según el cual la creatinina es capaz de unirse al ácido pícrico en medio alcalino y dar lugar a un complejo coloreado (complejo de Janvosky), cuya intensidad es proporcional a la concentración de la creatinina.

Para la medida de este parámetro en **plasma** se utilizaron 30 μL de la muestra y de los estándares de la recta patrón (rango 0,25-10 mg/dL de creatinina). Se añadió el volumen indicado y 200 μL de la mezcla de reactivos A y B del kit comercial (proporción 1:1) a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 490 nm inmediatamente después de añadir los reactivos (DO-0) y 5 minutos después (DO-5). En el caso de las muestras de **orina**, se utilizaron 5 μL de cada una de las muestras, previamente diluidas 1:10, y de los estándares de la recta patrón de creatinina (rango 0,25-50 mg/dL). Se añadió el volumen indicado y 200 μL de la mezcla de reactivos A, B y agua bidestilada (proporción 1:1:2) a cada pocillo, y se midió la absorbancia siguiendo los pasos explicados anteriormente. En ambos casos, se determinó la concentración de creatinina siguiendo los siguientes pasos: I. Se calculó la diferencia entre (DO-5) – (DO-0) de las muestras y de los estándares de la recta patrón; II. Se creó la recta patrón a partir de las absorbancias obtenidas para cada estándar utilizado; III. Se extrapoló la concentración de creatinina de cada una de las muestras y se tuvo en cuenta el factor de dilución en las muestras de orina. El ClCr, parámetro que estima la TFG, se calculó utilizando la siguiente fórmula:

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

Donde ClCr es el aclaramiento de creatinina, CrP es la concentración de creatinina plasmática, CrU es la concentración de creatinina urinaria, FU es el flujo urinario y TFG es la tasa de filtración glomerular.

4.2 Determinación de la urea plasmática

La urea es un metabolito hepático cuyos niveles aumentan en la sangre cuando disminuye la filtración glomerular. Para la determinación de la concentración de urea en el plasma se utilizó el kit comercial *Quantichrom Urea Assay*. Este kit comercial se fundamenta en el método colorimétrico propuesto por Jung (Jung *et al.*, 1975), que describe la reacción que se produce entre la urea y dos moléculas, el orto-ftalaldehído y el N-naftileno diamida para dar lugar a un compuesto coloreado cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración de urea. Según el protocolo comercial, se pipetearon 5 μL de las muestras de plasma previamente diluidas 1:10 en una placa de 96 pocillos y de los estándares de la recta patrón de urea (0 a 50 mg/dL). 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 espectrofotómetro a 520 nm. Tras obtener las absorbancias correspondientes a cada estándar se calculó la recta patrón y se extrapoló la concentración de urea de cada una de las muestras de plasma analizadas teniendo en cuenta el factor de dilución.

4.3 Medida del INR en sangre

La medida del ratio internacional normalizado (INR de sus siglas en inglés *International Normalized Ratio*) se utiliza principalmente para el seguimiento de pacientes bajo tratamiento anticoagulante. La prueba del tiempo de protrombina (TP) mide el tiempo que tarda en formarse un coágulo en una muestra de sangre al agregar el reactivo de tromboplastina. Este TP se convierte matemáticamente al INR utilizando dos factores de corrección principales: el TP de un individuo control y el índice de sensibilidad internacional (ISI) (Dorgalaleh *et al.*, 2021). Este parámetro se diseñó con el fin de estandarizar resultados. En este trabajo de investigación se midió el INR con el coagulómetro portátil CoaguCheck®.

El **ISI** depende del origen de la tromboplastina, y, por tanto, cada fabricante asigna un valor de este índice en función del reactivo utilizado para cada coagulómetro (Dorgalaleh *et al.*, 2021).

4.4 Medida de la concentración de proteínas en la orina

Una elevada excreción urinaria de proteínas es un indicador de una alteración renal (glomerular, tubular o ambas). Para determinar la concentración de proteínas (ConcP) en nuestras muestras, se utilizó el kit comercial *Quantichrom Protein Assay* cuya 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 es proporcional a la concentración de proteínas en las muestras.

Siguiendo el protocolo del kit, se pipetearon 10 μ L de las muestras de orina previamente diluidas 1:10, y de los estándares de una recta patrón de albúmina de suero bovino (BSA de sus siglas en inglés *Bovine Serum Albumin*) (rango 0 a 1 mg/mL) en una placa de 96 pocillos y se añadieron 200 μ L del reactivo comercial previamente diluido 1:5. Se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro. Tras obtener las absorbancias correspondientes a cada estándar de la recta, se creó la recta patrón y se extrapoló la concentración de proteínas de cada una de las muestras analizadas teniendo en cuenta el factor de dilución. Los datos se analizaron con el programa *Gen 5.0*. La concentración de proteínas en las muestras de orina de los animales 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, su excreción. Por tanto, se determinó la excreción de proteínas totales por día, con el fin de valorar si estos animales presentaban proteinuria (excreción urinaria de proteínas superior a lo normal). Se calculó según la siguiente fórmula:

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

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

5. AISLAMIENTO DE VESÍCULAS URINARIAS

5.1 Método de aislamiento por precipitación

Para el aislamiento de vesículas procedentes de la orina se utilizó el kit comercial *Exo-Quick-TC PLUS™*. Este kit se basa en un método de precipitación donde los polímeros son capaces de precipitar VE urinarias mediante ultracentrifugación a baja velocidad (<20 000 g) (Merchant *et al.*, 2017).

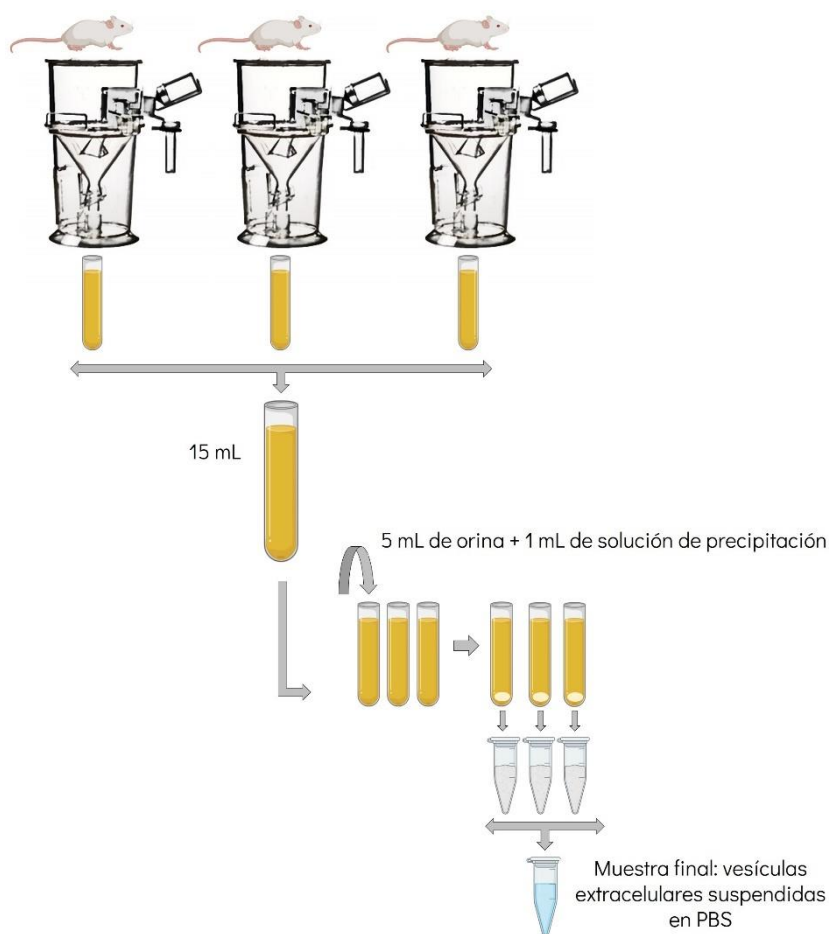


Figura 9. Etapas del proceso de aislamiento de las VE urinarias por el método de precipitación. CDDP: Cisplatino 5 mg/kg; PBS: Tampón fosfato salino (de sus siglas en inglés Phosphate Buffered Saline).

Para este procedimiento se utilizó un total de 15 mL de orina por grupo experimental. Ante el reducido FU de algunos animales, que impedía llegar al volumen indicado para obtener una cantidad de vesículas aceptable, se mezcló el 90 % de la orina excretada de cada uno de los animales del mismo grupo, para formar una combinación única de orina del grupo control y otra del grupo CDDP. Los 15 mL iniciales fueron divididos en 3 tubos de 5 mL y a cada tubo se le añadió 1 mL de la solución de precipitación (Figura 9).

Después de una incubación a 4 °C durante toda la noche, se centrifugó la mezcla a 1500 x g durante 30 minutos a 4 °C. De este proceso se obtuvo un precipitado de aspecto blanquecino que se resuspendió, después de retirar los restos de fluido no servibles, en 250 µl de una solución de resuspensión y se añadió a las columnas con microesferas que fueron hidratadas previamente según las instrucciones del fabricante. De forma que, a cada columna se le añadieron las vesículas procedentes de 1 solo tubo inicial de orina. A continuación, se incubaron las microesferas purificadoras con la muestra durante 15 minutos en un agitador de noria y, por último, se centrifugó la mezcla a 8000 x g durante 5 minutos. El sobrenadante contenía las VE que se utilizaron para los análisis posteriores por *Nanosight*, Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y nanoproteómica.

5.2 Método de aislamiento por cromatografía de exclusión por tamaño

El aislamiento de vesículas de la orina de ratas individuales se llevó a cabo utilizando el kit comercial *ExoUrine™EV Isolation*. Este kit se basa en la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC de sus siglas en inglés *Size Exclusion Chromatography*). En esta técnica se utiliza una columna de resina porosa (denominada fase estacionaria) capaz de separar las moléculas por tamaño gracias al diámetro de sus poros, que son capaces de atrapar las moléculas más pequeñas. Las moléculas de mayor dimensión, por el contrario, al no ser capaces de adherirse al poro son arrastradas por la fase móvil eluyéndose en primer lugar (Yi Zhang *et al.*, 2020).

Se necesitaron 1,5 mL de orina de cada animal. La muestra se procesó previamente con una primera centrifugación a 200 x g durante 10 minutos y una segunda a 1800 x g durante 10 minutos.

En primer lugar, se añadió la resina y un filtro en la columna. A continuación, se añadieron 10 mL de solución de equilibrio para hidratar la resina y una vez hidratada, se añadió la muestra de orina suplementada con 75 μ L de reactivo A y 75 μ L de reactivo B. Una vez que la resina absorbió toda la muestra, se añadieron de nuevo 10 mL de solución de equilibrio. Los primeros 8 mL fueron desechados y se recogieron los 2 mL siguientes como la fracción que contenía las VE purificadas. La muestra obtenida se utilizó para su análisis posterior por *Nanosight* y *Western blot*.

6. NANOSIGHT

Para el análisis de la distribución de tamaños y de la concentración de las vesículas obtenidas por las diferentes técnicas de aislamiento se utilizó el *Nanosight NS300* (Servicio Científico- Técnico del Institut de Ciència de Materials de Barcelona-CSIC).

El *Nanosight* es un equipo que utiliza la dispersión de luz y el movimiento Browniano para obtener mediciones de concentración y distribución del tamaño de las partículas en una suspensión líquida, en este caso nuestras nanopartículas se encontraban en una solución similar al PBS. La muestra es atravesada por un rayo láser, y las partículas en suspensión en el camino de este haz, dispersan la luz de tal manera que pueden verse a través de un microscopio en el que está acoplada una cámara que, captura un video de las partículas en su movimiento Browniano natural. El *software* incorporado en el equipo rastrea las partículas individualmente y utilizando la ecuación de Stokes-Einstein calcula el diámetro hidrodinámico de cada una de ellas.

7. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

La preparación y la observación de la muestra se realizó en el Servicio de Microscopía de la Universidad de Salamanca.

Para la caracterización de las VE aisladas por el método de precipitación se utilizó la técnica e TEM. En primer lugar, se realizó una tinción negativa de las

muestras. Después, se colocó *parafilm* en una placa Petri, y sobre él, 40 μ l de muestra teñida. A continuación, se depositó sobre la suspensión a contrastar una rejilla con una película *Formvar* y se incubó durante 4 minutos. Se lavó 2 veces con agua destilada y se secó. Una vez seca la preparación se añadió sobre ella una gota de acetato de uranilo 2 % y se dejó secar. Las imágenes fueron capturadas por un Microscopio electrónico de Transmisión *Tecnai Spirit Twin a 120 kv*.

8. NANOPROTEÓMICA

La nanoproteómica se ha convertido en el método de elección para identificar proteínas y cuantificar los cambios dinámicos en los niveles de expresión de nanopartículas (Zhu *et al.*, 2018). Esta técnica nos permite la identificación de posibles biomarcadores de DRA que estén contenidos en la fracción vesicular de la orina.

8.1 Lisado de las VE y determinación de la concentración de proteínas

El volumen de muestra restante, que procedía de la mezcla de orinas de diferentes animales del mismo grupo, que no se utilizó para las técnicas de caracterización de las VE, se lisó. Para ello se utilizó un tampón de lisis (Tris base 20 mM, pH 7,5, NaCl 140 mM, EDTA 50 mM, glicerol al 10 % e IGEPAL CA-630 al 1 %), suplementado con inhibidores de proteasas (aprotinina 1 mg/mL, leupeptina 1 mg/mL y fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF) 100 mM) y de fosfatasa (NaF 0,5 M y Na_3VO_4 100 mM) y posteriormente se sometió a ultrasonidos durante 15 minutos para descomponer al máximo las vesículas y que su contenido se vertiera.

La ConcP de los lisados se midió con el kit comercial *Quantichrom Protein Assay* y los datos se analizaron con el programa *Gen 5.0*. En este caso la muestra no se diluyó y se siguió el mismo procedimiento descrito en el apartado 4.2.

8.2 Preparación de la muestra y electroforesis

El análisis nanoproteómico requería 70 μ g de proteína vesicular por cada grupo experimental. Las proteínas de cada grupo se separaron en un gel diferente de acrilamida para su posterior tinción.

La baja ConcP de las muestras hizo que el volumen a cargar en el gel de acrilamida fuera muy alto, de modo que se utilizaron geles de acrilamida caseros de 5 pocillos para que el gel pudiera albergar el volumen requerido. Se prepararon 2 geles del 10 % de acrilamida (Tris base 0,4 M, pH 8,8, persulfato de amonio (APS de sus siglas en inglés *Ammonium PerSulfate*) al 0,1 %, TEMED al 0,08 % y acrilamida diluida al 10 %) y en cada uno de los pocillos de los geles se cargaron 14 μg de muestra, a las cuales se les añadió el tampón de carga de Laemmli (Tris 125 mM, glicerol al 10 %, dodecil sulfato sódico (SDS de sus siglas en inglés *Sodium Dodecyl Sulphate*) 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 (Laemmly, 1970).

La electroforesis se realizó en cubetas *Mini-PROTEAN@III*. Los geles estaban sumergidos en un tampón de electroforesis (Tris 25 mM, Glicina 192 mM pH 8,3, SDS al 0,1%), que favorece el proceso; el SDS se une a las proteínas y enmascara su carga positiva, de forma que, las cargadas negativamente se desplazan hacia el polo positivo separándose únicamente por su peso molecular. La electroforesis se paró cuando la muestra había entrado por completo en el gel separador.

8.3 Tinción con azul de Coomassie

Para que las bandas de proteínas fueran más fáciles de identificar cuando se fueran a digerir para el análisis nanoproteómico, los geles obtenidos se tiñeron con Azul de Coomassie. Esta tinción se basa en la unión no específica del tinte azul a las proteínas que, tras ser separadas por electroforesis, se fijan y tiñen simultáneamente. Las proteínas se detectan como una banda azul sobre un fondo claro (Wilson, 1983).

Para la fijación y tinción de las proteínas, los geles se incubaron con una solución fijadora de metanol al 50 %, ácido acético al 10 % y agua destilada durante 2 horas. Después se añadió la solución de azul de Coomassie R 250 al 0,05 % y se tuvo en agitación durante 4 horas. El último paso fue la decoloración del gel con una solución de metanol al 5 % y de ácido acético al 7 % para eliminar el exceso de tinte. Los geles se conservaron en ácido acético al 7 % y a 4 °C hasta el análisis nanoproteómico. El aspecto de los geles después de la tinción se puede observar en la [Figura 10](#).

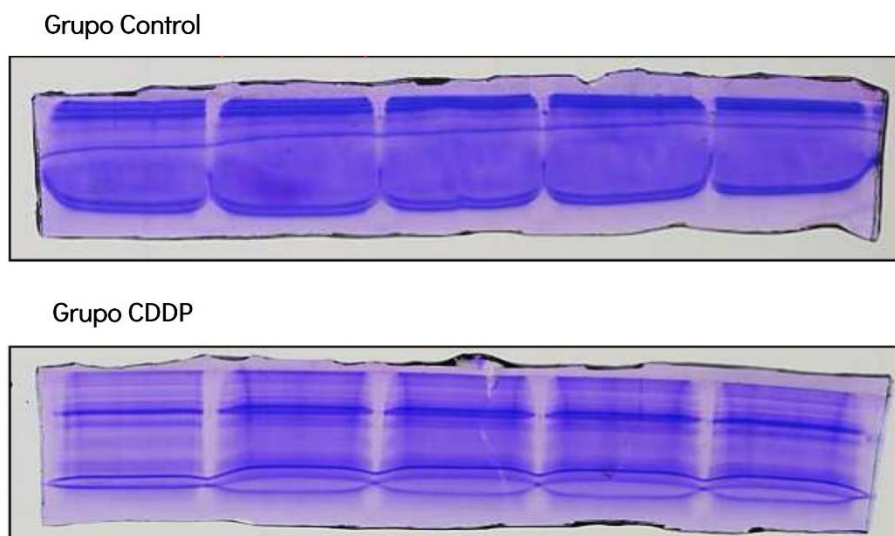


Figura 10. Aspecto de los geles de acrilamida después de la tinción con azul de Coomassie. Cada gel contiene los lisados vesiculares procedentes de la orina de los diferentes grupos experimentales. Las bandas de color azul más intenso corresponden a las analizadas por nanoproteómica.

8.4 Digestión de las proteínas contenidas en el gel de acrilamida

Para la digestión de las proteínas incluidas en los geles teñidos se cortaron las bandas de color azul más intenso de cada gel en 5 fragmentos y se digirieron con tripsina siguiendo el método de Shevchenko (Shevchenko *et al.*, 2006).

Los fragmentos cortados se destiñeron con acetonitrilo al 50 % y bicarbonato de amonio 50 mM. La reducción y la alquilación de proteínas se realizó con ditioneitol 10 mM y yodoacetamida 55 mM. Para la digestión de las proteínas se usó tripsina (6,25 ng/mL). La solución de péptidos resultante se acidificó con ácido trifluoroacético al 0,1 % y se desaló utilizando columnas *C18-Stage-Tips*. Las muestras se secaron parcialmente y se

LC-MS/MS es una combinación de cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem. Se utiliza para la identificación y cuantificación de las proteínas que hay en una muestra, mediante analizadores de masas que funcionan en serie para un resultado más óptimo (Domon y Aebersold, 2006)

almacenaron a - 20 °C hasta que se analizaron por **LC-MS/MS** (de sus siglas en inglés *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*).

8.5 Análisis LC-MS/MS

Esta técnica implica la separación física de analitos en una muestra líquida seguida de su detección basada en masas. En nuestro caso nos informará de las proteínas más abundantes contenidas en los lisados vesiculares de ambos grupos. Para el análisis LC-MS/MS de fase inversa se utilizó un sistema *nanoUPLC* acoplado a un espectrómetro de masas *LTQ Orbitrap XL* con una fuente de iones de *nanoelectrospray*.

Los datos obtenidos se procesaron en el programa informático *PeptideShaker* y se analizaron con la base de datos *UniProt* como referencia.

9. INGENUITY PATHWAY ANALYSIS (IPA)

El análisis de datos obtenidos a partir de la LC-MS/MS se realizó en colaboración con el *UCD (University College Dublin) Conway Institute* de Irlanda. Para ello se utilizó el *software Ingenuity Pathway Analysis® (IPA)*.

Se trata de un programa informático que alberga una gran colección estructurada de observaciones en varios contextos experimentales. La información que contiene ha sido seleccionada manualmente de la literatura biomédica o integrada a partir de bases de datos de terceros. De esta forma cuando el usuario carga los datos obtenidos en sus estudios “ómicos”, gracias a algoritmos, el programa los coteja con los suyos. De esta forma, es capaz de interpretar los datos en el contexto de procesos, vías y redes biológicas. En nuestro caso, nos permitió contextualizar las proteínas identificadas por nanoproteómica en diferentes procesos biológicos, vías canónicas y redes en las que estaban implicadas. La significación de las biofunciones y las vías canónicas se evaluó mediante el *p valor*.

10. CULTIVOS CELULARES

Los cultivos celulares se realizaron en una campana de flujo laminar vertical *Gelair TC-48* con material estéril. Los cultivos se mantuvieron en un incubador en atmósfera húmeda, a 37 °C con 5 % de CO₂.

10.1 Línea celular inmortalizada de células epiteliales renales de rata

Para este estudio se usó la línea celular NRK-52E (Figura 11). Se trata de una línea inmortalizada de tipo epitelial de túbulo proximal de rata (*Rattus norvergicus*).

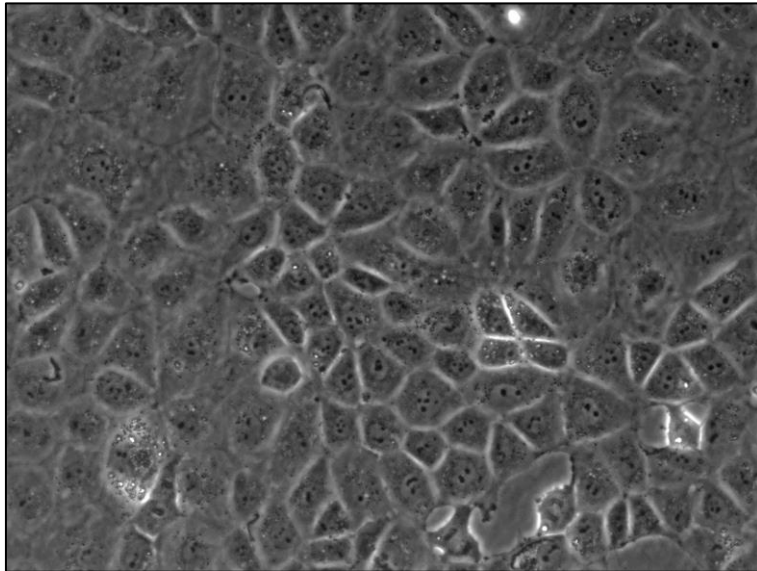


Figura 11. Células epiteliales renales NRK-52E en cultivo. Magnificación original: 400X.

Mantenimiento de las células

Las células se cultivaron en placas de 100 mm y se mantuvieron a 37 °C con medio de cultivo DMEM/F-12 suplementado con 500 UI/mL de penicilina, 50 mg/mL de estreptomicina, L-Glutamina 1 % y FBS sin inactivar al 10 % (de sus siglas en inglés, *Fetal Bovine Serum*). Los pases se realizaron a una dilución 1:5-1:20 en función de la confluencia cada 48 horas.

10.2 Técnicas básicas de cultivos celulares

Preservación de las células

Para **congelar** las células, en primer lugar, se tripsinizaron y centrifugaron como se describe en el apartado 10.2.2. Seguidamente, se resuspendieron en 0,9 mL de FBS frío sin inactivar y se pasaron a un vial de criopreservación. A continuación, cuidadosamente se añadió al vial 0,9 mL más de FBS frío sin inactivar con dimetil sulfóxido (DMSO) al 20 % para que la concentración final del DMSO fuera del 10 %. El criovial se almacenó dentro de un recipiente relleno de isopropanol en el que la temperatura va disminuyendo lenta y gradualmente siguiendo un gradiente de 1 °C por minuto cuando se introduce en un ultracongelador a - 80 °C. Después de 24 horas, las células se almacenaron en un tanque de nitrógeno líquido a - 196 °C. Se congela una placa de 100 mm confluyente por cada criovial.

Para **descongelar** las células almacenadas en criotubos se introdujo el vial en un baño de agua a 37 °C y, cuando las células se despegaron de la pared del tubo, éstas se transfirieron rápidamente a 10 mL de medio de cultivo a 37 °C para diluir rápidamente el DMSO presente en el medio de congelación. Se centrifugó la suspensión celular a 600 x g durante 3 minutos y el precipitado se resuspendió en 5 mL de medio de cultivo DMEM/F-12. Las células resuspendidas se pasaron a una placa Petri a la cual se le añadieron 5 mL más de medio.

Tripsinización celular

Las células utilizadas son adherentes, por lo que para su mantenimiento y utilización en ensayos se necesita despegarlas de la placa, para ello se utilizó la técnica de la tripsinización celular. Después de retirar el medio y lavar con PBS 1X, se añadió Tripsina-EDTA 0,05 % para romper los enlaces de cationes divalentes que unen las células a la superficie de la placa. La acción de la tripsina se detuvo aproximadamente a los 3 minutos con medio de cultivo caliente, y las células se transfirieron a un tubo estéril. La suspensión celular se centrifugó a 600 x g durante 3 minutos y el precipitado se resuspendió en la cantidad adecuada de medio de cultivo para hacer una resiembra o si el experimento lo requería, se procedió al recuento celular.

Recuento celular

Después de despegar las células, una muestra de la suspensión celular se mezcló en proporción 1:1 con azul de Trypan. Este colorante es capaz de penetrar en la membrana de células muertas o dañadas, pero no de células vivas, que se observan refringentes sobre el fondo azul del medio. A continuación, se depositaron 10 μ L de esta mezcla en una cámara de Neubauer previamente cubierta con un cubreobjetos y se procedió al conteo de los 4 cuadrantes. Después de la suma de las células de cada cuadrante, se hicieron los cálculos necesarios para obtener el número de células por mL.

10.3 Tratamiento con cisplatino

Para analizar la expresión de las proteínas identificadas por nanoproteómica en las células y en su medio de cultivo, se realizó un ensayo que intentaba simular los experimentos realizados *in vivo*. Se utilizó el cisplatino como fármaco citotóxico.

La concentración de cisplatino que se determinó como la más idónea fue la de 60 μ M. Las placas de 100 mm se sembraron con el mismo número de células ($5,25 \times 10^5$), ya que este número permitía que la placa estuviera a una confluencia de aproximadamente el 80 % al día siguiente. Pasadas 24 horas, después de retirar el medio, todas las placas se lavaron con PBS 1X y se les añadieron 6 mL de medio 0 % FBS, para que ningún componente del suero interfiriera en los experimentos a realizar. La cantidad correspondiente de cisplatino se disolvió en medio de cultivo a 37 °C para conseguir una solución madre a una concentración de 3 nM. De esta solución se cogió el volumen necesario para que mezclado con el medio de cultivo las placas de 100 mm quedaran a una concentración final del fármaco de 60 μ M. Las placas se dejaron en incubación a 37°C con 5 % de CO₂ durante 18 horas.

10.3.1 Ensayo de viabilidad celular

Para comprobar la efectividad del tratamiento con el cisplatino se realizó un ensayo de viabilidad celular mediante el método del MTT.

Este método se basa en la relación directa (en un determinado rango lineal) entre la cantidad de células metabólicamente activas (vivas) existentes en un cultivo, y la cantidad de formazán (sustancia de color morado azulado) que producen cuando se incuban con el sustrato amarillento MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio] (Mosmann, 1983). El viraje de color del medio de cultivo del amarillo, debido a la sal de tetrazolio, al morado (debido a los cristales de formazán) por parte de las células que producen nicotinamida adenina dinucleótido o nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (cofactores necesarios en esta reacción de reducción), se cuantifica espectrofotométricamente mediante la determinación de la absorbancia a 595 nm.

Finalizado el tiempo de tratamiento (18 horas) se añadieron al medio de cultivo, en condiciones estériles, 600 μ L de MTT (5 mg/mL en solución salina tamponada de PBS preparado según las especificaciones del fabricante). Tras 4 horas de incubación a 37 °C en atmósfera de 5 % de CO₂ y 95 % aire, donde las células vivas pudieron transformar el MTT a formazán, se añadieron 6 mL de SDS al 10 % en HCl 0,01 M para disolver los cristales de formazán producidos en el medio de cultivo. Todo ello se incubó durante toda la noche (o/n de sus siglas en inglés *over night*) a 37 °C en las mismas condiciones atmosféricas anteriormente descritas. Pasados 2 días, se comprobó que los cristales estuvieran bien disueltos y se cuantificó la absorbancia a 595 nm con un espectrofotómetro. Un mayor número de células metabólicamente activas se corresponde con una mayor cantidad de cristales de formazán y, por lo tanto, con una mayor absorbancia.

10.3.2 Ensayo de muerte celular

Para este experimento se sembraron 3×10^5 células en placas de 60 mm, este número permitía que las células estuvieran confluentes al día siguiente. Pasadas 24 horas, se retiró el medio, se lavaron con PBS1X y se añadió el volumen necesario de una solución madre de cisplatino 3nM para obtener la concentración elegida (60 μ M), como se describe en el apartado 10.3. El volumen final de medio de cultivo en las placas fue de 3 mL.

Con la ayuda una cámara acoplada a un Microscopio de fluorescencia *Axiovert 200M*, se tomaron fotografías cada 5 minutos durante las 18 horas de

tratamiento con cisplatino. Las células se mantuvieron en todo momento en una atmósfera húmeda, a 37 °C y 5 % de CO₂.

11. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOT

La técnica de *Western blot* se utiliza para detectar proteínas específicas en una muestra. Esto se consigue gracias a la separación de las proteínas de dicha muestra en un gel de poliacrilamida en función de su peso molecular y su posterior transferencia a una membrana. En la membrana, las proteínas son reconocidas por anticuerpos específicos (anticuerpos primarios) que reaccionan con los anticuerpos secundarios conjugados con la enzima HRP (enzima peroxidasa de rábano picante de sus siglas en inglés *Horseradish Peroxidase*); esta enzima al reaccionar con su sustrato (por ejemplo, el luminol al que oxida en presencia de peróxido de hidrógeno) produce una reacción fácilmente detectable y relativamente proporcional a la cantidad de proteína de la muestra (Gallagher *et al.*, 2008). El esquema de todo el proceso de la técnica se puede observar en la [Figura 12](#).

En este trabajo de investigación se ha usado esta técnica para detectar proteínas en muestras de orina, tejido, medio de cultivo, extracto celular y extracto vesicular procedente de la orina.

11.1 Obtención de los extractos de proteínas

Para la **extracción de proteínas tisulares** se pulverizaron los riñones en hielo seco y se pesaron 20-30 mg del tejido pulverizado. Se lisó el tejido con 1 mL de tampón de lisis por 100 mg de tejido (composición descrita en el apartado 8.1), suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (composición descrita en el apartado 8.1). Con la ayuda de un politrón *Ultra-turrax T8* se procedió a la homogenización de las muestras. Todo el proceso descrito se llevó a cabo en frío para evitar la degradación de las proteínas de las muestras.

Para la obtención de **extractos proteicos celulares** se trabajó con las células en un estado de semiconfluencia (aproximadamente de un 80 %). Las placas con las células cultivadas se colocaron sobre hielo para ralentizar la degradación celular. Se

lavaron con PBS 1X frío y se lisaron con el mismo tampón de lisis frío utilizado en el tejido, suplementado con los inhibidores de proteasas y fosfatasa anteriormente indicados. Se lisó la muestra con el uso de rascadores.

En ambos casos el lisado se centrifugó a 14 000 x g a 4 °C durante 20 minutos. Después de la centrifugación se recogió el sobrenadante (extracto de proteínas) y las muestras se almacenaron a - 80 °C hasta su uso.

Para el **lisado de vesículas extracelulares** procedentes de la orina de ratas se utilizó el mismo procedimiento que se describe en el apartado 8.1.

11.2 Determinación de la concentración de proteínas

Para la cuantificación de la ConcP del extracto celular y de tejido se utilizó el kit comercial colorimétrico *DC™ Protein Assay*, basado en el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

Previamente, se hizo una dilución 1:20 (del extracto de tejido) y 1:2 (del extracto celular). En una placa de 96 pocillos se hizo reaccionar cada muestra (5 µL), así como cada uno de los estándares de la recta patrón de concentraciones conocidas (0-1 mg/mL de BSA) con los reactivos del kit (25 µL de la mezcla de reactivos A+S y 200 µL de reactivo B). Inmediatamente, se midió la absorbancia del producto de reacción a 720 nm en un espectrofotómetro 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.

Para la determinación de la ConcP del medio de cultivo y del lisado de VE se utilizó el kit *comercial Quantichrom Protein Assay* cuya técnica de análisis, como se ha descrito en el apartado 4.4 se basa en el método colorimétrico de Bradford. Las muestras de medio de cultivo se concentraron previamente utilizando las columnas comerciales de *Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Unit*. En este caso las muestras no se diluyeron para su análisis. Se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro y los datos se analizaron con el programa *Gen 5.0* para obtener la recta patrón y extrapolar la ConcP de cada una de las muestras analizadas.

11.3 Preparación de las muestras, electroforesis y transferencia

Para la preparación de las **muestras de orina**, primero se determinó el volumen de orina a cargar en función del FU diario correspondiente a cada animal. De manera que la cantidad de orina cargada fue proporcional al FU en relación 1:1000. El volumen determinado se completó con H₂O bidestilada hasta 21 μ L. El volumen de **medio de cultivo** y de los **lisados tisulares, celulares y vesiculares** que se cargaron en el gel fue en función de la ConcP.

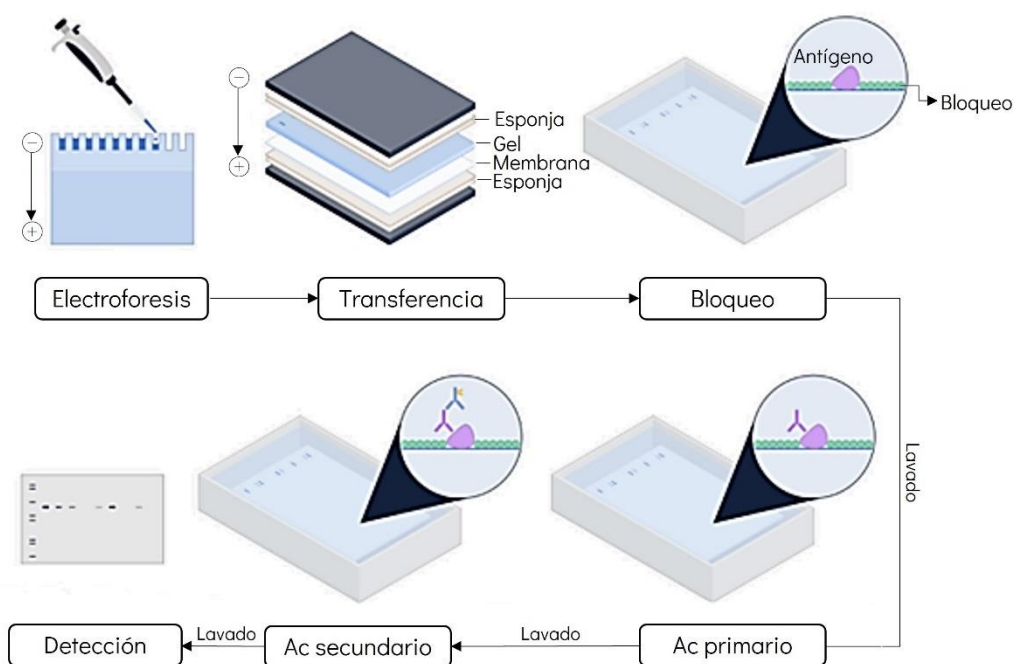


Figura 12. Representación de los pasos generales de la técnica Western blot. Ac: anticuerpo.

Las muestras se prepararon en condiciones desnaturizantes y reductoras con el fin de deshacer su estructura tridimensional. Para ello, se añadió a las muestras el tampón de carga Laemmli, cuya composición se describe en el apartado 8.1, y se hirvieron a 100 °C durante 5 minutos (Laemmly, 1970). Las proteínas se separaron mediante electroforesis vertical en geles comerciales de acrilamida 4–20% *Criterion™ TGX™ Precast Midi Protein Gel*. Este paso se realizó en cubetas *Criterion™ Vertical Electrophoresis Cell* donde el gel se encontraba sumergido en un tampón de electroforesis cuya composición se cita en el apartado 8.1. En uno de los

pocillos del gel se cargó el marcador de proteínas de pesos moleculares conocidos *PageRuler™*.

Una vez que las proteínas se separaron por su tamaño se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF de sus siglas en inglés *Polyvinylidene Difluoride*) para facilitar su detección por los anticuerpos en los pasos siguientes. Se utilizó el método de transferencia semiseca: se montó un “sándwich” poniendo en contacto el gel con la membrana y colocando una esponja sobre el gel y otra sobre la membrana y se humedeció con tampón de transferencia *1x Transfer Buffer*. Para la transferencia se utilizó el equipo *Trans-blot® Turbo* que permite el paso de una corriente eléctrica a través del gel haciendo que las proteínas migren del polo negativo, donde se encuentra el gel, hacia el polo positivo donde se encuentra la membrana quedando atrapadas en ésta.

11.4 Bloqueo e incubación con los anticuerpos

Una vez finalizada la transferencia, para evitar uniones inespecíficas durante la inmunodetección se procedió al bloqueo. Para ello se incubó en agitación la membrana con tampón de bloqueo, BSA en tampón de lavado salino tamponado con fosfato (PBS 1X y Tween-20). A continuación, se incubó la membrana bloqueada con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C en agitación. Seguidamente, se lavó la membrana con tampón de lavado 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 1-2 horas a temperatura ambiente en agitación. Las [Tablas 3 y 4](#) muestran los anticuerpos primarios y secundarios utilizados y su dilución.

Anticuerpo primario	Referencia	Casa Comercial	Dilución	% BSA	Tiempo
Ac de ratón anti-PAI-1	612025	BD Biosciencias	1:500	1%	4° o/n
Ac de ratón anti-GAPDH	AM4300	Ambion	1: 40 000	1%	4° o/n

Tabla 3. Anticuerpos primarios utilizados en el Western blot. Ac: anticuerpo; BSA: albúmina de suero bovino (de sus siglas en inglés *Bovine Serum Albumine*); GAPDH: enzima Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa; o/n: toda la noche (de sus siglas en inglés *over night*); PAI-1: inhibidor del activador de plasminógeno -1 (de sus siglas en inglés *Plasminogen Activator Inhibitor-1*).

Anticuerpo Secundario	Referencia	Casa Comercial	Dilución	% BSA	Tiempo
Cabra anti- conejo IgG (H+L)-HRP	4052-05	Southern Biotech	1:5000	3 %	2h RT
Cabra anti- ratón IgG (H+L)- HRP	1034-05	Southern Biotech	1:5000	3 %	2h RT

Tabla 4. Anticuerpos secundarios utilizados en el Western blot. BSA: albúmina de suero bovino (de sus siglas en inglés Bovine Serum Albumine); HRP: enzima peroxidasa de rábano picante (de sus siglas en inglés Horseradish Peroxidase); IgG: inmunoglobulina G; RT: temperatura ambiente (de sus siglas en inglés Room Temperature).

11.5 Revelado

Para la detección de la señal emitida por el anticuerpo secundario, se utilizó una solución de ECL (Tris-HCl 1M, pH 9,35; luminol 2,2 mM, iodofenol 2,2 mM) suplementada con H₂O₂ al 0,03-0,06 %. La enzima HRP unida al anticuerpo secundario cataliza el 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 se unirá a mayor cantidad de anticuerpo y habrá más catálisis enzimática. La quimioluminiscencia emitida se detectó con el equipo *ChemiDoc™ MP imager* y las imágenes resultantes se cuantificaron con el *software Image Lab 6.0.1*.

12. ANÁLISIS DEL NIVEL DE EXPRESIÓN GÉNICA: PCR A TIEMPO REAL

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR de sus siglas en inglés *Polymerase chain reaction*), es una técnica que permite la amplificación de una determinada región del ADN gracias a la utilización de cebadores específicos que anillan a ambos lados de dicha región y a la capacidad de la 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). Para poder comparar la cantidad de ADN entre diferentes muestras se usa la técnica qPCR (de sus siglas en inglés *quantitative real-time PCR*), que permite la detección en tiempo real de los productos generados por PCR mediante un compuesto fluorescente.

Esta técnica se divide en 3 pasos: En primer lugar, se produce la desnaturalización, que tiene como resultado la apertura de la doble hélice de ADN. En segundo lugar, se produce el proceso de hibridación, donde los cebadores específicos se unen a las hebras de ADN. Y, por último, la elongación en la que se sintetiza la secuencia del ADN a amplificar gracias a la acción de la ADN polimerasa. Estas etapas se repiten durante sucesivos ciclos, de ahí su nombre de reacción en cadena, dando lugar a una amplificación exponencial del producto final (Mullis *et al.*, 1986). La amplificación de la secuencia al final de cada ciclo se puede conocer debido a la adición de un fluoróforo capaz de unirse al ADN de doble hélice cuando este se une tras la amplificación. Se requiere un *software* acoplado al termociclador para registrar la emisión de fluorescencia de cada muestra y generar una curva de amplificación sigmoidea.

En este trabajo se estudió la expresión de ARNm de las proteínas más relevantes identificadas en las VE urinarias, en el tejido renal mediante esta técnica.

12.1 Extracción del ARN del tejido renal

Para la obtención del ARN de las muestras de tejido renal extraídas y ultracongeladas según se describe en el apartado 3.3, se utilizó el kit comercial *NucleoSpin® RNA* siguiendo las indicaciones del fabricante. Esta técnica se basa en la extracción del ARN mediante cromatografía de adsorción. En condiciones nativas los ácidos nucleicos son solubles en solución acuosa ya que están recubiertos de una capa de moléculas de agua. Tras la adición de iones caotrópicos al medio, los ácidos nucleicos se recubren de una capa hidrófoba y son fácilmente retenidos en la membrana de sílica de las columnas del kit, 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.

