

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

TESIS DOCTORAL

CARACTERIZACIÓN FISIOPATOLÓGICA DE UN
MODELO EXPERIMENTAL DE DAÑO RENAL
AGUDO *TRIPLE WHAMMY*: DIAGNÓSTICO
DIFERENCIAL Y PREVENTIVO

Memoria presentada por

Laura Prieto García

para optar al Grado de Doctor
por la Universidad de Salamanca.

Laura Prieto García

Salamanca, 26 de Julio de 2017

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

CERTIFICA:

Que el presente trabajo, elaborado por la Lda. en Biología Dña. **Laura Prieto García** para optar al Grado de Doctor, con el título **“CARACTERIZACIÓN FISIOPATOLÓGICA DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE DAÑO RENAL AGUDO *TRIPLE WHAMMY*: DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y PREVENTIVO”**, ha sido realizado bajo la dirección de los Doctores Francisco J. López Hernández y Sandra Sancho Martínez, en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expide y firma el presente certificado en Salamanca, a 23 de Junio de 2017.

Fdo.: Dra. Dña. María Jesús Monte Río

EL DOCTOR, **D. FRANCISCO J. LÓPEZ HERNÁNDEZ**, INVESTIGADOR DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE SALAMANCA Y PROFESOR ASOCIADO DE FISIOLÓGIA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y LA DOCTORA **DÑA. SANDRA SANCHO MARTÍNEZ**, PROFESOR AYUDANTE DOCTOR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo, titulado “**CARACTERIZACIÓN FISIOPATOLÓGICA DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE DAÑO RENAL AGUDO *TRIPLE WHAMMY*: DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y PREVENTIVO**”, presentado por la Licenciada en Biología Dña. **Laura Prieto García** 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, expiden y firman el presente certificado en Salamanca, a 23 de Junio de 2017.

Dr. D. Francisco López Hernández

Dra. Dña. Sandra Sancho Martínez

Esta Tesis Doctoral ha sido financiada con
**una ayuda/contrato predoctoral de Formación en
Investigación en Salud (PFIS)** del Instituto de
Salud Carlos III **(PFIS-2012)**.

ÍNDICE

ÍNDICE	I
Índice de figuras	VII
Índice de tablas	X
ABREVIATURAS	XVI
INTRODUCCIÓN	3
BLOQUE I: RESUMEN INTRODUCTORIO: TERAPIAS MULTIFARMACOLÓGICAS Y EL DAÑO RENAL AGUDO	3
1. EL SISTEMA CARDIOVASCULAR	7
2. EL SISTEMA RENAL	9
2.1. Descripción anatómica del sistema renal.	9
2.2. Descripción anatómica y funcional de la nefrona	10
3. LA FILTRACIÓN GLOMERULAR	12
3.1. Determinantes de la filtración glomerular	13
3.2. Regulación de los determinantes de la filtración glomerular	14
4. MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA HEMODINÁMICA SISTÉMICA Y RENAL	16
4.1. El aparato yuxtaglomerular	16
4.2. Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA)	17
4.3. Autorregulación renal	18
4.3.1. Mecanismo miogénico	19
4.3.2. Retroalimentación tubulo-glomerular (RTG)	20
4.4. Regulación de la PA en el control de la TFG	21
4.4.1. Mecanismos nerviosos y hormonales sobre el corazón y las RVP	22
4.4.2. Homeostasis de la volemia para controlar el FSR	23
5. DAÑO RENAL AGUDO (DRA) PRE-RENAL	25
5.1. El daño renal agudo: definición y tipos	25
5.2. Repercusión sanitaria y socioeconómica del DRA.	26
5.3. El DRA pre-renal	27
5.3.1. Fisiopatología del DRA pre-renal	27
5.3.2. Fármacos que alteran la función renal	29
6. ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS	29
6.1. La enzima ciclooxigenasa en el riñón	29