En primer lugar, se pulverizó el tejido, se pesaron de 10 a 12 mg de este y se lisó con el tampón RA1 del kit suplementado con β -mercaptoetanol al 1 %. El lisado se filtró por unas columnas específicas, se diluyó con etanol al 70 % y se pasó a una columna capaz de retener los ácidos nucleicos en la membrana de sílica. Esta membrana se incubó con ADNasa recombinante para eliminar el ADN que pudiera permanecer en ella. Se hicieron 3 lavados para eliminar sales, metabolitos y

componentes macromoleculares y finalmente el ARN se eluyó con H₂O libre de ARNasas para 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.

12.2 Obtención del ADNc

Para el análisis de la expresión génica se necesita 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 de sus siglas en inglés *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) que permite sintetizar ADNc a partir de ARN gracias a la enzima transcriptasa reversa.

Para sintetizar ADNc se diluyó 1 µg de ARN de cada muestra con agua libre de ARNasas hasta un volumen final de 16 µL. A continuación, se añadieron 4 µL del reactivo *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 µL totales se incubaron en un termociclador *MyCycler* a 25 °C durante 5 minutos, seguidos de 30 minutos a 42 °C y 5 minutos finales a 85 °C. El ADNc obtenido se almacenó a - 20 °C.

12.3 Diseño de los cebadores

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

Se llevaron a cabo dos pruebas para verificar 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 permitió, por una parte, elegir la temperatura de anillamiento a la que mejor funcionasen los cebadores y, por otro lado, el análisis de la curva de disociación del producto de PCR

que permitió saber si se había amplificado un solo producto o había habido amplificaciones inespecíficas que invalidasen el uso de estos cebadores. Debido a la posibilidad de que dos productos de PCR de diferente longitud tuviesen una curva de disociación similar por su composición en pares de bases, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos en la PCR. De este modo, se pudo comprobar que la pareja de cebadores seleccionada ofrecía un solo producto.

Posteriormente, se comprobó la eficiencia de amplificación de la 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 ciclo umbral (Ct de sus siglas en inglés *Cycle threshold*) con la dilución de la muestra. Se consideró válida la recta con un valor de R2 superior a 0,99. Además, la eficiencia, es decir, la proporción de ADN que rendía en la reacción de PCR en cada muestra o pendiente de la recta debía estar entre el 90 y el 110 %. Un resultado positivo en ambas pruebas validaba los cebadores para su uso. La secuencia del gen analizado se recoge en la [Tabla 5](#).

Gen	Secuencia de los cebadores 5' → 3'	Tª de anillamiento
PAI- 1	CCATCTCCGTGCCCATGA	58° C

Tabla 5. Cebador de diseño propio y condiciones empleadas en la qPCR.

12.4 PCR a tiempo real

Para llevar a cabo la reacción de PCR, se mezclaron 1 µL de ADNc de cada muestra, 10 µL de la *Supermix iQ™SYBR@Green*, 0,4 µL de cada cebador y 8,2 µL de H₂O bidestilada.

Se utilizó un termociclador *iQ™ 5* con el siguiente protocolo para llevar a cabo las diferentes etapas de la reacción: 5 minutos a 95 °C, 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C (desnaturalización, etapa en la que se abre la doble hélice de ADN), 30 segundos a la temperatura de anillamiento específica (unión de los cebadores a las

hebras de ADN), 30 segundos a 72 °C (elongación). El termociclador detecta la señal fluorescente emitida, siendo esta mayor cuanto mayor es el producto de PCR.

Cuando el protocolo finalizó, se produjo un aumento en la temperatura del termociclador de 70 °C a 90 °C que conlleva la desnaturalización del ADN y un decaimiento de la señal fluorescente, obteniendo la curva de disociación del producto de PCR. Para verificar la amplificación de un solo producto, esta curva debe ser única. El *software* establece una línea horizontal que corta a las curvas de amplificación de cada muestra cuando están en su fase exponencial, denominada línea de umbral. Posteriormente, a partir de los Ct de las muestras (ciclo de amplificación de cada muestra en el que la curva de amplificación en fase exponencial corta la línea de umbral) calcula los niveles de expresión relativos de las distintas muestras de estudio. Un Ct más bajo implica que en esa muestra se alcanza antes la fase exponencial de amplificación y por tanto hay una mayor cantidad de ADN del gen analizado.

13. ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Los riñones destinados a los estudios histológicos se fijaron con formaldehído tamponado al 3,7 % durante 24 horas para evitar su degradación. Después se deshidrataron en una concentración creciente de etanol desde el 50 % hasta 100 % para permitir que la parafina pudiera penetrar posteriormente en el tejido ya que no es miscible con el agua. Tras la deshidratación, el tejido se sumergió en xileno, para sustituir el etanol y por tanto favorecer la penetración de la parafina en el siguiente paso. Finalmente, 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* 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, los cortes de tejido se desparafinaron con xileno y se rehidrataron haciéndolos pasar por una serie de graduaciones decrecientes de etanol (desde el 100 hasta el 76 %) hasta finalizar con una solución 100 % de H₂O destilada.

Para teñir las muestras se introdujo el tejido desparafinado e hidratado en hematoxilina durante 10 minutos y en eosina durante 30 segundos. Posteriormente, se deshidrató de nuevo el tejido con alcohol siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente. Tras la deshidratación, se añadió medio de montaje DPX a los portaobjetos y se colocó un cubreobjetos para proteger los cortes teñidos. Una vez secos, se observaron en un microscopio óptico *Olympus BX51* y se realizaron fotografías para su análisis. Se realizó una valoración visual del grado de daño renal en la médula externa por ser la principalmente afectada por el tratamiento con cisplatino y por la isquemia (Figura 13). Para ello, se utilizaron 5 cortes renales teñidos con hematoxilina y eosina que provenían de animales controles y 3 y 5 cortes renales con la misma tinción de ratas a las que se les realizó una I/R y tratadas con CDDP respectivamente.

14. ESTUDIO CON PACIENTES DE DRA

Se analizó la proteína PAI-1 en la orina de pacientes con DRA de diferentes etiologías con el fin de estudiar si también se asocia a este síndrome en humanos.

Consideraciones legales

Todos los protocolos fueron aprobados por el Comité de Ética local y se llevaron a cabo de acuerdo con los principios establecidos en la Declaración de Helsinki (Asamblea Médica Mundial) de 1964, el Convenio del Consejo de Europa sobre Derechos Humanos y Biomedicina, la Declaración Universal de la UNESCO sobre el Genoma Humano y Derechos Humanos de 1997, los requisitos establecidos en la legislación española en el campo de la investigación biomédica, protección de datos personales y bioética; así como lo dispuesto en la Ley 14/2007, de julio 3, de Investigación Biomédica; y RD 53/2013, de febrero.

Antes de su inclusión, todos los pacientes de este trabajo fueron informados verbalmente del estudio que se estaba realizando. Además, se les entregó una “Hoja de información al paciente”, tras su lectura cada paciente firmó el consentimiento informado.

Descripción general

Se recogieron muestras de orina de 72 voluntarios que pertenecían a la Unidad de Nefrología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander, España). De los 72 pacientes, 9 eran controles y 63 tenían un DRA cuando ingresaron. Los datos demográficos de caracterización de la función renal, diagnóstico y otros parámetros de interés, fueron cedidos por el Servicio de Nefrología del mismo hospital. La función renal se monitorizó mediante la CrP, y el DRA se definió y clasificó de acuerdo con los criterios KDIGO. La orina recogida de los pacientes se utilizó para medir la ConcP con el kit comercial *DC™ Protein Assay* cuyo procedimiento se describe en el apartado 11.2, la NAG y para la cuantificación de NGAL y PAI-1 según se indica en el siguiente apartado.

14.1 ELISA

Los niveles de PAI-1 y NGAL urinarios se midieron utilizando la técnica ELISA, acrónimo del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, que es un ensayo de inmunoabsorción enzimática que permite la detección de un antígeno presente en una muestra mediante anticuerpos que, directa o indirectamente, producen una reacción cuantificable espectrofotométricamente (Engvall y Perlmann, 1971). En la [Tabla 6](#) se muestran los ELISAS utilizados y las diluciones empleadas en cada uno de ellos.

Proteína	Nombre	Rango de detección	Dilución de muestras
NGAL	Human NGAL ELISA Kit 036CE	0,102-25 ng/mL	Sin diluir
PAI- 1	Human PAI-1 RAB0429	10-1000 pg/mL	1:2500

Tabla 6. Resumen de los kits de ELISA utilizados. Ambos kits comerciales se realizaron siguiendo las indicaciones del fabricante.

El tipo de ELISA empleado en este estudio fue de tipo “sándwich”. Se denomina así porque la proteína a detectar queda atrapada entre dos capas de anticuerpos, el de captura y el de detección. En este tipo de ELISA, la proteína a determinar queda inmovilizada en una superficie sólida mediante la unión al

anticuerpo de captura (Figura 14.2) previamente adherido al pocillo de la placa de ELISA. Una vez inmobilizada la proteína de interés, se añade un segundo anticuerpo primario conjugado con biotina, denominado anticuerpo de detección, que también se une a la proteína de interés, pero en un epítopo distinto al que lo hace el anticuerpo de captura (Figura 14.3).

Tras un periodo de incubación, se añadió la proteína estreptavidina asociada a la enzima HRP. La estreptavidina tiene gran afinidad por la biotina del anticuerpo de detección, de manera que si hay proteína en las muestras de estudio se forma el siguiente complejo de unión: anticuerpo de captura-proteína-anticuerpo de detección-HRP estreptavidina (Figura 13.4). Finalmente, la adición de un sustrato coloreado (generalmente TMB, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina) susceptible de ser modificado por esta última enzima permite obtener una señal visible por espectrofotometría (Figura 13.5).

Se midió la densidad óptica a 450 nm con un espectrofotómetro *ELx800, Bio-Tek Instruments* y los datos se analizaron con el programa *Gen 5.0*. La intensidad de color producido es directamente proporcional a la cantidad de proteína contenida en las muestras de estudio. Con la absorbancia determinada de cada uno de los calibradores de la recta estándar se creó la curva de concentraciones conocidas mediante la realización de un análisis de tipo 4PL (de sus siglas en inglés *four Parametric Logistic*), un modelo de regresión no lineal de uso común en ensayos biológicos.

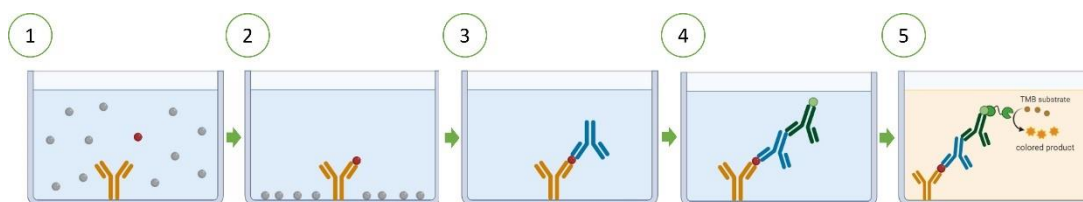


Figura 14. Representación esquemática de la técnica ELISA. Imagen adaptada de Biorender. *Colored product*: producto coloreado; *TMB substrate*: sustrato TMB.

14.2 Excreción urinaria de NAG

El marcador de daño tubular 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 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 las indicaciones de la casa comercial, se pipetearon 10 μL de las muestras de orina y de una recta patrón estándar de concentraciones conocidas de NAG (0-46,9 UI/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 que para la reacción y produce el viraje de color del compuesto formado, cuya absorbancia se midió a 505 nm en un espectrofotómetro *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 utilizando el programa *Gen 5.0*.

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

$$\text{Excreción urinaria de NAG (UI/mL)} = \frac{\text{Conc NAG (UI/mL)}}{\text{CrU (mg/mL)}}$$

Donde Conc NAG es la concentración de NAG en la orina obtenida por el kit, CrU es la concentración de la creatinina en la orina y UI son unidades internacionales de medida.

15. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En los experimentos *in vivo* se utilizaron al menos tres animales en cada grupo; en la experimentación *in vitro* se hicieron como mínimo tres experimentos independientes. Los datos se expresan como la media \pm el error estándar de la media (EEM). Para comprobar la distribución de los datos se aplicó el test estadístico Shapiro-Wilk. En el caso de datos con distribución normal, se aplicaron estudios estadísticos paramétricos, mientras que, en el de datos con distribución no normal se aplicaron estudios estadísticos no paramétricos.

Para datos normales se utilizó el test estadístico de análisis de la varianza (ANOVA) de una o doble vía para determinar las diferencias significativas entre más de dos grupos de datos. En el caso de encontrar interacción en la ANOVA de doble vía o para determinar las diferencias entre dos grupos se aplicó el test estadístico de t de Student. Se consideró 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, se empleó para las comparaciones “post hoc” el test de Dunnett o Šídák para comparar cada grupo de estudio con el grupo control.

A los datos no normales se les aplicó el test de Kruskal-Wallis para comparar un mismo grupo en los diferentes puntos de estudio. En este caso se empleó el test de Dunn’s para las comparaciones “post hoc”. Para determinar las diferencias entre dos grupos se utilizó el test estadístico de Mann Whitney. En ambos casos se consideró significativo un valor de $p < 0,05$ y altamente significativo un valor de $p < 0,01$. Para analizar la correlación de los datos de pacientes se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman.

En el análisis de los datos de qPCR, se aplicó una transformación logarítmica del valor de expresión relativa obtenido. Esto permitió transformar la distribución de los datos, con sesgo positivo, en una distribución normal. Sobre el valor transformado se aplicaron los estudios estadísticos mencionados.

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa informático *GraphPad Prism 9*.

16. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

16.1 Tabla 7. Reactivos y productos utilizados

Reactivo/Producto	Referencia	Casa comercial
Aceite mineral	141003.1211	Panreac
Ácido acético	71251	Merck
ADNasa	D5025	Merck
Agujas 25 G	9186158	Braun
Agujas 23 G	4657667	Braun
Alcohol 96°	3496629	Acofarma
Aprotinina	A-1153	Merck
APS	A3678	Merck
Azida sódica	6688	Merck
Azul de Trypan	T10282	Thermo Fisher Scientific
Bisacrilamida	161-01107	Bio-Rad
Albúmina sérica bovina	A7906	Merck
Buprex (Buprenorfina)	679588	Indivior
Coomassie brilliant blue R250	20278	Thermo Fisher Scientific
Capilares heparinizados	7301	Deltalab
Cebadores qPCR	-	Isogen Life Science
Cisplatino	P4394	Merck
Columnas AmiconUltra-0.5 Centrifugal Filter Unit	UFC500324	Merck
Crioviales	5000-0020	Thermo Fisher Scientific
Cubreobjetos	200x200	Thermo Fisher Scientific
Dieta estandarizada	AØ4	Panlab
DC™ Protein Assay (Lowry)	5000112	Bio-Rad
DMEM/F12	BE12-719F	Lonza
DMSO	154938	Merck
Dolethal (pentobarbital)	424126	Ventoquinol
Eosina surgipath	353501601	Casa Álvarez
Esponjas de transferencia	10026933	Merck

Etanol	100983	Merck
ELISA PAI-1	Ab201283	Abcam
ELISA NGAL	036CE	Bioporto
ExoQuick-TC PLUS™	EQPL10TC-1	System Biosciences
Exo-Urine™ EV Isolation Kit	EXOU100A-1	System Biosciences
Filtros de jeringa 0,2 µm	Z3559904	Merck
Formaldehído	344198	Calbiochem
Geles Criterion TGX 4-20%	5678094	Bio-Rad
Glicina	161-0724	Bio-Rad
H ₂ O ₂	H-6520	Merck
Hematoxilina de Harris	10-2332	Casa Álvarez
Heparina 5%	6547533	Hospira
IGEPAL CA-630	I3021	Merck
iQ™ SYBR® Green Supermix	1708882	Bio-Rad
iScript RT Supermix	170-8841	Bio-Rad
Isoflurano (Vetflurane)	305845	Virbac
Jeringuillas 1 mL	9161406V	Braun
Jeringuillas 2 mL	4606027V	Braun
Ketamidor®	K1NAI027	Richter Pharma
Leupeptina	L-2023	Merck
L-Glutamina	G8540	Merck
Luminol	A8511	Merck
Marcador 1kb	107-87-018	Termo Fischer Scientific
Marcador pesos moleculares PageRuler™	26616	Termo Fischer Scientific
Material quirúrgico	-	Fine Scientific Tools (F.S.T)
Membranas de PVDF	10026933	Bio-Rad
Metanol	34885	Merck
Micropipetas	-	Gibson
MTT (metil tetrazolio)	M5655	Merck
Na ₃ VO ₄	S-6508	Merck
NaCl	S3014	Merck
NaF	56776	Merck
NAG kit colorimétrico	DZ062A-K	Diazyme Laboratories

Nucleospin® RNA II	740.955	Macherey Nagel
Parafina	-	Casa Á
PBS 5X	1610780	Bio-rad
Penicilina - Estreptomina	15410-122	Termo Fischer Scientific
Pipetas de plástico de 5,10 y 25mL	-	Corning
Placas de 96 pocillos para qPCR	HSS9601	Bio-Rad
Placas de cultivos	353003	Falcon
PMSF (fluoruro de fenilmetil sulfonilo)	P-1585	Merck
Puntas micropipeta con filtro	-	Neptune
Puntas micropipeta sin filtro	200/80/16	Deltalab
Quantichrom™ Creatinine assay kit	DICT-500	BioAssay Systems
Quantichrom™ Protein assay kit	QPCR-500	BioAssay Systems
Quantichrom™ Urea assay kit	DIUR-500	BioAssay Systems
Rascadores de células	353086	Falcon
Suero bovino fetal	10270-106	Gibco
SDS	152002C	Bio-Rad
Sutura 4/0	CO765073	Braun
Sutura 6/0	CO765074	Braun
TEMED (tetrametil-etilendiamina)	142093	PanReac
Tampón de transferencia Trans- blot® turbo™	10026929	Bio-Rad
Tripsina 0,05% - EDTA 0,05 %	25300054	Gibco
Tris-glicina 10X	1610771	Bio-Rad
Tubos de plástico de 10, 15 y 20mL	-	Corning
Tubos de plástico de 2 mL	4092.7N	Deltalab
Tween-20	P7949	Merck
XILAGESIC 2% 25 ML	01CLR034	Calier
β-mercaptoetanol	M6250	Merck
4–20% Criterion™ TGX™ Precast Midi Protein Gel	5671094	Bio-Rad

16.2 Tabla 8. Equipos y aparatos utilizados

Equipos/Aparatos	Casa comercial
Agitador	Grant BOEKEL
Agitador rotatorio	Biocomp Navigator
Almohadilla eléctrica	Daga PH
Baño húmedo	Indelab
Baño seco	Termolyne, modelo 17600
Bomba de infusión	Dinko Instruments
Campana de flujo laminar vertical Gelaire TC-48	Flow Laboratories
Centrífugas	Eppendorf
ChemiDoc™ MP Imagen	Bio-Rad
Cubetas Criterion™ Vertical Electrophoresis Cell	Bio-Rad
Cubetas Mini-PROTEAN®III	Bio-Rad
Espectrofotómetro Biotek Epoch	Bio Tek
Espectrómetro de masas LTQ Orbitrap XL	Thermo Fisher Scientific
Equipo de electroforesis Sub-Cell GT Wide Mini	Bio-Rad
Incubador de células Forma Scientific 3111	Thermo Fisher Scientific
Estufa	BioTek
Fuente de alimentación Power Pac 3000	Bio-Rad
Fuente de iones de nanoelectrospray	Proxeon Biosystems
Jaulas metabólicas	Panlab
Lector de placas ELISA Elx800	BioTek
Máquina anestesia inhalatoria	MSS Isoflurane
Máquina de rasurar Golden A5	Oster
Microscopio electrónico de Transmisión Tecnai Spirit Twin 120 kv	-
Microscopio de fluorescencia Axiovert 200M	Carl Zeiss
MyCycler™ Bio-Rad	Bio-Rad
Nanodrop (ND-1000)	Thermo Fisher Scientific
Nanosight NS300	Malvern Panalytical
NanoUPLC nanoAcquity	Waters
Politrón Ultra-turrax T8	IKA Labortechnik

Sonicador	J.P Selecta
Soporte agitador rotatorio	Biocomp Navigator
Termociclador iQ™ 5	Bio-Rad
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad
Transiluminador GelDoc	Bio-Rad
Ultracongelador	Thermo Fisher Scientific

16.3 Tabla 9. Programas informáticos utilizados

Programas/Software informáticos	Casa comercial
Axiovision Rel 4.8	Zeiss
Image Lab 6.1 software	Bio-Rad
Ingenuity Pathway Analysis	Qiagen
DP Controller	Olympus
Gen 5.0	Bio-Tek
GraphPad Prism 9	GraphPad
iQ™ 5 Optical System Software	Bio-Rad
Mendeley Desktop	Mendeley
Microsoft Excel 2016	Microsoft
Microsoft Word 2016	Microsoft
Primer Blast	NCBI (<i>National Center Biotechnology Information</i>)
Quantity One	Bio-Rad

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

BLOQUE I: MODELOS EXPERIMENTALES DE DRA

A pesar de las mejoras significativas en la comprensión de la fisiopatología y el manejo del DRA, su incidencia, su gravedad, la necesidad de TRR y sus consecuencias se han mantenido similares en los últimos años. Dentro de los tipos de daño renal, uno de los más comunes es el intrínseco (Farrar, 2018). Frecuentemente este daño causa una NTA que implica la destrucción de las células epiteliales de los túbulos. La isquemia grave, que conlleva la interrupción del aporte de oxígeno y nutrientes a las células o las toxinas o fármacos que alteran los procesos renales (Guyton y Hall, 2016) como el antineoplásico cisplatino, ampliamente utilizado para la terapia contra una gran variedad de tumores sólidos (Kelland, 1993; Wang y Lippard, 2005; Jaggi y Singh, 2012) son algunos casos comunes que producen necrosis tubular.

1. EL CISPLATINO Y LA ISQUEMIA PRODUCEN DRA

1.2 Caracterización funcional del DRA

Para diagnóstico del DRA en clínica se han generado y consensuado las guías de clasificación RIFLE, AKIN y KDIGO, todas ellas basadas principalmente en la interpretación de los valores de la concentración de la CrP (Rahman, Shad y Smith, 2012). Por ello, en este trabajo se midió este parámetro con el fin de evaluar el desarrollo de la función renal en los modelos animales generados.

Según la escala KDIGO, cuando la CrP aumenta de 1,5 a 1,9 veces respecto al valor basal, el paciente se encuentra en el estadio 1 de la enfermedad (Khwaja, 2012). Teniendo en cuenta que los valores basales de una rata se encuentran entre 0,4-0,7 mg/dL (Bolant-Hernández *et al.*, 1990), se estableció que en nuestros animales se produce un daño renal cuando sus valores de CrP son $\geq 1,5$ mg/dL. Nuestros resultados mostraron que 4 días después de la administración del cisplatino y 24 horas después de realizar una isquemia renal, se detecta un daño renal agudo que se refleja en el incremento de los niveles de CrP (Figura 15). Este aumento es entre 3,5-5,7 veces superior el día de daño (Día 1 y Día 4) con respecto al basal (Día 0) en los

grupos de DRA. Los niveles del grupo control no presentaron cambios durante el experimento.

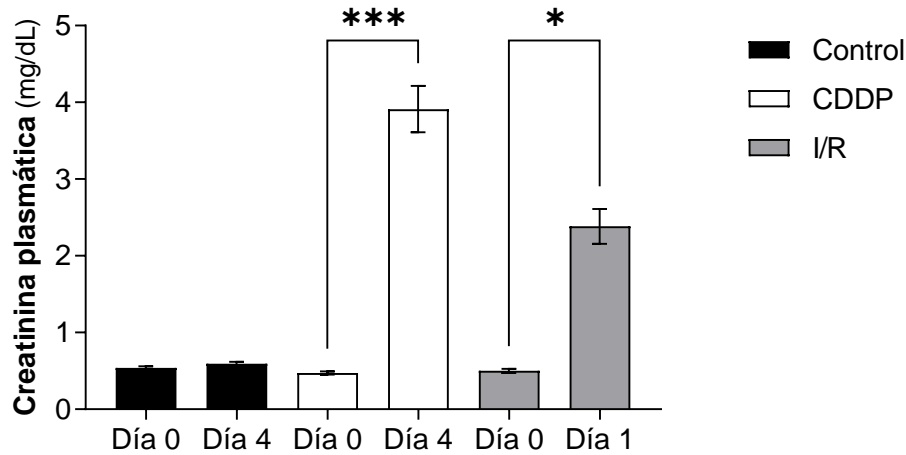


Figura 15. Evolución de la concentración de creatinina plasmática. Se muestran los valores de los animales controles (n=22), tratados con cisplatino 5 mg/kg (CDDP) (n=21), y a los que se les realizó una isquemia-reperfusión de 60 minutos (I/R) (n=6) en los diferentes puntos de estudio (Día 0, Día 1 y Día 4). Los valores se expresan como la media \pm error estándar de la media (EEM). * $p < 0,05$ vs. Día 0 del mismo grupo; *** $p < 0,001$ vs Día 0 del mismo grupo.

La urea es un metabolito tóxico resultante de la degradación de las proteínas ingeridas en el hígado y cuya eliminación es principalmente por filtración renal (Baum, Dichoso y Carlton, 1975). Sus niveles plasmáticos en condiciones fisiológicas se mantienen entre 5-20 mg/dL pero, cuando la función renal se encuentra alterada, sus niveles aumentan debido a la reducción de la filtración glomerular al igual que ocurre con la CrP. Sin embargo, no es la única circunstancia donde los valores de urea plasmática se elevan, por este motivo no es un parámetro especialmente sensible ni específico de la función renal en el contexto del daño renal. La producción metabólica de la urea puede estar influenciada por diferentes circunstancias como la absorción de proteínas del paciente, pero también por traumatismos, lesiones tisulares, la medicación y las hemorragias (Rossaint y Zarbock, 2016). Asimismo, las disfunción hepática o la baja captación de proteínas puede reducir los niveles de este metabolito en plasma sin estar afectada la función renal (Traynor *et al.*, 2006).

En la Figura 16 se observa que los niveles de urea plasmática en los grupos de daño renal experimentaron un fuerte aumento con respecto a su basal (Día 0) y al grupo control. Estos resultados junto con los datos de CrP indican un fallo en la TFG.

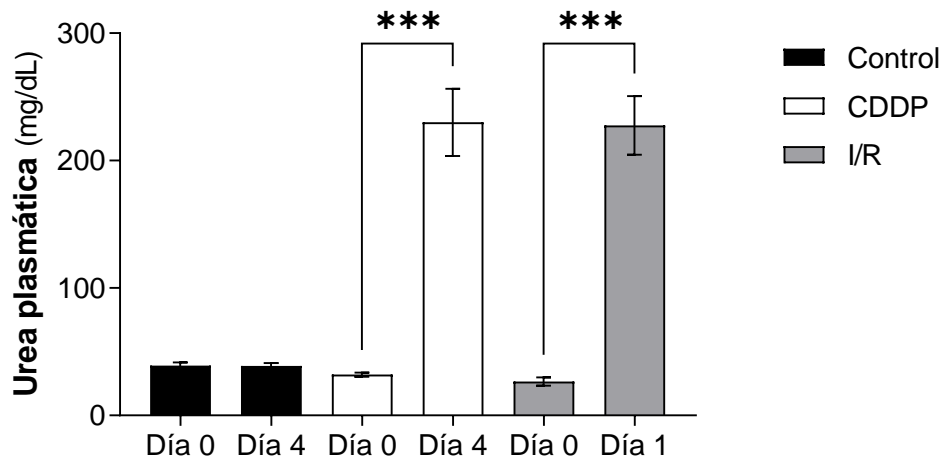


Figura 16. Evolución de la urea plasmática. Los valores que se muestran son de animales controles ($n=22$), tratados con cisplatino 5 mg/kg (CDDP) ($n=21$), y a los que se les realizó una isquemia-reperfusión de 60 minutos (I/R) ($n=6$) en los diferentes puntos de estudio (Día 0, Día 1 y Día 4). Los valores se expresan como la media \pm el error estándar de la media EEM. *** $p < 0,001$ vs. Día 0 del mismo grupo.

Para completar la evaluación de la función renal se midieron los valores de proteinuria y se determinó el CICr.

La estimación de la TFG se basa en el CICr, es decir, el volumen de sangre que queda depurada de creatinina en un tiempo determinado (Shahbaz y Gupta, 2021). El aumento de factores liberados durante un estímulo isquémico y tóxico tras la lesión del endotelio, producen una vasoconstricción de las arteriolas aferentes y de la microvasculatura renal que compromete la microcirculación del riñón, lo que explica la reducción brusca de la TFG (J. A. Winston y Safirstein, 1985; Bonventre y Zuk, 2004). Además, la TFG también se reduce debido a la paulatina destrucción y desorganización del epitelio tubular de la nefrona. Los datos de CICr mostraron que a TFG disminuye bruscamente en ambos modelos de DRA (Figura 17) coincidiendo con los días donde la CrP se encuentra elevada, por lo que en esos puntos de estudio (Día 1 y 4) la función renal se encuentra alterada.

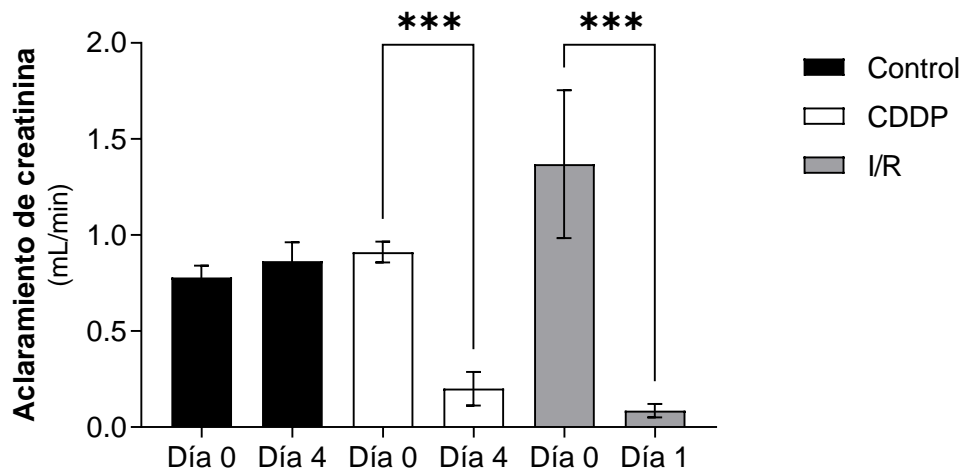


Figura 17. Evolución de los valores del aclaramiento de creatinina. Los valores que se muestran son de animales controles ($n=22$), tratados con cisplatino 5 mg/kg (CDDP) ($n=21$), y a los que se les realizó una isquemia-reperfusión de 60 minutos (I/R) ($n=6$) en los diferentes puntos de estudio (Día 0, Día 1 y Día 4). Los valores se expresan como la media \pm error estándar de la media (EEM). *** $p < 0,001$ vs. Día 0 del mismo grupo.

Una elevada excreción urinaria de proteínas se puede deber a un daño tubular que altere los mecanismos de reabsorción de las proteínas, a una alteración en la barrera de filtración glomerular que tenga como consecuencia un aumento de la permeabilidad a las proteínas o a una combinación de ambos mecanismos (Eneigh Hart, 2005). El daño tóxico e isquémico están estrechamente relacionados con una lesión de las células tubulares (Kohn *et al.*, 2002; Kanagasundaram, 2014), por lo que cuando esto ocurre se produce una alteración de la reabsorción tubular y como consecuencia aparece proteinuria. Además, la propia desepitelización tubular causada por la NTA provoca el desprendimiento de las células epiteliales y su vertido al lumen tubular (Molitoris y Marrs, 1999), y por tanto, a la orina lo que también contribuye al aumento de este parámetro.

El rango normal de excreción urinaria de proteínas en una rata de laboratorio es de unos 5 mg/día (Bolant-Hernández *et al.*, 1990), pudiendo aumentar su valor hasta 10 veces en modelos de NTA. Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que la proteinuria de los animales tratados con CDDP presenta unos valores 2-3 veces superiores a los de su basal (Día 0), al igual que los animales que

han sufrido una isquemia (Figura 18). Según la bibliografía, la proteinuria que aparece en ambos modelos parece tener un origen tubular, es decir, se produce por una afectación de la reabsorción tubular de las proteínas filtradas (Martínez-Salgado, López-Hernández y López-Novoa, 2007; Bulacio y Torres, 2013).

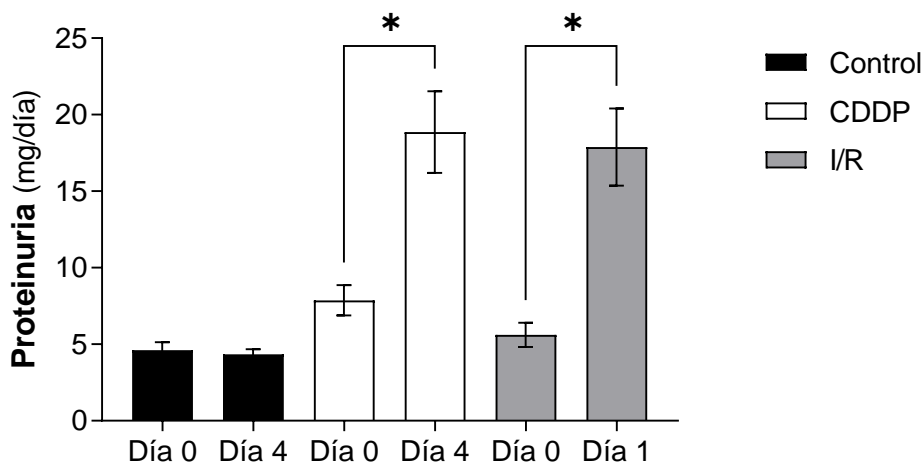


Figura 18. Evolución de la proteinuria. Los valores que se muestran son de animales controles ($n=22$), tratados con cisplatino 5 mg/kg (CDDP) ($n=21$) y a los que se les realizó una isquemia-reperfusión de 60 minutos (I/R) ($n=6$) en los diferentes puntos de estudio (Día 0, Día 1 y Día 4). Los valores se expresan como la media \pm el error estándar de la media (EEM). * $p < 0,05$ vs. Día 0 del mismo grupo.

1.2 Caracterización histológica del DRA

Para caracterizar las alteraciones estructurales que produce un DRA intrínseco se analizaron histológicamente los riñones de animales controles y de ambos grupos de daño renal mediante la tinción con hematoxilina y eosina. Dado que tanto el cisplatino como la isquemia inducen la mayor parte del daño en la médula externa (Sharfuddin y Molitoris, 2011; Xu *et al.*, 2015) se ha evaluado a fondo esta zona, aunque también se ha comprobado la ausencia de daño en otras partes del riñón.

La tinción con hematoxilina y eosina permite observar algunas alteraciones de la estructura de un órgano. Los resultados mostraron que en ambos modelos de daño renal se produce una necrosis tubular masiva, con pérdida de la integridad

tisular y acumulación de restos celulares en los túbulos, donde se forman cilindros de material hialino que obstruyen el lumen tubular (Figura 19). Se sabe que la principal manifestación estructural tanto de la isquemia como del cisplatino es el daño de los túbulos proximales, característico de la NTA (Hanif, Bali y Ramphul, 2021). La necrosis tubular, el desprendimiento de las células epiteliales, la obstrucción y la dilatación tubular, y la pérdida del borde en cepillo son características típicas de la NTA (Hanif, Bali y Ramphul, 2021).

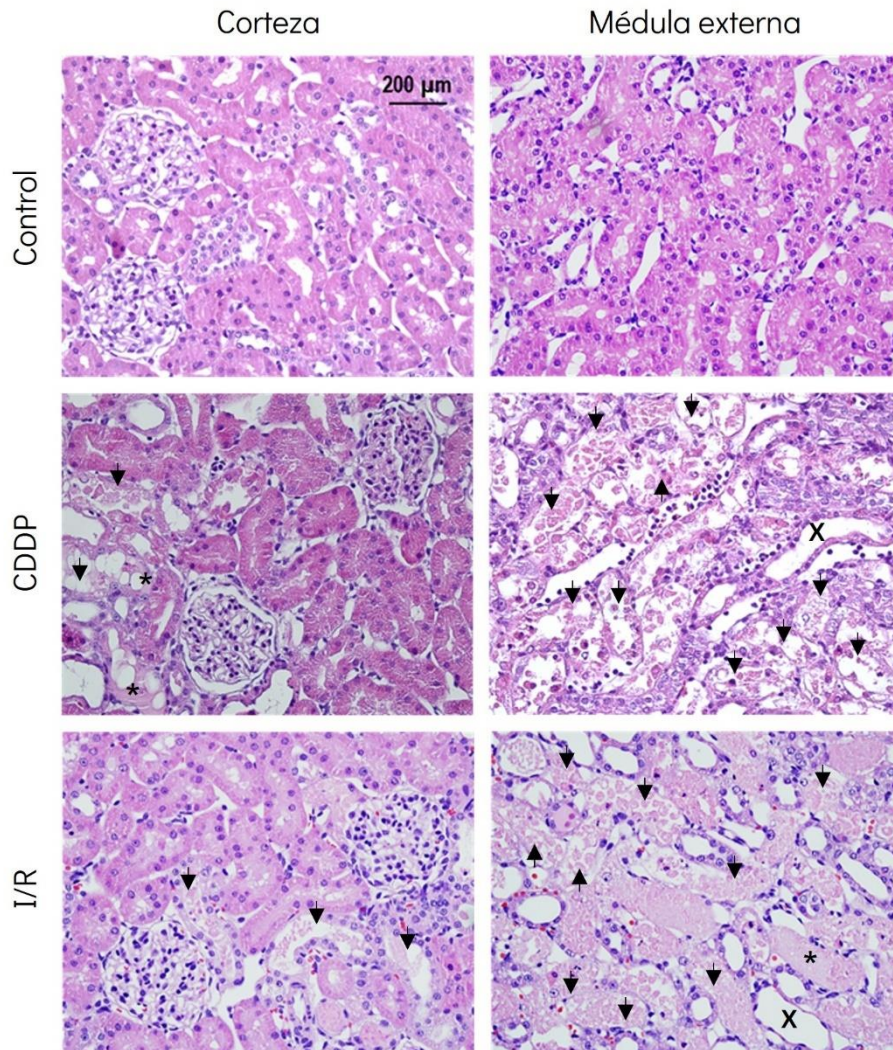


Figura 19. Caracterización histológica de los modelos experimentales de DRA. En la figura se muestran imágenes representativas de la corteza y la médula externa (x400) de muestras de riñón

(n= 6 por grupo) teñido con hematoxilina y eosina de ratas Control, tratadas con cisplatino 5 mg/kg (CDDP) y a los que se les realizó una isquemia-reperusión de 60 minutos (I/R) en el punto de máximo daño renal. Los asteriscos señalan los cilindros hialinos, las flechas representan desepitelización y NTA y las cruces indican la presencia de túbulos amorfos y dilatación tubular. DRA: daño renal agudo; NTA: necrosis tubular aguda.

Las ratas controles muestran un parénquima renal normal con túbulos y glomérulos intactos, mientras que en los modelos de DRA se observa una evidente necrosis tubular con una marcada desepitelización tubular y acumulo de material hialino además de dilatación tubular. Estos resultados indican que efectivamente existe un daño estructural renal causado por el tratamiento con cisplatino y por la isquemia.

BLOQUE II: IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES VESICULARES URINARIOS DE DRA

2. CARACTERIZACIÓN DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES URINARIAS

Las vesículas extracelulares son estructuras membranosas secretadas por casi todos los tipos de células a los diferentes fluidos corporales. Por su tamaño y biogénesis se clasifican principalmente en exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos. Su composición molecular es similar a la de su célula de origen, definida tanto por la carga interna como por los componentes presentes en la membrana. Ésta parece indicar en qué mecanismos específicos participan (Schorey *et al.*, 2015; Karpman, Ståhl y Arvidsson, 2017; Gurunathan *et al.*, 2019).

Algunas características como el tamaño, la morfología, la concentración, el origen celular y la composición molecular son utilizadas comúnmente para su caracterización.

2.1 Identificación de las VE urinarias según su tamaño

Las VE comprenden una amplia y heterogénea población de partículas difíciles de diferenciar, ya que los protocolos actuales para su aislamiento de fluidos biológicos no son los suficientemente sensibles y específicos para ayudar a su distinción (Willms *et al.*, 2016).

Los métodos de aislamiento de VE urinarias se pueden dividir en técnicas basadas en propiedades fisicoquímicas (tamaño y densidad) o en enriquecimiento por afinidad y polímeros de exclusión, cada una de ellas con sus ventajas y limitaciones en cuanto a la pureza y el rendimiento con respecto a una aplicación posterior (Svenningsen, Sabaratnam y Jensen, 2020). Es por ello por lo que no existe un consenso sobre un método óptimo que deba utilizarse de manera uniforme para aislar y purificar estas vesículas. La elección de un método más eficiente depende del objetivo científico y de las aplicaciones posteriores que se quieran llevar a cabo (Lötvall *et al.*, 2014).

La composición de los exosomas, debido a su origen endosómico, contiene una serie de proteínas abundantes como ALIX, TSG101, así como algunas tetraspaninas (CD9, CD63, CD81) o proteínas de choque térmico (HSC70 y HSP90) (Merchant *et al.*, 2017; Svenningsen, Sabaratnam y Jensen, 2020) que se utilizan para su caracterización. Por su parte, el perfil proteómico de las MV depende en gran medida del método de aislamiento. Existe una categoría de proteínas denominadas “marcadoras”, independientes del origen celular, cuya presencia depende del proceso de biogénesis (Østergaard *et al.*, 2012). Debido a su formación por gemación de la membrana plasmática, contienen principalmente proteínas citosólicas y asociadas a la membrana plasmática como las tetraspaninas (Escola *et al.*, 1998). La composición de los cuerpos apoptóticos contrasta con la de los exosomas y las MV, ya que a diferencia de ellos, contienen orgánulos intactos, cromatina y pequeñas cantidades de proteínas glicosiladas (Kerr, Wyllie y Currie, 1972; Borges, Reis y Schor, 2013). Por lo tanto, se espera observar niveles más altos de proteínas asociadas con el núcleo (histonas), mitocondrias (HSP60), aparato de Golgi y RE (GRP78). Sin embargo, aún no se ha identificado ningún marcador que esté presente en todas las clases de VE. Por ello, para diferenciar entre las poblaciones vesiculares contenidas en una muestra una de las técnicas más utilizadas es el análisis de seguimiento de nanopartículas (ASN), que permite identificarlas por su tamaño.