6.2. COX-2 y la retroalimentación tubuloglomerular	31
6.3. AINEs y sus efectos renales adversos	32
7. INHIBIDORES DE LA ANGIOTENSINA II	33
7.1. Inhibidores de la enzima convertora de angiotensina (IECA)	34
7.2. Antagonistas de los receptores de la angiotensina II (ARAs)	35
7.3. IECA/ARA II y sus efectos renales	36
8. DIURÉTICOS	37
8.1. Generalidades de los diuréticos	37
8.2. Los diuréticos y sus efectos renales	39
BLOQUE II: NUEVOS HORIZONTES EN EL DIAGNÓSTICO DEL DRA	40
9. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DEL DRA	42
9.1. Determinaciones analíticas básicas en sangre y orina	42
9.2. Técnicas de imagen	44
9.3. Estudio histopatológico del tejido renal	45
9.4. Diagnóstico diferencial del DRA pre-renal	45
10. DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DIFERENCIAL	46
11. DIAGNÓSTICO TEMPRANO Y PREVENCIÓN DEL DRA	47
11.1. Diagnóstico temprano del DRA	47
11.2. Diagnóstico del riesgo de desarrollar un DRA	50
OBJETIVOS	57
MATERIALES Y MÉTODOS	63
1. ESQUEMA METODOLÓGICO GENERAL	65
2. MODELO EXPERIMENTAL ANIMAL	66
2.1. Mantenimiento y manipulación de los animales	66
2.2. Modelo experimental animal Triple Whammy	67
2.3. Preparación y administración de fármacos	69
3. TÉCNICAS EXPERIMENTALES IN VIVO	69
3.1. Recogida de orina de 24 horas: jaulas metabólicas.	69
3.2. Control de la ingesta de la bebida	70
3.3. Recolección de muestras de sangre y plasma	71

3.4. Determinación de la presión arterial en la cola por esfigmomanometría	71
3.5. Determinación del flujo sanguíneo renal in vivo	73
3.6. Determinación de la perfusión de la corteza renal con láser Doppler	75
3.7. Perfusión y recogida de los órganos	77
4. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS	77
4.1. Determinación de la creatinina en plasma y en orina. Aclaramiento de creatinina	77
4.2. Determinación de la urea plasmática	79
4.3. Determinación de la concentración de proteínas en la orina	80
4.4. Determinación de la excreción urinaria de N-acetil-β-D-glucosaminidasa (NAG)	80
4.5. Determinación de la osmolaridad urinaria: Osmómetro	81
4.6. Determinación de la concentración de Na ⁺ en orina y en plasma	82
4.7. Determinación de la fracción excretada de glucosa	84
4.7.1. Determinación de la glucosa en el plasma	84
4.7.2. Determinación de la glucosa en la orina	85
4.8. Identificación de proteínas: técnica Western blot	85
4.8.1. Extracción de proteínas del tejido renal	86
4.8.2. Cuantificación de la concentración de proteínas	86
4.8.3. Preparación de las muestras de orina	87
4.8.4. Preparación de las muestras, electroforesis y transferencia	87
4.8.5. Incubación con los anticuerpos	88
4.9. Estudio de la expresión génica: q-PCR/PCR a tiempo real	90
4.9.1. Extracción de RNA del tejido renal	90
4.9.2. Obtención de ADNc	91
4.9.3. PCR cuantitativa o PCR a tiempo real	91
4.10. Técnica de ELISA	92
4.10.1. Obtención del substrato de renina e incubación	93
4.10.2. Inmunoensayo de angiotensina I	93
5. HISTOLOGÍA	95
5.1. Tinción hematoxilina-eosina	95

5.2. Tinción inmunohistoquímica de fluorescencia	97
6. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE UN ANÁLISIS PROTEÓMICO	99
6.1. Medida de la concentración de proteínas de la muestra	100
6.2. Preparación de las muestras mediante el kit “Clean up”	100
6.3. Electroforesis bidimensional (2D)	100
6.4. Tinción del gel y captura de las imágenes	101
6.5. Recorte de puntos y digestión de las proteínas	102
6.6. Identificación de proteínas mediante la huella de masas peptídica	103
7. RECOGIDA Y ANÁLISIS DE MUESTRAS DE ORINA DE PACIENTES CON DRA	104
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	105
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	116
BLOQUE 1: MODELO EXPERIMENTAL ANIMAL DE TRIPLE WHAMMY	118
1. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL ANIMAL DE DAÑO RENAL AGUDO TRIPLE WHAMMY	119
1.1. Caracterización de la función renal	120
1.1.1. Análisis de la creatinina y de la urea plasmática	120
1.1.2. Estimación de la tasa de filtración glomerular	121
1.2. Caracterización del tipo de DRA del modelo animal	124
1.2.1. Concentración de proteínas en la orina	124
1.2.2. Estado hidro-electrolítico	127
1.2.3. Estudio histológico del riñón	130
2. ESTUDIO DEL PÁTRÓN DE MARCADORES URINARIOS ASOCIADOS A DAÑO RENAL AGUDO EN EL MODELO TRIPLE WHAMMY	135
2.1. Biomarcadores urinarios relacionados con un daño tubular	136
2.1.1. Biomarcador 1	
2.1.2. Biomarcador 2	
2.1.3. Biomarcador 3	
2.1.4. Biomarcador 4	140
2.1.5. Biomarcador 5	
2.1.6. Biomarcador 6	
2.1.7. Biomarcador 7	
2.2. Biomarcadores urinarios relacionados con un daño glomerular	146