Nuestros resultados confirmaron la presencia de vesículas en ambas muestras de estudio. El carácter no simétrico de los datos obtenidos de distribución de tamaño observados en la Figura 20, indica que las suspensiones analizadas contenían una población heterogénea de partículas, predominantemente microvesículas (> 100 nm) (Akers *et al.*, 2013). La concentración de partículas en la muestra control fue mayor con respecto a la muestra de CDDP con $9,30E11 \pm 3,77E10$ frente a $6,73E11 \pm 1,79E10$ partículas/mL. Pero en cuanto a la distribución, se observan ciertas similitudes. El tamaño vesicular predominante en las muestras control y CDDP fue de $135,3 \pm 5,8$ nm y $129,5 \pm 4,6$ nm respectivamente. Sin embargo, dentro de las vesículas del grupo CDDP se encontraron concentraciones aceptables de microvesículas de un tamaño de entre 250-450 nm que no aparecen en la población control. Este hecho deja patente las limitaciones de la técnica de aislamiento incluso en muestras preparadas simultáneamente. Aunque el método de precipitación es eficaz para medir la concentración de VE, tiene el inconveniente de

coprecipitar proteínas contaminando así la muestra y afectando a la pureza de ésta (Svenningsen, Sabaratnam y Jensen, 2020).

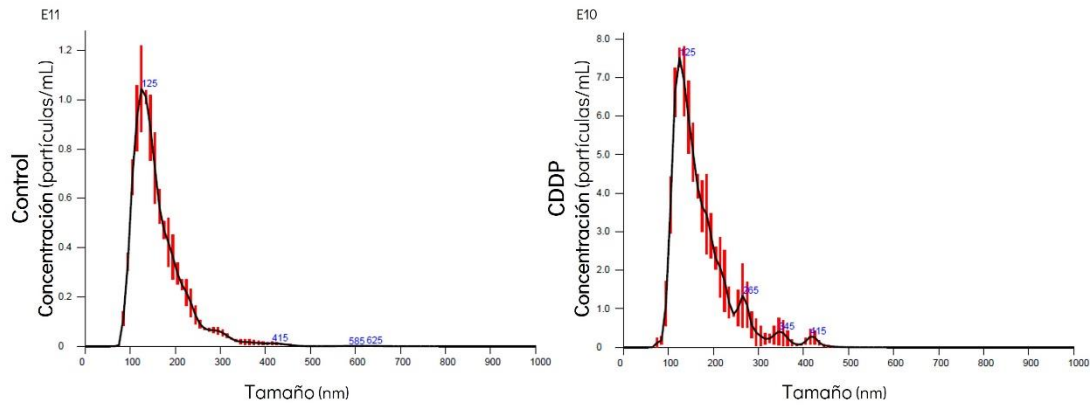


Figura 20. Concentración y distribución de los tamaños de las VE urinarias. Medida realizada por la técnica de Nanosight en las muestras obtenidas a partir de la orina de animales control ($n=3$) y tratados con cisplatino 5 mg/kg (CDDP) ($n=5$) en el día 4 del estudio (punto temporal de máximo daño renal). La gráfica muestra el valor medio que se obtiene de 3 medidas de la misma suspensión \pm el error estándar de la media (EEM). La técnica de aislamiento de VE urinarias utilizada es la precipitación. E: exponencial; VE: vesículas extracelulares.

2.2 Análisis morfológico de las VE urinarias

La Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV de sus siglas en inglés *International Society for Extracellular Vesicles*) ha proporcionado unos estándares para la caracterización experimental de las VE. Esta guía indica que se deben utilizar al menos 2 tecnologías diferentes para caracterizar las VE. Entre las más utilizadas se encuentra la TEM. En el caso de haber utilizado la ASN como técnica para el primer análisis de las VE, la ISEV recomienda utilizar alguna técnica de imagen, ya que la ASN no distingue las vesículas de membrana de las partículas coaisladas no membranosas de tamaño similar. Además, señala que las imágenes adquiridas deben mostrar un campo amplio que abarque múltiples vesículas además de imágenes ampliadas de vesículas individuales.

La observación del producto aislado con la técnica de TEM (Figura 21) después de la tinción negativa reveló la presencia de VE en la muestra. Las partículas presentaban forma de copa, tal y como se describe en la bibliografía (Colombo,

Raposo y Théry, 2014). Se sabe que su apariencia es un artefacto del paso de fijación/contraste que forma parte del proceso de tinción, ya que induce el encogimiento de las estructuras. Algunos tipos de vesículas observadas por la técnica de **Cryo-EM**, donde no es necesario una tinción, presentan una morfología redonda (Conde-Vancells *et al.*, 2008; Raposo y Stoorvogel, 2013).

La **Cryo-EM** por sus siglas en *Cryogenic Electron Microscopy*, es una técnica de criomicroscopía en la que la muestra se vitrifica en etano líquido para poder ser observadas al microscopio sin ninguna alteración, ya que el líquido donde se prepara previene la formación de cristales de hielo que alteraría la estructura celular (Conde-Vancells *et al.*, 2008; Raposo y Stoorvogel, 2013).

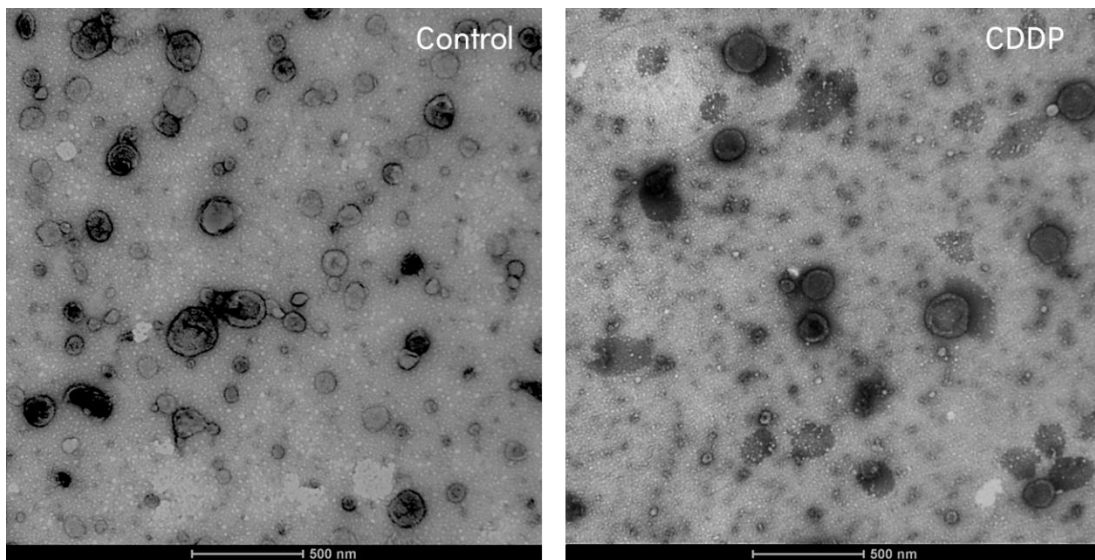


Figura 21. Imágenes representativas de las VE urinarias. Las imágenes obtenidas por la técnica de TEM, corresponden a las VE urinarias contenidas en la orina de animales control (n=3) y tratados con cisplatino 5 mg/kg (CDDP) (n=5) en el día 4 de estudio (punto temporal de máximo daño renal). La técnica de aislamiento de VE urinarias utilizada es la precipitación. VE: vesículas extracelulares. VE: vesículas extracelulares.

3. ANÁLISIS NANOPROTEÓMICO DE LAS VESÍCULAS URINARIAS

La identificación del contenido proteico de las VE puede realizarse por diferentes técnicas (Szatanek *et al.*, 2017), no obstante, para una determinación más rigurosa se requiere la aplicación de una combinación de los métodos actuales con la adición de las tecnologías “ómicas”. La proteómica basada en espectrometría de masas se ha convertido en uno de los métodos más elegidos para el estudio del perfil proteico de pequeñas partículas y la cuantificación de sus cambios en los niveles de expresión (Aebersold y Mann, 2016).

Para este estudio se realizaron dos análisis del perfil proteico de la fracción vesicular urinaria de ratas con y sin daño renal. En un primer análisis se identificaron 1824 proteínas que pertenecían al grupo control y 1367 que correspondían al grupo CDDP, de las cuales 1234 coincidían con las encontradas en el grupo de animales sin daño renal. Lo interesante de este estudio fue el descubrimiento de 133 proteínas que únicamente se encontraban en las vesículas de los animales con afectación renal (Figura 22a). En la segunda parte del estudio se tuvieron en cuenta las proteínas, reconocidas en el primer análisis, del grupo control (1824) y, además se identificaron 2479 pertenecientes al grupo CDDP en conjunto con otro grupo experimental de DRA inducido por un antibiótico potencialmente nefrotóxico que coincidían entre sí y a la vez con proteínas del grupo control. En este caso se encontraron 159 proteínas únicas de ambos grupos de DRA (Figura 22b).

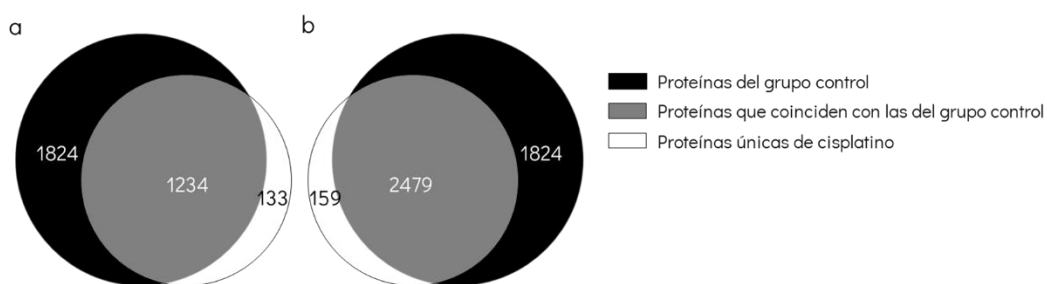


Figura 22. Datos obtenidos del análisis nanoproteómico de las VE urinarias. a. El sector negro corresponde al número de proteínas identificadas en las VE del grupo control, la fracción gris representa las proteínas encontradas en las VE del grupo de animales tratados con cisplatino 5 mg/kg (CDDP) que coinciden con las presentes en el grupo control. La porción blanca muestra las proteínas que se encuentran únicamente en las VE del grupo CDDP. b. La sección de color negro

se corresponde con el número de proteínas identificadas en las VE del grupo control, la parte gris indica en este caso las proteínas encontradas en las VE del grupo CDDP y el grupo experimental de DRA inducido por un antibiótico nefrotóxico que coinciden con las halladas en el grupo control. La zona de color blanco muestra proteínas únicas de las VE de los grupos de DRA coincidentes entre sí. VE: vesículas extracelulares.

Después de los análisis proteómicos, se obtienen largas listas de proteínas que pueden ser difíciles de interpretar o deducir en qué procesos están involucradas. Durante estos años se han ido generando bases de datos con información sobre las funciones o vías en las que participan las proteínas identificadas en este tipo de estudios, con el fin de que puedan servir para contextualizar biológicamente posibles resultados ómicos futuros. Los conjuntos de datos de expresión proteica de este estudio (Figura 22) se cargaron en el *software* IPA para determinar las vías relacionadas con las proteínas reconocidas en el grupo de daño renal inducido por cisplatino.

El *software* informó de cinco vías canónicas principales en las que estaban implicadas las proteínas contenidas en las VE (Tabla 10). Al cotejar con el programa los 133 datos indicadas en la Figura 22.a, que pertenecían únicamente al grupo CDDP, se observó que la vía más destacada fue la de la coagulación, cuya relación entre las proteínas identificadas y las ya definidas en la bibliografía era de un 20 %. Además 2 de las 4 principales vías canónicas restantes, estaban relacionadas con las vías de activación de la protrombina que conforman el sistema de la coagulación con los siguientes porcentajes de relación más altos.

PRINCIPALES VÍAS CANÓNICAS	p-VALOR	COINCIDENCIA
Sistema de Coagulación	5,21E-10	20,0 % - 7/35
Vía intrínseca de activación de protrombina	2,58E-06	11,9 % - 5/42
Señalización de respuesta de fase aguda	3,90E-05	4,0 % - 7/176
Supervía de degradación de la metionina	4,07E-05	10,8 % - 4/37
Vía extrínseca de activación de protrombina	7,38E-05	18,8 % - 3/16

Tabla 10. Principales vías canónicas en las que están involucradas las proteínas identificadas en las VE urinarias durante un DRA causado por cisplatino. En la tabla se muestran los resultados obtenidos tras el análisis IPA. Las vías canónicas están ordenadas en función del p-valor ($p < 0,05$).

También se muestra el porcentaje de relación entre las proteínas detectadas en la muestra y las ya descritas en las bases de datos, que contiene en programa informático, relacionadas con la misma vía. DRA: daño renal agudo; VE: vesículas extracelulares.

El análisis de los datos que se muestran en la Figura 22.b, que corresponden al grupo control y a los dos modelos de DRA, determinó que la vía con mayor relevancia fue la del complemento, seguida de la vía del sistema de coagulación que tenía el segundo porcentaje más alto en relación. Las vías intrínseca y extrínseca de la activación de la protrombina, que forman parte del sistema de coagulación, también están presentes en la lista de las principales vías canónicas.

PRINCIPALES VÍAS CANÓNICAS	p-VALOR	COINCIDENCIA
Sistema del Complemento	5,59E-18	35,3 % - 12/34
Vía intrínseca de activación de protrombina	8,55E-13	9,10 % - 15/164
Sistema de Coagulación	9,10E-11	23,5 % - 8/34
Activación de LXR/RXR	3,74E-10	10,1 % - 11/109
Vía intrínseca de activación de protrombina	9,01E-09	18,4 % - 7/38

Tabla 11. Principales vías canónicas en las que están involucradas las proteínas identificadas en las VE urinarias durante un DRA causado por cisplatino o un antibiótico potencialmente nefrotóxico. En la tabla se muestran los resultados obtenidos tras el análisis IPA. Las vías canónicas están ordenadas en función del p-valor ($p < 0,05$). También se muestra el porcentaje de relación entre las proteínas detectadas en la muestra y las ya descritas en las bases de datos, que contiene en programa informático, relacionadas con la misma vía. DRA: daño renal agudo; VE: vesículas extracelulares.

Las VE están involucradas en la mayoría de los procesos fisiológicos, entre ellos en la coagulación, la agregación plaquetaria y la trombosis, en los que tienen importante papel (Karpman, Ståhl y Arvidsson, 2017). Las propiedades protrombóticas de las microvesículas y los exosomas se asocian principalmente con la exposición de la fosfatidilserina cargada negativamente y el factor tisular (Satta *et al.*, 1994). La fosfatidilserina de las VE proporciona sitios de unión para el ensamblaje de factores de coagulación seguido de la generación de trombina (Owens y Mackman, 2011; Skotland, Sandvig y Llorente, 2017). Por su parte, el factor tisular normalmente está encriptado pero puede exponerse en las VE liberadas de algunos tipos celulares

como las células endoteliales (Combes *et al.*, 1999) y formar un complejo con el factor VII/VIIa, activando así la vía extrínseca de la coagulación. En el contexto renal, se ha descubierto que las VE modulan las cascadas de complemento y coagulación durante las lesiones renales relacionadas con el trasplante renal e isquemia-reperfusión (Quaglia *et al.*, 2020).

Tras la integración de los datos obtenidos por nanoproteómica, se identificaron 11 y 15 proteínas del primer y segundo análisis respectivamente (Tabla 12 y 13), relacionadas con la coagulación sanguínea. De las 26 proteínas relacionadas con este proceso, donde parecen participar de alguna forma las VE urinarias, se seleccionó el inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1 de sus siglas en inglés *Plasminogen Activator Inhibitor-1*) para continuar con el estudio teniendo en cuenta los siguientes antecedentes.

GEN	PROTEÍNA
F12	Factor de coagulación XII
APOH	Apolipoproteína H
SERPINE1	Inhibidor del activador de plasminógeno 1
F13A1	Cadena A del factor de coagulación XIII
FGA	Cadena α del fibrinógeno
KLKB1	Calicreína plasmática
F9	Factor de coagulación IX
F13B1	Cadena B del factor de coagulación XIII
PLAT	Activador del plasminógeno tisular
PAFAH1B1	Factor activador plaquetario acetilhidrolasa IB subunidad alfa1
PAFAH1B3	Factor activador plaquetario acetilhidrolasa IB subunidad gamma1

Tabla 12. Proteínas identificadas en las VE urinarias tras el tratamiento con cisplatino que están relacionadas con el sistema de coagulación. Proteínas identificadas tras el análisis nanoproteómico de las VE urinarias. VE: vesículas extracelulares.

PAI-1 es una glicoproteína de 47 kDa que pertenece a la familia de las serpinas. Se trata de un inhibidor del proceso de fibrinólisis, cuya función es inhibir al activador de plasminógeno, tanto tisular (tPA de sus siglas en inglés *Tissue-type*

Plasminogen Activator) como el tipo urokinasa (uPA de sus siglas en inglés *Urokinase-type Plasminogen Activator*) (Gupta *et al.*, 2015). Pero además de regular la fibrinólisis, participa en otras funciones fisiológicas, como la migración y la adhesión celular (Eddy y Fogo, 2006). La alteración de sus niveles se ha asociado con enfermedades vasculares, fibrosis, obesidad y síndrome metabólico y cáncer (Dellas y Loskutoff, 2005). Aunque se trata de una proteína que está ampliamente descrita en la ERC, se sabe poco sobre su papel en el DRA. Estudios llevados a cabo en nuestro grupo de investigación (Quiros *et al.*, 2013) han relacionado PAI-1 con el daño renal temprano (Blanco-Gozalo, 2017) y con las secuelas subclínicas que quedan en los riñones tras este síndrome (Cuesta, 2018). Teniendo en cuenta estos datos, en este trabajo nos propusimos profundizar en el origen y significado de esta proteína en el DRA.

GEN	PROTEÍNA
F13B	Cadena B del factor de coagulación XIII
HEPB2	Cofactor II de la Heparina
F11	Factor de coagulación XI
HABP2	Proteína de unión a hialuronano 2
SERPINA3M	Inhibidor de la serina proteasa A3M
PROS1	Proteína S
KNG1	Isoforma LMW del quininógeno-1
PROC	Proteína dependiente de vitamina K
APOH	Apolipoproteína H
SERPINA10	Inhibidor de proteasa dependiente de proteína Z
F7	Factor de coagulación VII
CPB2	Carboxipeptidasa B2
F10	Factor de coagulación X
FGA	Cadena α del fibrinógeno
FBLN1	Fibulin-1

Tabla 13. Proteínas identificadas en las VE urinarias tras el tratamiento con cisplatino y con un antibiótico potencialmente nefrotóxico, que están relacionadas con el sistema de coagulación. Proteínas identificadas tras el análisis nanoproteómico de las VE urinarias. VE: vesículas extracelulares.

4. COMPROBACIÓN DE LA PRESENCIA DEL PAI-1 EN LAS VE URINARIAS DE RATAS INDIVIDUALES

Debido a las limitaciones de la técnica de aislamiento, el análisis proteómico se realizó en muestras donde convergían las vesículas procedentes de la orina de un grupo de animales, no de ratas individuales. Por ello, para corroborar los resultados obtenidos, se decidió comprobar la presencia de PAI-1 en las vesículas aisladas de la orina de cada animal de forma individual.

4.1 Caracterización de VE urinarias de ratas individuales

Para comprobar la eficacia de la nueva técnica de aislamiento de vesículas, se analizaron 4 suspensiones procedentes de la orina de animales sanos y de 4 de animales que habían sufrido un DRA tóxico.

Según los datos obtenidos, se confirmó la presencia de VE en las muestras de estudio. La concentración de partículas en las suspensiones del grupo control y CDDP, aunque de la misma magnitud, fueron diferentes. El tamaño promedio de las vesículas varió entre 126,0 – 166,2 nm, estando relacionadas en general las partículas más pequeñas con los animales control (Tablas 14 y 15). No obstante, en ambos grupos predominaron las microvesículas (>100 nm) (Akers *et al.*, 2013).

Muestra	Concentración total (partículas/mL)	Tamaño promedio (nm)	Moda de tamaño (nm)
Control 1	9,17E+10 ± 2,10E+10	137,3 ± 9,9	113,4 ± 8,5
Control 2	5,68E+10 ± 4,10E+09	144,2 ± 3,3	128,0 ± 4,7
Control 3	8,26E+10 ± 1,49E+10	132,9 ± 14,8	117,8 ± 17,2
Control 4	1,15E+11 ± 2,74E+10	126,0 ± 2,2	111,1 ± 11,3

Tabla 14. Datos de concentración y tamaño de las VE urinarias que proceden de la orina de animales individuales del grupo control. En la tabla se muestran los resultados obtenidos tras el análisis por Nanosight de las muestras el día 4 del estudio (punto temporal de máximo daño renal). Los valores son el promedio de 3 medidas realizadas a cada una de las suspensiones ± el error estándar de la media (EEM). La técnica de aislamiento utilizada para el aislamiento de las VE fue la SEC. SEC: Cromatografía de exclusión por tamaño; VE: vesículas extracelulares.

RESULTADOS

Muestra	Concentración total (partículas/mL)	Tamaño promedio (nm)	Moda de tamaño (nm)
CDDP 1	7,44E+10 ± 2,32E+10	166,2 ± 23,2	138,0 ± 31,3
CDDP 2	5,12E+10 ± 1,33E+10	117,0 ± 9,8	100,1 ± 2,4
CDDP 3	3,80E+10 ± 1,56E+09	154,2 ± 2,9	113,0 ± 22,4
CDDP 4	4,86E+10 ± 6,32E+09	152,0 ± 6,1	128,9 ± 13,9

Tabla 15. Datos de concentración y tamaño de las VE urinarias que proceden de la orina de animales individuales tratados con CDDP. En la tabla se muestran los resultados obtenidos tras el análisis por Nanosight de las muestras el día 4 del estudio (punto temporal de máximo daño renal). Los valores son el promedio de 3 medidas realizadas a cada una de las suspensiones ± el error estándar de la media (EEM). La técnica de aislamiento utilizada para el aislamiento de las VE fue la SEC. CDDP: Cisplatino 5 mg/kg; SEC: Cromatografía de exclusión por tamaño; VE: vesículas extracelulares.

Las gráficas de la Figura 24 y 25 representan la distribución de las diferentes poblaciones de partículas procedentes de cada uno de los animales del estudio.

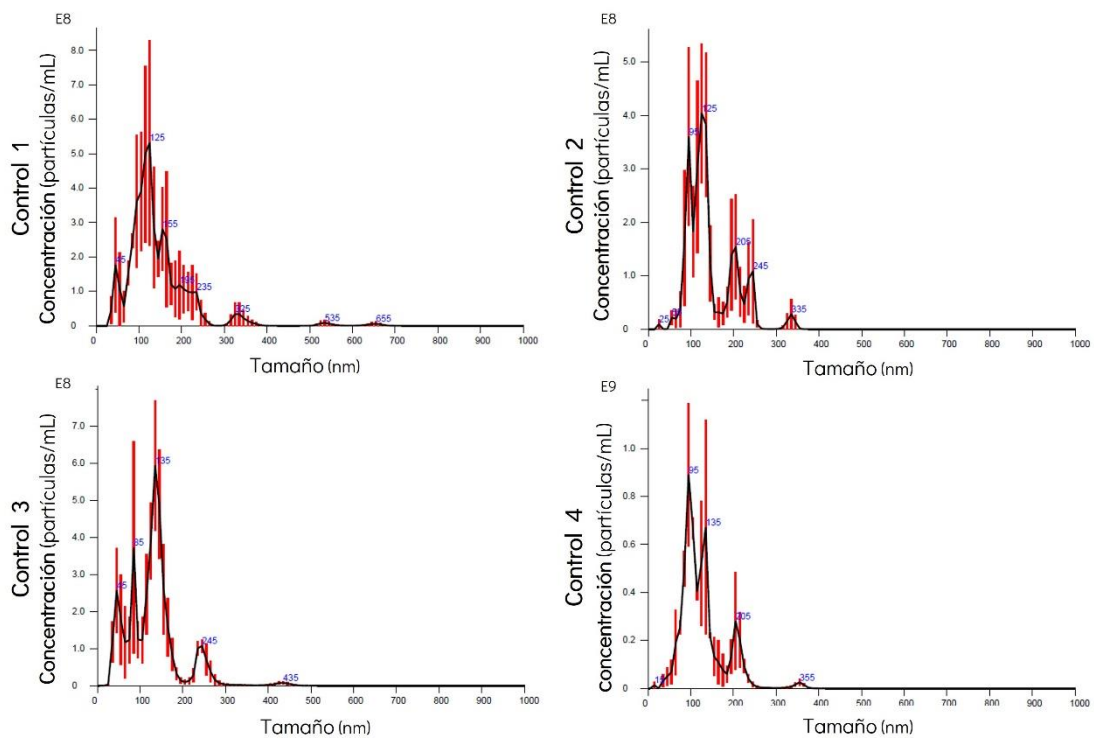


Figura 24. Representación gráfica de la concentración y distribución de los tamaños de las VE urinarias procedentes de animales individuales del grupo control. Se muestran los resultados

obtenidos tras el análisis por Nanosight de las muestras el día 4 del estudio (punto temporal de máximo daño renal). La gráfica muestra el valor medio que se obtiene de 3 medidas de cada una de las suspensiones \pm el error estándar de la media (EEM). La técnica de aislamiento utilizada para el aislamiento de las VE fue la SEC. SEC: Cromatografía de exclusión por tamaño; VE: vesículas extracelulares.

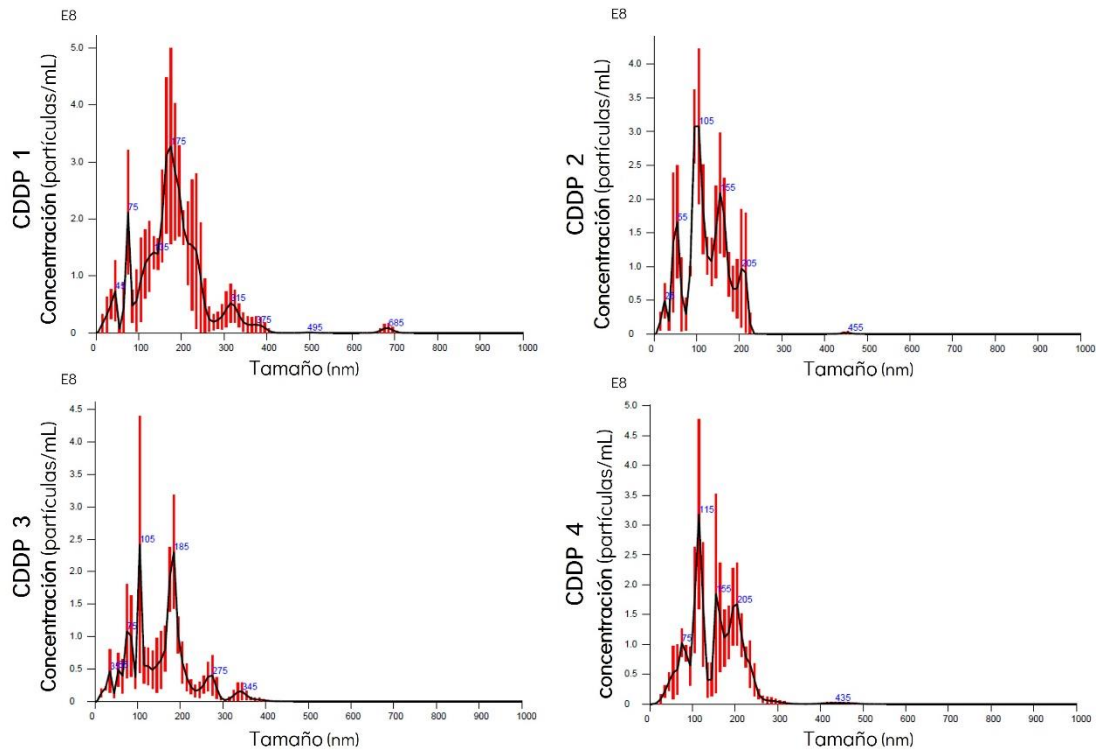


Figura 25. Representación gráfica de la concentración y distribución de los tamaños de las VE urinarias procedentes de animales individuales tratados con cisplatino. Se muestran los resultados obtenidos tras el análisis por Nanosight de las muestras el día 4 del estudio (punto temporal de máximo daño renal). La gráfica muestra el valor medio que se obtiene de 3 medidas de cada una de las suspensiones \pm el error estándar de la media (EEM). La técnica de aislamiento utilizada para el aislamiento de las VE fue la SEC. SEC: Cromatografía de exclusión por tamaño; VE: vesículas extracelulares.

Se puede observar que el patrón de dispersión no se repite, cada una de las muestras tiene una distribución diferente. Comparando las gráficas de distribución y concentración de partículas urinarias procedentes de animales individuales (Figura 24 y 25) con las procedentes de varios animales (Figura 20) queda patente que la

dispersión entre subgrupos es similar, pero existen diferencias entre el análisis conjunto y el individual. Mientras que en el primer aislamiento se obtuvo un pico de población que predominaba sobre el resto, en el segundo ensayo queda patente la presencia de varios picos de población con mayor presencia de exosomas, aunque en ambos casos predominan las microvesículas.

4.2 Presencia del PAI-1 en las VE urinarias

Para validar los datos obtenidos por nanoproteómica, se estudió la expresión de PAI-1 en vesículas urinarias de ratas individuales mediante *Western blot*.

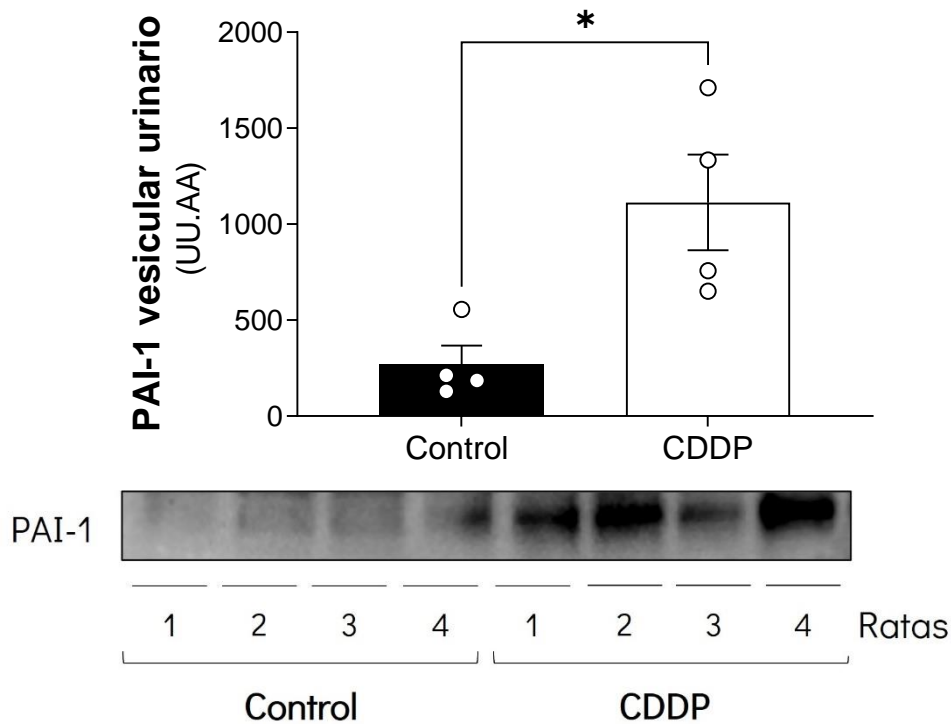


Figura 26. Análisis de PAI-1 en las VE urinarias durante un DRA. El peso molecular de PAI-1 es 52 kDa. Las VE se aislaron en el punto temporal de máximo daño renal (Día 4). La gráfica representa la cuantificación por densitometría óptica del Western blot. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar de la media (EEM). * $p < 0,05$ vs. Control. CDDP: Cisplatino 5 mg/kg; PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno-1; UU. AA: unidades arbitrarias; VE: vesículas extracelulares.

La presencia del PAI-1 en las VE urinarias confirmó los resultados obtenidos por LC/MS-MS (Tabla 12). Esta técnica se basa en dos subanálisis: un primer filtrado identifica los picos más intensos que corresponden con las proteínas mayoritarias en la muestra, y sobre estos datos se realiza una segunda determinación que identifica los péptidos y, por tanto, de qué proteínas se trata (Domon y Aebersold, 2006). Es posible que, por su baja concentración en la muestra control, PAI-1 no estuviera incluido en el segundo análisis, pero al utilizar otro método si aparece en las muestras controles, como es el caso del *Western blot*, aunque en menor cantidad comparado con el grupo CDDP.

PAI-1 se expresa en una amplia variedad de células como las endoteliales, las tumorales o las plaquetas y su papel biológico depende en gran medida de sus niveles de expresión y de su actividad. Numerosos factores de transcripción están involucrados en su regulación, dependiente del tipo de célula y de las condiciones fisiológicas y patológicas. Una amplia variedad de citoquinas y factores de crecimiento que incluyen TGF- β , IL-1 β , factor de crecimiento epidérmico, insulina, lipopolisacárido (endotoxina) y lipoproteínas, están implicadas en el control de la expresión del gen de PAI-1 (SERPINE1) (Liu, 2008; Samarakoon *et al.*, 2008; Wyrzykowska y Kasza, 2009).

La fisiopatología del DRA se caracteriza por un compendio de mecanismos patológicos intrínsecos que destruyen algunas estructuras renales junto con procesos de reparación concomitantes. La principal reacción del organismo en respuesta a una lesión es promover la cicatrización de heridas, que se caracterizan por los procesos de inflamación, liberación de citoquinas y quimiocinas, migración celular a la zona lesionada y agregación y activación de células mononucleares y fibroblastos circulantes. Por tanto, existe un vínculo estrecho entre la inflamación y la coagulación (Suárez-Álvarez, Liapis y Anders, 2016). En el contexto de las enfermedades renales, las VE se han relacionado con ambos procesos (Owens y MacKman, 2011; Pomatto *et al.*, 2017). Es posible que de la misma forma que las VE participan en la cascada de coagulación como portadores de fosfatidilserina y factor tisular (Owens y MacKman, 2011), alberguen en su interior otras moléculas relacionadas estrechamente con el proceso de coagulación cuando se produce un DRA.

BLOQUE III: ESTUDIO DEL ORIGEN DEL PAI-1

5. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL PAI-1 EN EL TEJIDO RENAL, LA ORINA Y EL PLASMA

Para este estudio se incluyó también el modelo animal de DRA isquémico con el fin de comprobar si los resultados obtenidos se podían asociar a un patrón de lesión específico de daño renal intrínseco o eran independientes de él.

En ambos modelos experimentales los niveles de ARNm aumentaron significativamente con respecto al grupo control, los cuales se mantuvieron más bajos (Figura 27a). En concordancia con estos datos, la expresión proteica del PAI-1 también fue mayor en los grupos de DRA en contraposición al control donde prácticamente su expresión fue inexistente (Figura 27b).

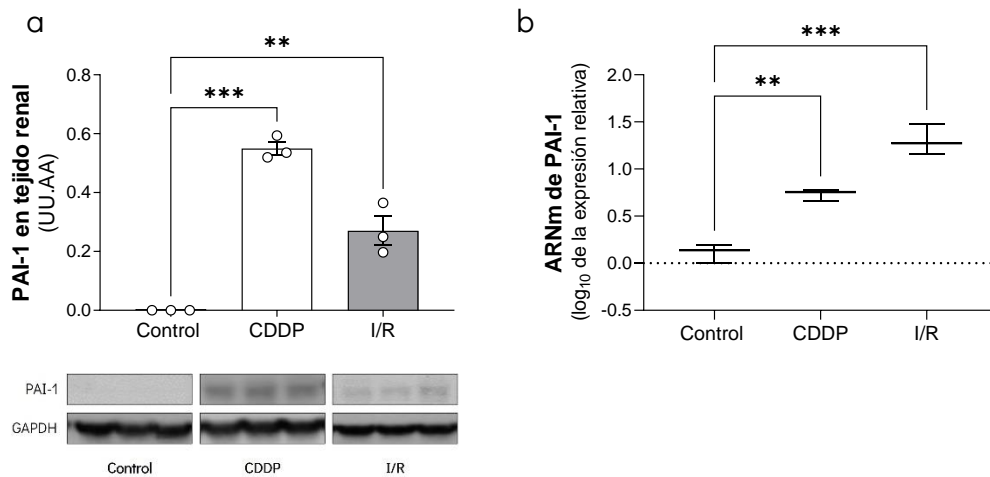


Figura 27. Expresión del PAI-1 en tejido renal durante un DRA. El peso molecular de PAI-1 es 52 kDa. Los resultados obtenidos son de animales controles, tratados con cisplatino 5 mg/kg (CDDP) y a los que se le ha realizado una isquemia-reperfusión (I/R) en el punto de máximo daño renal, es decir, el día 1 y 4 del grupo I/R y CDDP respectivamente. **a.** Análisis de la expresión relativa del ARNm de PAI-1 por qPCR. los valores se representan como el logaritmo en base diez de la expresión relativa de cada muestra con respecto a las muestras controles. **b.** Determinación de la expresión proteica de PAI-1. Se utilizó la proteína GAPDH como control de carga. La gráfica

representa la cuantificación por densitometría óptica del Western blot. GAPDH: enzima Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa; PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno-1; UU. AA: unidades arbitrarias. Los datos se expresan como la media \pm error estándar de la media (EEM). ** $p < 0,01$ vs. Control; *** $p < 0,001$ vs. Control.

Los niveles urinarios del PAI-1 en condiciones basales fueron casi indetectables, sin embargo, en los grupos de daño renal aumentaron (Figura 28). Los resultados muestran que el DRA induce la expresión del ARNm del PAI-1 en los riñones, lo que sugiere que podría existir una relación entre la síntesis de esta proteína y los niveles de ésta reflejados en la orina. Por tanto, estos resultados podrían estar indicando que al menos parte del PAI-1 urinario procede directamente de algunas de las estructuras renales.

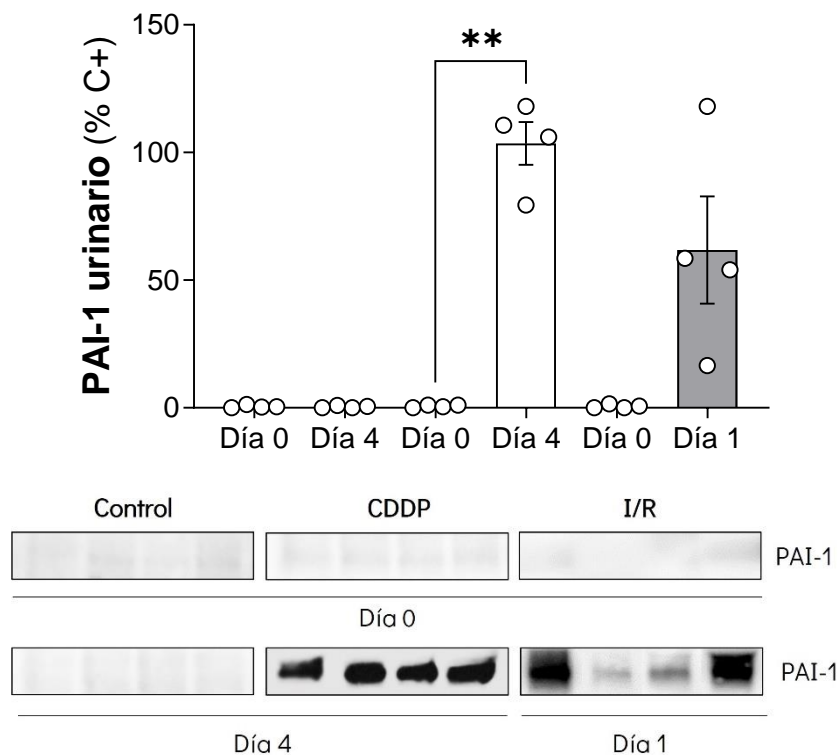


Figura 28. Niveles urinarios de PAI-1 durante un DRA. El peso molecular de PAI-1 es de 52 kDa. Los resultados obtenidos son de animales controles, tratados con cisplatino 5 mg/kg (CDDP) y a los que se le ha realizado una isquemia-reperfusión (I/R) en los distintos puntos del estudio. La gráfica representa la cuantificación por densitometría óptica del Western blot. PAI-1: Inhibidor del

activador del plasminógeno-1. Los datos se expresan como la media \pm error estándar de la media (EEM). * $p < 0,05$ vs. Día 0 del mismo grupo.

Las proteínas de bajo peso molecular como el PAI-1 se filtran libremente en el glomérulo, y en condiciones fisiológicas, se reabsorben prácticamente por completo a nivel tubular. La reabsorción se lleva a cabo a través de un proceso de endocitosis mediado por el receptor multiligando megalina-cubilina, que se localiza en el borde en cepillo de las células epiteliales del túbulo proximal (Hvidberg *et al.*, 2005; Nielsen, Christensen y Birn, 2016). Por tanto, un daño a nivel del túbulo proximal podría suponer una disminución de su reabsorción y en consecuencia un aumento de su excreción urinaria (Hvidberg *et al.*, 2005; Amsellem *et al.*, 2010; Blanco-Gozalo, 2017).