2.2.1. Biomarcador 8	144
2.3. Biomarcadores relacionados con un daño vascular	147
2.3.1. Biomarcador 9	147
2.4. Nuevos biomarcadores en estudio	148
2.4.1. Biomarcador 10	149
2.4.2. Biomarcador 11	150
2.4.3. Biomarcador 12	150
2.5. Tabla resumen biomarcadores DRA pre-renal	151
BLOQUE 2: ESTUDIO HEMODINÁMICO SISTÉMICO Y RENAL EN EL MODELO TRIPLE WHAMMY	154
3. ESTADO DE LA HEMODINÁMICA SISTÉMICA Y RENAL EN EL MODELO TRIPLE WHAMMY	154
3.1. Evolución de la presión arterial sistólica	154
3.2. Presión arterial límite en la autorregulación renal	157
3.3. Relación de la creatinina plasmática y la PAS	158
3.4. Flujo sanguíneo renal	160
4. MECANISMOS REGULADORES DEL ESTADO HEMODINÁMICO SISTÉMICO Y RENAL	163
4.1. Aparato yuxtaglomerular	163
4.2. Expresión de la COX-2 y de la renina en el tejido renal	166
4.3. Sistema-renina-angiotensina-aldosterona	168
4.4. Estado hemodinámico global, una visión integradora	170
BLOQUE 3: IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS BIOMARCADORES URINARIOS ASOCIADOS AL DRA PRE-RENAL	171
5. IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES URINARIOS DEL RIESGO DE DESARROLLAR UN DRA DE TIPO PRE-RENAL	172
6. IDENTIFICACIÓN DE POTENCIALES BIOMARCADORES URINARIOS ASOCIADOS A UN DRA DE TIPO PRE-RENAL	174
7. VALIDACIÓN DE LAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR PROTEÓMICA DIFERENCIAL	176
7.1. Biomarcador 13	
7.1.1. Estudio de la excreción urinaria del biomarcador 13	177
7.1.2. Estudio de la composición relativa de la orina	178
7.2. Biomarcador 14	

7.2.1. Estudio de la excreción urinaria del biomarcador 14	181
7.2.2. Estudio de la composición relativa de la orina	182
7.3. Biomarcador 15	183
7.3.1. Estudio de la excreción urinaria del biomarcador 15	184
7.3.2. Estudio de la composición relativa de la orina	185
7.4. Huella proteica del DRA de tipo pre-renal	187
8. ESTUDIO DE LA HUELLA PEPTÍDICA URINARIA EN PACIENTES PROCEDENTES DEL SERVICIO DE NEFROLOGÍA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE SALAMANCA	190
8.1. Caracterización de la función renal de cada paciente	192
8.2. Estudio del patrón de aparición de los biomarcadores urinarios asociados al DRA	196
8.3. Estudio de los biomarcadores urinarios identificados en el modelo experimental animal Triple whammy	198
8.4. Huella proteica de los pacientes con un DRA	199
9. DISCUSIÓN GENERAL	202
9.1. Terapias individuales: AINEs, inhibidores de angiotensina II o diuréticos en monoterapia	202
9.2. Terapias dobles: mecanismos de regulación al límite	204
9.2.1. AINE+inhibidor de la angiotensina II (ibuprofeno+trandolapril)	205
9.2.2. AINE+diurético (ibuprofeno+furosemida)	206
9.2.3. Diurético+inhibidor de la angiotensina II (furosemida+trandolapril)	208
9.3. La triple terapia, el talón de Aquiles de la hemodinámica	210
10. PERSPECTIVAS	212
CONCLUSIONES	217
BIBLIOGRAFÍA	223

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de la regulación sistémica y renal activados en una situación de hipoperfusión renal6

Figura 2. Esquema del sistema cardiovascular 7

Figura 3. Resumen de los principales mecanismos de regulación de la PA inmediatos, a medio y largo plazo9

Figura 4. Esquema del sistema urinario 10

Figura 5. Imagen representativa del glomérulo y del sistema tubular de una nefrona12

Figura 6. Parámetros determinantes de la tasa de filtración glomerular (TFG)14

Figura 7. Regulación de los determinantes de la tasa de TFG15

Figura 8. Aparato yuxtaglomerular17

Figura 9. Autorregulación renal. Relación entre la TFG, el FSR y la PPR19

Figura 10. Representación esquemática de la respuesta de la rtg ante variaciones en la PAM21

Figura 11. Esquema de la síntesis de prostanoides29

Figura 12. Papel de la COX-2 en la mácula densa31

Figura 13. Resumen del SRAA y del punto de acción farmacológica de los IECA y los ARA-II para inhibirlos33

Figura 14. Concepto de DRA según los criterios de KDIGO, RIFLE y AKIN, su diagnóstico preventivo y precoz 40

Figura 15. Concepto de riesgo o sensibilización de desarrollar un DRA 50

Figura 16. Esquema de los grupos experimentales 66

Figura 17. Equipo NIBCHART LE5002 panlab (A) y cepo necesario para inmovilizar al animal (B) 70

Figura 18. Imagen de la pantalla de registro de presión medida en cola71

Figura 19. Esquema de la sonda de ultrasonidos transonic para medir el flujo sanguíneo renal 72

Figura 20. Determinación de la perfusión de la corteza renal con el láser doppler 74

Figura 21. Reacción de Jaffé76

Figura 22. Equipo Osmomat 030, osmómetro crioscópico utilizado para determinar la osmolalidad en muestras de orina 80

Figura 23. Potenciómetro para medir iones Na⁺81

Figura 24. Medidor de la concentración de glucosa en plasma.83

Figura 25. Representación esquemática Western blot.....88

Figura 26. Esquema representativo del ELISA indirecto llevado a cabo para determinar la concentración de angiotensina i en muestras de plasma	92
Figura 27. Imagen representativa de un corte longitudinal de un riñón de rata teñido con hematoxilina-eosina.	94
Figura 28. Imágenes obtenidas mediante inmunofluorescencia en tejido renal de rata.....	97
Figura 29. Imagen representativa de un gel de poliacrilamida, obtenida con el escáner ettan dige imager tras la realización de la electroforesis bidimensional	100
Figura 30. Evolución de la creatinina y de la urea plasmática durante el tratamiento de los tres fármacos de forma individual, doble o triple	119
Figura 31. Representación del aclaramiento de la creatinina analizada en los tratamientos individuales	120
Figura 32. Representación del aclaramiento de la creatinina analizada en los tratamientos en la terapia doble y triple	121
Figura 33. Excreción urinaria de proteínas en la terapia individual.....	123
Figura 34. Excreción urinaria de proteínas en la terapia doble y triple.....	124
Figura 35. Imágenes representativas de cortes histológicos (20x) teñidos con hematoxilina-eosina procedentes de la corteza, la médula y la papila renal de los grupos experimentales tratados con ibuprofeno, trandolapril o furosemida de forma individual.	130
Figura 36. Imágenes representativas de cortes histológicos (20x) teñidos con hematoxilina-eosina procedentes de la corteza, la médula y la papila renal de los grupos experimentales tratados con las terapias dobles (I+T, I+F o T+F).	131
Figura 37. Imágenes representativas de cortes histológicos (20x) teñidos con hematoxilina-eosina procedentes de la corteza, la médula y la papila renal de los grupos experimentales tratados con el triple tratamiento (i+t+f).	132
Figura 38. Presencia urinaria del biomarcador 1 en la orina de las ratas tratadas con la doble y triple terapia.	135
Figura 39. Presencia urinaria del biomarcador 2 en la orina de las ratas tratadas con la doble y triple terapia.	136
Figura 40. Presencia urinaria del biomarcador 3 en la orina de las ratas tratadas con la doble y triple terapia	137
Figura 41. Presencia urinaria del biomarcador 4 en la orina de las ratas tratadas con la doble y triple terapia.	139
Figura 42. Presencia urinaria del biomarcador 5 en la orina de las ratas tratadas con la doble y triple terapia.	140
Figura 43. Excreción urinaria del biomarcador 6 en el modelo animal <i>Triple whammy</i>	142
Figura 44. Presencia urinaria del biomarcador 7 en la orina de las ratas tratadas con la doble y triple terapia.	143
Figura 45. Presencia urinaria del biomarcador 8 en la orina de las ratas tratadas con la doble y triple terapia.	144