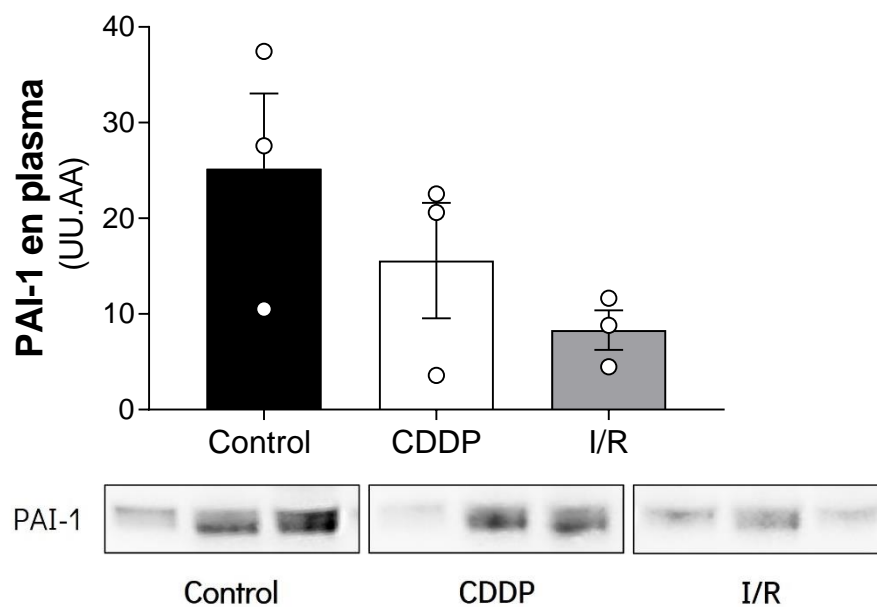


Figura 29. Niveles plasmáticos de PAI-1 durante un DRA. El peso molecular de PAI-1 es de 52 kDa. Los resultados obtenidos son de animales controles, tratados con cisplatino 5 mg/kg (CDDP) y a los que se le ha realizado una isquemia-reperfusión (I/R) en los distintos puntos del estudio. La gráfica representa la cuantificación por densitometría óptica del Western blot. PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno-1; UU. AA: unidades arbitrarias. Los datos se expresan como la media \pm error estándar de la media (EEM).

Una de las hipótesis que podría explicar los elevados niveles urinarios de PAI-1 durante un DRA, sería que el aumento de los niveles plasmáticos de esta proteína, sumados a una reabsorción defectuosa generada por el daño tubular, induciría el incremento de los niveles de PAI-1 en la orina. Sin embargo, nuestros datos mostraron que, aunque había presencia de PAI-1 en el plasma de todos los grupos experimentales, no hubo diferencia entre los grupos de DRA y el control, existiendo incluso una tendencia de expresión a la baja en los animales con DRA (Figura 29). Estos resultados sugieren que además de la filtración, hay otros mecanismos implicados en la aparición de PAI-1 en orina después de un DRA intrínseco.

6. EL PAI-1 APARECE EN LA ORINA DURANTE LA PERFUSIÓN RENAL *IN SITU*

Ya se ha sugerido que el origen de los biomarcadores urinarios de DRA está relacionado con el aumento de su expresión en los compartimentos dañados, desde donde se vierten directamente a la orina (Devarajan, 2008). Los resultados del bloque anterior nos hicieron cuestionarnos si la presencia del PAI-1 en la orina estaba relacionada con el daño intrarrenal que se produce tras un DRA. De forma que, esta proteína pudiera ser secretada y eliminada por las células renales o incluso que fueran las mismas células se desprendieran del túbulo y se vertieran a la orina. Esta conjetura estaba avalada por la presencia de PAI-1 en vesículas urinarias que por su tamaño no pueden filtrarse y, por tanto, deberían proceder de las estructuras renales.

Para esclarecer la procedencia del PAI-1 se realizó una perfusión renal con una solución de Krebs-dextrano a los animales. Los resultados mostraron que cuando los riñones de las ratas tratadas con cisplatino o sometidas a una isquemia se perfundieron con esta solución isotónica, el PAI-1 seguía excretándose en la orina de ambos grupos (Figura 30). Estos datos apoyan la idea de que esta proteína proviene del tejido renal. 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 para descartar un posible artefacto experimental. Los animales de los grupos experimentales con DRA excretaban PAI-1 en la orina, pero no los animales del grupo control.

En muchas ocasiones la comunidad científica ha defendido el origen renal de algunos biomarcadores erróneamente, como es el caso de la NGAL. Los niveles renales, sanguíneos y urinarios de esta proteína aumentan durante la lesión tubular temprana (Vaidya, Ferguson y Bonventre, 2008; Devarajan, 2011). Las evidencias de su origen se fundamentan en el vertido de esta proteína al medio de cultivo cuando las células tubulares se exponen a condiciones isquémicas (Mishra *et al.*, 2004). Tras estos datos, se ha asumido que el marcador detectado en la orina durante un DRA es producido por túbulos dañados y se elimina directamente a la orina (Bonventre *et al.*, 2010; Murray *et al.*, 2014), informando sobre el estado de lesión del compartimento tubular renal.

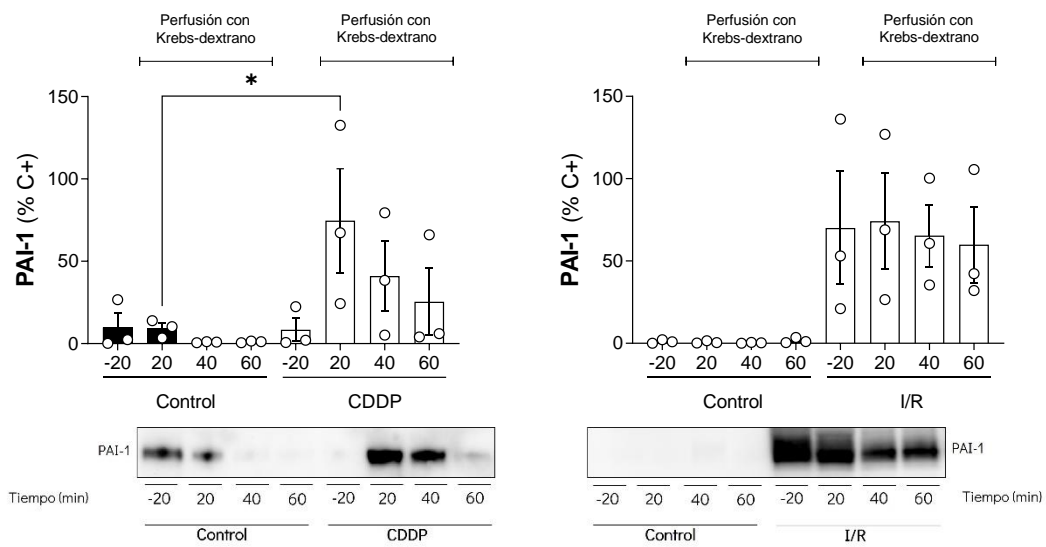


Figura 30. Niveles de PAI-1 urinario durante la perfusión renal in situ con Krebs-dextrano. Los resultados obtenidos son de animales controles, tratados con cisplatino 5 mg/kg (CDDP) y animales a los que se le indujo una isquemia-reperfusión de 60 minutos (I/R) en el punto de máximo daño renal (Día 1 y 4). Se escogieron fracciones temporales representativas del experimento completo: 20, 40 y 60 minutos y el tiempo -20, que corresponde al periodo anterior a la perfusión con Krebs, es decir, cuando el riñón todavía estaba siendo perfundido por la sangre del animal. Las gráficas representan la cuantificación por densitometría óptica del Western blot. PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno-1 (de sus siglas en inglés Plasminogen Activator Inhibitor-1). Los datos se expresan como la media \pm error estándar de la media (EEM). * $p < 0,05$ vs. Mismo tiempo del grupo control.

Sin embargo, según los resultados de nuestro grupo de investigación obtenidos a partir de las técnicas de perfusión renal *in situ*, se llegó a la conclusión de que en condiciones normales la NGAL transportada por la sangre se filtra a través de la barrera de filtración glomerular hasta el ultrafiltrado y se reabsorbe en el túbulo proximal, lo que causa que no haya NGAL (o sea indetectable) en la orina como ya se mencionaba en algunos estudios (Kuwabara *et al.*, 2009; Helanova, Spinar y Parenica, 2014). Sin embargo, durante un DRA, la NGAL se filtra y no es completamente (o apenas) reabsorbido por los túbulos dañados, lo que resulta en su excreción urinaria aumentada. En consecuencia, la NGAL urinaria sería un marcador de reabsorción tubular defectuosa (Sancho-Martínez, Blanco-Gozalo, *et al.*, 2020).

Uno de los pocos biomarcadores cuyo origen ha sido atribuido parcialmente a las estructuras renales es el TCP1-*eta*. Esta proteína se ha relacionado con la necrosis tubular asociada a la apoptosis activada por estrés del RE en células en cultivo. (Blanco-Gozalo *et al.*, 2020; Sancho-Martínez, Sánchez-Juanes, *et al.*, 2020).

Nuestra hipótesis con respecto al PAI-1 confirmada por los resultados obtenidos, propone que durante un episodio de DRA, parte de los niveles urinarios de esta proteína tiene un origen plasmático. Esta interpretación se basa en la capacidad de esta proteína para filtrarse libremente en el glomérulo y por la incapacidad de ser reabsorbida en el túbulo proximal por endocitosis dependiente de megalina, en el túbulo proximal debido al daño de las estructuras. Por otra parte, hemos observado que tras el daño se produce una sobreexpresión de PAI-1 en el riñón que parece estar relacionada con su excreción urinaria. Además, cuando se limita la circulación sanguínea al sistema renal y se perfunden los riñones esta proteína sigue estando presente en la orina, lo que indica que parte del contenido excretado procede directamente del riñón. Por tanto, es posible que la presencia de PAI-1 en la orina después de un DRA tóxico e isquémico, se deba a la suma del aumento de su producción renal y de la disminución de su reabsorción tubular.

7. LAS CÉLULAS EPITELIALES DEL TÚBULO PROXIMAL SECRETAN PAI-1

En los resultados obtenidos hasta ahora, se ha observado que el PAI-1 está presente en mayor medida en las VEu después de un DRA causado por el cisplatino y de acuerdo con nuestra hipótesis estas partículas, junto con su carga proteica,

tendrían un origen renal por la incapacidad de la filtración de las VE plasmáticas (Pisitkun, Shen y Knepper, 2004). Además, después de realizar la perfusión *in situ*, se observó que PAI-1 seguía apareciendo en la orina, respaldando aún más la hipótesis de que su aumento está relacionada con su vertido directo desde las células renales. Por tanto, la aparición de PAI-1 en las VEu después de un DRA podría tener la siguiente justificación:

El cisplatino es un compuesto directamente tóxico para las células endoteliales (Dursun et al., 2006) y además produce una lesión a nivel vascular pudiendo dañar los capilares peritubulares. Este hecho desencadena varios mecanismos relacionados con la protección y reparación de la lesión del endotelio, entre ellos la inflamación (Bonventre y Zuk, 2004; Zhang et al., 2008). El infiltrado de células inflamatorias provoca la liberación de factores y citoquinas (Furuichi, Kaneko y Wada, 2009; Sprague y Khalil, 2009) que activan la cascada de coagulación (Suárez-Álvarez, Liapis y Anders, 2016) y con ella también la síntesis de PAI-1 probablemente por parte de las células endoteliales, como regulador del tapón de fibrina (Van De Craen, Declerck y Gils, 2012). Además de la afectación vascular, el DRA intrínseco cursa con una marcada NTA que produce alteraciones en las células tubulares como el desprendimiento de éstas de la membrana basal que resulta en un aumento de la permeabilidad con fuga de filtrado glomerular desde la luz tubular hacia el intersticio (Zuk, Bonventre y Matlin, 2001). Así, durante este proceso también es frecuente observar edema intersticial o acumulación de leucocitos en el intersticio (Basile, Anderson y Sutton, 2012). De forma que la suma de la activación de la cascada de activación en el endotelio y la destrucción tubular podría resultar en el intercambio de componentes de ambas zonas, y que de esta manera las nanopartículas procedentes de las células endoteliales que intervienen en la cascada de la coagulación se desplazaran a los túbulos y de estos a la orina.

Para comprobar la procedencia de PAI-1 se analizó su expresión en una línea celular de túbulo proximal. Con la finalidad de reproducir las condiciones de los experimentos *in vivo*, se evaluó el perfil concentración-respuesta del cisplatino sobre la línea utilizada y se eligió una concentración citotóxica que pudiera modificar la expresión de la proteína de interés igual que ocurre en los modelos animales.

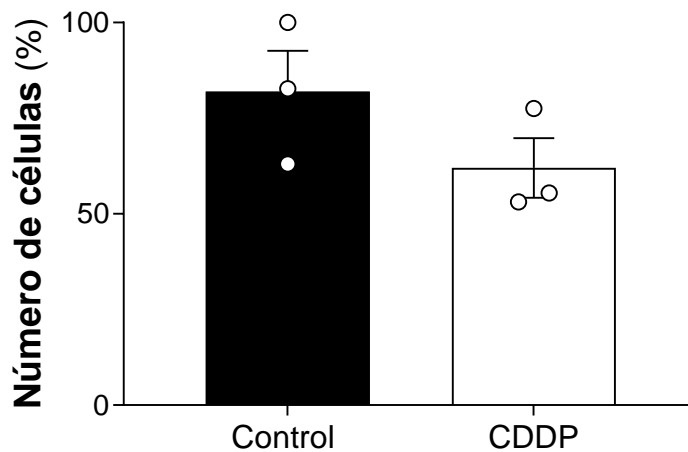


Figura 31. Análisis de la viabilidad celular tras el tratamiento con cisplatino. Porcentaje del número de células viables evaluado mediante ensayo de MTT a las 18 horas tras el tratamiento con cisplatino $60 \mu\text{M}$ (CDDP). Los datos se expresan como la media \pm error estándar de la media (EEM).

El cisplatino es altamente tóxico para las células (Sorenson y Eastman, 1988; Saris *et al.*, 1996). La evaluación de la viabilidad celular se relacionó con la citotoxicidad del fármaco donde según los datos obtenidos, después de las 18 horas de tratamiento se redujo la viabilidad celular y aumentó el número de células apoptóticas (Figura 31) como ya se indicó en estudios previos (Wang *et al.*, 2017).

El cisplatino es capaz de activar tanto la vía de la apoptosis intrínseca como la extrínseca. Este fenómeno de muerte celular se define como el colapso de una célula a través de un proceso activo y altamente regulado que requiere actividad metabólica por parte de la célula moribunda y se caracteriza por la presencia de ampollas en la membrana, encogimiento celular, condensación de cromatina y fragmentación del ADN (Kerr, Wyllie y Currie, 1972). Este tipo de muerte se pudo observar durante una secuencia de imágenes que se tomaron desde el tiempo 0 del tratamiento hasta su finalización a las 18 horas (Figura 32).

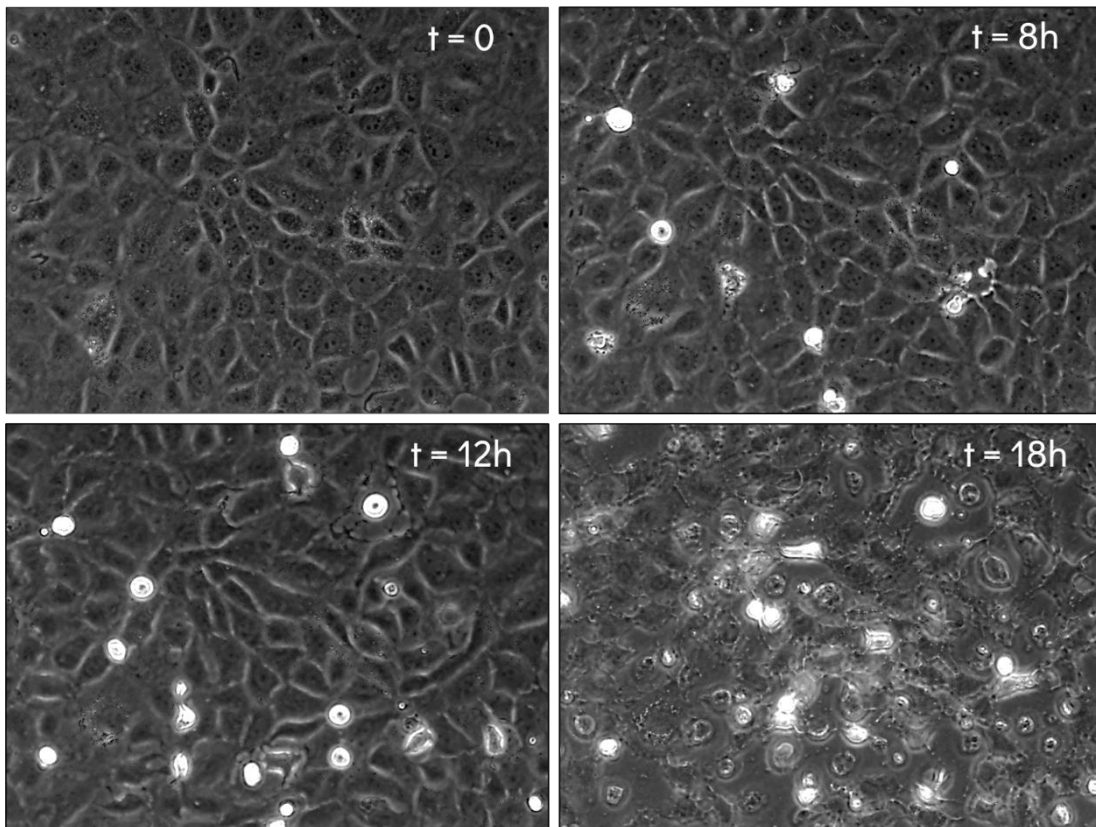


Figura 32. Apoptosis de las células epiteliales de túbulo proximal tras el tratamiento con cisplatino. Imágenes representativas tras 0, 8, 12 y 18 horas de tratamiento con cisplatino a una concentración de 60 μ M. Magnificación original: 400X.

El análisis del extracto celular confirmó que la expresión del PAI-1 en las células epiteliales tubulares de rata aumentó tras la exposición al cisplatino. El aumento del flujo de salida o la disminución de la recaptación por parte de las células dañadas, pudo propiciar que se encontraran mayores cantidades de esta proteína en el compartimento extracelular (Figura 33). Por tanto, estos resultados sugieren que las células de los túbulos sintetizan y secretan PAI-1, cuya expresión aumenta en condiciones citotóxicas.

El PAI-1 es sintetizado por una variedad de células que incluyen células endoteliales vasculares, adipocitos, macrófagos, cardiomiocitos y fibroblastos (Ghosh y Vaughan, 2012). Se trata de una proteína que media actividades biológicas

importantes como la angiogénesis, homeostasis e invasión de células tumorales además de la remodelación tisular y otros procesos, incluida la migración celular (Sillen y Declerck, 2021). En condiciones fisiológicas PAI-1 normalmente no se produce en los riñones, sin embargo, en varios estados del DRA esta proteína es sintetizada por las células inflamatorias residentes e intrarrenales (Eddy y Fogo, 2006). Según algunos estudios *in vitro*, el PAI-1 participa en la reparación de células epiteliales renales tras un daño regulando la motilidad celular (Providence y Higgins, 2004); su expresión aumenta durante la fase migratoria de células epiteliales renales (Pawar, Kartha y Toback, 1995).

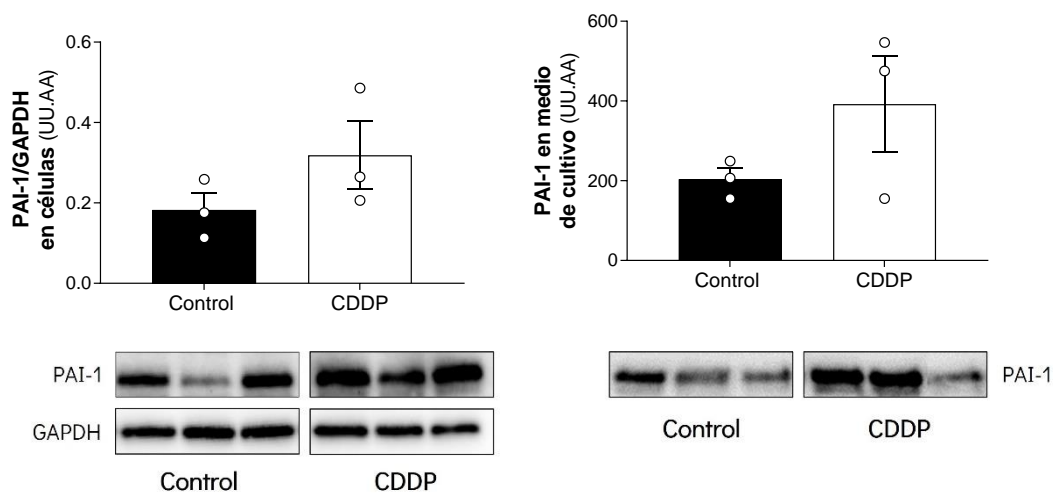


Figura 33. Análisis de la expresión de PAI-1 intracelular y en medio de cultivo. Cuantificación por densitometría óptica e imágenes representativas del análisis por Western blot de la expresión de PAI-1 en células epiteliales de túbulo proximal y en el medio de cultivo, en condiciones basales y tras el tratamiento con cisplatino (18 horas). Se utilizó GAPDH como control de carga. CDDP: Cisplatino 60 μ M; GAPDH: enzima Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa; PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno-1; UU. AA: unidades arbitrarias. Los datos se expresan como la media \pm error estándar de la media (EEM).

La presencia del PAI-1 en células epiteliales del túbulo en condiciones basales y el aumento de sus niveles en condiciones tóxicas parece no estar relacionada con el sistema de la coagulación debido a la inexistencia de factores que podrían activar este proceso en este contexto experimental.

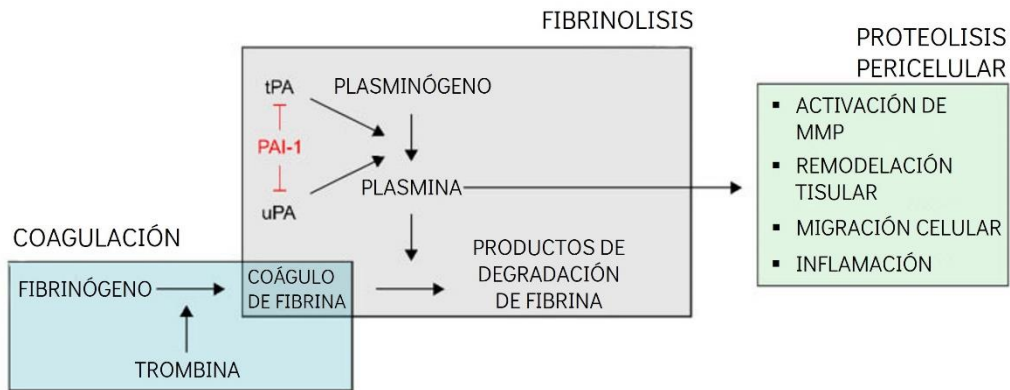


Figura 34. Procesos en los que participa PAI-1. Tras la lesión vascular, se activa el proceso de coagulación que genera trombina y actúa sobre el fibrinógeno para formar un coágulo de fibrina. Esta respuesta de coagulación está equilibrada por el sistema fibrinolítico. Los activadores de plasminógeno de tipo tisular (tPA) y de tipo uroquinasa (uPA) convierten el plasminógeno en plasmina proteolíticamente activa. La plasmina, enzima clave del sistema fibrinolítico, degrada el coágulo de fibrina en productos de degradación de fibrina solubles. A través de la activación del plasminógeno mediada por uPA, la función de la plasmina se extiende a los procesos proteolíticos pericelulares, que involucran la activación de metaloproteinasas de la matriz (MMP), remodelación tisular, migración y adhesión celular e inflamación. PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno-1. Figura adaptada de (Sillen y Declerck, 2021).

Estos resultados nos condujeron a estudiar la coagulación a nivel sistémico para comprobar si la alteración de dicho proceso estaba relacionada con la aparición de PAI-1 en las VE urinarias durante un DRA o si, por el contrario, era consecuencia, además, de otro tipo de procesos como parecían indicar los resultados *in vitro*.

7.1 Los niveles urinarios del PAI-1 no están relacionados la una alteración sistémica de la coagulación en el DRA

El análisis IPA apuntaba principalmente a la vía de la coagulación como la más representada por las proteínas contenidas en las VE urinarias aisladas durante un DRA. Para corroborar la relación entre el proceso de nefrotoxicidad que desencadena un daño renal inducido por cisplatino y la afectación de esta vía se realizaron los siguientes estudios.

En primer lugar, se midió el INR. Esta prueba mide el tiempo (en segundos) requerido para la formación de coágulos después de agregar el reactivo de tromboplastina, de forma que evalúa la afectación de los factores de coagulación y, por tanto, de las vías de coagulación (Dorgalaleh *et al.*, 2021).

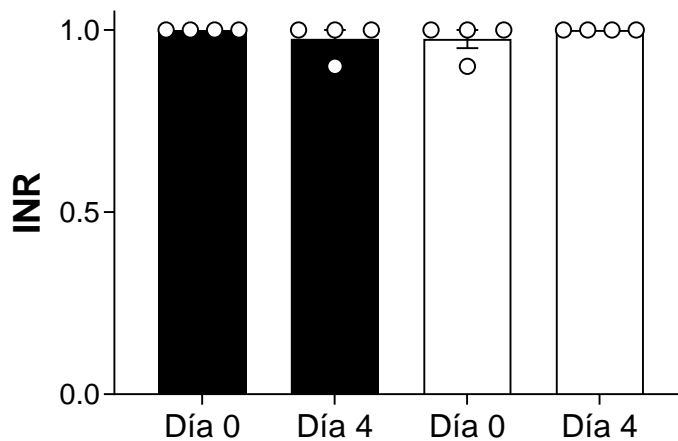


Figura 35. Valores de INR de ratas controles y tratadas con cisplatino. La determinación se realizó el Día 0 (basal) y el Día 4 (día de máximo daño renal). INR: ratio internacional estandarizado; CDDP: cisplatino 5 mg/kg. Los datos se expresan como la media \pm error estándar de la media (EEM).

En una persona con una coagulación normal el INR es igual a 1 (Dorgalaleh *et al.*, 2021). Por tanto, tras los resultados obtenidos, se puede considerar que todos los animales del estudio tuvieron un tiempo de protrombina normal tanto el día 0 (basal) como cuando desarrollaron un DRA 4 días después de la inyección del cisplatino, manteniendo su INR entre 0,9-1 (Figura 35). En el grupo control tampoco hubo variaciones entre los puntos de estudio. Esta prueba nos indicó que no había afectación del sistema de coagulación de los animales con un DRA tóxico.

También se analizaron los cortes histológicos de los riñones de estos animales. Para realizar esta determinación, los animales no se perfundieron para no eliminar ningún indicio de coágulos o procesos trombóticos.

Como se muestra en las imágenes de la Figura 36 no se encontró ningún indicio en las estructuras renales de que la cascada de la coagulación se hubiera

activado, ya que los vasos sanguíneos de las zonas de estudio estaban libres de coágulos de fibrina. En la luz de los vasos se observan solamente restos de eritrocitos y en algunos casos, material proteináceo en ambos grupos experimentales.

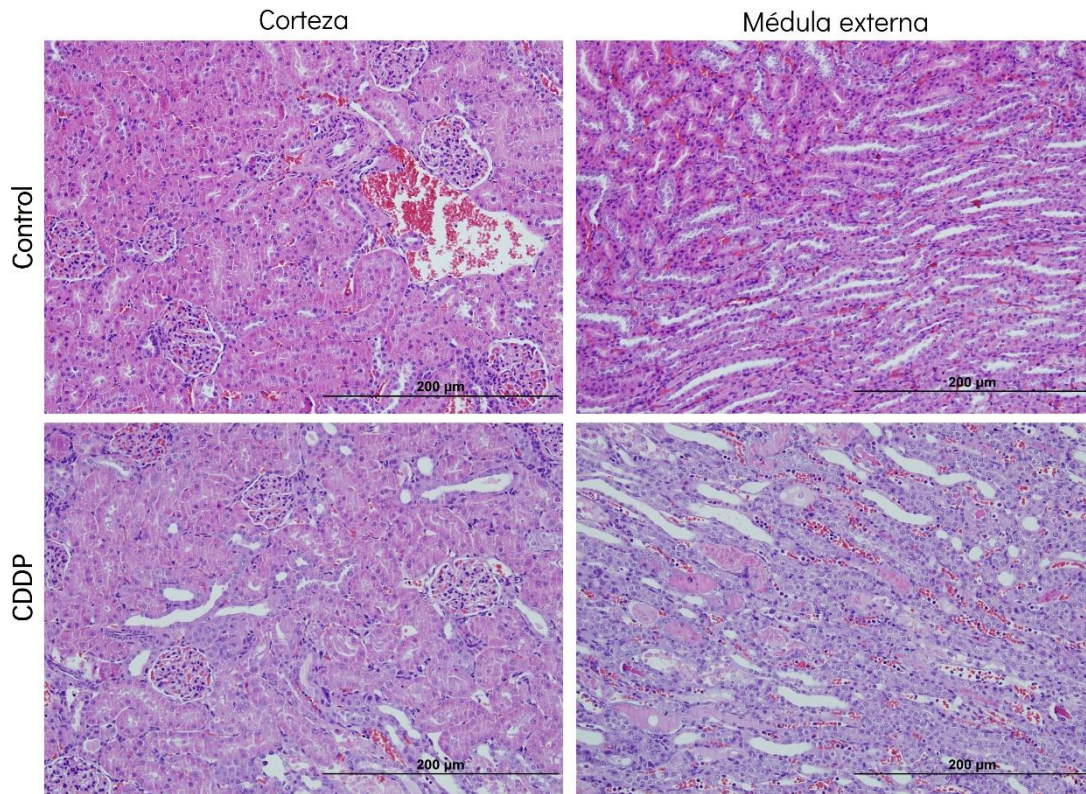


Figura 36. Evaluación de la coagulación en las estructuras renales mediante la tinción con hematoxilina y eosina. Imágenes representativas (200X) de cortes histológicos de la región cortical y medular externa de animales control y tratadas con cisplatino 5 mg/kg (CDDP).

Aunque los primeros resultados parecían indicar que la presencia de PAI-1 en las VE urinarias durante un DRA estaba vinculada solamente con la coagulación, los estudios posteriores sobre la alteración de este proceso sugirieron que no tienen una aparente conexión o no es un fenómeno suficientemente notorio. Por otro lado, la ausencia de procesos trombóticos completos concuerda con los datos obtenidos *in vitro* donde hay una clara expresión de PAI-1 en ausencia de factores que puedan intervenir en la activación de la cascada de coagulación. Es por ello por lo que la

explicación de la presencia de PAI-1 en las VE urinarias y su posible función podría ser otra.

Varias proteasas y sus inhibidores específicos modulan los procesos de migración celular y proteólisis de la matriz como parte del proceso global de reparación de una lesión. Las células pueden migrar a través de las barreras tisulares (Lund *et al.*, 1999) con, a menudo, dependencia de la conversión del plasminógeno a la proteasa plasmina por acción del uPA, (Andreasen, Egelund y Petersen, 2000) cuya actividad está regulada, a su vez, por PAI-1 (Cajot *et al.*, 1990). El conjunto de estos procesos es un determinante principal del equilibrio proteolítico pericelular general que afecta, por lo tanto, a la remodelación de la matriz extracelular (MEC) y al movimiento celular dirigido (Odekon, Sato y Rifkin, 1992; Bajou *et al.*, 1998; Lund *et al.*, 1999; Legrand *et al.*, 2001). La capacidad de PAI-1 para limitar la síntesis de plasmina aparentemente promueve la invasión del estroma al preservar una estructura que sirve como un "andamio" de matriz que permite la migración (Bajou *et al.*, 1998, 2001). La función de esta proteína inhibidora puede no estar restringida a sus propiedades antiproteolíticas, ya que estudios sugieren un papel más general en el control de la adhesión de la célula al sustrato (Palmieri *et al.*, 2002; Al-Fahkri *et al.*, 2003; Czekay *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2020).

El PAI-1 activo se estabiliza por su interacción de alta afinidad con la glicoproteína vitronectina. La vitronectina está presente en abundancia en el plasma y la MEC y desempeña un papel fundamental en la remodelación tisular, la diferenciación y migración celular y la inflamación (Wheaton *et al.*, 2016). Estos efectos están mediados por su unión a proteínas asociadas a la superficie celular que incluyen integrinas y receptores transmembrana como el receptor de uPA (uPAR), que inician eventos de señalización intracelular. Debido a la proximidad de los sitios de unión que tiene la vitronectina para PAI-1, integrinas y uPA, PAI-1 puede interferir con la función de ésta ya que compite con las integrinas y uPAR por unirse a ella.

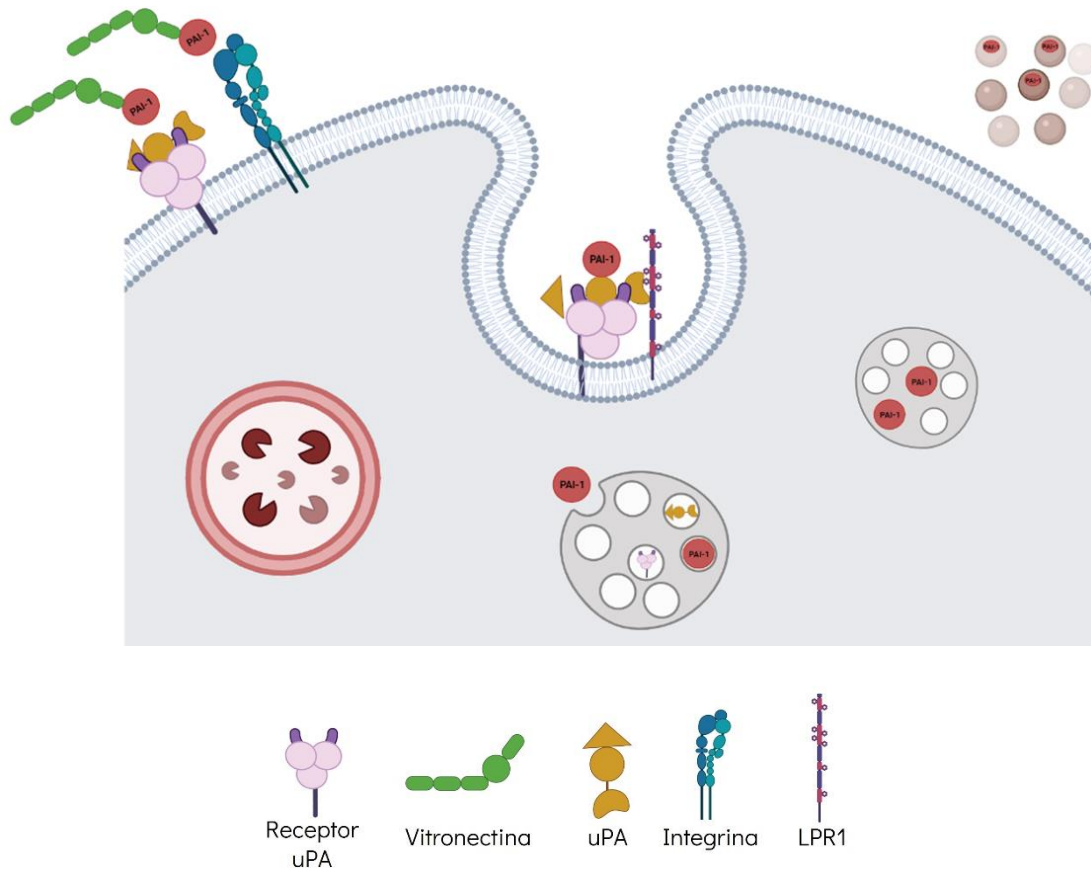


Figura 37. Regulación de la migración y adhesión celular mediada por PAI-1. PAI-1 puede unirse a uPA para formar el complejo uPAR-uPA-PAI-1 y así alterar las vías de señalización en las cuales está implicado uPAR (PAI-1 también puede inhibir uPA en estado libre). Al formarse este complejo, se internaliza en la célula con la ayuda de la proteína LRP1. (Czekay et al., 2001). Por otro lado, la vitronectina también interactúa con el complejo uPA-uPAR-integrinas, de tal manera que PAI-1 puede evitar su formación uniéndose tanto a vitronectina como a uPA y, por lo tanto, interrumpir la activación de las vías de señalización de las que forman parte y promoviendo la migración y alterando las uniones célula-célula (Bale et al., 1989; Deng et al., 1996, 2001; Waltz et al., 1997). LRP1: Proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad (de sus siglas en inglés Low density Lipoprotein Receptor-related protein 1); MEC: Matriz extracelular; uPA: activador del plasminógeno tipo uroquinasa (de sus siglas en inglés Urokinase-type Plasminogen Activator); uPAR: receptor del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (de sus siglas en inglés Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor).

Junto al sitio de unión de la vitronectina, el PAI-1 también muestra una zona de enlace de alta afinidad para los receptores de la familia LDLR, como la proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LPR1 de sus siglas en inglés *Low density Lipoprotein Receptor-related protein 1*) (Gettins y Dolmer, 2016).

Nuestros resultados sugieren que la presencia de PAI-1 en las vesículas urinarias podría estar relacionada con un proceso de reparación que comienza ya en las primeras fases del DRA (Bonventre y Zuk, 2004). La marcada necrosis tubular provoca una respuesta inflamatoria que induce la liberación de citoquinas y quimiocinas. Además, se desencadenan procesos de migración y proliferación celular para recuperar la integridad tisular y funcional. Según algunos estudios (Pawar, Kartha y Toback, 1995) y nuestros resultados, en esta etapa las células epiteliales renales comienzan a sintetizar PAI-1 de manera más prominente con respecto a una situación de normalidad, que podría potenciar la reparación de la lesión. Cuando PAI-1 interactúa con el complejo uPA-uPAR, que se encuentra en la superficie celular, el inhibidor también interacciona con el receptor LPR1 y el complejo se internaliza dentro de la célula por endocitosis para posteriormente ser degradado y el reciclado (Sillen y Declerck, 2021). Este evento produce un decremento del receptor en la superficie celular e interrumpe así las vías de señalización relacionadas con la adhesión celular y la organización del citoesqueleto y la MEC (Czekay et al., 2001). El complejo una vez internalizado es dirigido hacia los lisosomas para su degradación (Sillen y Declerck, 2021). Los encargados del transporte dentro de la célula son los endosomas. Se trata de las estructuras principales en la biogénesis de un tipo de VE lo que podría explicar la presencia de PAI-1 en ellas durante un episodio de DRA.

8. EL PAI-1 URINARIO EN PACIENTES CON DRA

El papel del PAI-1 ha sido estudiado en humanos en diversos procesos fisiológicos y fisiopatológicos. Su función principal se ha asociado a la regulación de la trombólisis y la hemostasia como inhibidor de la fibrinólisis (Van De Craen, Declerck y Gils, 2012). Esta proteína se ha relacionado con procesos como la fibrosis, la artritis reumatoide, la aterosclerosis y diversas enfermedades, incluidas las enfermedades cardiovasculares, las alteraciones metabólicas, el envejecimiento, el cáncer, la obesidad y las enfermedades neurodegenerativas (Carmeliet y Collen, 1997; Juhan-Vague *et al.*, 2003). Pero además de su papel en la hemostasia también modula la adhesión o migración celular interviniendo en la cicatrización de heridas, la angiogénesis y la metástasis de células tumorales (Małgorzewicz, Skrzypczak-Jankun y Jankun, 2013).

	DRA (n = 63)	Controles (n = 9)
Género (hombre/mujer)	45/18 71,4%/28,6%	4/5 44,4%/55,6%
Edad (años)	62,8 ± 16,0 *	50,6 ± 14,6
Peso (Kg)	79,9 ± 13,2	73,0 ± 21,6
Altura (cm)	167,6 ± 9,9	165,3 ± 8,1
Cr _{pl} (mg/dL)	6,6 ± 4,4 *	0,7 ± 0,2
Diabetes mellitus (si/no)	43/20 68,3%/31,7%	7/2 77,8%/22,2%
Hipertensión (si/no)	16/47 * 25,4%/74,6%	6/3 66,7%/33,3%
Enfermedad renal crónica (si/no)	42/21 66,7%/33,3%	7/2 77,8%/22,2%
Enfermedad cardiovascular (si/no)	26/37 * 41,3%/58,7%	8/1 88,9%/11,1%

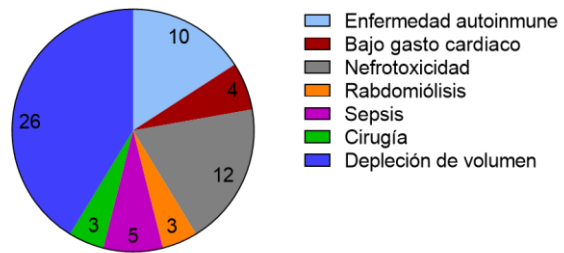


Figura 38. Características y etiologías del DRA de los pacientes que participaron en el estudio.

En algunos estudios se ha detectado un aumento de los niveles de PAI-1 en tejidos dañados e inflamados (Renckens *et al.*, 2005), esto sugiere que esta proteína también podría participar en el proceso inflamatorio. Se sabe que actúa como factor profibrótico en diferentes órganos, incluidos los riñones (Ghosh y Vaughan, 2012), inhibiendo la renovación de la MEC dependiente de plasmina, aumentando la

expresión de TGF- β y estimulando la infiltración de macrófagos y miofibroblastos (Huang y Noble, 2007; Seo *et al.*, 2009). Específicamente, PAI-1 juega un papel importante en la fibrosis renal y en la progresión de la ERC (Huang y Noble, 2007; Małgorzewicz, Skrzypczak-Jankun y Jankun, 2013), pero también se ha relacionado con el DRA de origen séptico (Gupta *et al.*, 2015) y con microangiopatías trombóticas renales (Eddy, 2002).