Figura 46. Presencia urinaria del biomarcador 9 en la orina de las ratas tratadas con la doble y triple terapia.....	145
Figura 47. Presencia urinaria del biomarcador 10 en la orina de las ratas tratadas con la doble y triple terapia	147
Figura 48. Presencia urinaria del biomarcador 11 en la orina de las ratas tratadas con la doble y triple terapia.....	148
Figura 49. Presencia urinaria del biomarcador 12 en la orina de las ratas tratadas con la doble y triple terapia	149
Figura 50. Evolución de la presión arterial sistólica de los animales del modelo experimental animal tratados con doble y triple terapia	153
Figura 51. Evolución de la presión arterial sistólica (A) y de la creatinina plasmática (B) en animales tratado con minoxidil y minoxidil+hidralazina	156
Figura 52. Análisis de la correlación existente entre el aumento de la Crpl y la disminución de la PAS tras la administración de dos y tres fármacos.	157
Figura 53. Evaluación del FSR en los diferentes grupos experimentales a día 6 de tratamiento con la furosemida	158
Figura 54. Imágenes representativas obtenidas mediante inmunohistoquímica de fluorescencia para estudiar la expresión y la localización renal de la renina y de la enzima COX-2 en animales sin tratamiento (control), en el grupo I+T y en el grupo I+F.....	162
Figura 55. Imágenes representativas obtenidas mediante inmunohistoquímica de fluorescencia para estudiar la expresión y la localización renal de la renina y de la enzima COX-2 en animales sin tratamiento (control), en el grupo T+F y en el grupo I+T+F.....	163
Figura 56. Expresión de las proteínas renina y COX-2 en el tejido renal de los animales tratados con la doble y triple terapia..	165
Figura 57. Evolución de la actividad de renina en el plasma de los animales tratados con la doble y la triple terapia..	167
Figura 58. Imágenes representativas de los geles de poliacrilamida obtenidos tras la electroforesis bidimensional.....	171
Figura 59. Imágenes representativas de los geles de poliacrilamida obtenidos tras la electroforesis bidimensional.....	173
Figura 60. Imágenes representativas de western blot y cuantificación de la excreción urinaria del biomarcador 13 en la orina de las ratas del modelo experimental a lo largo del tratamiento.....	176
Figura 61. Imágenes representativas de western blot y cuantificación de la presencia de la proteína biomarcador 13 en la orina de las ratas de los diferentes grupos de estudio.....	178
Figura 62. Imágenes representativas de western blot y cuantificación de la excreción urinaria del biomarcador 14 en la orina de las ratas del modelo experimental a lo largo del tratamiento.....	180
Figura 63. Imágenes representativas de Western blot y cuantificación de la presencia de la proteína biomarcador 14 en la orina de las ratas de los diferentes grupos de estudio.....	181

ÍNDICE

Figura 64. Imágenes representativas de Western blot y cuantificación de la excreción urinaria del biomarcador 15 en la orina de las ratas del modelo experimental a lo largo del tratamiento.....	183
Figura 65. Imágenes representativas de western blot y cuantificación de la presencia de biomarcador 15 en la orina de las ratas de los diferentes grupos de estudio.....	184
Figura 66. Huella peptídica obtenida en el modelo experimental animal de dra de tipo pre-renal que diferencia este daño del dra intrínseco.....	189
Figura 67. Caracterización de la función renal alterada de los pacientes procedentes del servicio de nefrología del hospital universitario de salamanca.....	193
Figura 68. Cuantificación de la presencia de los diferentes marcadores urinarios relacionados con el DRA en las orinas de 25 pacientes procedentes del servicio de nefrología del HUSA.....	195
Figura 69. Cuantificación de los resultados obtenidos al analizar la presencia de las proteínas identificadas en la orina del modelo experimental animal puesto a punto en este trabajo de investigación.....	196
Figura 70. Resumen de la huella proteica obtenida tras el análisis de 12 potenciales marcadores DRA en la orina de pacientes con DRA procedentes del Servicio de Nefrología del HUSA.....	197
Figura 71. Resumen de las principales vías alteradas por los fármacos administrados y los puntos clave donde producen su acción.....	201
Figura 72. Esquema representativo del estado fisiológico de los animales tratados con ibuprofeno y trandolapril de forma combinada durante 10 días.....	203
Figura 73. Resumen de las vías fisiológicas activadas y alteradas tras la administración de un diurético y un aine de forma conjunta.....	205
Figura 74. Principales mecanismos de regulación de la PA y de la TFG activados tras la administración de un diurético y un inhibidor de la angiotensina ii.....	207
Figura 73. Resumen del estado fisiopatológico y de las principales vías involucradas en el desarrollo del modelo experimental animal <i>Triple whammy</i>	209
Figura 74. Esquema representativo de las alteraciones producidas en un DRA de tipo pre-renal”.....	212

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características principales de los tipos de DRA	26
Tabla 2. Mecanismo de acción de los principales grupos de diuréticos	37
Tabla 3. Resumen de la correlación entre proteínas excretadas y la lesión renal que podrían marcar según diferentes estudios	43
Tabla 4. Parámetros estudiados para diferenciar el DRA de tipo pre-renal del renal o intrínseco	45
Tabla 5. Principales biomarcadores correlacionados con el DRA temprano	47

Tabla 6. Preparación de los fármacos utilizados en el modelo experimental animal.....	67
Tabla 7. Relación de anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la técnica de western blot	87
Tabla 8. Cebadores utilizados y condiciones empleadas en la técnica de PCR	90
Tabla 9. Características de daño renal evaluadas y valor numérico asociado	95
Tabla 10. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados y condiciones de uso	96
Tabla 11. Relación de productos y reactivos utilizados.	104
Tabla 12. Anticuerpos utilizados, referencia y casa comercial	107
Tabla 13. Relación de equipos y aparatos utilizados	108
Tabla 14. Principales modelos animales llevados a cabo para analizar la nefrotoxicidad tras la administración de aines	110
Tabla 15. Osmolalidad urinaria, balance hídrico y fracción excretada de glucosa evaluada en los diferentes grupos experimentales a día 6 de tratamiento con los diferentes fármacos según el diseño experimental.....	126
Tabla 16. Análisis del manejo del Na ⁺ al finalizar el tratamiento (día 6) en el modelo experimental animal	128
Tabla 17. Tabla resumen de la presencia o ausencia de los potenciales marcadores de DRA analizados en el modelo experimental animal Triple whammy en comparación con un modelo de dra intrínseco (G-150).	150
Tabla 18. Resumen de los principales parámetros analizados en los grupos de estudio.....	160
Tabla 19. Resumen integrador que refleja las características de la función renal, los biomarcadores analizados y las características hemodinámicas analizadas en cada grupo experimental.....	168
Tabla 20. Proteínas identificadas en la orina de los animales tratados con I+T durante cuatro días (día 0) ausentes en la orina del grupo control	170
Tabla 21. Proteínas identificadas en la orina de los animales tratados con I+T+F a día 6 ausentes en la orina del grupo control.....	173
Tabla 22. Tabla resumen de los resultados obtenidos en la validación de las proteínas identificadas por proteómica diferencial.....	186
Tabla 23. Resumen de las diferencias encontradas para discernir el tipo de DRA según los resultados obtenidos en nuestro modelo experimental animal.....	187
Tabla 24. Principales características de los pacientes incluidos en el estudio, diagnóstico principal establecido por el servicio de nefrología y principales parámetros utilizados para diferenciar el DRA.....	191