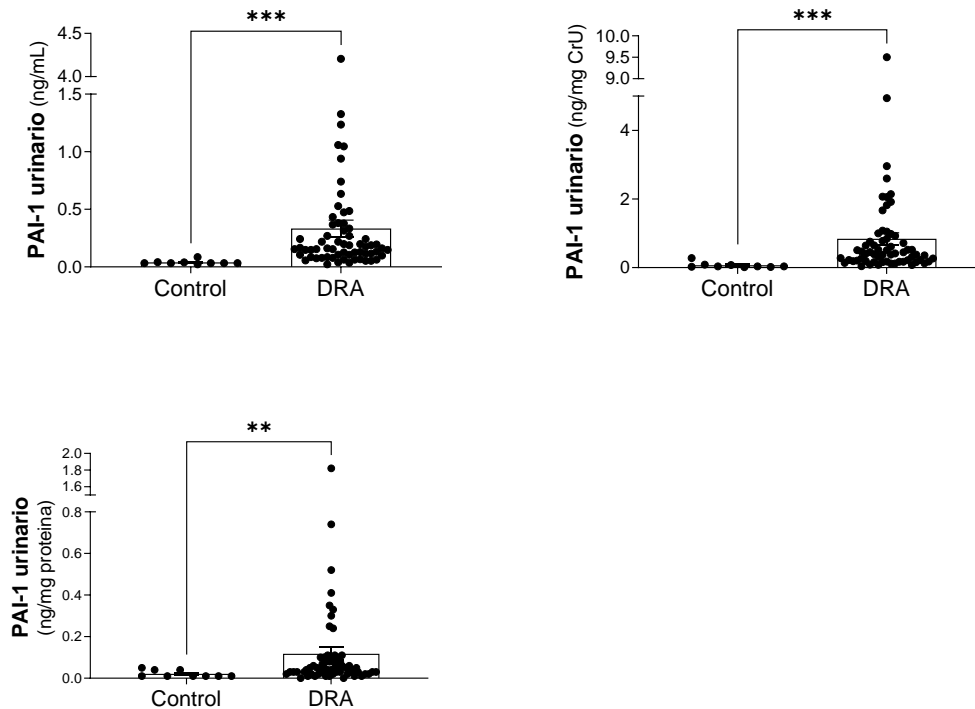


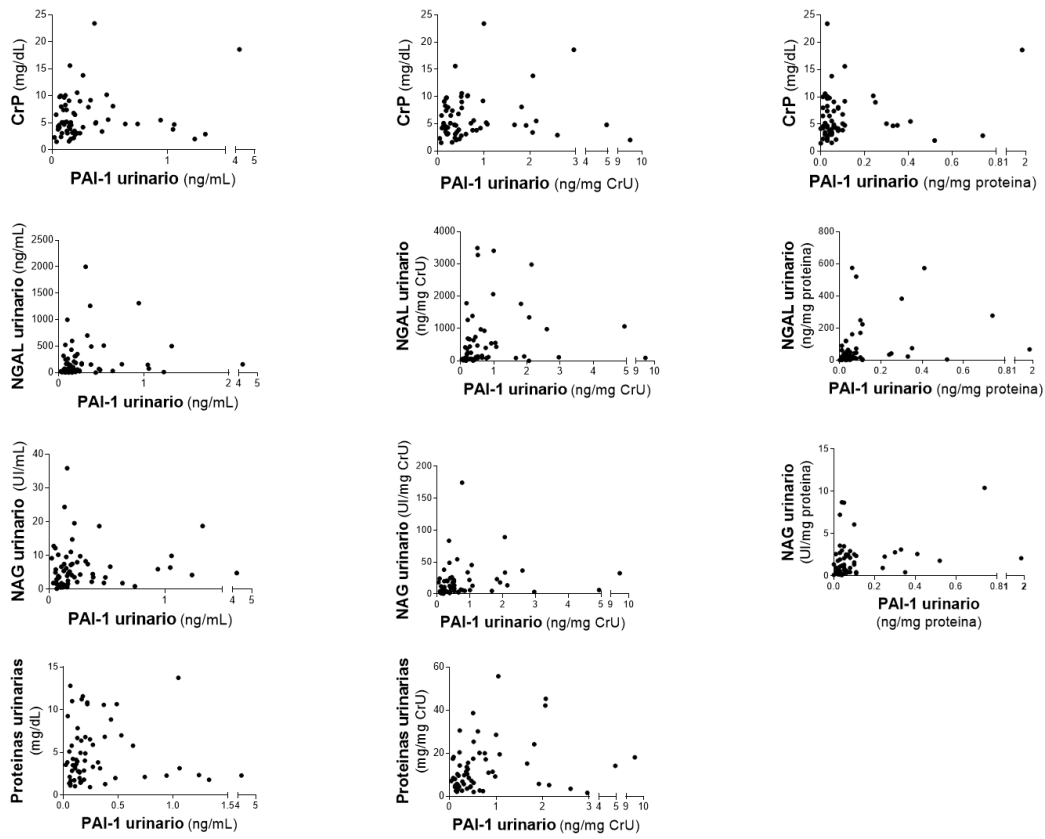
Figura 39. Niveles urinarios de PAI-1 en pacientes controles y con DRA. a. Concentración urinaria de PAI-1. **b.** Concentración urinaria de PAI-1 normalizada por creatinina urinaria (CrU). **c.** Concentración urinaria de PAI-1 normalizada por proteinuria. Los datos se expresan como la media \pm error estándar de la media (EEM). ** $p < 0,01$ vs. Grupo control; *** $p < 0,001$ vs. Grupo control.

Los datos de la excreción urinaria del PAI-1 en pacientes con DRA, cuyas características se detallan en la Figura 38, se normalizaron por la CrU, parámetro de normalización de uso frecuente en pacientes (al no disponerse de los valores de flujo urinario), y por la proteinuria. Los datos corregidos por la proteinuria (Figura 39c) sugieren que la excreción de PAI-1 no es una consecuencia general de la pérdida indiscriminada de proteínas, sino el reflejo de un fenómeno más específico. En todos los casos, el PAI-1 urinario se encuentra significativamente elevado en los pacientes

con DRA con respecto a los controles, cuyos niveles son muy bajos (Figura 39). Estos resultados son coherentes con los datos de los experimentos *in vivo*, donde se observó que, en los 2 modelos utilizados etiológicamente diferentes de daño tubular, como son el cisplatino y lesión isquémica, la excreción urinaria de PAI-1 aumentó relacionándose con su sobreexpresión en los riñones. En estos modelos de daño tubular como en los reportados en (Quiros *et al.*, 2010, 2013) la inflamación amplifica el daño (Sánchez-González *et al.*, 2011; Sharfuddin y Molitoris, 2011). Por lo tanto, PAI-1 podría estar involucrado también en estas respuestas inflamatorias.

La lesión renal que producen estos tipos de DRA desencadena eventos procoagulatorios como la disfunción endotelial (Devarajan, 2006; Basile, Anderson y Sutton, 2012), expresión de moléculas de adhesión en las plaquetas (Singbartl, Forlow y Ley, 2001) y en las células endoteliales (Devarajan, 2006), y depósito de fibrina en la luz vascular, el glomérulo y cápsula e intersticio de Bowman (Enestrom y Rammer, 1988; Loverre *et al.*, 2004). De acuerdo con esto, la fibrinólisis reduce la obstrucción tubular, probablemente evitando la conversión de fibrinógeno en fibrina (Enestrom y Rammer, 1988). Estos eventos procoagulantes no parecen conducir a procesos trombóticos completos, sino más bien a una leve obstrucción microvascular (Devarajan, 2006; Basile, Anderson y Sutton, 2012) resultante de la agregación de las células sanguíneas y las plaquetas al endotelio (Molitoris y Sutton, 2004; Devarajan, 2006). La disfunción del endotelio también permite la infiltración de glóbulos blancos, diapedesis, hiperpermeabilidad vascular e inflamación (Özden *et al.*, 2001) que activa la señalización endotelial proinflamatoria y procoagulante (Bonventre, 2007). Por tanto, la coagulación patológica también podría explicar la participación de PAI-1 en el DRA tóxico e isquémico.

Como se muestra en la tabla de la Figura 40, se encontraron correlaciones estadísticamente significativas pero bajas entre los niveles de PAI-1 urinario y la excreción urinaria de NGAL y NAG, lo que sugiere que el significado fisiopatológico transmitido por PAI-1 no es redundante, sino complementario, al significado de ambos biomarcadores.



a	CrP (mg/dL)	Proteinuria (mg/mL)	NGAL urinario (ng/mL)	NAG urinario (UI/mL)
PAI-1 urinario (ng/mL)	0,116	0,094	0,309*	0,199
b	CrP (mg/dL)	Proteinuria (mg/mg CrU)	NGAL urinario (ng/mg CrU)	NAG urinario (UI/mg CrU)
PAI-1 urinario (ng/mg CrU)	0,154	0,309*	0,426***	0,374**
c	CrP (mg/dL)		NGAL urinario (ng/mg proteína)	NAG urinario (UI/mg proteína)
PAI-1 urinario (ng/mg proteína)	0,154		0,378**	0,363**

Figura 40. Correlación de los niveles urinarios de PAI-1 y otros biomarcadores de daño renal. a. Análisis con los datos brutos de biomarcadores urinarios. **b.** Biomarcadores urinarios normalizados por la concentración de creatinina urinaria. **c.** Biomarcadores normalizados por la proteinuria. Los datos se expresan como coeficiente de correlación de Spearman. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. CrP: concentración de creatinina plasmática; CrU, concentración de creatinina urinaria. NAG: enzima N-acetil- β -D-glucosaminidasa; NGAL: lipocalina asociada a la gelatinasa

de neutrófilos (de sus siglas en inglés Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin); PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno-1 (de sus siglas en inglés Plasminogen Activator Inhibitor-1. UI: unidades internacionales.

El hecho de que el PAI-1 parezca aportar información diferente respecto a otros biomarcadores de DRA como es la NGAL resulta interesante, ya que pone de manifiesto la necesidad de hallar biomarcadores con un significado fisiopatológico concreto y diferente entre sí que permitan realizar un diagnóstico etiopatológico del DRA más preciso.

Como conclusión de este apartado, se muestra un resumen de los principales resultados obtenidos en este trabajo de investigación:

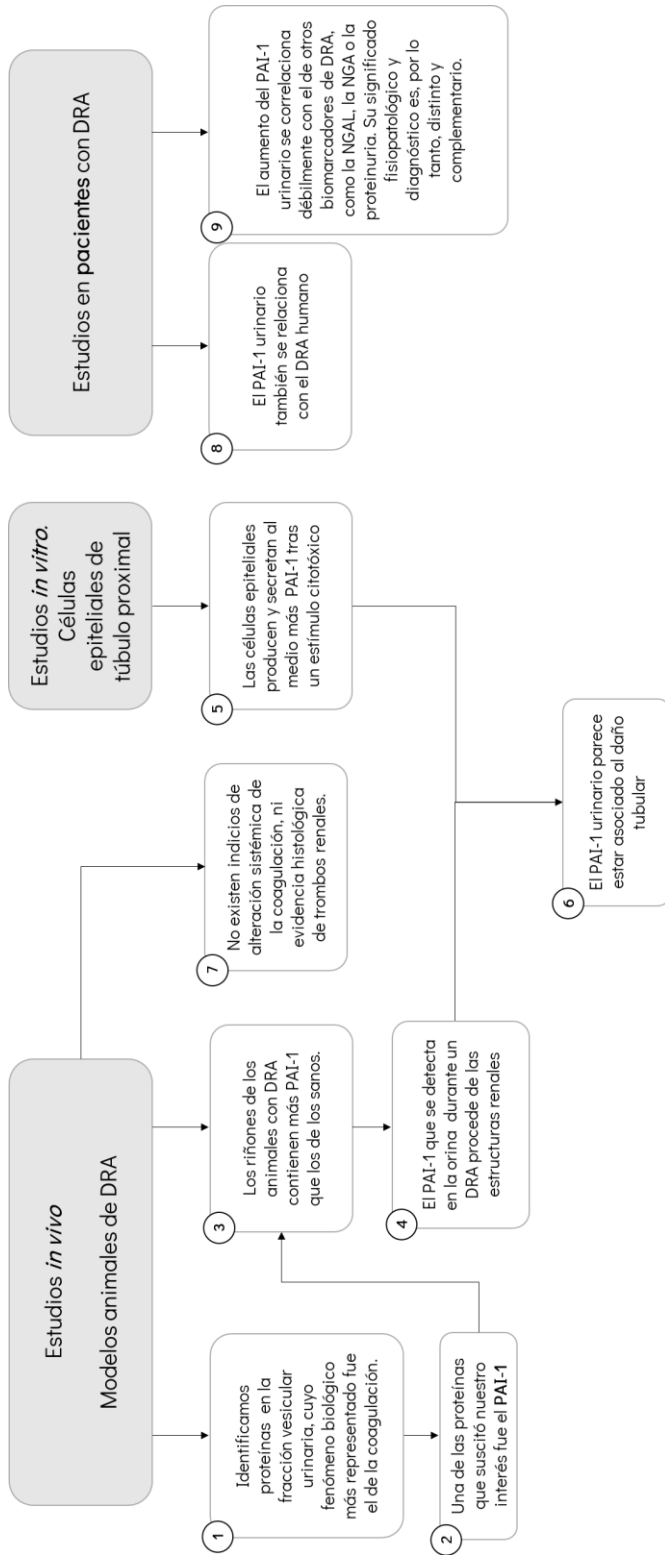


Figura 41. Esquema de los principales resultados obtenidos en este trabajo de investigación. DRA: daño renal agudo; NAG: enzima N-acetil-β-D-glucosaminidasa; NGAL: lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (de sus siglas en inglés Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin); PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno-1 (de sus siglas en inglés Plasminogen Activator Inhibitor-1).

DISCUSIÓN FINAL

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación ponen de manifiesto la relación entre el PAI-1 y el DRA y la utilidad potencial de esta proteína en el diagnóstico de este síndrome. En los últimos años, la búsqueda de biomarcadores de DRA se ha centrado en la necesidad de hallar proteínas relacionadas con procesos fisiopatológicos concretos que permitan identificar el patrón de daño subyacente sobre el que realizar un diagnóstico más preciso y estratificado, predecir la evolución de la enfermedad y el desenlace clínico, y aplicar el tratamiento más adecuado.

Algunos biomarcadores como las proteínas NGAL, KIM-1, TIMP-2 o IGFBP7 han irrumpido en la práctica clínica aportando información complementaria a la de la CrP (Vaidya et al., 2008; Medic et al., 2016). Durante mucho tiempo se pensó que la mayoría de ellos, si no todos, eran producidos por los riñones tras una lesión de las células epiteliales tubulares, y que eran eliminados por éstas directamente a la orina, de modo que se los relacionó estrechamente con el daño tubular. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que el aumento de los niveles urinarios de NGAL (Sancho-Martínez, Blanco-Gozalo, et al., 2020; Skrypnyk et al., 2020), TIMP-2 e IGFBP7 (Johnson y Zager, 2018) no es necesariamente el resultado de la necrosis tubular, sino de cualquier alteración que produzca una reducción de la reabsorción tubular de las proteínas filtradas. Por ello, es necesario continuar con la búsqueda de nuevos marcadores con significado biológico conocido y diferente entre sí, y específicos de procesos biológicos individuales.

Hasta el momento, el PAI-1 se ha relacionado vagamente con el DRA. Hay estudios que vinculan esta proteína con el DRA producido por la sepsis (Gupta et al., 2015), con la detección temprana del daño renal intrínseco (Blanco-Gozalo, 2017) y con las secuelas subclínicas derivadas de la lesión del parénquima renal (Cuesta, 2018), pero no se ha profundizado ni en su origen ni en su significado fisiopatológico en esta nefropatía.

En este trabajo se ha asociado el aumento de los niveles urinarios del PAI-1 con el DRA intrínseco, y este hecho podría deberse a diferentes procesos. Según nuestros resultados, el PAI-1 se encuentra en el plasma en condiciones fisiológicas y también tras un episodio de DRA tóxico o isquémico. Debido a su bajo peso molecular

esta proteína se filtra libremente a través de los glomérulos y posteriormente se reabsorbe casi totalmente en los túbulos. Una lesión tubular, como la que ocurre en el DRA intrínseco, puede provocar desde la pérdida del borde en cepillo de las células tubulares hasta su muerte, lo que conduce a una reabsorción defectuosa de las proteínas filtradas, como el PAI-1, y su excreción con la orina (**Figura 41.1**).

Por otra parte, la identificación del PAI-1 en la fracción vesicular de la orina tras el tratamiento con cisplatino sugiere que esta proteína podría tener un origen renal, es decir, que se produce tras un estímulo tóxico por los riñones dañados. Esta conjetura cobró más relevancia cuando observamos una relación entre la expresión renal del PAI-1 y su excreción urinaria durante el DRA. Tras el análisis posterior de la orina recogida durante la perfusión renal *in situ*, se confirmó que su aparición en la orina durante este síndrome se debe, al menos en parte, a su producción y eliminación directa por parte de las células renales. Esta proteína está relacionada con la coagulación, pero los resultados *in vitro* mostraron que, al menos en las células tubulares, el aumento de la síntesis de PAI-1 inducido por la citotoxicidad del cisplatino no parecía estar relacionado solamente con dicho proceso. Por tanto, todos los indicios apuntan a que esta proteína podría ser un marcador de daño tubular (**Figura 41.2**).

Según nuestros resultados, tras el tratamiento con cisplatino aumenta la expresión del PAI-1 en las células epiteliales del túbulo proximal y también su secreción al medio. Una de las funciones reconocidas del PAI-1 es como mediador en los procesos de remodelación tisular y migración celular (Sillen y Declerck, 2021). La expresión del PAI-1 está regulado directamente por proteínas involucradas en la remodelación de la MEC y por cambios en la estructura del citoesqueleto (Frixen y Nagamine, 1993). Tanto la isquemia como el tratamiento con cisplatino son capaces de alterar la estructura del citoesqueleto (Molitoris, Dahl y Geerdes, 1992; Brown, Lee y Bonventre, 1997; Sancho-Martínez et al., 2012) y desorganizar los filamentos de actina y las moléculas de adhesión. Este fenómeno ya se ha relacionado con una mayor síntesis de PAI-1 (Samarakoon y Higgins, 2002) y, por tanto, podría explicar su aumento en las células tubulares. Ya en la fase de mantenimiento del DRA se inicia la reparación celular. Este proceso implica la migración y la proliferación celular para recuperar la integridad tisular y funcional. Así, es posible que la producción de PAI-1 tras un daño tubular esté relacionada con la reparación de estas estructuras.

La implicación del PAI-1 en la migración celular parte de su unión con otras proteínas. Una de las alternativas que tiene es unirse a una de las moléculas que inhibe, el uPA. Cuando el éste está unido a su receptor de membrana (uPAR), el PAI-1 puede unirse a este complejo y alterar las vías de señalización en las que está implicado el receptor de uPA. Este nuevo complejo (PAI-1-uPA-uPAR) se internaliza en la célula mediante endocitosis con la ayuda de la proteína LRP1, lo que conlleva una disminución de la cantidad de uPAR en la superficie celular. Esto produce la desorganización del citoesqueleto y de la MEC, así como la interrupción de las vías de señalización en las que está implicado el complejo uPAR-uPA (Nykjaer et al., 1997). Otra de las opciones que tiene el PAI-1 es unirse al complejo formado por el uPA, el uPAR y la vitronectina, lo que provoca la pérdida de contactos focales entre la célula y la MEC mediados por las integrinas, e interrumpe la activación de las vías de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK de sus siglas en inglés Mitogen-Activated Protein Kinases) y de las quinasas de adhesión focal (FAK de sus siglas en inglés Focal Adhesión Kinase), ambas relacionadas con la adhesión y migración celulares (Bale et al., 1989; Deng et al., 1996; Waltz et al., 1997).

Cuando el PAI-1 se une al complejo uPA-uPAR y éste se internaliza, el conjunto se dirige a los lisosomas para su degradación y posterior reciclaje (Sillen y Declerck, 2021). Las estructuras encargadas de transportar los componentes celulares inservibles a los lisosomas son los endosomas. Estos orgánulos se forman por endocitosis de la membrana plasmática y posteriormente incorporan las moléculas que tienen que transportar. El contenido que portan puede ser degradado o liberado al medio extracelular, proceso que forma parte de la biogénesis de un tipo de VE. Por tanto, es posible que exista una conexión entre el aumento de la síntesis de PAI-1 por parte de las células tubulares y la aparición de esta proteína en las VE urinarias. Sin un aumento en la síntesis de PAI-1, posiblemente se producirían menos interacciones con las proteínas uPA, uPAR, y vitronectina y, por tanto, menos migración celular y menor reparación tubular, lo que se traduciría en una menor presencia de PAI-1 en las VE urinarias. Según esta teoría, los eventos de reparación celular que se producen durante un daño tubular provocado por un episodio de DRA podrían ser otro de los mecanismos responsables de la presencia de PAI-1 en la orina, tanto en su forma soluble como en la fracción vesicular.

La lesión vascular también forma parte de la fisiopatología del DRA inducido tanto por el cisplatino como por la isquemia. Una de las estructuras vasculares que puede sufrir sus efectos nocivos es el endotelio (Winston y Safirstein, 1985). Se sabe que la lesión endotelial induce un estado proinflamatorio y protrombótico que implica la sobreexpresión de moléculas de adhesión, la infiltración de leucocitos y su consiguiente unión al endotelio con una posterior liberación de citoquinas y congestión vascular (Luke, Vadiiei y Lopez-Berestein, 1992). Así pues, la lesión de los capilares peritubulares podría contribuir a la explicación del aumento de la excreción urinaria del PAI- 1 durante un DRA, como se explica a continuación.

El PAI-1 se ha relacionado con el proceso inflamatorio debido a que sus niveles se han encontrado aumentados en tejidos dañados e inflamados (Renckens et al., 2005). En el contexto del DRA, se sabe que esta proteína participa en el daño inducido por la sepsis (Gupta et al., 2015), y dicho síndrome tiene un importante componente inflamatorio tubular y endotelial. Se sabe que algunas citoquinas inflamatorias como el TNF α inducen actividad procoagulante en las células endoteliales humanas (Bevilacqua et al., 1986; Nawroth y Stern, 1986). Con anterioridad ya se han descrito eventos procoagulantes renales en los tipos de DRA tóxico e isquémico que implican disfunción endotelial (Devarajan, 2006; Basile, Anderson y Sutton, 2012). Pero estos fenómenos no parecen conducir a procesos trombóticos completos, sino más bien a una congestión microvascular (Devarajan, 2006; Basile, Anderson y Sutton, 2012). Este hecho explicaría la ausencia de trombos en las histologías renales de los animales con DRA analizadas en este estudio y la ausencia de alteración de la coagulación a nivel sistémico. Así, es posible que una respuesta pro-inflamatoria en el endotelio produzca una preactivación de la cascada de la coagulación, lo que podría justificar la síntesis de PAI-1 (Van De Craen, Declerck y Gils, 2012) y de factores de la coagulación por parte de las células endoteliales (Cohen, Turner y Moake, 2020), y su presencia en las VE urinarias estudiadas en este trabajo (**Figura 41.3**).

Las células endoteliales, al igual que las tubulares, tienen la capacidad de sintetizar PAI-1 después de una lesión (Pawar, Kartha y Toback, 1995; Wyrzykowska y Kasza, 2009). La incógnita radica en cómo esta proteína aparecería finalmente en la orina. En el caso de las células tubulares, el desplazamiento más lógico tanto del PAI-1 soluble como el de las VE que contienen esta proteína sería desde la célula hacia el

lumen tubular ya sea en condiciones fisiológicas como cuando se produce la destrucción del epitelio (Alejandro et al., 1995; Molitoris y Marrs, 1999). Sin embargo, en el caso de las células endoteliales el escenario es más complejo, ya que lo más probable sería que los componentes fueran excretados por parte de la célula hacia la luz del capilar. No obstante, cuando se desencadenan los procesos fisiopatológicos asociados con un DRA intrínseco ocurren acontecimientos en el endotelio y en los túbulos que podrían favorecer que el rumbo de esta proteína cambie. En la superficie del endotelio se produce un aumento de la expresión de moléculas de adhesión que conlleva una infiltración de leucocitos y posterior liberación de citoquinas que resulta en una disfunción endotelial y en un aumento de la permeabilidad endotelial (Bodiga et al., 2016). De esta forma los componentes inflamatorios que provienen de la luz del capilar son capaces de atravesar el endotelio, llegar hasta el intersticio y entrar en contacto con las células epiteliales. De esta forma se favorecen los procesos de inflamación y coagulación en las células tubulares. Por lo que se refiere a las células tubulares, su desprendimiento de la membrana basal deja a ésta como única barrera entre el filtrado y el intersticio peritubular llegando incluso a formarse en ocasiones edemas intersticiales (Basile, Anderson y Sutton, 2012). Por tanto, es posible que la hiperpermeabilidad que sufre tanto el endotelio como el epitelio tubular facilite el intercambio de componentes entre ambas estructuras renales o que los elementos presentes en la luz de los capilares como las proteínas o las VE liberadas por las células endoteliales, atraviesen ambas barreras y acaben en el lumen tubular.

Así pues, el compendio de acontecimientos que ocurren en el DRA y que estarían relacionados con el PAI-1 serían por un lado la disfunción endotelial, que permite la infiltración de leucocitos y con ello la inflamación (Özden et al., 2001). que contrae los vasos renales, reduce el flujo sanguíneo renal y la TFG (Lopez-Novoa et al., 2011; Sánchez-González et al., 2011), e induce señalización endotelial proinflamatoria y procoagulante (Bonventre, 2007). Ambos procesos terminan trasladándose a los túbulos proximales donde potencian el daño tubular. En consecuencia, el PAI-1 urinario podría ser un indicador fisiopatológico directo, por un lado, del estado de los túbulos renales y, por otro, del proceso inflamación-coagulación mediado por el endotelio.

Aunque la información diagnóstica transmitida por PAI-1 debe explorarse más a fondo, este marcador proporciona un valor diagnóstico diferencial y aditivo. La baja correlación encontrada entre los niveles del PAI-1 con los de algunos biomarcadores, como la NGAL y la NAG, implica que el tipo de daño o los eventos fisiopatológicos que causan la excreción de estas dos proteínas en los pacientes de este estudio es, al menos parcialmente, diferente del daño que conduce a la excreción del PAI-1. Este nivel de especificidad es necesario para un futuro diagnóstico fisiopatológico del DRA y una estimación del pronóstico basados en el patrón de daño individual (Moledina y Parikh, 2018; Sancho-Martínez, Sánchez-Juanes, et al., 2020). Ya se ha conseguido asociar proteínas concretas a procesos específicos que ocurren en el DRA. Recientemente, un estudio de vesículas extracelulares procedentes de la orina de pacientes con DRA inducido por la vancomicina ha relacionado este síndrome con algunas proteínas que participan en las vías del complemento, la coagulación y la inflamación (Awdishu et al., 2021). Estos datos apoyan la expectativa de una mejora del conocimiento de los mecanismos de la lesión y con ello un diagnóstico preciso de los pacientes que sufran este síndrome, independientemente de su etiología. El reto para el futuro inmediato es identificar los patrones de daño o mecanismos patológicos asociados etiológicamente a cada biomarcador.

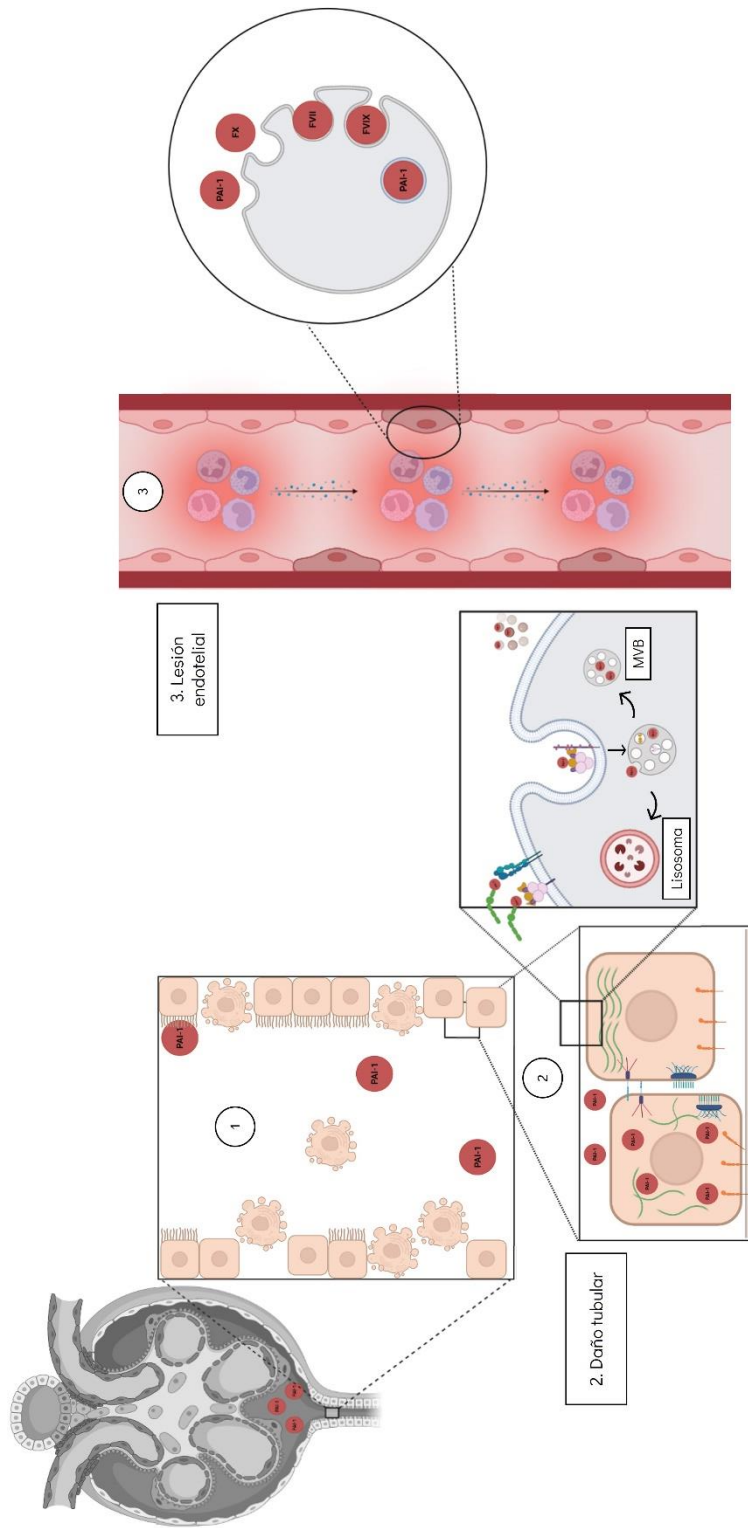


Figura 42. Esquema de los posibles mecanismos implicados en la presencia del PAI-1 en la orina durante un DRA. 1. La NTA produce un defecto en la reabsorción tubular que podría contribuir a la excreción de PAI-1 en la orina. 2. El daño tubular es responsable de la síntesis de PAI-1. El aumento en los niveles de esta proteína podría estar relacionado con la necesidad de recuperar el parénquima renal, favoreciendo la migración y reparación celular. El proceso de migración implica que PAI-1 pueda aparecer en las VE tras su internalización en la célula. 3. La lesión endotelial durante un DRA favorece los procesos proinflamatorios y procoagulatorios en las células endoteliales.

CONCLUSIONES

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

1. El aumento de la excreción urinaria de PAI-1 durante un DRA tóxico o isquémico experimental es debido, por lo menos parcialmente, a su producción y secreción por parte de las estructuras renales, entre ellas, el epitelio tubular afectado. Así, el PAI-1 urinario puede ser indicativo, y por lo tanto un biomarcador potencial, de daño tubular. Sin embargo, dado que también se ha documentado su papel en los procesos proinflamatorios y procoagulantes derivados del daño y disfunción endotelial, y en el remodelado tisular reparador observados durante el DRA, no podemos descartar que su presencia en la orina también pueda reflejar estos fenómenos.

2. El PAI-1 urinario asociado al DRA se encuentra tanto en forma soluble como contenido en vesículas extracelulares, pero se desconoce por el momento el origen de cada una de estas fracciones y su asociación con los distintos eventos fisiopatológicos. Esto constituye un reto para el futuro, que podría permitir afinar el diagnóstico del DRA.

3. En pacientes, el PAI-1 aparece como una herramienta potencialmente valiosa para el diagnóstico etiopatológico del DRA. En perspectiva, el desarrollo de un sistema diagnóstico que integre la información de varios biomarcadores con significados biológicos diferentes y específicos, y asociados a patrones de lesión concretos, mejoraría la precisión del diagnóstico de este síndrome, la capacidad de pronóstico y, por lo tanto, el manejo personalizado de los pacientes.

“La verdadera ciencia enseña, por encima de todo,
a dudar y a ser ignorante”

Miguel de Unamuno

BIBLIOGRAFÍA

Abels, E. y Breakefield, X. (2016). Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cellular and molecular neurobiology*, 36(3), p. 301. doi: 10.1007/s10571-016-0366-z.

Abuelo, J. (2007). Normotensive Ischemic Acute Renal Failure. *The new England journal of medicine*, 357(8), pp. 797-805. doi: 10.1056/nejmra064398.

Aebersold, R. y Mann, M. (2016). Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature*, 537(7620), pp. 347-355. doi: 10.1038/nature19949.

Aggarwal, B. *et al.* (2004). Nuclear transcription factor NF-kappa B: role in biology and medicine. *Indian journal of experimental biology*, 42(4), pp. 341-353. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15088683/>.

Akers, J. *et al.* (2013). Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *Journal of neuro-oncology*, 113(1), p. 1. doi: 10.1007/s11060-013-1084-8.

Al-Fahkri, N. *et al.* (2003). Induction of apoptosis in vascular cells by plasminogen activator inhibitor-1 and high molecular weight kininogen correlates with their anti-adhesive properties. *Biological Chemistry*, 384(3), pp. 423-435. doi: 10.1515/bc.2003.048/machinereadablecitation/ris.

Al-Jaghbeer, M. *et al.* (2018). Clinical Decision Support for In-Hospital AKI», *Journal of the American Society of Nephrology*, 29(2), pp. 654-660. doi: 10.1681/asn.2017070765/-/dcsupplemental.

Alejandro, V. *et al.* (1995). Mechanisms of filtration failure during postischemic injury of the human kidney. A study of the reperfused renal allograft. *Journal of Clinical Investigation*, 95(2), p. 820. doi: 10.1172/jci117732.

Alonso, R. *et al.* (2007). A new role of diacylglycerol kinase α on the secretion of lethal exosomes bearing Fas ligand during activation-induced cell death of T lymphocytes. *Biochimie*, 89(2), pp. 213-221. doi: 10.1016/j.biochi.2006.07.018.

Amsellem, S. *et al.* (2010). Cubilin Is Essential for Albumin Reabsorption in the Renal Proximal Tubule. *Journal of the American Society of Nephrology*, 21(11), p. 1859. doi:

10.1681/asn.2010050492.

Andreasen, P., Egelund, R. y Petersen, H. (2000). The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57:1, 57(1), pp. 25-40. doi: 10.1007/s000180050497.

Antunes, L., Darin, J. y Bianchi, M. (2000). Protective effects of vitamin c against cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in adult rats: a dose-dependent study. *Pharmacological research*, 41(4), pp. 405-411. doi: 10.1006/phrs.1999.0600.

Aregger, F. *et al.* (2014). Identification of IGFBP-7 by urinary proteomics as a novel prognostic marker in early acute kidney injury. *Kidney International*, 85(4), pp. 909-919. doi: 10.1038/ki.2013.363.

Argyropoulos, C. *et al.* (2017). Rediscovering Beta-2 Microglobulin As a Biomarker across the Spectrum of Kidney Diseases. *Frontiers in Medicine*, 4, p. 1. doi: 10.3389/fmed.2017.00073.

Awad, A. *et al.* (2009). Compartmentalization of neutrophils in the kidney and lung following acute ischemic kidney injury. *Kidney International*, 75(7), pp. 689-698. doi: 10.1038/ki.2008.648.

Awdishu, L. *et al.* (2021). Urinary Exosomes Identify Inflammatory Pathways in Vancomycin Associated Acute Kidney Injury. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), pp. 1-14. doi: 10.3390/ijms22062784.

Bagshaw, S. *et al.* (2007). Changes in the incidence and outcome for early acute kidney injury in a cohort of Australian intensive care units. *Critical Care*, 11(3), p. R68. doi: 10.1186/cc5949.

Baietti, M. *et al.* (2012). Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nature Cell Biology*, 14(7), pp. 677-685. doi: 10.1038/ncb2502.

Bajou, K. *et al.* (1998). Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nature Medicine*, 4(8), pp. 923-928. doi: 10.1038/nm0898-923.

Bajou, K. *et al.* (2001). The Plasminogen Activator Inhibitor PAI-1 Controls in Vivo Tumor Vascularization by Interaction with Proteases, Not Vitronectin Implications for Antiangiogenic Strategies. *Journal of Cell Biology*, 152(4), pp. 777-784. doi: 10.1083/jcb.152.4.777.

Bale, M. *et al.* (1989). Identification of Vitronectin as a Major Plasma Protein Adsorbed on Polymer Surfaces of Different Copolymer Composition. *Blood*, 74(8), pp. 2698-2706. doi: 10.1182/blood.v74.8.2698.2698.

Baliga, R. *et al.* (1998). Role of cytochrome P-450 as a source of catalytic iron in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Kidney International*, 54(5), pp. 1562-1569. doi: 10.1046/j.1523-1755.1998.00161.x.

Barh, D., Blum, K. y Madigan, M. (2016). OMICS: biomedical perspectives and applications. *CRC Press*.

Basile, D. (2007). The endothelial cell in ischemic acute kidney injury: implications for acute and chronic function. *Kidney International*, 72(2), pp. 151-156. doi: 10.1038/sj.ki.5002312.

Basile, D. *et al.* (2008). Renal ischemia reperfusion inhibits VEGF expression and induces ADAMTS-1, a novel VEGF inhibitor. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 294(4), pp. 928-936. doi: 10.1152/ajprenal.00596.2007.

Basile, D., Anderson, M. y Sutton, T. (2012). Pathophysiology of Acute Kidney Injury. *Comprehensive Physiology*, 2(2), p. 1303. doi: 10.1002/cphy.c110041.

Batista, B. *et al.* (2011). Identification of a conserved glycan signature for microvesicles. *Journal of Proteome Research*, 10(10), pp. 4624-4633. doi: 10.1021/pr200434y.

Baum, N., Dichoso, C. y Carlton, C. (1975). Blood urea nitrogen and serum creatinine: Physiology and interpretations. *Urology*, 5(5), pp. 583-588. doi: 10.1016/0090-4295(75)90105-3.

Beckler, M. *et al.* (2013). Proteomic analysis of exosomes from mutant KRAS colon cancer cells identifies intercellular transfer of mutant KRAS. *Molecular and Cellular Proteomics*, 12(2), pp. 343-355. doi: 10.1074/mcp.m112.022806.

Beker, B. *et al.* (2018). Novel acute kidney injury biomarkers: their characteristics, utility and concerns. *International Urology and Nephrology*, 50(4), pp. 705-713. doi: 10.1007/s11255-017-1781-x.

Bell, M. *et al.* (2015). Assessment of Cell-Cycle Arrest Biomarkers to Predict Early and Delayed Acute Kidney Injury. *Disease Markers*, 2015(158658) doi: 10.1155/2015/158658.

Bellomo, R. *et al.* (2004). Acute renal failure – definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Critical Care*, 8(4), p. R204. doi: 10.1186/cc2872.

Bellomo, R., Kellum, J. y Ronco, C. (2012). Acute kidney injury. *The Lancet*, 380(9843), pp. 756-766. doi: 10.1016/s0140-6736(11)61454-2.

Belzer, F. (1988). Immunosuppressive agents--a personal historical perspective. *Transplantation proceedings*, 20(3 Suppl 3), pp. 3-7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3291260/>.

Bessman, M. *et al.* (1958). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. III. The incorporation pyrimidine and purine analogues into deoxyribonucleic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 44(7), p. 633. doi: 10.1073/pnas.44.7.633.

Bevilacqua, M. *et al.* (1986). Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(12), pp. 4533-4537. doi: 10.1073/pnas.83.12.4533.

Blanco-Gozalo, V. (2017). *Caracterización etiopatogénica de diferentes modelos de daño renal agudo: biomarcadores, mecanismos fisiopatológicos y aplicaciones clínicas diagnósticas*. Universidad de Salamanca.

Blanco-Gozaño, V. *et al.* (2020). Combined use of GM2AP and TCP1-eta urinary levels predicts recovery from intrinsic acute kidney injury. *Scientific Reports*, 10(1), p. 11599. doi: 10.1038/s41598-020-68398-0.

Bodiga, V. *et al.* (2016). Intracellular zinc status influences cisplatin-induced endothelial permeability through modulation of PKC α , NF- κ B and ICAM-1 expression. *European Journal of Pharmacology*, 791, pp. 355-368. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.09.013.

Bolant-Hernández, B. *et al.* (1990). Hematología y Bioquímica Clínica de La Rata. *Research in Surgery*, 4, pp. 12-19. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/92614560/Hematologia-y-Bioquimica-Clinica-de-La-Rata>.

Bonventre, J. (2007). Pathophysiology of Acute Kidney Injury: Roles of Potential Inhibitors of Inflammation. *Acute Kidney Injury*, 156, pp. 39-46. doi: 10.1159/000102069.

Bonventre, J. (2009). Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a urinary biomarker and much more. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 24(11), pp. 3265-3268. doi: 10.1093/ndt/gfp010.

Bonventre, J. *et al.* (2010). Next-generation biomarkers for detecting kidney toxicity. *Nature Biotechnology*, 28(5), pp. 436-440. doi: 10.1038/nbt0510-436.

Bonventre, J. y Weinberg, J. (2003). Recent Advances in the Pathophysiology of Ischemic Acute Renal Failure. *Journal of the American Society of Nephrology*, 14(8), pp. 2199-2210. doi: 10.1097/01.asn.0000079785.13922.f6.

Bonventre, J. y Yang, L. (2011). Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(11), p. 4210. doi: 10.1172/jci45161.

Bonventre, J. y Zuk, (2004). Ischemic acute renal failure: An inflammatory disease?. *Kidney International*, 66(2), pp. 480-485. doi: 10.1111/j.1523-1755.2004.761_2.x.

Bonventre, J. *et al.* (1993). Mechanisms of ischemic acute renal failure Managing Editor. *Kidney international*, 43, pp. 1160-1178. doi: 10.1038/ki.1993.163.

Borges, F., Reis, L. y Schor, N. (2013). Extracellular vesicles: structure, function, and potential clinical uses in renal diseases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 46(10), pp. 824-830. doi: 10.1590/1414-431x20132964.

Boukouris, S. y Mathivanan, S. (2015). Exosomes in bodily fluids are a highly stable resource of disease biomarkers. *Proteomics. Clinical applications*, 9(3-4), p. 358. doi: 10.1002/prca.201400114.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, pp. 248-254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

Brooks, D. (1996). Role of endothelin in renal function and dysfunction. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 23(4), pp. 345-348. doi: 10.1111/j.1440-1681.1996.tb02835.x.

Brown, D., Lee, R. y Bonventre, J. (1997). Redistribution of villin to proximal tubule basolateral membranes after ischemia and reperfusion. *American Journal of Physiology* 273(6). doi: 10.1152/ajprenal.1997.273.6.f1003.

Bucki, R. *et al.* (1998). Calcium Induces Phospholipid Redistribution and Microvesicle Release in Human Erythrocyte Membranes by Independent Pathways. *Biochemistry*, 37(44), pp. 15383-15391. doi: 10.1021/bi9805238.

Bulacio, R. y Torres, A. (2013). Organic anion transporter 5 (Oct5) renal expression and urinary excretion in rats treated with cisplatin: a potential biomarker of cisplatin-induced nephrotoxicity. *Archives of toxicology*, 87(11), pp. 1953-1962. doi: 10.1007/s00204-013-1062-0.

Bunel, V. *et al.* (2017). Early detection of acute cisplatin nephrotoxicity: interest of urinary monitoring of proximal tubular biomarkers. *Clinical Kidney Journal*, 10(5), pp. 639-647. doi: 10.1093/ckj/sfx007.

Cajot, J. *et al.* (1990). Plasminogen-activator inhibitor type 1 is a potent natural inhibitor of extracellular matrix degradation by fibrosarcoma and colon carcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(18), pp. 6939-6943. doi:

10.1073/pnas.87.18.6939.

Campbell, N. y Reece, J. (2007). *Biología*. Séptima Ed. Panamericana, Editorial Medica.

Carlier, M. *et al.* (2015). Comparison of different equations to assess glomerular filtration in critically ill patients. *Intensive Care Medicine*, 41(3), pp. 427-435. doi: 10.1007/s00134-014-3641-9.

Carmeliet, P. y Collen, D. (1997). Molecular genetics of the fibrinolytic and coagulation systems in haemostasis, thrombogenesis, restenosis and atherosclerosis. *Current opinion in lipidology*, 8(2), pp. 118-125. doi: 10.1097/00041433-199704000-00010.

Cheng, B. *et al.* (2014). Urinary N-Acetyl-beta-D-glucosaminidase as an Early Marker for Acute Kidney Injury in Full-Term Newborns with Neonatal Hyperbilirubinemia. *Disease Markers*. doi: 10.1155/2014/315843.

Chertow, G. *et al.* (2005). Acute Kidney Injury, Mortality, Length of Stay, and Costs in Hospitalized Patients. *Journal of the American Society of Nephrology*, 16(11), pp. 3365-3370. doi: 10.1681/asn.2004090740.

Ciarimboli, G. (2012). Membrane Transporters as Mediators of Cisplatin Effects and Side Effects. *Scientifica*, pp. 1-18. doi: 10.6064/2012/473829.

Cockcroft, D. y Gault, M. (1976). Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron*, 16(1), pp. 31-41. doi: 10.1159/000180580.

Cohen, C., Turner, N. y Moake, J. (2020). Production and control of coagulation proteins for factor X activation in human endothelial cells and fibroblasts. *Scientific Reports*, 10:1, 10(1), pp. 1-19. doi: 10.1038/s41598-020-59058-4.

Colombo, M. *et al.* (2013). Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of Cell Science*, 126(24), pp. 5553-5565. doi: 10.1242/jcs.128868

Colombo, M., Raposo, G. y Théry, C. (2014). Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30, pp. 255-289. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.

Combes, V. *et al.* (1999). In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *Journal of Clinical Investigation*, 104(1), p. 93. doi: 10.1172/jci4985.

Conde-Vancells, J. *et al.* (2008). Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. *Journal of Proteome Research*, 7(12), pp. 5157-5166. doi: 10.1021/pr8004887.

Conger, J. (1997). Hemodynamic factors in acute renal failure. *Advances in Renal Replacement Therapy*, 4(2 Suppl 1), pp. 25-37. Disponible en: <https://europepmc.org/article/med/9113238>

Conger, J. (1983). Vascular abnormalities in the maintenance of acute renal failure. *Circulatory Shock*, 11(3), pp. 235-244. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6652879/>

Contrada, E. (2016). 2 CE Test Hours: Preventing Contrast-Induced Acute Kidney Injury. *The American journal of nursing*, 116(12), pp. 46-47. doi: 10.1097/01.naj.0000508669.64457.f7.

Cuartero, M. *et al.* (2017). Cell-cycle arrest biomarkers in urine to predict acute kidney injury in septic and non-septic critically ill patients. *Annals of Intensive Care*, 7(1), p. 92. doi: 10.1186/s13613-017-0317-y.

Cuesta, C. (2018) *Biomarcadores urinarios para la identificación de las secuelas subclínicas del daño renal agudo y de su recuperación*. Universidad de Salamanca.

Cullen, K. *et al.* (2007). Mitochondria as a critical target of the chemotherapeutic agent cisplatin in head and neck cancer. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 39(1), pp. 43-50. doi: 10.1007/s10863-006-9059-5.

Czekay, R. *et al.* (2001). Direct Binding of Occupied Urokinase Receptor (uPAR) to LDL Receptor-related Protein Is Required for Endocytosis of uPAR and Regulation of Cell Surface Urokinase Activity. *Molecular Biology of the Cell*, 12(5), p. 1467. doi: 10.1091/mbc.12.5.1467.

Czekay, R. *et al.* (2003). Plasminogen activator inhibitor-1 detaches cells from extracellular matrices by inactivating integrins. *Journal of Cell Biology*, 160(5), pp. 781-791. doi: 10.1083/jcb.200208117.

Dasari, S. y Tchounwou, P. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European journal of pharmacology*, 740, p. 364. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025.

Day, Y. *et al.* (2005). Renal ischemia-reperfusion injury and adenosine 2A receptor-mediated tissue protection: role of macrophages. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 288(4 57-4), pp. 722-731. doi: 10.1152/ajprenal.00378.2004.

Delanaye, P. *et al.* (2011). Trimethoprim, Creatinine and Creatinine-Based Equations. *Nephron Clinical Practice*, 119(3), pp. c187-c194. doi: 10.1159/000328911.

Delanaye, P., Cavalier, E. y Pottel, H. (2017). Serum Creatinine: Not So Simple!. *Nephron*, 136(4), pp. 302-308. doi: 10.1159/000469669.

Delanghe, J. y Speeckaert, M. (2011). Creatinine determination according to Jaffe—what does it stand for?. *NDT Plus*, 4(2), p. 83. doi: 10.1093/ndtplus/sfq211.

Delbridge, M. *et al.* (2007). The Effect of Body Temperature in a Rat Model of Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *Transplantation Proceedings*, 39(10), pp. 2983-2985. doi: 10.1016/j.transproceed.2007.04.028.

Dellas, C. y Loskutoff, D. (2005). Historical analysis of PAI-1 from its discovery to its potential role in cell motility and disease. *Thrombosis and haemostasis*, 93(4), pp. 631-640. doi: 10.1160/th05-01-0033.

Deng, G. *et al.* (1996). Is plasminogen activator inhibitor-1 the molecular switch that governs urokinase receptor-mediated cell adhesion and release?. *The Journal of Cell Biology*, 134(6), p. 1563. doi: 10.1083/jcb.134.6.1563.

Deng, G. *et al.* (2001). Plasminogen activator inhibitor-1 regulates cell adhesion by binding to the somatomedin B domain of vitronectin. *Journal of Cellular Physiology*, 189(1), pp. 23-33. doi: 10.1002/jcp.1133.

Dennen, P., Douglas, I. y Anderson, R. (2010). Acute kidney injury in the intensive care unit: An update and primer for the intensivist. *Crit Care Med*, 38(1), pp. 261-275. doi: 10.1097/ccm.0b013e3181bfb0b5.

Devarajan, P. (2006). Update on Mechanisms of Ischemic Acute Kidney Injury. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17(6), pp. 1503-1520. doi: 10.1681/asn.2006010017.

Devarajan, P. (2008). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin—an emerging troponin for kidney injury. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 23(12), p. 3737. doi: 10.1093/ndt/gfn531.

Devarajan, P. (2011). Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. *Current Opinion in Pediatrics*, 23(2), pp. 194-200. doi: 10.1097/mop.0b013e328343f4dd.

Devarajan, P. (2015). Genomic and Proteomic Characterization of Acute Kidney Injury. *Nephron*, 131(2), p. 85. doi: 10.1159/000437237.

Doi, K. *et al.* (2009). Reduced Production of Creatinine Limits Its Use as Marker of Kidney Injury in Sepsis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(6), p. 1217. doi: 10.1681/asn.2008060617.

Domon, B. y Aebersold, R. (2006). Mass spectrometry and protein analysis. *Science*, 312(5771), pp. 212-217. doi: 10.1126/science.1124619.

Dorgalaleh, A. *et al.* (2021). Standardization of Prothrombin Time/International Normalized Ratio (PT/INR). *International Journal of Laboratory Hematology*, 43(1), pp. 21-28. doi: 10.1111/ijlh.13349.

Le Dorze, M. *et al.* (2009). The role of the microcirculation in acute kidney injury. *Current opinion in critical care*, 15(6), pp. 503-508. doi: 10.1097/mcc.0b013e328332f6cf.

Dubin, R. y Rhee, E. (2020). Proteomics and Metabolomics in Kidney Disease, including Insights into Etiology, Treatment, and Prevention. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 15(3), p. 404. doi: 10.2215/cjn.07420619.

Eddy, A. (2002). Plasminogen activator inhibitor-1 and the kidney. *American Journal of*

Physiology - Renal Physiology, 283(2 52-2). doi: 10.1152/ajprenal.00032.2002.

Eddy, A. y Fogo, A. (2006). Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Chronic Kidney Disease: Evidence and Mechanisms of Action. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17(11), pp. 2999-3012. doi: 10.1681/asn.2006050503.

Eldh, M. *et al.* (2010). Exosomes Communicate Protective Messages during Oxidative Stress; Possible Role of Exosomal Shuttle RNA. *PLoS ONE*, 5(12), pp. 1-8. doi: 10.1371/journal.pone.0015353.

Emeigh Hart, S. (2005). Assessment of renal injury in vivo. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 52(1), pp. 30-45. doi: 10.1016/j.vascn.2005.04.006.

Emlet, D. *et al.* (2017). Inflammation and Inflammatory Mediators in Kidney Disease: Insulin-like growth factor binding protein 7 and tissue inhibitor of metalloproteinases-2: differential expression and secretion in human kidney tubule cells. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 312(2), p. F284. doi: 10.1152/ajprenal.00271.2016.

Endre, Z. *et al.* (2011). Improved performance of urinary biomarkers of acute kidney injury in the critically ill by stratification for injury duration and baseline renal function. *Kidney International*, 79(10), pp. 1119-1130. doi: 10.1038/ki.2010.555.

Endre, Z., Pickering, J. y Walker, R. (2011). Clearance and beyond: the complementary roles of GFR measurement and injury biomarkers in acute kidney injury (AKI). *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 301(4), pp. 697-707. doi: 10.1152/ajprenal.00448.2010.

Enestrom S. y Rammer, L. (1988). Fibrin deposition in the kidney in post-ischaemic renal damage. *British journal of experimental pathology*, 69(3), p. 387. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3291926/>

Engvall, E. y Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), pp. 871-874. doi: 10.1016/0019-2791(71)90454-x.

Escola, J. *et al.* (1998). Selective Enrichment of Tetraspan Proteins on the Internal

Vesicles of Multivesicular Endosomes and on Exosomes Secreted by Human B-lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 273(32), pp. 20121-20127. doi: 10.1074/jbc.273.32.20121.

Estrela, G. *et al.* (2017). MATE-1 modulation by kinin B1 receptor enhances cisplatin efflux from renal cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 428(1), pp. 101-108. doi: 10.1007/s11010-016-2920-x.

Fader, C. *et al.* (2009). TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1793(12), pp. 1901-1916. doi: 10.1016/j.bbamcr.2009.09.011.

Farrar, A. (2018). Acute Kidney Injury. *Nursing Clinics of North America*, 53(4), pp. 499-510. doi: 10.1016/j.cnur.2018.07.001.

Ferreira, L. *et al.* (2011). GM2AP. *Kidney international*, 79(5), pp. 518-28. doi: 10.1038/ki.2010.439.

Finlay, S. *et al.* (2013). Identification of risk factors associated with acute kidney injury in patients admitted to acute medical units. *Clinical Medicine*, 13(3), p. 233. doi: 10.7861/clinmedicine.13-3-233.

Florea, A. y Büsselberg, D. (2011). Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. *Cancers*, 3(1), pp. 1351-1371. doi: 10.3390/cancers3011351.

Frixen, U. y Nagamine, Y. (1993). Stimulation of Urokinase-type Plasminogen Activator Expression by Blockage of E-Cadherin-dependent Cell-Cell Adhesion. *Cancer Research*, 53(15). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8339268/>.

Fuentes-Calvo, I. *et al.* (2021). Biomarkers of persistent renal vulnerability after acute kidney injury recovery. *Scientific Reports*, 11(1), pp. 1-12. doi: 10.1038/s41598-021-00710-y.

Furuichi, K., Kaneko, S. y Wada, T. (2009). Chemokine/chemokine receptor-mediated inflammation regulates pathologic changes from acute kidney injury to chronic kidney

disease. *Clinical and Experimental Nephrology*, 13(1), pp. 9-14. doi: 10.1007/S10157-008-0119-5.

Gailit, J. *et al.* (1993). Redistribution and dysfunction of integrins in cultured renal epithelial cells exposed to oxidative stress. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 264(1 33-1). doi: 10.1152/ajprenal.1993.264.1.f149.

Gallagher, S. *et al.* (2008). Immunoblotting and Immunodetection. *Current Protocols in Immunology*, 83(1), pp. 8.10.1-8.10.28. doi: 10.1002/0471142735.im0810s83.

Gettins, P. y Dolmer, K. (2016). The High Affinity Binding Site on Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) for the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein (LRP1) Is Composed of Four Basic Residues. *Journal of Biological Chemistry*, 291(2), pp. 800-812. doi: 10.1074/jbc.m115.688820.

de Geus, H., Betjes, M. y Bakker, J. (2012). Biomarkers for the prediction of acute kidney injury: a narrative review on current status and future challenges. *Clinical Kidney Journal*, 5(2), pp. 102-108. doi: 10.1093/ckj/sfs008.

Ghatanatti, R. *et al.* (2013). Role of renal biomarkers as predictors of acute kidney injury in cardiac surgery. *Asian Cardiovascular and Thoracic Annals*, 22(2), pp. 234-241. doi: 10.1177/0218492313502028.

Ghosh, A. y Vaughan, D. (2012). PAI-1 in Tissue Fibrosis. *Journal of cellular physiology*, 227(2), p. 493. doi: 10.1002/jcp.22783.

Ghosh, S. (2019). Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorganic Chemistry*, 88, p. 102925. doi: 10.1016/j.bioorg.2019.102925.

Gluba, A. *et al.* (2010). The role of Toll-like receptors in renal diseases. *Nature Reviews Nephrology*, 6(4), pp. 224-235. doi: 10.1038/nrneph.2010.16.

Goñi, F. y Alonso, A. (2009). Effects of ceramide and other simple sphingolipids on membrane lateral structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1788(1), pp. 169-177. doi: 10.1016/j.bbamem.2008.09.002.

Gonzalez-Begne, M. *et al.* (2009). Proteomic Analysis of Human Parotid Gland

Exosomes by Multidimensional Protein Identification Technology (MudPIT). *Journal of proteome research*, 8(3), p. 1304. doi: 10.1021/pr800658c.

Graner, M. *et al.* (2009). Proteomic and immunologic analyses of brain tumor exosomes. *The FASEB Journal*, 23(5), pp. 1541-1557. doi: 10.1096/fj.08-122184.

Grant, B. y Donaldson, J. (2009). Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(9), pp. 597-608. doi: 10.1038/nrm2755.

Grenier, F. *et al.* (2010). Evaluation of the ARCHITECT urine NGAL assay: Assay performance, specimen handling requirements and biological variability. *Clinical Biochemistry*, 43(6), pp. 615-620. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2009.12.008.

Gupta, K. *et al.* (2015). Abrogation of Plasminogen Activator Inhibitor-1-Vitronectin Interaction Ameliorates Acute Kidney Injury in Murine Endotoxemia. *PLoS ONE*, 10(3), p. e0120728. doi: 10.1371/journal.pone.0120728.

Gurunathan, S. *et al.* (2019). Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells*, 8(4), p. 307. doi: 10.3390/cells8040307.

Guyton, A. y Hall, J. (2016). *Tratado de Fisiología Médica*. 13.ª ed. Elsevier.

Hanif, M., Bali, A. y Ramphul, K. (2021). Acute Renal Tubular Necrosis. *StatPearls*. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507815/>.

Hannemann, J., Duwe, J. y Baumann, K. (1991). Iron- and ascorbic acid-induced lipid peroxidation in renal microsomes isolated from rats treated with platinum compounds. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 28(6), pp. 427-433. doi: 10.1007/bf00685818.

Hansen, Y., Damgaard, A. y Poulsen, J. (2014). Evaluation of NGAL testTM on cobas 6000. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 74(1), pp. 20-26. doi: 10.3109/00365513.2013.855943.

Harrach, S. y Ciarimboli, G. (2015). Role of transporters in the distribution of platinum-based drugs. *Frontiers in Pharmacology*, 6, p. 85. doi: 10.3389/fphar.2015.00085.

Helanova, K., Spinar, J. y Parenica, J. (2014). Diagnostic and Prognostic Utility of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) in Patients with Cardiovascular Diseases - Review. *Kidney and Blood Pressure Research*, 39(6), pp. 623-629. doi: 10.1159/000368474.

Henne, W., Buchkovich, N. y Emr, S. (2011). The ESCRT Pathway. *Developmental Cell*, 21(1), pp. 77-91. doi: 10.1016/j.devcel.2011.05.015.

Henne, W., Stenmark, H. y Emr, S. (2013). Molecular Mechanisms of the Membrane Sculpting ESCRT Pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(9), p. a016766. doi: 10.1101/cshperspect.a016766.

Holzscheiter, L. *et al.* (2014). NGAL, L-FABP, and KIM-1 in comparison to established markers of renal dysfunction. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 52(4), pp. 537-546. doi: 10.1515/cclm-2013-0693.

Homeister, J. y Lucchesi, B. (2003). Complement Activation and Inhibition in Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 34, pp. 17-40. doi: 10.1146/annurev.pa.34.040194.000313.

Honicker, T. y Holt, K. (2016). Contrast-Induced Acute Kidney Injury: Comparison of Preventative Therapies. *Nephrology Nursing Journal*, 43(2), pp. 109-117. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27254966/>.

Horgan, R. y Gynaecologist, L. (2011). 'Omic' technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. *Wiley Online Library*, 13(3), pp. 189-195. doi: 10.1576/toag.13.3.189.27672.

Hoste, E. *et al.* (2015). Epidemiology of acute kidney injury in critically ill patients: the multinational AKI-EPI study. *Intensive Care Medicine*, 41(8), pp. 1411-1423. doi: 10.1007/s00134-015-3934-7.

Hoste, E. *et al.* (2018). Global epidemiology and outcomes of acute kidney injury. *Nature Reviews Nephrology*, 14(10), pp. 607-625. doi: 10.1038/s41581-018-0052-0.

Hsu, C. *et al.* (2010). Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *Journal of Cell Biology*, 189(2), pp. 223-232. doi:

10.1083/jcb.200911018.

Huang, Y. y Noble, N. (2007). PAI-1 as a Target in Kidney Disease. *Current Drug Targets*, 8(9), pp. 1007-1015. doi: 10.2174/138945007781662373.

Husdan, H. y Rapoport, A. (1968). Estimation of creatinine by the Jaffe reaction. A comparison of three methods. *Clinical Chemistry*, 14(3), pp. 222-38. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5637963/>.

Husi, H. *et al.* (2013). A combinatorial approach of Proteomics and Systems Biology in unravelling the mechanisms of acute kidney injury (AKI): involvement of NMDA receptor GRIN1 in murine AKI. *BMC Systems Biology*, 7(1), pp. 1-13. doi: 10.1186/1752-0509-7-110.

Hvidberg, V. *et al.* (2005). The endocytic receptor megalin binds the iron transporting neutrophil-gelatinase-associated lipocalin with high affinity and mediates its cellular uptake. *FEBS Letters*, 579(3), pp. 773-777. doi: 10.1016/j.febslet.2004.12.031.

Ichimura, T. *et al.* (2008). Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(5), p. 1657. doi: 10.1172/jci34487.

Imai, N. *et al.* (2015). Distinct Roles of Urinary Liver-Type Fatty Acid-Binding Protein in Non-Diabetic Patients with Anemia. *PLoS ONE*, 10(5). doi: 10.1371/journal.pone.0126990.

Isnard-Bagnis, C. *et al.* (2005). Anticancer drug-induced nephrotoxicity. *Nephrologie & thérapeutique*, 1(2), pp. 101-114. doi: 10.1016/j.nephro.2004.12.001.

Ivanova, S. *et al.* (2008). Chapter Nine Lysosomes in Apoptosis. *Methods in Enzymology*, 442, pp. 183-199. doi: 10.1016/s0076-6879(08)01409-2.

Jaggi, A. y Singh, N. (2012). Mechanisms in cancer-chemotherapeutic drugs-induced peripheral neuropathy. *Toxicology*, pp. 1-9. doi: 10.1016/j.tox.2011.10.019.

Jamieson, E. y Lippard, S. (1999). Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chemical Reviews*, 99(9), pp. 2467-2498. doi:

10.1021/cr980421n.

Jang, H. *et al.* (2009). The interaction between ischemia-reperfusion and immune responses in the kidney. *Journal of molecular medicine*, 87(9), pp. 859-864. doi: 10.1007/s00109-009-0491-y.

Jang, H. y Rabb, H. (2009). The innate immune response in ischemic acute kidney injury. *Clinical immunology*, 130(1), p. 41. doi: 10.1016/j.clim.2008.08.016.

John, R. y Nelson, P. (2007). Dendritic Cells in the Kidney. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(10), pp. 2628-2635. doi: 10.1681/asn.2007030273.

Johnson, A. y Zager, R. (2018). Mechanisms underlying increased TIMP2 and IGFBP7 urinary excretion in experimental AKI. *Journal of the American Society of Nephrology*, 29(8), pp. 2157-2167. doi: 10.1681/asn.2018030265.

Johnstone, R. *et al.* (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *The Journal of Biological Chemistry*, 262, pp. 9412-9420. doi: 10.1016/s0021-9258(18)48095-7.

de Jong, O. *et al.* (2012). Cellular stress conditions are reflected in the protein and RNA content of endothelial cell-derived exosomes. *Journal of Extracellular Vesicles*, 1(1). doi: 10.3402/jev.v1i0.18396.

Juhan-Vague, I. *et al.* (2003). Plasminogen activator inhibitor-1, inflammation, obesity, insulin resistance and vascular risk. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1(7), pp. 1575-1579. doi: 10.1046/j.1538-7836.2003.00279.x.

Jung, D. *et al.* (1975). New colorimetric reaction for end point, continuous flow, and kinetic measurement of urea. *Clinical Chemistry*, 21(8), pp. 1136-1140. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1137920/>

Kadikoylu, G. *et al.* (2004). The effects of desferrioxamine on cisplatin-induced lipid peroxidation and the activities of antioxidant enzymes in rat kidneys. *Human and Experimental Toxicology*, 23(1), pp. 29-34. doi: 10.1191/0960327104ht413oa.

Kalra, H. *et al.* (2012). Vesiclepedia: A Compendium for Extracellular Vesicles with Continuous Community Annotation. *PLoS Biology*, 10(12). doi: 10.1371/journal.pbio.1001450.

Kanagasundaram, N. (2014). Pathophysiology of ischaemic acute kidney injury. *Ann Clin Biochem*, 52(2), pp. 193-205. doi: 10.1177/0004563214556820.

Karahalil, B. (2016). Overview of systems biology and omics technologies. *Currente Medicinal Chemistry*, 23, pp. 1-10. doi: 10.2174/0929867323666160926.

Karlberg, L. *et al.* (1983). Impaired medullary circulation in postischemic acute renal failure. *Acta Physiologica Scandinavica*, 118(1), pp. 11-17. doi: 10.1111/j.1748-1716.1983.tb07234.x.

Karpman, D., Ståhl, A. y Arvidsson, I. (2017). Extracellular vesicles in renal disease. *Nature Reviews Nephrology*, 13(9), pp. 545-562. doi: 10.1038/nrneph.2017.98.

Kashani, K. *et al.* (2013). Discovery and validation of cell cycle arrest biomarkers in human acute kidney injury. *Critical Care*, 17(1), p. R25. doi: 10.1186/cc12503.

Katzmann, D., Babst, M. y Emr, S. (2001). Ubiquitin-Dependent Sorting into the Multivesicular Body Pathway Requires the Function of a Conserved Endosomal Protein Sorting Complex, ESCRT-I. *Cell*, 106(2), pp. 145-155. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00434-2.

Kelland, L. (1993). New platinum antitumor complexes. *Critical Reviews in Oncology and Hematology*, 15(3), pp. 191-219. doi: 10.1016/1040-8428(93)90042-3.

Kelly, K. *et al.* (1996). Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal injury. *The Journal of Clinical Investigation*, 97(4), pp. 1056-1063. doi: 10.1172/jci118498.

Kerr, J., Wyllie, A. y Currie, A. (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), p. 239. doi: 10.1038/bjc.1972.33.

Khwaja, A. (2012). KDIGO clinical practice guidelines for acute kidney injury. *Nephron*

Clinical practice, 120(4). doi: 10.1159/000339789.

Kim, D. *et al.* (2015). EVpedia: a community web portal for extracellular vesicles research. *Bioinformatics*, 31(6), p. 933. doi: 10.1093/bioinformatics/btu741.

Kohn, S. *et al.* (2002). Nephrotoxicity of Combined Treatment with Cisplatin and Gentamicin in the Guinea Pig: Glomerular Injury Findings. *Ultrastructural Pathology*, 26(6), pp. 371-382. doi: 10.1080/01913120290104683.

Kokkoris, S. *et al.* (2013). Novel Biomarkers of Acute Kidney Injury in the General Adult ICU: A Review. *Renal Failure*, 35(4), pp. 579-591. doi: 10.3109/0886022x.2013.773835.

Kono, H. y Rock, K. (2008). How dying cells alert the immune system to danger. *Nature reviews. Immunology*, 8(4), p. 279. doi: 10.1038/nri2215.

Krämer, A. *et al.* (2014). Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis. *Bioinformatics*, 30(4), p. 523. doi: 10.1093/bioinformatics/btt703.

Kröning, R., Lichtenstein, K. y Nagami, G. (2000). Sulfur-containing amino acids decrease cisplatin cytotoxicity and uptake in renal tubule epithelial cell lines. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 45(1), pp. 43-9. doi: 10.1007/pl00006741.

Kurata, H. *et al.* (2005). Protective effect of nitric oxide on ischemia/reperfusion-induced renal injury and endothelin-1 overproduction. *European Journal of Pharmacology*, 517(3), pp. 232-239. doi: 10.1016/j.ejphar.2005.05.026.

Kurien, B., Everds, N. y Scofield, R. (2004). Experimental animal urine collection: a review. *Laboratory animals*, 38(4), pp. 333-361. doi: 10.1258/0023677041958945.

Kuwabara, T. *et al.* (2009). Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels reflect damage to glomeruli, proximal tubules, and distal nephrons. *Kidney International*, 75(3), pp. 285-294. doi: 10.1038/KI.2008.499.

Kwon, O., Hong, S. y Ramesh, G. (2009). Diminished NO generation by injured endothelium and loss of macula densa nNOS may contribute to sustained acute kidney injury after ischemia-reperfusion. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 296(1), pp. 25-33. doi: 10.1152/ajprenal.90531.2008.

Laemmly, U. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature 1970 227:5259*, 227(5259), pp. 680-685. doi: 10.1038/227680a0.

Lagos-Arevalo P. *et al.* (2015). Cystatin C in acute kidney injury diagnosis: early biomarker or alternative to serum creatinine?. *Pediatric nephrology*, 30(4), p. 665. doi: 10.1007/s00467-014-2987-0.

Lameire, N., Biesen, W. y Vanholder, R. (2008). Acute kidney injury. *The Lancet*, 372(9653), pp. 1863-1865. doi: 10.1016/s0140-6736(08)61794-8.

Lancaster, G. y Febbraio, M. (2005). Exosome-dependent Trafficking of HSP70: a novel secretory pathway for cellular stress proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 280(24), pp. 23349-23355. doi: 10.1074/jbc.m502017200.

Lebwohl, D. y Canetta, R. (1998). Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *European Journal of Cancer*, 34(10), pp. 1522-1534. doi: 10.1016/s0959-8049(98)00224-x.

Lee, S. *et al.* (2011). Distinct Macrophage Phenotypes Contribute to Kidney Injury and Repair. *Journal of the American Society of Nephrology*, 22(2), pp. 317-326. doi: 10.1681/asn.2009060615.

Lee, S. *et al.* (2018). Distant Organ Dysfunction in Acute Kidney Injury: A Review. *American journal of kidney diseases*, 72(6), p. 846. doi: 10.1053/j.ajkd.2018.03.028.

Leedahl, D. *et al.* (2014). Derivation of Urine Output Thresholds That Identify a Very High Risk of AKI in Patients with Septic Shock. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 9(7), p. 1168. doi: 10.2215/cjn.09360913.

Legrand, C. *et al.* (2001). uPA/Plasmin System-Mediated MMP-9 Activation Is Implicated in Bronchial Epithelial Cell Migration. *Experimental Cell Research*, 264(2), pp. 326-336. doi: 10.1006/excr.2000.5125.

Levey, A. y James, M. (2017). Acute Kidney Injury. *Annals of internal medicine*, 167(9), pp. ITC65-ITC79. doi: 10.7326/AITC201711070.

Levey, A. S. *et al.* (1999). Dietary Protein Restriction and the Progression of Chronic Renal Disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 10(11), pp. 2426-2439. doi: 10.1681/ASN.V10112426.

Lieberthal, W. y Nigam, S. (1998). Acute renal failure. I. Relative importance of proximal vs. distal tubular injury. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 275(5 44-5). doi: 10.1152/ajprenal.1998.275.5.F623.

Lieberthal, W. y Nigam, S. (2000). Acute renal failure. II. Experimental models of acute renal failure: imperfect but indispensable. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 278(1 47-1). doi: 10.1152/ajprenal.2000.278.1.F1.

Lieberthal, W., Triaca, V. y Levine, J. (1996). Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 270(4 PART 2). doi: 10.1152/ajprenal.1996.270.4.F700.

Linfert, D., Chowdhry, T. y Rabb, H. (2009). Lymphocytes and ischemia-reperfusion injury. *Transplantation reviews*, 23(1), p. 1. doi: 10.1016/j.trre.2008.08.003.

Lio, F. *et al.* (1996). Epidemiology of acute renal failure: A prospective, multicenter, community-based study The following persons and institutions participated in the Madrid. *Kidney International*, 50, pp. 811-818. doi: 10.1038/ki.1996.380.

Liu, C. *et al.* (2017). The diagnostic accuracy of urinary [TIMP-2]·[IGFBP7] for acute kidney injury in adults: A PRISMA-compliant meta-analysis. *Medicine*, 96(27), p. 27. doi: 10.1097/MD.00000000000007484.

Liu, K. *et al.* (2011). Acute Kidney Injury in Patients with Acute Lung Injury: Impact of Fluid Accumulation on Classification of Acute Kidney Injury and Associated Outcomes. *Critical care medicine*, 39(12), p. 2665. doi: 10.1097/ccm.0b013e318228234b.

Liu, R. (2008). Oxidative Stress, Plasminogen Activator Inhibitor 1, and Lung Fibrosis. *Antioxidants & redox signaling*, 10(2), p. 303. doi: 10.1089/ars.2007.1903.

Lopez-Novoa, J. M. *et al.* (2011). New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view. *Kidney International*, 79(1), pp. 33-45. doi: 10.1038/ki.2010.337.

Lötvall, J. *et al.* (2014). Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3(1). doi: 10.3402/jev.v3.26913.

Loverre, A. *et al.* (2004). Ischemia-Reperfusion Induces Glomerular and Tubular Activation of Proinflammatory and Antiapoptotic Pathways: Differential Modulation by Rapamycin. *Journal of the American Society of Nephrology*, 15(10), pp. 2675-2686. doi: 10.1097/01.ASN.0000139932.00971.E4.

Lowry, O. *et al.* (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biology Chemistry*, 193(1), pp 265-75. Disponible es: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14907713/>.

Luke, D, Vadiiei, K. y Lopez-Berestein, G. (1992). Role of vascular congestion in cisplatin-induced acute renal failure in the rat. *Nephrology, dialysis, transplantation*, 7(1), pp. 1-7. doi: 10.1093/oxfordjournals.ndt.a091984.

Lund, L. *et al.* (1999). Functional overlap between two classes of matrix-degrading proteases in wound healing. *The EMBO Journal*, 18(17), p. 4645. doi: 10.1093/emboj/18.17.4645.

Malagrino, P. *et al.* (2017). Proteome analysis of acute kidney injury – Discovery of new predominantly renal candidates for biomarker of kidney disease. *Journal of Proteomics*, 151, pp. 66-73. doi: 10.1016/j.jprot.2016.07.019.

Małgorzewicz, S., Skrzypczak-Jankun, E. y Jankun, J. (2013). Plasminogen activator inhibitor-1 in kidney pathology (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 31(3), pp. 503-510. doi: 10.3892/ijmm.2013.1234.

Mandic, A. *et al.* (2003). Cisplatin Induces Endoplasmic Reticulum Stress and Nucleus-independent Apoptotic Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 278(11), pp. 9100-9106. doi: 10.1074/jbc.M210284200.

Manohar, S. y Leung, N. (2017). Cisplatin nephrotoxicity: a review of the literature. *Journal of Nephrology*, 31(1), pp. 15-25. doi: 10.1007/s40620-017-0392-z.

Martin, R. (2010). Acute kidney injury: advances in definition, pathophysiology, and diagnosis. *AACN advanced critical care*, 21(4), pp. 350-356. doi: 10.1097/NCI.0b013e3181f9574b.

Martínez-Salgado, C., López-Hernández, F. J. y López-Novoa, J. M. (2007). Glomerular nephrotoxicity of aminoglycosides. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 223(1), pp. 86-98. doi: 10.1016/j.taap.2007.05.004.

Martinez, G. *et al.* (2009). Cisplatin-induced kidney injury in the rat: l-carnitine modulates the relationship between MMP-9 and TIMP-3. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 61(3), pp. 183-188. doi: 10.1016/j.etp.2008.07.004.

Marx, D. *et al.* (2018). Proteomics and Metabolomics for AKI Diagnosis. *Seminars in Nephrology*, 38(1), pp. 63-87. doi: 10.1016/j.semnephrol.2017.09.007.

Mason, J., Torhorst, J. y Welsch, J. (1984). Role of the medullary perfusion defect in the pathogenesis of ischemic renal failure. *Kidney International*, 26(3), pp. 283-293. doi: 10.1038/ki.1984.171.

Mayer, T. *et al.* (2017). Urine Biomarkers of Tubular Renal Cell Damage for the Prediction of Acute Kidney Injury After Cardiac Surgery-A Pilot Study. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, 31(6), pp. 2072-2079. doi: 10.1053/j.jvca.2017.04.024.

McSweeney, K. R. *et al.* (2021). Mechanisms of Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury: Pathological Mechanisms, Pharmacological Interventions, and Genetic Mitigations. *Cancers*, 13(7). doi: 10.3390/cancers13071572.

Medic, B. *et al.* (2016). Evaluation of Novel Biomarkers of Acute Kidney Injury: The Possibilities and Limitations. *Current Medicinal Chemistry*, 23(19), pp. 1981-1997. doi: 10.2174/0929867323666160210130256.

Mehta, R. L. *et al.* (2004). Spectrum of acute renal failure in the intensive care unit: The PICARD experience. *Kidney International*, 66(4), pp. 1613-1621. doi: 10.1111/j.1523-1755.2004.00927.x.

Mehta, R. L. *et al.* (2007). Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve

outcomes in acute kidney injury. *Critical Care*, 11(2), p. R31. doi: 10.1186/cc5713.

Merchant, M. *et al.* (2017). Isolation and characterization of urinary extracellular vesicles: implications for biomarker discovery. *Nature reviews. Nephrology*, 13(12), pp. 731-749. doi: 10.1038/nrneph.2017.148.

Midwood, K. S. y Piccinini, A. M. (2010). DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators of Inflammation*, 2010. doi: 10.1155/2010/672395.

Mijuskovic, M. *et al.* (2017). Tissue and urinary KIM-1 relate to tumor characteristics in patients with clear renal cell carcinoma. *International Urology and Nephrology*, 50(1), pp. 63-70. doi: 10.1007/s11255-017-1724-6.

Miller, R. P. *et al.* (2010). Mechanisms of Cisplatin Nephrotoxicity. *Toxins*, pp. 2490-2518. doi: 10.3390/toxins2112490.

Mingeot-Leclercq, M. P. y Tulkens, P. M. (1999). Aminoglycosides: Nephrotoxicity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(5), p. 1003. doi: 10.1128/AAC.43.5.1003.

Miranda, K. C. *et al.* (2010). Nucleic acids within urinary exosomes/microvesicles are potential biomarkers for renal disease. *Kidney international*, 78(2), p. 191. doi: 10.1038/ki.2010.106.

Mishra, J. *et al.* (2004). Amelioration of Ischemic Acute Renal Injury by Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin. *Journal of the American Society of Nephrology*, 15(12), pp. 3073-3082. doi: 10.1097/01.ASN.0000145013.44578.45.

Moledina, D. G. y Parikh, C. R. (2018). Phenotyping of Acute Kidney Injury: Beyond Serum Creatinine. *Seminars in Nephrology*, 38(1), pp. 3-11. doi: 10.1016/j.semnephrol.2017.09.002.

Molitoris, B. A., Dahl, R. y Geerdes, A. (1992). Cytoskeleton disruption and apical redistribution of proximal tubule Na(+)-K(+)-ATPase during ischemia. *American Journal of Physiology*, 263(3 Pt 2), pp. 488-95. doi: 10.1152/ajprenal.1992.263.3.F488.

Molitoris, B. A. y Marrs, J. (1999). The role of cell adhesion molecules in ischemic acute renal failure. *The American Journal of Medicine*, 106(5), pp. 583-592. doi:

10.1016/s0002-9343(99)00061-3.

Molitoris, B. A. y Sutton, T. A. (2004). Endothelial injury and dysfunction: Role in the extension phase of acute renal failure. *Kidney International*, 66(2), pp. 496-499. doi: 10.1111/j.1523-1755.2004.761_5.x.

Morelli, A. E. *et al.* (2004). Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood*, 104(10), pp. 3257-3266. doi: 10.1182/blood-2004-03-0824.

Moreno-Gonzalo, O., Villarroya-Beltri, C. y Sánchez-Madrid, F. (2014). Post-Translational Modifications of Exosomal Proteins. *Frontiers in Immunology*, 11(5), pp 383. doi: 10.3389/fimmu.2014.00383.

Morrison, E. E., Bailey, M. A. y Dear, J. W. (2016). Renal extracellular vesicles: from physiology to clinical application. *Journal of Physiology*, 594(20), pp. 5735-5748. doi: 10.1113/jp272182.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), pp. 55-63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

Mukhopadhyay, P. *et al.* (2010). Cannabinoid-2 receptor limits inflammation, oxidative/nitrosative stress and cell death in nephropathy. *Free radical biology & medicine*, 48(3), p. 457. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.11.022.

Müller, T. *et al.* (2011). Sense and nonsense of pathway analysis software in proteomics. *Journal of Proteome Research*, 10(12), pp. 5398-5408. doi: 10.1021/pr200654k.

Mullis, K. *et al.* (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 51 Pt 1(1), pp. 263-273. doi: 10.1101/sqb.1986.051.01.032.

Muñoz, J. y Heck, A. J. R. (2014). From the Human Genome to the Human Proteome. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(41), pp. 10864-10866. doi: 10.1002/anie.201406545.

Muralidharan-Chari, V. *et al.* (2009). ARF6-Regulated Shedding of Tumor Cell-Derived Plasma Membrane Microvesicles. *Current Biology*, 19(22), pp. 1875-1885. doi: 10.1016/j.cub.2009.09.059.

Murray, P. T. *et al.* (2014). Potential use of biomarkers in acute kidney injury: Report and summary of recommendations from the 10th Acute Dialysis Quality Initiative consensus conference. *Kidney International*, 85(3), pp. 513-521. doi: 10.1038/ki.2013.374

Nabhan, J. F. *et al.* (2012). Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(11), pp. 4146-4151. doi: 10.1073/PNAS.1200448109.

Nalesso, F. *et al.* (2020). Evaluating Nephrocheck® as a Predictive Tool for Acute Kidney Injury. *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease*, 13, p. 85. doi: 10.2147/ijnrd.s198222.

Nawroth, P. P. y Stern, D. M. (1986). Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. *Journal of Experimental Medicine*, 163(3), pp. 740-745. doi: 10.1084/jem.163.3.740.

Negi, S. *et al.* (2018). Acute kidney injury: Epidemiology, outcomes, complications, and therapeutic strategies. *Seminars in Dialysis*, 31(5), pp. 519-527. doi: 10.1111/sdi.12705.

Nejat, M. *et al.* (2012). Albuminuria increases cystatin C excretion: implications for urinary biomarkers. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 27(suppl_3), pp. 96-103. doi: 10.1093/ndt/gfr222.

van Niel, G., D'Angelo, G. y Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(4), pp. 213-228. doi: 10.1038/nrm.2017.125.

Nielsen, R., Christensen, E. I. y Birn, H. (2016). Megalin and cubilin in proximal tubule protein reabsorption: from experimental models to human disease. *Kidney International*, 89(1), pp. 58-67. doi: 10.1016/j.kint.2015.11.007.

Nykjaer, A. *et al.* (1997). Recycling of the urokinase receptor upon internalization of the uPA:serpin complexes. *The EMBO Journal*, 16(10), p. 2610. doi: 10.1093/emboj/16.10.2610.

Obermüller, N. *et al.* (2013). Current developments in early diagnosis of acute kidney injury. *International Urology and Nephrology* 2013 46:1, 46(1), pp. 1-7. doi: 10.1007/s11255-013-0448-5.

Odekon, L. E., Sato, Y. y Rifkin, D. B. (1992). Urokinase-type plasminogen activator mediates basic fibroblast growth factor-induced bovine endothelial cell migration independent of its proteolytic activity. *Journal of Cellular Physiology*, 150(2), pp. 258-263. doi: 10.1002/jcp.1041500206.