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

AAP	Alanina aminopeptidasa
ACN	Acetonitrilo
ADH	Hormona antidiurética
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADQUI	Grupo de Iniciativa para la Calidad de la Diálisis Aguda (del inglés <i>Acute Dialysis Quality Initiative</i>)
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
AKIN	Red de la lesión renal aguda (del inglés <i>Acute Kidney Injury Network</i>)
ARA II	Antagonistas de los receptores de los receptores de la angiotensina II
ARN	Ácido ribonucleico
ARP	Actividad de renina en plasma
ASB	Albúmina de suero bovina
AT1	Angiotensina II tipo 1
ATF	Ácido trifluoroacético (del inglés <i>trifluoroacetic acid</i>)
ATP	Adenosín trifosfato
BMP-7	Proteína morfogenética ósea-7 (del inglés <i>bone morphogenetic protein-7</i>)
BR	Barorreceptores
Clc	Aclaramiento de creatinina
Co	Creatinina urinaria
Co NAG	Concentración urinaria de NAG
COX	Ciclooxigenasa
COX-1	Ciclooxigenasa 1
COX-2	Ciclooxigenasa 2
Cpo	Concentración de proteínas en la orina
Crpl	Creatinina plasmática
CHAPS	Propanosulfonato 3 - [(3 - Colamidopropil) - dimetilamonio] - (del inglés <i>3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propane- sulfonate</i>)
CHCA	Ácido ciano-4-hidroxicinámico (del inglés <i>cyano-4-hydroxycinnamic acid</i>)
DRA	Daño renal agudo
DTT	Ditiotreitrol
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDTA	Etilendiaminotetracético
EEM	Error estándar de la media
EFNa	Excrección fraccional de Na ⁺
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés <i>Enzyme-Linked immunosorbent Assay</i>)

EPI	Epinefrina
F	Furosemida
FAL	Fosfatasa alcalina
FC	Frecuencia cardiaca
FeGlc	Fracción excretora de glucosa
FSR	Flujo sanguíneo renal
FU	Flujo urinario
G-150	Gentamicina 150 mg/kg/día
GC	Gasto cardiaco
GGT	Gamma-glutamilttransferasa
Glc	Concentración de glucosa en la orina
Glcp	Concentración de glucosa en el plasma
GM ₂ AP	Proteína activadora del gangliósido M2 (del inglés <i>ganglioside M2 activator protein</i>)
GST	Glutation transferasa
HRP	Enzima peroxidasa de rábano picante (del inglés <i>horseradish peroxidase</i>)
HUSA	Hospital Universitario de Salamanca
I	Ibuprofeno
I.G	Intragástrica
I.P	Intraperitoneal
IECA	Inhibidores de la enzima convertora de angiotensina II
IGFBP-7	Proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (del inglés <i>insulin like growth factor binding protein 7</i>)
IL-8	Interleukina 8
ISE	Electrodo selectivo de iones (del inglés <i>Ion-selective-electrode</i>)
KDIGO	(del inglés <i>Kidney Disease Improving Global Outcomes</i>)
Kf	Coefficiente de ultrafiltración
KIM-1	Molécula de daño renal 1 (del inglés <i>kidney injury molecule-1</i>)
LDH	Lactato deshidrogenasa
L-FABP	Proteína hepática fijadora de ácidos grasos (del inglés <i>Liver type fatty acid binding protein</i>)
LPM	Latidos por minuto
MALDI-TOF/TOF	Desorción/ionización láser asistida por matriz-tiempo de retorno de la señal (por sus siglas en inglés <i>MALDI Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization; TOF Time-Of-Flight</i>)
MR	Mecanorreceptores
NAG	<i>N-acetyl-beta-D-glucosaminidasa</i>
Nao	Concentración del Na ⁺ en la orina

ABREVIATURAS

Nap	Concentración de Na ⁺ en el plasma
NED	N-naptileno diamida
NGAL	Lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (del inglés <i>neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i>)
NKCC2	Cotransportador Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻
NO	Óxido nítrico (del inglés <i>nitric oxide</i>)
NTA	Necrosis tubular aguda
O	Oral
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPA	Ortoftalaldehído
PA	Presión arterial
PAD	Presión arterial diastólica
PAI-1	Inhibidor del activador de plasminógeno (del inglés <i>Plasminogen Activator Inhibitor-1</i>)
PAM	Presión arterial media
PAS	Presión arterial sistólica
P _c	Presión hidrostática intracapilar
P _{cg}	Presión en la capsula de Bowman
PEF	Presión efectiva de ultrafiltración
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGH ₂	Prostaglandina H ₂
PGI ₂	Prostaciclina
PGR	Receptor de prostaglandina (del inglés <i>prostaglandin receptor</i>)
PGs	Prostaglandinas
P _i	Presión hidrostática intersticial
PL	Fosfolipasa
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (del inglés <i>a-toluensulphonylfluoride</i>)
PNA	Péptido natriurético atrial
PNB	Péptido natriurético cerebral
PPR	Presión de perfusión renal
PVDF	Difluoruro de polivilideno (del inglés <i>polyvinylidene difluoride</i>)
qPCR	Reacción de la polimerasa en cadena cuantitativa (del inglés <i>quantitative polymerase chain reaction</i>)
RBP	Proteína unida a retinol (del inglés <i>retinol binding protein</i>)
Reg-III-B	Proteína 3-B derivada de islote regenerador (del inglés <i>regenerating islet-derived protein III</i>)
RT	Retrotranscriptasa
RIFLE	Del inglés <i>Risk, Injury, Failure, Loss</i> .