Olivero, O. A. *et al.* (1997). Preferential formation and decreased removal of cisplatin-DNA adducts in Chinese hamster ovary cell mitochondrial DNA as compared to nuclear DNA. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 391(1-2), pp. 79-86. doi: 10.1016/s0165-1218(97)00037-2.

Østergaard, O. *et al.* (2012). Quantitative proteome profiling of normal human circulating microparticles. *Journal of Proteome Research*, 11(4), pp. 2154-2163. doi: 10.1021/pr200901p.

Owens, A. P. y Mackman, N. (2011). Microparticles in Hemostasis and Thrombosis. *Circulation research*, 108(10), p. 1284. doi: 10.1161/circresaha.110.233056.

Özden, A. *et al.* (2001). Antithrombin III reduces renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Research in Experimental medicine*, 200(3), pp. 195-203. Disponible en: <https://europepmc.org/article/med/11426671>.

Pabla, N. *et al.* (2009). The copper transporter Ctr1 contributes to cisplatin uptake by renal tubular cells during cisplatin nephrotoxicity. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 296(3), p. 505. doi: 10.1152/ajprenal.90545.2008.

Pabla, N. y Dong, Z. (2008). Cisplatin nephrotoxicity: Mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney International*, 73(9), pp. 994-1007. doi: 10.1038/sj.ki.5002786.

Palmieri, D. *et al.* (2002). Plasminogen Activator Inhibitor-1 and -3 Increase Cell

Adhesion and Motility of MDA-MB-435 Breast Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277(43), pp. 40950-40957. doi: 10.1074/jbc.m202333200.

Palsson, R. y Waikar, S. S. (2018). Renal Functional Reserve Revisited. *Advances in Chronic Kidney Disease*, 25(3), pp. e1-e8. doi: 10.1053/j.ackd.2018.03.001.

Panich, T. *et al.* (2017). Urinary exosomal activating transcriptional factor 3 as the early diagnostic biomarker for sepsis-induced acute kidney injury. *BMC Nephrology*, 18(1). doi: 10.1186/s12882-016-0415-3.

Pasquet, J. M., Dachary-Prigent, J. y Nurden, A. T. (1996). Calcium Influx is a Determining Factor of Calpain Activation and Microparticle Formation in Platelets. *European Journal of Biochemistry*, 239(3), pp. 647-654. doi: 10.1111/j.1432-1033.1996.0647u.x.

Patel, S. (2018). Danger-Associated Molecular Patterns (DAMPs): the Derivatives and Triggers of Inflammation. *Current Allergy and Asthma Reports*, 18(11), pp. 1-12. doi: 10.1007/s11882-018-0817-3.

Pawar, S., Kartha, S. y Toback, F. G. (1995). Differential gene expression in migrating renal epithelial cells after wounding. *Journal of Cellular Physiology*, 165(3), pp. 556-565. doi: 10.1002/jcp.1041650314.

Pegtel, D. M. *et al.* (2010). Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(14), p. 6328. doi: 10.1073/pnas.0914843107.

Pickering, J. W. y Endre, Z. H. (2016). Bench to bedside: the next steps for biomarkers in acute kidney injury. *American Journal of Physiology*, 311(4), pp. F717-F721. doi: 10.1152/ajprenal.00268.2016.

Pisitkun, T., Shen, R. F. y Knepper, M. A. (2004). Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(36), p. 13368. doi: 10.1073/pnas.0403453101.

Planells-Cases, R. *et al.* (2015). Subunit composition of VRAC channels determines substrate specificity and cellular resistance to Pt-based anti-cancer drugs. *The EMBO*

Journal, 34(24), p. 2993. doi: 10.15252/embj.201592409.

Pol, E. van der *et al.* (2016). Recent developments in the nomenclature, presence, isolation, detection and clinical impact of extracellular vesicles. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 14(1), pp. 48-56. doi: 10.1111/jth.13190.

Pols, M. S. y Klumperman, J. (2009). Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Experimental Cell Research*, 315(9), pp. 1584-1592. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.09.020.

Pomatto, M. A. C. *et al.* (2017). Extracellular Vesicles in Renal Pathophysiology. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7(4), p. 37. doi: 10.3389/fmolb.2017.00037.

Preiss, D. J. *et al.* (2016). The influence of a cooked-meat meal on estimated glomerular filtration rate. *Annals of Clinical Biochemistry*, 44(1), pp. 35-42. doi: 10.1258/000456307779595995.

Providence, K. M. y Higgins, P. J. (2004). PAI-1 expression is required for epithelial cell migration in two distinct phases of in vitro wound repair. *Journal of Cellular Physiology*, 200(2), pp. 297-308. doi: 10.1002/jcp.20016.

Qian, W. *et al.* (2005). Mitochondrial density determines the cellular sensitivity to cisplatin-induced cell death. *Am J Physiol Cell Physiol*, 289(6), pp. 1466-1475. doi: 10.1152/ajpcell.00265.2005.

Quaglia, M. *et al.* (2020). Extracellular Vesicles as Mediators of Cellular Crosstalk Between Immune System and Kidney Graft. *Frontiers in Immunology*, 11, p. 74. doi: 10.3389/fimmu.2020.00074.

Quiros, Y. *et al.* (2010). Sub-nephrotoxic doses of gentamicin predispose animals to developing acute kidney injury and to excrete ganglioside M2 activator protein. *Kidney international*, 78(10), pp. 1006-1015. doi: 10.1038/ki.2010.267.

Quiros, Y. *et al.* (2013). Cardioprotrophin-1 administration prevents the renal toxicity of iodinated contrast media in rats. *Toxicological Sciences*, 132(2), pp. 493-501. doi: 10.1093/toxsci/kft007.

Rahman, M., Shad, F. y Smith, M. C. (2012). Acute Kidney Injury: A Guide to Diagnosis

and Management. *American Family Physician*, 86(7), pp. 631-639. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23062091/>.

Raiborg, C. y Stenmark, H. (2009). The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature*, 458(7237), pp. 445-452. doi: 10.1038/nature07961.

Ramesh, G. y Reeves, W. B. (2002). TNF- α mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity. *The Journal of Clinical Investigation*, 110(6), p. 835. doi: 10.1172/jci15606.

Raposo, G. y Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of Cell Biology*, 200(4), p. 373. doi: 10.1083/jcb.201211138.

Redahan, L. y Murray, P. T. (2017) «Biomarkers of drug-induced kidney injury», *Current Opinion in Critical Care*, 23(6), pp. 463-469. doi: 10.1097/mcc.0000000000000464.

Renckens, R. *et al.* (2005). The role of plasminogen activator inhibitor type 1 in the inflammatory response to local tissue injury. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3(5), pp. 1018-1025. doi: 10.1111/J.1538-7836.2005.01311.X.

Ricci, Z. *et al.* (2006). Practice patterns in the management of acute renal failure in the critically ill patient: an international survey. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 21(3), pp. 690-696. doi: 10.1093/ndt/gfi296.

Ricci, Z. y Romagnoli, S. (2018). Acute Kidney Injury: Diagnosis and Classification in Adults and Children. *Contributions to Nephrology*, 193, pp. 1-12. doi: 10.1159/000484956.

Ronco, C., Bellomo, R. y Kellum, J. A. (2019). Acute kidney injury. *The Lancet*, 394(10212), pp. 1949-1964. doi: 10.1016/s0140-6736(19)32563-2.

Ronco, C. y Rosner, M. H. (2012). Acute kidney injury and residual renal function. *Critical Care*, 16, p. 144. doi: 10.1186/cc11426.

Rossaint, J. y Zarbock, A. (2016). Acute kidney injury: definition, diagnosis and epidemiology. *Minerva Urologica e Nefrologica*, 68(1), pp. 49-57. Disponible en:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26364570/>.

Sabbisetti, V. S. *et al.* (2013). Novel Assays for Detection of Urinary KIM-1 in Mouse Models of Kidney Injury. *Toxicological Sciences*, 131(1), pp. 13-25. doi: 10.1093/toxsci/kfs268.

Safirstein, R. *et al.* (1986). Cisplatin Nephrotoxicity. *American Journal of Kidney Diseases*, 8(5), pp. 356-367. doi: 10.1016/S0272-6386(86)80111-1.

Safirstein, R., Miller, P. y Guttenplan, J. B. (1984). Uptake and metabolism of cisplatin by rat kidney. *Kidney international*, 25(5), pp. 753-8. doi: 10.1038/ki.1984.86.

Sahin, Z. *et al.* (2019). Long-term metabolic cage housing increases anxiety/depression-related behaviours in adult male rats. *Archives of physiology and biochemistry*, 125(2), pp. 122-127. doi: 10.1080/13813455.2018.1441314.

Samarakoon, R. *et al.* (2008). TGF- β 1-induced plasminogen activator inhibitor-1 expression in vascular smooth muscle cells requires pp60c-src/EGFR γ 845 and Rho/ROCK signaling. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 44(3), p. 527. doi: 10.1016/j.yjmcc.2007.12.006.

Samarakoon, R. y Higgins, P. J. (2002). MEK/ERK pathway mediates cell-shape-dependent plasminogen activator inhibitor type 1 gene expression upon drug-induced disruption of the microfilament and microtubule networks. *Journal of Cell Science*, 115(15), pp. 3093-3103. doi: 10.1242/jcs.115.15.3093.

Samimi, G. *et al.* (2004). Modulation of the Cellular Pharmacology of Cisplatin and Its Analogs by the Copper Exporters ATP7A and ATP7B. *Molecular Pharmacology*, 66(1), pp. 25-32. doi: 10.1124/mol.66.1.25.

Sánchez-González, P. D. *et al.* (2011). An integrative view of the pathophysiological events leading to cisplatin nephrotoxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, 41(10), pp. 803-821. doi: 10.3109/10408444.2011.602662.

Sancho-Martínez, S. M. *et al.* (2012). Subcellular targets of cisplatin cytotoxicity: An integrated view. *Pharmacology and Therapeutics*, pp. 35-55. doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.07.003.

Sancho-Martínez, S. M., Blanco-Gozaño, V., *et al.* (2020). Impaired Tubular Reabsorption Is the Main Mechanism Explaining Increases in Urinary NGAL Excretion Following Acute Kidney Injury in Rats. *Toxicological sciences*, 175(1), pp. 75-86. doi: 10.1093/toxsci/kfaa029.

Sancho-Martínez, S. M., Sánchez-Juanes, F., *et al.* (2020). Urinary TCP1-eta: A Cortical Damage Marker for the Pathophysiological Diagnosis and Prognosis of Acute Kidney Injury. *Toxicological Sciences*, 174(1), pp. 3-15. doi: 10.1093/toxsci/kfz242.

Dos Santos, N. A. G. *et al.* (2012). Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: an update. *Archives of Toxicology* 2012 86:8, 86(8), pp. 1233-1250. doi: 10.1007/s00204-012-0821-7.

Dos Santos, O. F. *et al.* (1991). Role of platelet activating factor in gentamicin and cisplatin nephrotoxicity. *Kidney international*, 40(4), pp. 742-7. doi: 10.1038/ki.1991.269.

Saris, C. P. *et al.* (1996). In vitro formation of DNA adducts by cisplatin, lobaplatin and oxaliplatin in calf thymus DNA in solution and in cultured human cells. *Carcinogenesis*, 17(12), pp. 2763-2769. doi: 10.1093/carcin/17.12.2763.

Satta, N. *et al.* (1994). Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. *The Journal of Immunology*, 153(7), pp. 3245-55. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7522256/>.

Schetz, M. *et al.* (2005). Drug-induced acute kidney injury. *Current Opinion in Critical Care*, 11(6), pp. 555-565. doi: 10.1097/01.ccx.0000184300.68383.95.

Schorey, J. S. *et al.* (2015). Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. *EMBO Reports*, 16(1), p. 24. doi: 10.15252/embr.201439363.

Schrezenmeier, E. V. *et al.* (2017). Biomarkers in acute kidney injury – pathophysiological basis and clinical performance. *Acta physiologica*, 219(3), p. 554. doi: 10.1111/apha.12764.

Schrier, R. W. y Wang, W. (2009). Acute Renal Failure and Sepsis. *The New England*

Journal of Medicine, 351(2), pp. 159-169. doi: 10.1056/NEJMra032401.

Selby, N. M. *et al.* (2012). Use of Electronic Results Reporting to Diagnose and Monitor AKI in Hospitalized Patients. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 7(4), pp. 533-540. doi: 10.2215/CJN.08970911.

Seo, J. Y. *et al.* (2009). Positive Feedback Loop between Plasminogen Activator Inhibitor-1 and Transforming Growth Factor-Beta1 during Renal Fibrosis in Diabetes. *American Journal of Nephrology*, 30(6), pp. 481-490. doi: 10.1159/000242477.

Shahbaz, H. y Gupta, M. (2021). Creatinine Clearance. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31334948/>.

Sharfuddin, A. A. y Molitoris, B. A. (2011). Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nature Reviews Nephrology*, 7(4), pp. 189-200. doi: 10.1038/nrneph.2011.16.

Sheldon, C. (2013). Retooling the Creatinine Clearance Equation to Estimate Kinetic GFR when the Plasma Creatinine Is Changing Acutely. *Journal of the American Society of Nephrology*, 24(6), pp. 877-888. doi: 10.1681/ASN.2012070653.

Shevchenko, A. *et al.* (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature protocols*, 1(6), pp. 2856-2860. doi: 10.1038/nprot.2006.468.

Shiraishi, F. *et al.* (2000). Heme oxygenase-1 gene ablation or expression modulates cisplatin-induced renal tubular apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol*, 278(5), pp. :F726-36. doi: 10.1152/ajprenal.2000.278.5.F726.

Siew, E. D. y Davenport, A. (2015). The growth of acute kidney injury: a rising tide or just closer attention to detail?. *Kidney International*, 87(1), p. 46. doi: 10.1038/ki.2014.293.

Sillen, M. y Declerck, P. J. (2021). A Narrative Review on Plasminogen Activator Inhibitor-1 and Its (Patho)Physiological Role: To Target or Not to Target?. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), pp. 1-16. doi: 10.3390/ijms22052721.

da Silveira, K. *et al.* (2010). ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas axis in renal ischaemia/reperfusion injury in rats. *Clinical Science*, 119(9), pp. 385-394. doi:

10.1042/cs20090554.

Singbartl, K., Forlow, S. Bradley y Ley, K. (2001). Platelet, but not endothelial, P-selectin is critical for neutrophil-mediated acute postischemic renal failure. *The FASEB Journal*, 15(13), pp. 2337-2344. doi: 10.1096/fj.01-0199com.

Skotland, T., Sandvig, K. y Llorente, A. (2017). Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward. *Progress in Lipid Research*, 66, pp. 30-41. doi: 10.1016/j.plipres.2017.03.001.

Skrypnik, N. I. *et al.* (2020). IL-6-mediated hepatocyte production is the primary source of plasma and urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin during acute kidney injury. *Kidney International*, 97(5), pp. 966-979. doi: 10.1016/j.kint.2019.11.013

Slocum, J., Heung, M. y Pennathur, S. (2012). Marking renal injury: can we move beyond serum creatinine?. *Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine*, 159(4), pp. 277-289. doi: 10.1016/j.trsl.2012.01.014.

Solez, K., Morel-Maroger, L. y Sraer, J. (1979). The morphology of "acute tubular necrosis" in man: analysis of 57 renal biopsies and a comparison with the glycerol model. *Medicine*, 58(5), pp. 362-376. Disponible en: <https://europepmc.org/article/med/481195>.

Sorenson, C. M. y Eastman, A. (1988). Mechanism of Cis-Diamminedichloroplatinum(H)-Induced Cytotoxicity: Role of G2 Arrest and DNA Double-Strand Breaks. *Cancer Research*, 48(16), pp. 4484-4488. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3395999/>.

Sprague, A. H. y Khalil, R. A. (2009). Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochemical Pharmacology*, 78(6), pp. 539-552. doi: 10.1016/j.bcp.2009.04.029.

Srisawat, N. y Kellum, J. A. (2020). The Role of Biomarkers in Acute Kidney Injury. *Critical Care Clinics*, 36(1), pp. 125-140. doi: 10.1016/j.ccc.2019.08.010.

Ståhl, A. L. *et al.* (2019). Exosomes and microvesicles in normal physiology, pathophysiology, and renal diseases. *Pediatric Nephrology*, 34(1), pp. 11-30. doi:

10.1007/S00467-017-3816-Z.

Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2009, 10(8), pp. 513-525. doi: 10.1038/nrm2728.

Stoorvogel, W. *et al.* (1991). Late endosomes derive from early endosomes by maturation. *Cell*, 65(3), pp. 417-427. doi: 10.1016/0092-8674(91)90459-c.

Stuffers, S. *et al.* (2009). Multivesicular Endosome Biogenesis in the Absence of ESCRTs», *Traffic*, 10(7), pp. 925-937. doi: 10.1111/j.1600-0854.2009.00920.x.

Suárez-Álvarez, B., Liapis, H. y Anders, H. J. (2016). Links between coagulation, inflammation, regeneration, and fibrosis in kidney pathology. *Laboratory Investigation*, 96(4), pp. 378-390. doi: 10.1038/labinvest.2015.164.

Sung, M. J. *et al.* (2008). Genistein protects the kidney from cisplatin-induced injury. *Kidney International*, 74(12), pp. 1538-1547. doi: 10.1038/KI.2008.409.

Susantitaphong, P. *et al.* (2013). World incidence of AKI: A meta-analysis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 8(9), pp. 1482-1493. doi: 10.2215/CJN.00710113.

Sutton, T. y Molitoris, B. (1998). Mechanisms of cellular injury in ischemic acute renal failure. *Seminars in Nephrology*, 18(5), pp. 490-497. Disponible en: <https://europepmc.org/article/med/9754601>.

Svenningsen, P., Sabaratnam, R. y Jensen, B. L. (2020). Urinary extracellular vesicles: Origin, role as intercellular messengers and biomarkers; efficient sorting and potential treatment options. *Acta Physiologica*, 228(1), pp. 1-14. doi: 10.1111/apha.13346.

Szataneck, R. *et al.* (2017). The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6). doi: 10.3390/ijms18061153.

Tenorio Cañamás, M. T. *et al.* (2010). Diagnóstico diferencial de la insuficiencia renal aguda. *Nefrología*, 3(2), pp. 16-32. doi: 10.3265/nefroplus.pre2010.jul.10548.

Teo, S. H. y Endre, Z. H. (2017). Biomarkers in acute kidney injury (AKI). *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, 31(3), pp. 331-344. doi: 10.1016/j.bpa.2017.10.003.

Thadhani, R., Pascual, M. y Bonventre, J. V. (2009). Acute Renal Failure. *The New England Journal of Medicine*, 334(22), pp. 1448-1460. doi: 10.1056/nejm199605303342207.

Théry, C. *et al.* (2001). Proteomic Analysis of Dendritic Cell-Derived Exosomes: A Secreted Subcellular Compartment Distinct from Apoptotic Vesicles. *The Journal of Immunology*, 166(12), pp. 7309-7318. doi: 10.4049/jimmunol.166.12.7309.

Thurman, J. M. *et al.* (2005). Acute tubular necrosis is characterized by activation of the alternative pathway of complement. *Kidney International*, 67(2), pp. 524-530. doi: 10.1111/j.1523-1755.2005.67109.x.

Townsend, D. M. *et al.* (2009). Role of glutathione S-transferase Pi in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 63(2), pp. 79-85. doi: 10.1016/j.biopha.2008.08.004.

Traynor, J. *et al.* (2006). How to measure renal function in clinical practice. *BMJ: British Medical Journal*, 333(7571), p. 733. doi: 10.1136/bmj.38975.390370.7c.

Turiák, L. *et al.* (2011). Proteomic characterization of thymocyte-derived microvesicles and apoptotic bodies in BALB/c mice. *Journal of Proteomics*, 74(10), pp. 2025-2033. doi: 10.1016/j.jprot.2011.05.023.

Uchino, S. *et al.* (2005). Acute Renal Failure in Critically Ill Patients: A Multinational, Multicenter Study. *JAMA*, 294(7), pp. 813-818. doi: 10.1001/jama.294.7.813.

Uchino, S. *et al.* (2006). An assessment of the RIFLE criteria for acute renal failure in hospitalized patients. *Critical Care Medicine*, 34(7), pp. 1913-1917. doi: 10.1097/01.ccm.0000224227.70642.4F.

Uchino, S. *et al.* (2010). Transient azotaemia is associated with a high risk of death in

hospitalized patients. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 25(6), pp. 1833-1839. doi: 10.1093/ndt/gfp624.

Van Acker, B. A. C. et al. (1993). Creatinine clearance with cimetidine for measurement of GFR. *The Lancet*, 341(8852), pp. 1089-1090. doi: 10.1016/0140-6736(93)92445-y.

Vaidya, V. S. et al. (2008). Urinary Biomarkers for Sensitive and Specific Detection of Acute Kidney Injury in Humans. *Clinical and Translational Science*, 1(3), p. 200. doi: 10.1111/j.1752-8062.2008.00053.x.

Vaidya, V. S., Ferguson, M. A. y Bonventre, J. V. (2008). Biomarkers of Acute Kidney Injury», *Annual review of pharmacology and toxicology*, 48, p. 463. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094615.

Vandijck, D. M. et al. (2014). Acute kidney injury, length of stay, and costs in patients hospitalized in the intensive care unit. *Acta Clinica Belgica*, 62(SUPPL. 2), pp. 341-345. doi: 10.1179/acb.2007.077.

Van De Craen, B., Declerck, P. y Gils, A. (2012). The Biochemistry, Physiology and Pathological roles of PAI-1 and the requirements for PAI-1 inhibition in vivo. *Thrombosis Research*, 130(4), pp. 576-585. doi: 10.1016/j.thromres.2012.06.023.

Verbeke, F. et al. (2021). The urinary proteomics classifier chronic kidney disease 273 predicts cardiovascular outcome in patients with chronic kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 36(5), pp. 811-818. doi: 10.1093/ndt/gfz242.

Wagener, G. et al. (2011). Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of acute kidney injury after orthotopic liver transplantation. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 26(5), pp. 1717-1723. doi: 10.1093/ndt/gfq770.

Waikar, S. S., Betensky, R. A. y Bonventre, J. V. (2009). Creatinine as the gold standard for kidney injury biomarker studies?. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 24(11), pp. 3263-3265. doi: 10.1093/ndt/gfp428.

Wallstrom, G., Anderson, K. S. y LaBaer, J. (2013). Biomarker Discovery for Heterogeneous Diseases. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, 22(5), pp. 747-755. doi: 10.1158/1055-9965.epi-12-1236.

Waltz, D. A. *et al.* (1997). Plasmin and plasminogen activator inhibitor type 1 promote cellular motility by regulating the interaction between the urokinase receptor and vitronectin. *Journal of Clinical Investigation*, 100(1), p. 58. doi: 10.1172/jci119521.

Wang, D. *et al.* (2020). PAI-1 overexpression promotes invasion and migration of esophageal squamous carcinoma cells. *Yi Chuan*, 42(3), pp. 287-295. doi: 10.16288/j.ycz.19-334.

Wang, D. y Lippard, S. J. (2005). Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* 2005 4:4, 4(4), pp. 307-320. doi: 10.1038/nrd1691.

Wang, Q. L. (1983). Cisplatin in the treatment of malignant tumors. *Chinese Journal of Oncology*, 5(6), pp. 461-464. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6426911/>.

Wang, S. *et al.* (2016). Cisplatin suppresses the growth and proliferation of breast and cervical cancer cell lines by inhibiting integrin β 5-mediated glycolysis. *American Journal of Cancer Research*, 6(5), p. 1108. Disponible en: </pmc/articles/PMC4889724/>.

Wang, T. *et al.* (2014). Hypoxia-inducible factors and RAB22A mediate formation of microvesicles that stimulate breast cancer invasion and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(31), pp. E3234-E3242. doi: 10.1073/pnas.1410041111.

Wang, X. *et al.* (2017). Fascin2 regulates cisplatin-induced apoptosis in NRK-52E cells. *Toxicology letters*, 266, p. 56. doi: 10.1016/j.toxlet.2016.11.021.

Ware, L. B., Johnson, A. C. M. y Zager, R. A. (2011). Renal cortical albumin gene induction and urinary albumin excretion in response to acute kidney injury. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 300(3), p. F628. doi: 10.1152/ajprenal.00654.2010.

Wiggins, R. C. *et al.* (1986). Procoagulant activity in normal human urine associated with subcellular particles. *Kidney International*, 29, pp. 591-597. doi: 10.1038/ki.1986.39.

Willms, E. *et al.* (2016). Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. *Scientific Reports*, 6, p. 22519. doi:

10.1038/srep22519.

Wilson, C. (1983). Staining of proteins on gels: comparisons of dyes and procedures. *Methods in enzymology*, 91, pp. 236-247. doi: 10.1016/s0076-6879(83)91020-0.

Winston, J. A. y Safirstein, R. (1985). Reduced renal blood flow in early cisplatin-induced acute renal failure in the rat. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 18(4). doi: 10.1152/AJPRENAL.1985.249.4.F490.

Wollert, T. y Hurley, J. H. (2010). Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* 2010 464:7290, 464(7290), pp. 864-869. doi: 10.1038/nature08849.

Wu, C. Z. *et al.* (2015). Chaperonin-containing t-complex protein-1 subunit β as a possible biomarker for the phase of glomerular hyperfiltration of diabetic nephropathy. *Disease Markers*, p. 548101. doi: 10.1155/2015/548101.

Wyrzykowska, P. y Kasza, A. (2009). Regulation of PAI-1 expression. *Postepy biochem*, 55(1), pp. 46-53. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19514465/>.

Xu, Y. *et al.* (2015). A Role for Tubular Necroptosis in Cisplatin-Induced AKI. *Journal of the American Society of Nephrology*, 26(11), pp. 2647-2658. doi: 10.1681/ASN.2014080741.

Yamate, J. *et al.* (2002). Participation of different macrophage populations and myofibroblastic cells in chronically developed renal interstitial fibrosis after cisplatin-induced renal injury in rats. *Veterinary pathology*, 39(3), pp. 322-333. doi: 10.1354/vp.39-3-322.

Yasuyuki, S., Takahiro, S. y Yoshio, T. (1992). Mechanism of the increase in lipid peroxide induced by cisplatin in the kidneys of rats. *Toxicology Letters*, 62(2-3), pp. 293-300. doi: 10.1016/0378-4274(92)90033-g.

Zager, R. A. y Carpenter, C. B. (1978). Radioimmunoassay for urinary renal tubular antigen: A potential marker of tubular injury. *Kidney International*, 13, pp. 505-512. doi: 10.1038/ki.1978.73.

Zager, R. A., Johnson, A. C. M. y Becker, K. (2013). Renal Cortical Lactate Dehydrogenase: A Useful, Accurate, Quantitative Marker of In Vivo Tubular Injury and Acute Renal Failure. *PLoS ONE*, 8(6), p. 66776. doi: 10.1371/journal.pone.0066776.

Zager, R. A., Johnson, A. C. M. y Frostad, K. (2016). An evaluation of the antioxidant protein α 1-microglobulin as a renal tubular cytoprotectant. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 311(3), pp. F640-F651. doi: 10.1152/ajprenal.00264.2016.

Zhang, B. *et al.* (2007). Cisplatin-induced nephrotoxicity is mediated by tumor necrosis factor- α produced by renal parenchymal cells. *Kidney International*, 72(1), pp. 37-44. doi: 10.1038/sj.ki.5002242.

Zhang, Yi *et al.* (2020). Exosome: A Review of Its Classification, Isolation Techniques, Storage, Diagnostic and Targeted Therapy Applications. *International Journal of Nanomedicine*, 15, p. 6917. doi: 10.2147/ijn.s264498.

Zhang, Yuping *et al.* (2020). The effect of monotropein on alleviating cisplatin-induced acute kidney injury by inhibiting oxidative damage, inflammation and apoptosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 129, p. 110408. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110408.

Zhou, H. *et al.* (2006). Exosomal Fetuin-A identified by proteomics: a novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury. *Kidney international*, 70(10), pp. 1847-57. doi: 10.1038/sj.ki.5001874.

Zhou, H. *et al.* (2008). Urinary exosomal transcription factors, a new class of biomarkers for renal disease. *Kidney international*, 74(5), p. 613. doi: 10.1038/ki.2008.206.

Zhu, Y. *et al.* (2018). Nanoproteomics comes of age. *Expert review of proteomics*, 15(11), p. 865. doi: 10.1080/14789450.2018.1537787.

Zuk, A. *et al.* (1998). Polarity, integrin, and extracellular matrix dynamics in the postischemic rat kidney. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 275(3), pp.711-31. doi: 10.1152/ajpcell.1998.275.3.c711.

Zuk, A., Bonventre, J. V. y Matlin, K. S. (2001). Expression of fibronectin splice variants

in the postischemic rat kidney», *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 280(6 49-6), pp. 1037-1053. doi: 10.1152/ajprenal.2001.280.6.F1037.

Zúñiga, J. M. y Muriana, J. M. O. (2016). Ciencia y tecnología en experimentación y protección animal. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=697765>.

Zymantiene, J. *et al.* (2015). Influence of metabolic cage on wistar rat physiological state. *Original Scientific Article*. doi: 10.1515/macvetrev-2015-0062.

ANEXOS

Urinary Plasminogen Activator Inhibitor-1: A Biomarker of Acute Tubular Injury

María Paniagua-Sancho^{a, b, c} Yaremi Quiros^{a, c, d} Alfredo G. Casanova^{a, b, c}
Víctor Blanco-Goza^{a, b, c} Consuelo Agüeros-Blanco^e
Adalberto Benito-Hernández^e María A. Ramos-Barron^e
Carlos Gómez-Alamillo^e Manuel Arias^e Sandra M. Sancho-Martínez^{a, b, c, f, g}
Francisco J. López-Hernández^{a, b, c, d, f, g}

^aInstitute of Biomedical Research of Salamanca (IBSAL), Salamanca, Spain; ^bDepartment of Physiology and Pharmacology, University of Salamanca, Salamanca, Spain; ^cGroup of Translational Research on Renal and Cardiovascular Diseases (TRECARD), Salamanca, Spain; ^dInstituto de Estudios de Ciencias de la Salud de Castilla y León (IECSCYL), Soria, Spain; ^eDepartment of Nephrology, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Instituto de Investigación Sanitaria Valdecilla (IDIVAL), Santander, Spain; ^fGroup of Biomedical Research on Critical Care (BioCritic), Valladolid, Spain; ^gSpanish Renal Research Network (REDinREN), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

Keywords

Acute kidney injury · Acute tubular necrosis · PAI-1 · Urinary biomarker · Tubular injury

Abstract

Introduction: Acute kidney injury (AKI) is a threatening, multi-aetiological syndrome encompassing a variety of forms and damage patterns. AKI lacks sufficiently specific diagnostic tools to evaluate the distinct combination of pathophysiological events underlying each case, which limits personalized and optimized handling. Therefore, a pathophysiological diagnosis based on new urinary biomarkers is sought for practical (readiness and noninvasiveness) and conceptual reasons, as the urine is a direct product of the kidneys. However, biomarkers found in the urine may also have extrarenal origin, thus conveying pathophysiological information from other organs or tissues. Urinary plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) has been associated to

AKI, although its origin and traffic to the urine are not known. **Methods:** Herein, we studied the blood or renal origin of urinary PAI-1 (uPAI-1) in experimental AKI in Wistar rats, by means of the in situ renal perfusion method. For this purpose, urine was collected while the kidneys of rats with AKI showing increased uPAI-1 excretion, and controls, were in situ perfused with a saline solution. **Results:** Our results show that during perfusion, PAI-1 remained in the urine of AKI rats, suggesting that renal cells shed this protein directly to the urine. PAI-1 is also significantly increased in the urine of AKI patients. Its low correlation with other urinary markers such as NGAL or NAG suggests that PAI-1 provides complementary and distinct phenotypical information. **Conclusion:** In conclusion, uPAI-1 is a biomarker produced by damaged kidneys following AKI, whose precise pathophysiological meaning in AKI needs to be further investigated.

© 2021 S. Karger AG, Basel

María Paniagua-Sancho and Yaremi Quiros share first authorship.

Introduction

Acute kidney injury (AKI) involves a sudden loss of renal excretory function and is defined according to internationally recognized scales on increments in plasma creatinine concentration (Cr_{pl}) or reductions in urinary output [1]. In many cases, after an AKI episode renal function returns apparently to normal parameters in a few days. However, in other cases, renal function and renal tissue structure undergo a variety of deleterious consequences, ranging from delayed recovery to the need of renal replacement therapy (i.e., dialysis) for life, or even death [2]. Worst scenarios are frequently observed among critically ill patients and in the context of intensive medicine [2]. In all cases, including mild and reversible, and even sub-clinical episodes, increased morbidity and mortality and incidence of chronic kidney disease are observed after AKI [2]. Prognosis of AKI is still difficult to estimate, beyond the assumption that milder cases tend to show a better prognosis, and that prerenal (i.e., hemodynamic) AKI is associated with milder outcomes than intrinsic AKI, such as acute tubular injury (ATI), formerly known as acute tubular necrosis [3, 4]. Thus, a precise pathophysiological diagnosis is necessary to study and then associate specific injury patterns to specific outcomes [5].

Attainment of this unmet need is limited by the lack of aetiopathological biomarkers, whose elevations (or decrements) in bodily samples be known to derive from concrete pathophysiological events. In this sense, the gold standard biomarker (i.e., Cr_{pl}) increases irrespective of cause or underlying process. Last generation markers erupting into the clinical practice, such as neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), kidney injury molecule 1 (KIM-1), tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP-2), and insulin-like growth factor-binding protein 7 (IGFBP7), incorporate some degree of specificity and sensitivity to AKI diagnosis beyond Cr_{pl} [6–8]. Most, if not all of these markers have been long believed to be produced by damaged kidneys (i.e., by tubular epithelial cells) and directly shed to the urine, where they serve as biomarkers of tubular damage. However, this concept has been questioned recently. It has been shown that the increased urinary level of NGAL [9, 10] and TIMP-2 and IGFBP7 [11] is not the result of direct shedding from tubule cells, but of reduced tubular reclamation of the filtered proteins. These findings might modify the pathophysiological and diagnostic meaning of these biomarkers.

New markers, with distinct biological meaning or sensitivity for individual biological processes, are thus needed to build fingerprints of aetiopathological varieties of

AKI, which can be used for pathophysiological diagnosis and thereof associated to distinctive prognosis. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) is an endogenous inhibitor of thrombolysis with pro-coagulant properties. Tissue and plasma levels of PAI-1 increase in coagulation, fibrotic and inflammatory disorders [12]. We previously reported abnormally elevated levels of PAI-1 in the urine of rats undergoing nephrotoxic AKI [13, 14]. However, its role in this type of AKI and, more specifically, the meaning of urinary PAI-1 (uPAI-1) in AKI diagnosis has not been thoroughly explored. In this article, we studied the urinary excretion of uPAI-1 in diverse animal models and patients of AKI, and deepened on its origin and traffic, with the aim of further understanding its diagnostic significance and utility.

Materials and Methods

Reagents were purchased from Sigma (Madrid, Spain), except where otherwise indicated.

Animal Models and Experimental Protocols

All procedures were approved by the Bioethics Committee of the University of Salamanca. Animals were handled according to the guidelines of the European Community Council Directive 2010/63/UE, and to the current Spanish legislation for experimental animal use and care, RD 53/2013. Three rat models of ATI, a most common form of intrinsic AKI, were used to study uPAI-1 excretion under typical aetiopathological scenarios involving ischemic and nephrotoxic acute renal damage. Wistar rats (220–240 g) were housed under controlled experimental conditions and allowed free access to regular chow and water. Rats were divided into 5 groups ($n = 6$ per group): (1) control group (Control), saline solution; (2) ischemia-reperfusion group (I/R), 1 h of warm renal ischemia plus contralateral nephrectomy; (3) gentamicin group (G), receiving gentamicin i.p. (150 mg/kg per day) for 6 days; (4) cisplatin group (CDDP), a single i.p. administration of 5 mg/kg cisplatin.

At specific time points, rats were allocated in metabolic cages to obtain 24-h, individual urine samples. Blood was drawn with a needle from the tail vein, and plasma was obtained by centrifugation and, at the end of the treatments, kidneys were perfused with heparinized saline and immediately dissected. Half of the kidney was fixed in paraformaldehyde for histological studies, and the rest was frozen at -80°C for biochemical analysis.

Urinary Excretion Studies with in situ Perfused Kidneys

At the end of the experimental protocol or treatment (i.e., day 1 in the I/R group; day 6 in the G group; and day 4 in the CDDP group), some rats were anesthetized (50 mg/kg sodium pentobarbital) and an extracorporeal circuit for kidney perfusion was set up, as described elsewhere [9]. Briefly, the renal artery, vein, and ureter of the right kidney were ligated. The renal artery and vein of the left kidney and the urinary bladder were cannulated. Oxygenated and warm (37°C) Krebs-dextran (40 g/L dextran [molecular weight 64k–76k] in Krebs solution [120 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.8 mM CaCl_2 ,

1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 0.026 mM EDTA, 11.1 glucose, pH = 7.4) was perfused through the renal artery at 3 mL/min. The effluent from the renal vein was collected during 60 min of perfusion or was discarded. Urine fractions were collected (every 20 min) from a catheter placed in the urinary bladder, starting 20 min before the perfusion with Krebs (when blood was still passing through the kidney), and during 60 min after perfusion with Krebs started.

Renal Function

Renal function was monitored by means of Cr_{pl} and urea and urinary protein concentration. Cr_{pl} and urea were determined with commercial colorimetric kits (Quantichrom Creatinine and Quantichrom Urea Assay Kits; BioAssay Systems, Hayward, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Proteinuria was determined with a commercial kit (Bio-Rad, Madrid, Spain) based in the Lowry method.

Renal Histopathology

Paraformaldehyde-fixed rat tissue samples were immersed in paraffin, cut into 2 μm-thick slices, and stained with hematoxylin and eosin. Renal specimens were then photographed under an Olympus BX51 microscope connected to an Olympus DP70 color, digital camera (Olympus, Madrid, Spain).

Patients and Clinical Protocol

Urine samples were collected from 72 volunteers from the Nephrology Department (Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spain), who provided written consent: 63 consultation patients referred to Nephrology had AKI at admission; and 9 controls. All protocols were approved by the local Ethics Committee and were conducted according to the principles established in the Declaration of Helsinki (World Medical Assembly), the Council of Europe Convention on Human Rights and Biomedicine, the UNESCO Universal Declaration on the Human Genome and Human Rights, the requirements established in the Spanish legislation in the field of biomedical research, personal data protection and bioethics; as well as the provisions of the Law 14/2007, of July 3, of Biomedical Research; and RD 53/2013, of February 1. Renal function and diagnosis data were obtained from the patients' medical records. Renal function was monitored by means of Cr_{pl} and AKI was defined and classified according to Kidney Disease: Improving Global Outcomes criteria [15]. Urine was collected upon admission to the Nephrology Department and was used to measure protein content (with a commercial kit from Bio-Rad, Madrid, Spain), N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG; with a commercial kit DZ062A-K from Diazyme Laboratories, Poway, CA, USA), PAI-1, and NGAL (as described below).

Western Blot

A volume of urine (μL) from each rat corresponding to the same excretion fraction (i.e., same % of their daily urinary output) was separated by acrylamide electrophoresis. Proteins were transferred to an Immobilon-P Transfer Membrane (Millipore, Madrid, Spain) and incubated with primary antibodies against PAI-1 (BD Transduction Laboratories, CA, USA), followed by horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies and chemiluminescent detection (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate kit; Millipore, Madrid, Spain) with the ChemiDoc™MP Imaging System (Bio-Rad, Madrid, Spain).

ELISA

PAI-1 and NGAL were measured in human samples with the following commercial ELISAs: Human PAI-1 RAB0429 (Merck Life Science, Madrid, Spain) and Human NGAL ELISA Kit 036CE (BioPorto Diagnostics, Hellerup, Denmark) respectively, following the manufacturer's instructions.

Statistical Analysis

Data are represented as the mean ± SEM of *n* experiments, as indicated in each case. Animal's and patients' data normality was checked with the Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Smirnov tests, respectively. Animal's non-parametric data were compared using Friedman test followed by the Dunn's post hoc test. For data with a normal distribution (animal's and patients'), a student *t* test or a one-way ANOVA was used (Bonferroni post hoc tests were used for multiple comparisons). The GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) and the IBM SPSS Statistics 20 (IBM, Armonk, NY, USA) software were used. A *p* value <0.05 was considered statistically significant.

Results

PAI-1 Urinary Excretion Is Increased in Experimental Models of Acute Tubular Necrosis

The 3 AKI models used in this study (i.e., cisplatin and gentamicin nephrotoxicity and I/R injury) showed typical characteristics of intrinsic AKI, congruently with other studies carried out by us [2, 9, 16] and others with these models. In all cases, rats showed increased Cr_{pl} and urea concentrations and proteinuria compared to the controls (Fig. 1), and clear histological evidence of tubular necrosis (Fig. 2). Typical features of ATI, such as epithelial cell desquamation, tubular dilation, tubular necrosis, tubular obstruction, and infiltration, were detected mainly in the outer medulla of I/R and cisplatin rats, and in the cortex of gentamicin rats. In the 3 models, the level of PAI-1 increased, nearly in association with the progression and the extent of renal damage, in the urine, and in the renal tissue, as revealed by the tissue level of the PAI-1 protein and gene expression. However, PAI-1 was not increased in the plasma from the AKI models (Fig. 3).

PAI-1 Is Produced by Damaged Kidneys and Secreted to the Urine Following AKI

We next investigated the origin of uPAI-1. Specifically, we aimed at unraveling whether the PAI-1 was shed directly to the urine by renal cells, or it was filtered from the blood and not reabsorbed in the tubules. This is relevant from a diagnostic perspective, as the pathophysiological interpretation may vary with the source and mechanism leading to its increased urinary excretion. For this purpose, we used an in situ renal perfusion method that we had

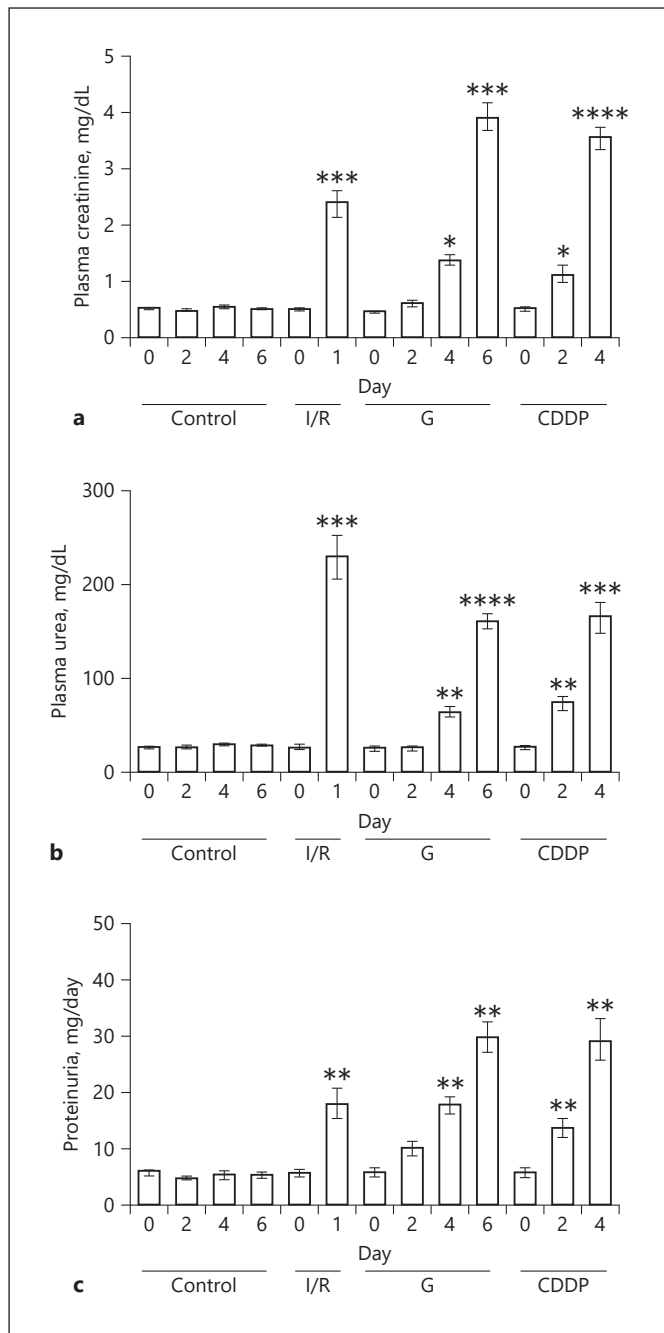


Fig. 1. Renal function assessment of the experimental models of AKI. **a** Plasma creatinine concentration; **b** plasma urea concentration; and **c** proteinuria. Data ($n = 6$ per group) are expressed as the mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$ versus day 0 (basal) in the same group. Control, I/R, G, and CDDP. I/R, ischemia/reperfusion; G, gentamicin; CDDP, cisplatin.

previously used to study the origin of other biomarkers [2, 9, 13]. When the kidneys of control and AKI (induced by I/R) rats were perfused with a saline isotonic solution,

PAI-1 did not disappear from the urine of AKI rats (Fig. 4), as expected of a protein yielded directly to the urine by renal cells. Should PAI-1 have disappeared from the urine during perfusion, we would have concluded that it had a blood-born origin. It is concluded that because PAI-1 remained in the urine of AKI rats during perfusion, renal cells must have shed this protein directly to the urine. As a technical control, before perfusion with Krebs, the kidneys were perfused with blood from the same animal, by shunting a carotid artery with the renal artery by means of a catheter. In those circumstances, PAI-1 was still excreted with the urine in AKI rats, and not in controls (Fig. 4). We further investigated whether PAI-1 was also shed to the circulation from renal cells in AKI rats. As shown in Figure 4, the renal vein eluent of kidneys perfused with Krebs from AKI rats is not different from that in controls.

uPAI-1 Increases in AKI Patients

We analyzed the urinary excretion of PAI-1 in patients with AKI. Results are shown as urinary concentration and also normalized to urinary creatinine or proteinuria. Urinary creatinine is a controversial but frequently used normalizing parameter [17]. Normalization by proteinuria suggests that PAI-1 excretion is not a general consequence of indiscriminate protein loss, but the reflection of a more specific phenomenon. In all cases, uPAI-1 is very low in controls. However, in AKI patients PAI-1 is markedly and statistically elevated (Fig. 5). As shown in Table 1, statistically significant but low correlations were found between the uPAI-1 and those of NGAL and NAG, which suggests that the pathophysiological meaning conveyed by PAI-1 is not redundant, but complementary, to the meaning of NGAL and NAG. Graphical depictions of these correlations are shown in online supplementary Fig. 1 (for all online suppl. material, see www.karger.com/doi/10.1159/000518455).

Discussion

The serine protease inhibitor (serpin) PAI-1 is the main inhibitor of tissue plasminogen activator and urokinase, the activators of plasminogen. Traditionally, the physiological and pathophysiological role of PAI-1 has been critically associated to the regulation of thrombolysis and hemostasis, as an inhibitor of fibrinolysis [18, 19], and its deficiency leads to hemorrhagic diathesis. PAI-1 is produced mainly by endothelial cells, but also by adipose tissue [20, 21]. Various diseases, such as cancer, obesity, and the metabolic syndrome are related to higher levels of PAI-1,

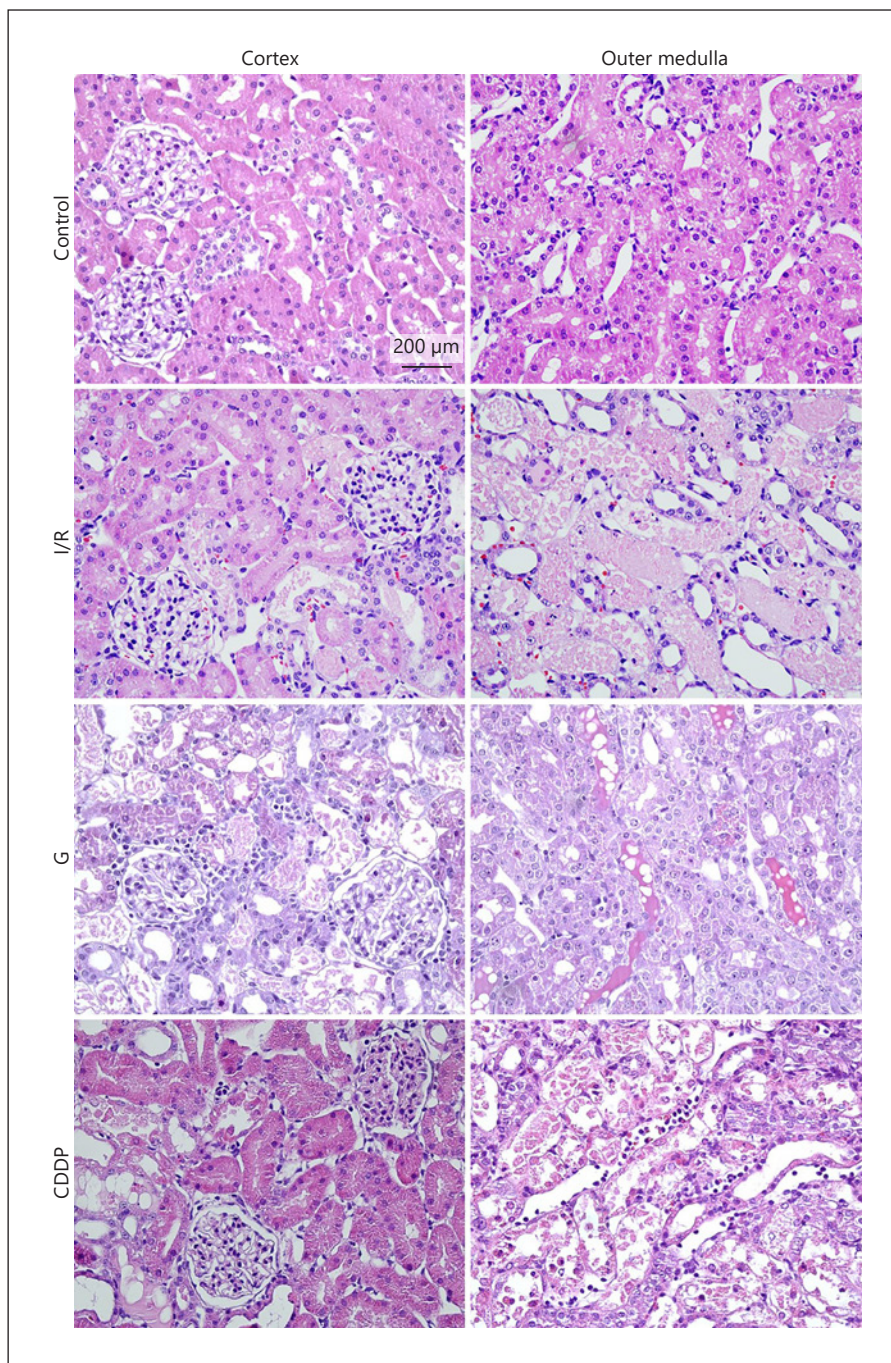


Fig. 2. Histological characterization of the experimental models of AKI. Representative images of the cortex and outer medullary area ($\times 400$) from kidney specimens ($n = 6$ per group) stained with hematoxylin and eosin from Control, I/R, G, and CDDP rats. Control rats show normal renal parenchyma (with intact tubules and glomeruli), whereas overt tubular necrosis is observed in the 3 models of AKI. Widespread evidence of tubular desepithelization (black arrows) and luminal tissue debris accumulation (asterisks) is seen most in the outer medullary region of the I/R and cisplatin models, and in the cortex of the G model. I/R, ischemia/reperfusion; G, gentamicin; CDDP, cisplatin.

and increased thrombosis has been linked to these states [22]. PAI-1 also participates in the inflammatory process and has been found increased in damaged and inflamed tissues [23]. In the kidneys (and other organs), PAI-1 is a pro-fibrotic factor [24, 25] that inhibits plasmin formation, increases transforming growth factor β expression, and stimulates fibroblasts and macrophage infiltration [26, 27]. Conversely,

pharmacological inhibition of PAI-1 ameliorates fibrosis [28]. Specifically, PAI-1 plays an important role in renal fibrosis and progression of chronic kidney disease [26, 29, 30]. Of note, in disease states including fibrosis, tissue, and plasma levels of PAI-1 increase [29, 31], and uPAI-1 also increases in specific conditions such as overt diabetic nephropathy [32] and active lupus nephritis [33].

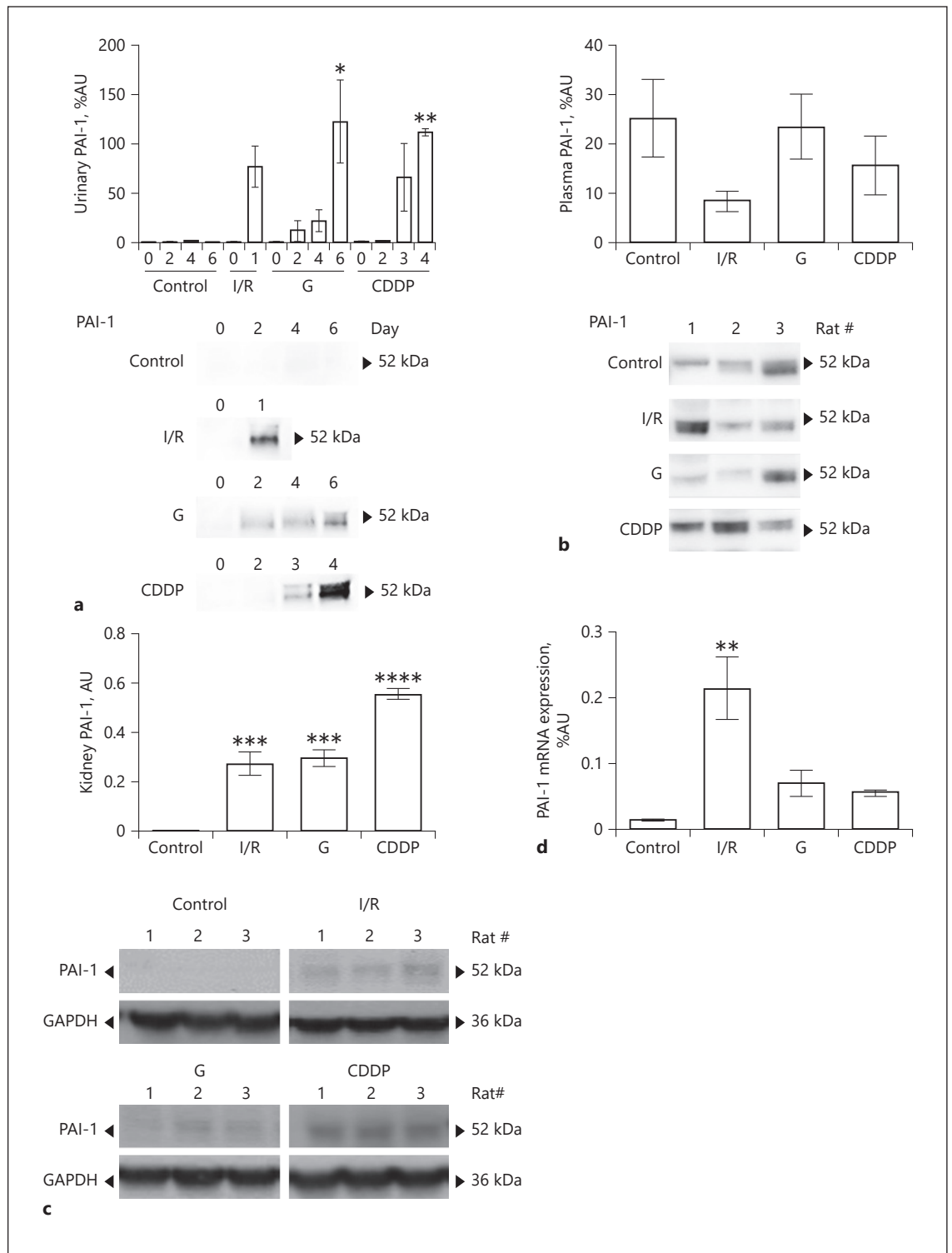


Fig. 3. PAI-1 was produced by the kidneys and increases in the urine during AKI. **a** Evolution of uPAI-1 levels. **b** Plasma PAI-1 levels at the end of the protocol. **c** Renal tissue PAI-1 levels. **d** PAI-1 renal gene expression. Data ($n = 3$ per group) are expressed as the mean \pm SEM. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ versus day 0 (basal) in the same group. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$ versus the control. Control, I/R, G, and CDDP. I/R, ischemia/reperfusion; G, gentamicin; CDDP, cisplatin; uPAI-1, urinary PAI-1.

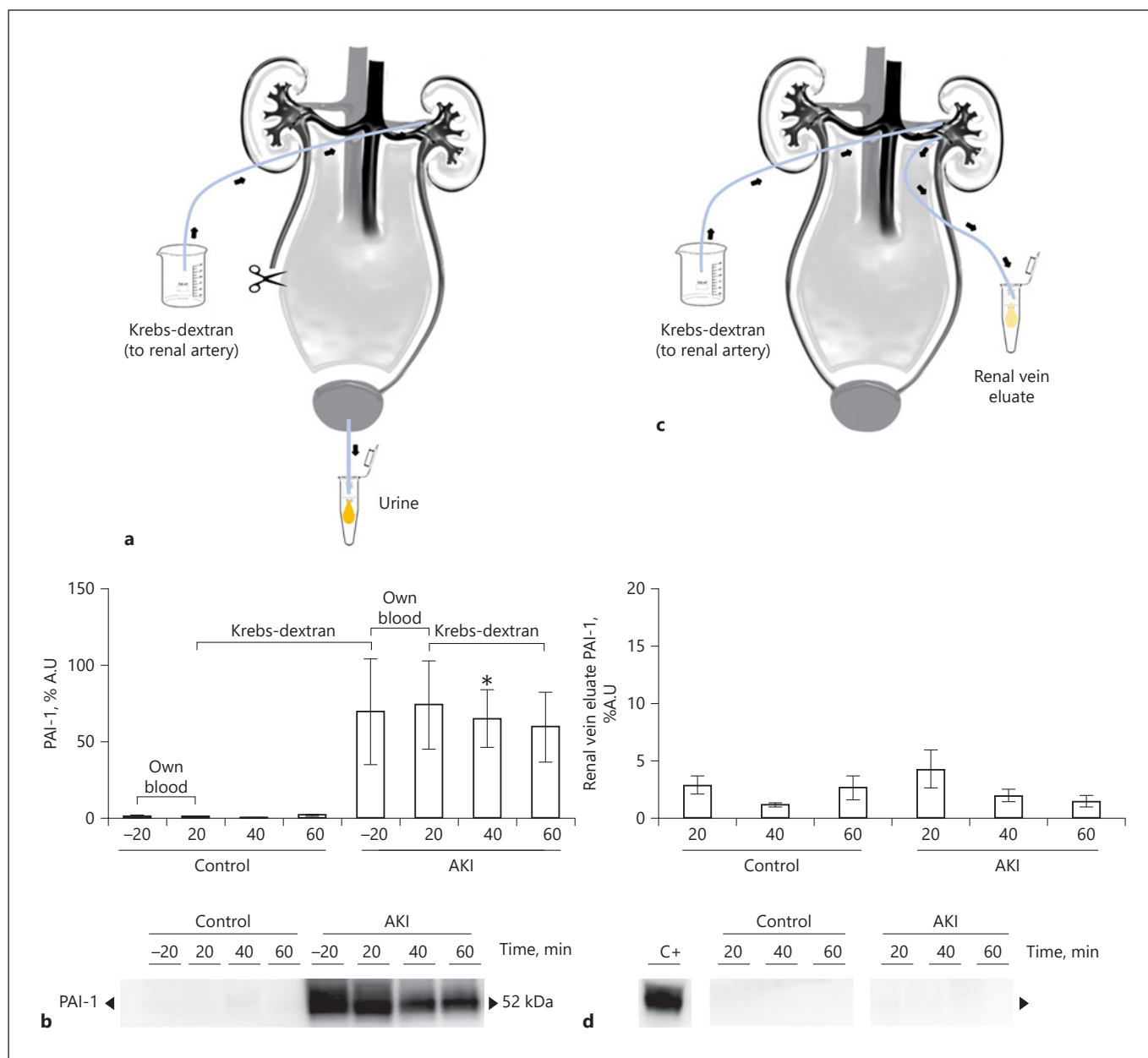


Fig. 4. PAI-1 was shed directly to the urine from renal cells. **a** Schematic representation of the experimental setup involving in situ kidney perfusion with Krebs-dextran solution or blood from the carotid artery, and urine collection from the bladder. **b** Representative image of Western blot analysis of uPAI-1 excretion during the 60-min perfusion with Krebs-dextran or own blood from the carotid artery (lower panel). Quantification of uPAI-1 excretion (upper panel). **c** Schematic representation of the experimental

setup involving in situ kidney perfusion with Krebs-dextran solution, and effluent collection from the renal vein (upper panel). **d** Representative image of Western blot analysis of uPAI-1 in the vein effluent during the 60-min perfusion with Krebs-dextran (lower panel). Quantification of PAI-1 in the effluent from the renal vein (upper panel). Data ($n = 3$ per group) are expressed as the mean \pm SEM. AU, arbitrary units. AKI, acute kidney injury; uPAI-1, urinary PAI-1.

PAI-1 has also been linked to AKI. PAI-1 participates in septic AKI [34] (a condition with an important inflammatory component [35]) and also in renal thrombotic microangi-

opathies [36]. Plasma PAI-1 is increased in AKI patients in the context of acute lung injury [37], and in human lung transplantation-related AKI [38], which has been related

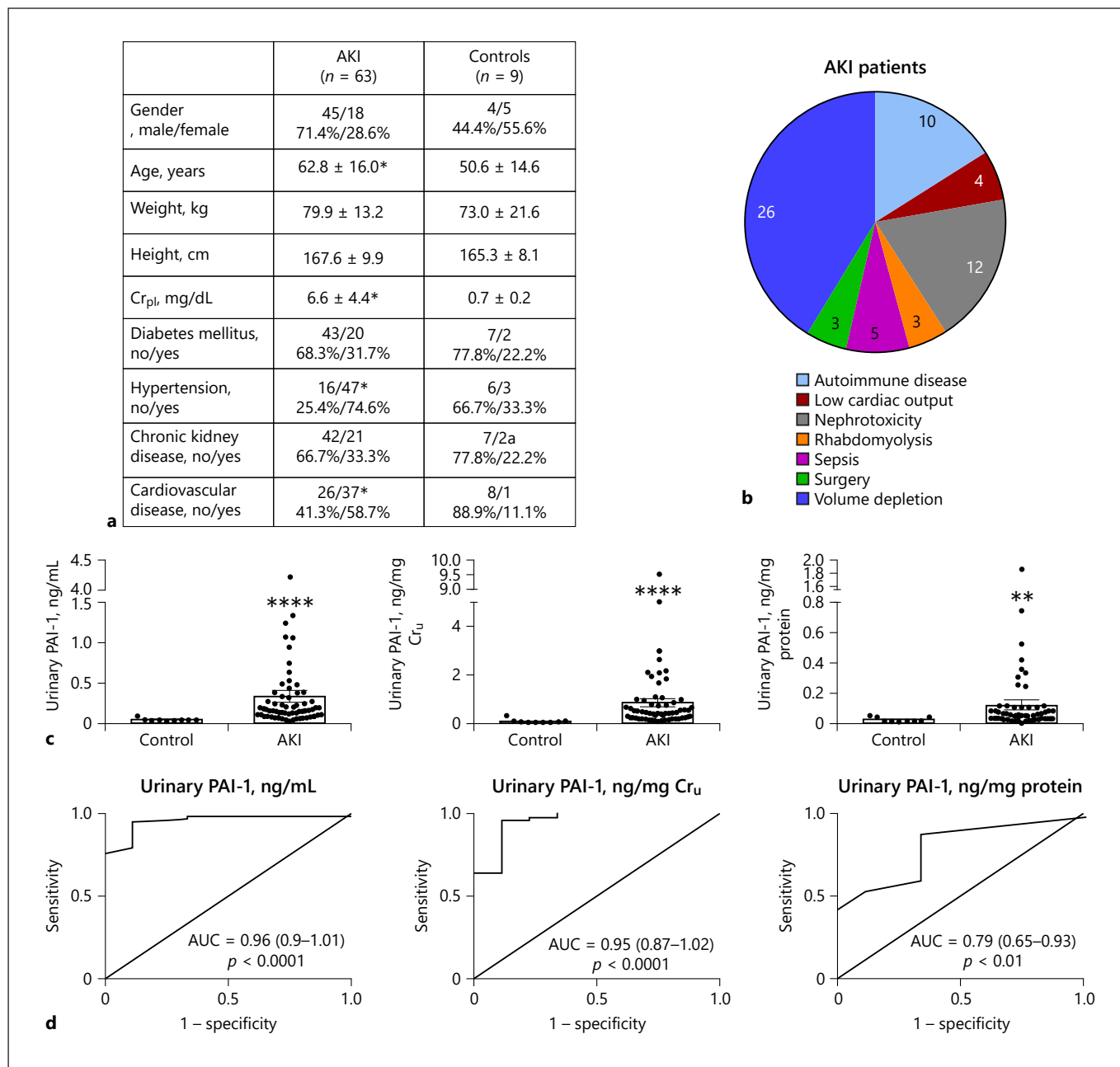


Fig. 5. uPAI-1 was increased in AKI patients. Patient characteristics (**a**) and AKI etiologies (**b**). **c** Urinary levels of PAI-1 in AKI patients and controls showing the mean ± SEM of $n = 9$ controls, and $n = 63$ AKI patients. The left panel shows urinary concentration of PAI-1, whereas in the central and right panels PAI-1 concentration is normalized to urinary creatinine concentration, and to proteinuria, respectively. **d** ROC curves on the capacity of uPAI-

1 (left panel), uPAI-1 normalized to urinary creatinine (central panel), and uPAI-1 normalized to proteinuria (right panel). * $p < 0.05$ versus control, ** $p < 0.01$ versus control, and **** $p < 0.0001$ versus control. AUC, area under the curve; Cr_{pl}, plasma creatinine concentration; Cr_u, urinary creatinine concentration; AKI, acute kidney injury; ROC, receiver operating characteristic; uPAI-1, urinary PAI-1.

to renal microvascular injury [38, 39]. PAI-1 is also increased in the urine of rats following toxic AKI induced by gentamicin [13] and iodinated contrast media [14]. Our

present results show that in 3 etiologically different models of ATI (i.e., gentamicin and cisplatin nephrotoxicity and ischemic injury), PAI-1 is overexpressed in the kidneys and

Table 1. Results of the correlation analysis of uPAI-1 and other biomarkers of kidney injury

	Cr _p , mg/dL	Proteinuria, mg/mL	uNGAL, ng/mL	uNAG, IU/mL
uPAI-1, ng/mL	0.116	0.094	0.309*	0.199
	Cr _p , mg/dL	proteinuria, mg/mg Cr _u	uNGAL, ng/mg Cr _u	uNAG, IU/mg Cr _u
uPAI-1, ng/mg Cr _u	0.154	0.309*	0.426***	0.374**
	Cr _p , mg/dL		uNGAL, ng/mg protein	uNAG, IU/mg protein
uPAI-1, ng/mg protein	0.154		0.378**	0.363**

In the upper panel, the study was carried out with raw data from urinary biomarkers. In the central panel, urinary biomarkers were normalized to urinary creatinine concentration (Cr_u). In the lower panel, biomarkers were normalized to proteinuria. Data are expressed as Spearman's correlation coefficient (ρ). Cr_p, plasma creatinine concentration; Prot, proteinuria; Cr_u, urinary creatinine concentration; IU, international units; uNAG, urinary NAG activity; uNGAL, urinary NGAL concentration; uPAI-1, urinary PAI-1. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$.

its urinary excretion is increased. In these ATI models, as in those reported in [13, 14], inflammation amplifies tubular damage and contributes to reducing glomerular filtration rate [40–42], the hallmark alterations of acute tubular disease. It is thus possible (and likely) that PAI-1 be involved in these inflammatory responses.

Pathological coagulation might also explain PAI-1 participation in toxic and ischemic AKI. Renal pro-coagulation events have been reported for these types of AKI, including endothelial dysfunction [43, 44], expression of adhesion molecules in platelets [45] and endothelial cells [43], and fibrin deposition in the vascular lumen, the glomerulus, Bowman's capsule and interstitium [46, 47]. In agreement, anticoagulation reduces tubular obstruction, probably by preventing conversion of filtered fibrinogen into fibrin [47, 48]. These pro-coagulant events do not seem to lead to full thrombotic processes, but rather to microvascular congestion [43, 44] resulting from blood cells and platelet aggregation to the endothelium [43, 49]. Endothelial dysfunction also enables white cell infiltration, diapedesis, vascular hyper-permeability, and inflammation [50]. In turn, inflammation contracts renal vessels, reduces renal blood flow and glomerular filtration rate [40, 41], and recruits pro-inflammatory and pro-coagulant endothelial signaling [51], which closes a vicious feedback cycle between inflammation, endothelial dysfunction, reduced renal flow, and glomerular filtration rate.

Our results also indicate that, in our ischemic ATI model, PAI-1 may be elevated in the urine by direct secretion from renal cells. Hypothetically, this secretion may be the consequence of the pro-coagulation and inflammatory scenario described above. Thus, PAI-1 is one of the few biomarkers, along with tail-less complex polypeptide-1 ϵ subunit (TCP1- ϵ) [2, 52], for which direct shedding from renal cells has been experimentally supported, in association with AKI. In fact, it has been generally assumed that other biomarkers increased in the renal tissue and urine following AKI, were directly shed to the urine from damaged renal structures. However, recent studies have shown differently, as described above for NGAL, TIMP-2, and IGFBP. Accordingly, uPAI-1 might be a direct pathophysiological indicator of renal inflammatory status. Although the diagnostic information conveyed by uPAI-1 needs to be further explored, this marker provides differential and additive diagnostic value.

The established knowledge indicates that PAI-1 might not be a general parenchymal damage level reporter, but a biomarker of a more specific pathological event, such as endothelium-mediated inflammatory damage. In agreement, inflammation is an important pathogenetic factor in AKI [40, 41, 51, 53]. Interestingly, the low correlation found with the level of NGAL and NAG implies that the type of damage or pathophysiological events causing NGAL and NAG excretion in these patients is different from the damage leading to the excretion of PAI-1. This level of biomarker specificity is needed for the sought

pathophysiological diagnosis of AKI, and for prognosis estimation based on the underlying individual damage pattern [2, 5]. Increasing knowledge of pathophysiological granularity provided by biomarker-based liquid autopsies should thus allow a more precise patient stratification and diagnosis, irrespective of etiology. The challenge for the immediate future is to identify the specific damage patterns, or pathological mechanisms etiologically associated to each biomarker.

Conclusions

In this article, we further characterize PAI-1, a regulator of coagulation, as a urinary biomarker of AKI, hitherto vaguely associated to this syndrome. Most importantly, we show that the PAI-1 detected in the urine following AKI is produced by damaged kidneys and shed directly to the urine. uPAI-1 is thus a direct probe of a specific pathological event of renal injury, which needs to be further explored. uPAI-1 is one of the few AKI biomarkers with substantiated renal origin, and thus a potentially valuable tool for a prospective pathophysiological diagnostic panel.

Statement of Ethics

All clinical protocols were approved by the Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander, Spain) Ethics Committee and were conducted according to the principles established in the Declaration of Helsinki (World Medical Assembly), the Council of Europe Convention on Human Rights and Biomedicine, the UNESCO Universal Declaration on the Human Genome and Human Rights, the requirements established in the Spanish legislation in the field of biomedical research, personal data protection and

bioethics; as well as the provisions of the Law 14/2007, of July 3, of Biomedical Research; and RD 53/2013, of February 1. Volunteer patients provided written consent. All procedures involving experimental animals were approved by the Bioethics Committee of the University of Salamanca. Animals were handled according to the guidelines of the European Community Council Directive 2010/63/UE and to the current Spanish legislation for experimental animal use and care, RD 53/2013.

Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no competing interests.

Funding Sources

This study was supported by Grants from the Instituto de Salud Carlos III (DT15S/00166, PI10-00624, PI15/01055, PI18/00996 and Retic RD016/0009/0025, REDINREN), and FEDER funds.

Author Contributions

M.P.-S., Y.Q., A.G.C., V.B.-G., and S.M.S.-N. carried out the experiments with animal models and the biochemical studies. C.A.-B., A.B.-H., M.A.R.-B., C.G.-A., and M.A.R.-B. designed and conducted the clinical study. A.G.C., M.P.-S., and S.M.S.-M. performed statistical data analysis and plotted the graphics. S.M.S.-M. and F.J.L.-H. designed and coordinated the overall study. F.J.L.-H. drafted the document.

Data Availability Statement

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

References

- 1 Thomas ME, Blaine C, Dawnay A, Devonald MA, Ftouh S, Laing C, et al. The definition of acute kidney injury and its use in practice. *Kidney Int.* 2015;87:62–73.
- 2 Sancho-Martínez SM, Sánchez-Juanes F, Blanco-Gozalo V, Fontecha-Barriuso M, Prieto-García L, Fuentes-Calvo I, et al. Urinary TCP1-eta: a cortical damage marker for the pathophysiological diagnosis and prognosis of acute kidney injury. *Toxicol Sci.* 2020 Mar 1;174(1):3–5.
- 3 Belayev LY, Palevsky PM. The link between acute kidney injury and chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2014;23:149–54.
- 4 Canaud G, Bonventre JV. Cell cycle arrest and the evolution of chronic kidney disease from acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant.* 2015 Apr [cited 2020 Feb 4];30(4):575–83.
- 5 Moledina DG, Parikh CR. Phenotyping of acute kidney injury: beyond serum creatinine. *Semin Nephrol.* 2018;38:3–11.
- 6 Kellum JA, Chawla LS. Cell-cycle arrest and acute kidney injury: the light and the dark sides. *Nephrol Dial Transplant.* 2016;31(1):16–22.
- 7 Ronco C. Acute kidney injury: from clinical to molecular diagnosis. *Crit Care.* 2016;20(1):201.
- 8 Ronco C, Kellum JA, Haase M. Subclinical AKI is still AKI. *Crit Care.* 2012 Jun 21 [cited 2020 Feb 4];16(3):313.
- 9 Sancho-Martínez SM, Blanco-Gozalo V, Quiros Y, Prieto-García L, Montero-Gómez MJ, Docherty NG, et al. Impaired tubular reabsorption is the main mechanism explaining increases in urinary NGAL excretion following acute kidney injury in rats. *Toxicol Sci.* 2020 May 1;175(1):75–86.
- 10 Skrypnik NI, Gist KM, Okamura K, Montford JR, You Z, Yang H, et al. IL-6-mediated hepatocyte production is the primary source of plasma and urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin during acute kidney injury. *Kidney Int.* 2020 May 1;97(5):966–79.
- 11 Johnson ACM, Zager RA. Mechanisms underlying increased TIMP2 and IGFBP7 urinary excretion in experimental AKI. *J Am Soc Nephrol.* 2018 Aug 1;29(8):2157–67.
- 12 Iwaki T, Urano T, Umemura K. PAI-1, progress in understanding the clinical problem and its aetiology. *Br J Haematol.* 2012 [cited 2020 Oct 12];157:291–8.

- 13 Quiros Y, Ferreira L, Sancho-Martínez SM, González-Buitrago JM, López-Novoa JM, López-Hernández FJ. Sub-nephrotoxic doses of gentamicin predispose animals to developing acute kidney injury and to excrete ganglioside M2 activator protein. *Kidney Int.* 2010 Nov;78(10):1006–15.
- 14 Quiros Y, Sánchez-González PD, López-Hernández FJ, Morales AI, López-Novoa JM. Cardiostrophin-1 administration prevents the renal toxicity of iodinated contrast media in rats. *Toxicol Sci.* 2013 Apr;132(2):493–501.
- 15 Khwaja A. KDIGO clinical practice guidelines for acute kidney injury. *Nephron Clin Pract.* 2012;120:c179–84.
- 16 Casanova AG, Vicente-Vicente L, Hernández-Sánchez MT, Prieto M, Rihuete MI, Ramis LM, et al. Urinary transferrin pre-emptively identifies the risk of renal damage posed by subclinical tubular alterations. *Biomed Pharmacother.* 2020 Jan 1 [cited 2020 Feb 16];121:109684.
- 17 Waikar SS, Sabbiseti VS, Bonventre JV. Normalization of urinary biomarkers to creatinine during changes in glomerular filtration rate. *Kidney Int.* 2010;78(5):486–94.
- 18 Iwaki T, Urano T, Umemura K. PAI-1, progress in understanding the clinical problem and its aetiology. *Br J Haematol.* 2012;157:291–8.
- 19 Yasar Yildiz S, Kuru P, Toksoy Oner E, Agirbasli M. Functional stability of plasminogen activator inhibitor-1. *ScientificWorldJournal.* 2014;2014:1.
- 20 Schäfer K, Konstantinides S. Adipokines and thrombosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2011 Dec;38(12):864–71.
- 21 Kaji H. Adipose tissue-derived plasminogen activator inhibitor-1 function and regulation. *Compr Physiol.* 2016 Oct 1;6(4):1873–96.
- 22 Wood PA. Connecting the dots: obesity, fatty acids and cancer. *Lab Invest.* 2009;89:1192–4.
- 23 Renckens R, Roelofs JJ, De Waard V, Florquin S, Lijnen HR, Carmeliet P, et al. The role of plasminogen activator inhibitor type 1 in the inflammatory response to local tissue injury. *J Thromb Haemost.* 2005 May [cited 2020 Oct 12];3(5):1018–25.
- 24 Ghosh AK, Vaughan DE. PAI-1 in tissue fibrosis. *J Cell Physiol.* 2012;227:493–507.
- 25 Rabieian R, Boshtam M, Zareei M, Kouhpayeh S, Masoudifar A, Mirzaei H. Plasminogen activator inhibitor type-1 as a regulator of fibrosis. *J Cell Biochem.* 2018 Jan 1;119(1):17–27.
- 26 Huang Y, Noble NA. PAI-1 as a target in kidney disease. *Curr Drug Targets.* 2007 Aug 28;8(9):1007–15.
- 27 Seo JY, Park J, Yu MR, Kim YS, Ha H, Lee HB. Positive feedback loop between plasminogen activator inhibitor-1 and transforming growth factor-beta1 during renal fibrosis in diabetes. *Am J Nephrol.* 2009 Dec;30(6):481–90.
- 28 Jeong BY, Uddin MJ, Park JH, Lee JH, Lee HB, Miyata T, et al. Novel plasminogen activator inhibitor-1 inhibitors prevent diabetic kidney injury in a mouse model. *PLoS One.* 2016 Jun 1;11(6):e0157012.
- 29 Ma LJ, Fogo AB. PAI-1 and kidney fibrosis. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2009 Jan 1;14(6):2028–41.
- 30 Małgorzewicz S, Skrzypczak-Jankun E, Jankun J. Plasminogen activator inhibitor-1 in kidney pathology (review). *Int J Mol Med.* 2013 Mar;31(3):503–10.
- 31 Ha H, Oh EY, Lee HB. The role of plasminogen activator inhibitor 1 in renal and cardiovascular diseases. *Nat Rev Nephrol.* 2009;5:203–11.
- 32 Verhave JC, Bouchard J, Goupil R, Pichette V, Brachemi S, Madore F, et al. Clinical value of inflammatory urinary biomarkers in overt diabetic nephropathy: a prospective study. *Diabetes Res Clin Pract.* 2013 Sep;101(3):333–40.
- 33 Landolt-Marticorena C, Prokopec SD, Morrison S, Noamani B, Bonilla D, Reich H, et al. A discrete cluster of urinary biomarkers discriminates between active systemic lupus erythematosus patients with and without glomerulonephritis. *Arthritis Res Ther.* 2016 Oct 4;18(1):218.
- 34 Gupta KK, Donahue DL, Sandoval-Cooper MJ, Castellino FJ, Ploplis VA. Abrogation of plasminogen activator inhibitor-1-vitronectin interaction ameliorates acute kidney injury in murine endotoxemia. *PLoS One.* 2015 Mar 23 [cited 2020 Oct 12];10(3):e0120728.
- 35 Gomez H, Ince C, De Backer D, Pickkers P, Payen D, Hotchkiss J, et al. A unified theory of sepsis-induced acute kidney injury: Inflammation, microcirculatory dysfunction, bioenergetics, and the tubular cell adaptation to injury. *Shock.* 2014 Jan [cited 2020 Oct 12];41(1):3–11.
- 36 Eddy AA. Plasminogen activator inhibitor-1 and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002 [cited 2020 Oct 12];283:F209–20.
- 37 Liu KD, Glidden DV, Eisner MD, Parsons PE, Ware LB, Wheeler A, et al. Predictive and pathogenetic value of plasma biomarkers for acute kidney injury in patients with acute lung injury. *Crit Care Med.* 2007;35(12):2755.
- 38 Forker CM, Miano TA, Reilly JP, Oyster ML, Porteous MK, Cantu EE, et al. Postreperfusion plasma endothelial activation markers are associated with acute kidney injury after lung transplantation. *Am J Transplant.* 2019 Aug 1;19(8):2366–73.
- 39 Molitoris BA. Therapeutic translation in acute kidney injury: the epithelial/endothelial axis. *J Clin Invest.* 2014 Jun [cited 2020 Feb 3];124(6):2355–63.
- 40 Lopez-Novoa JM, Quiros Y, Vicente L, Morales AI, Lopez-Hernandez FJ. New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view. *Kidney Int.* 2011 Jan [cited 2020 Oct 12];79(1):33–45.
- 41 Sánchez-González PD, López-Hernández FJ, López-Novoa JM, Morales AI. An integrative view of the pathophysiological events leading to cisplatin nephrotoxicity. *Crit Rev Toxicol.* 2011 [cited 2020 Oct 12];41:803–21.
- 42 Sharfuddin AA, Molitoris BA. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol.* 2011 [cited 2020 Oct 12];7:189–200.
- 43 Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17:1503–20.
- 44 Basile DP, Anderson MD, Sutton TA. Pathophysiology of acute kidney injury. *Compr Physiol.* 2012 Apr [cited 2020 Oct 12];2(2):1303–53.
- 45 Singbartl K, Forlow SB, Ley K. Platelet, but not endothelial, P-selectin is critical for neutrophil-mediated acute postischemic renal failure. *FASEB J.* 2001 Nov [cited 2020 Oct 12];15(13):2337–44.
- 46 Loverre A, Ditonno P, Crovace A, Gesualdo L, Ranieri E, Pontrelli P, et al. Ischemia-reperfusion induces glomerular and tubular activation of proinflammatory and antiapoptotic pathways: differential modulation by rapamycin. *J Am Soc Nephrol.* 2004 Oct [cited 2020 Oct 12];15(10):2675–86.
- 47 Enestrom Druid SH, Rammer L. Fibrin deposition in the kidney in post-ischaemic renal damage. *Br J Exp Pathol.* 1988 Jun [cited 2020 Oct 12];69(3):387–94.
- 48 Druid H, Eneström S, Rammer L. Effect of anticoagulation upon nephron obstruction in experimental acute ischaemic renal failure. A morphological study. *Int J Exp Pathol.* 1998 [cited 2020 Oct 12];79(1):55–66.
- 49 Molitoris BA, Sutton TA. Endothelial injury and dysfunction: role in the extension phase of acute renal failure. *Kidney Int.* 2004;66:496–9.
- 50 Ozden A, Sarioglu A, Demirkan NC, Bilgihan A, Düzcan E. Antithrombin III reduces renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Res Exp Med.* 2001;200:195–203.
- 51 Bonventre JV. Pathophysiology of acute kidney injury: roles of potential inhibitors of inflammation. *Contrib Nephrol.* 2007 [cited 2020 Dec 19];156:39–46.
- 52 Blanco-Goza V, Casanova AG, Sancho-Martínez SM, Prieto M, Quiros Y, Morales AI, et al. Combined use of GM2AP and TCP1-eta urinary levels predicts recovery from intrinsic acute kidney injury. *Sci Rep.* 2020 Dec 1;10(1):11599.
- 53 Mulay SR, Holderied A, Kumar SV, Anders HJ. Targeting inflammation in so-called acute kidney injury. *Semin Nephrol.* 2016 [cited 2020 Dec 19];36:17–30.