RTG	Retroalimentación tubuloglomerular
rt-PCR	Reacción de la polimerasa en cadena a tiempo real (del inglés <i>real time PCR</i>)
RVP	Resistencias vasculares periféricas
RVR	Resistencias vasculares renales
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (del inglés <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SEA	Servicio de experimentación animal
SNA	Sistema nervioso autónomo
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso parasimpático
SNS	Sistema nervioso simpático
SR	Receptores de distensión (del inglés <i>stretch receptor</i>)
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
T	Trandolapril
TCA	Ácido tricloroacético (del inglés <i>trichloroacetic acid</i>)
TFG	Tasa de filtración glomerular
THP	Proteína tammhorsfall (del inglés <i>tamhorskfall protein</i>)
TIMP-2	Inhibidor tisular de la metaloproteinasa 2 (del inglés <i>tissue inhibitor of metalloproteinase 2</i>)
TXA ₂	Tromboxano A ₂
UCI	Unidad de cuidados intensivos
Upl	Urea plasmática
Uu	Urea urinaria
V.A	Vía de administración
π_g	Presión oncótica de los capilares glomerulares
π_c	Presión oncótica intracapilar
π_i	Presión oncótica intersticial

INTRODUCCIÓN

BLOQUE I: RESUMEN INTRODUCTORIO: TERAPIAS MULTIFARMACOLÓGICAS Y EL DAÑO RENAL AGUDO

Las enfermedades cardiovasculares son la cuarta causa de muerte en el mundo actual ya que engloban el 31,5 % de todas las muertes registradas (Townsend y cols., 2016). Uno de los principales factores de riesgo a desarrollar estas patologías es la hipertensión, la cual causa el 12,8 % de las muertes mundiales totales, siendo responsable del 51 % de las muertes por enfermedad cerebro-vascular y del 45 % de aquellas causadas por cardiopatía isquémica (Kumar y cols., 2013). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), esta patología crónica afecta al 40 % de la población mayor de 25 años. Por ello, controlar los niveles de la presión arterial (PA) mediante farmacoterapia y cambios en el estilo de vida es esencial para mejorar el pronóstico cardiovascular de estos pacientes y reducir la morbimortalidad asociada. La etiología de esta enfermedad es multifactorial ya que se encuentran implicados numerosos factores hemodinámicos, neuroendocrinos, estructurales, celulares y moleculares (Kamran y cols., 2014), por lo que se requiere terapia combinada para actuar sobre las diferentes vías neuroendocrinas involucradas. El uso conjunto de antihipertensivos con mecanismos de acción diferentes ha demostrado tener una mayor eficacia en el control de los valores de la PA. Aproximadamente el 70 % de los pacientes que padecen hipertensión necesitan dos o más fármacos antihipertensivos para controlar esta enfermedad (Frank, 2008). Además, la terapia combinada de estos fármacos permite reducir sus efectos secundarios individuales hasta el 50 % debido a la disminución de la dosis utilizada (Wald y cols., 2009). Dentro de las posibles terapias, el uso combinado de los diuréticos y los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina II (IECA) es uno de los tratamientos más eficientes en la actualidad (Escobar-Cervantes y Barrios-Alonso, 2010).

Debido a la cronicidad de la hipertensión, es muy común la coexistencia del tratamiento antihipertensivo con la administración aguda o crónica de otro tipo de fármacos. Por otra parte, los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) utilizados para tratar el dolor agudo o crónico son los medicamentos más prescritos en el mundo, por lo que es frecuente encontrar este tipo de fármacos junto con antihipertensivos, comúnmente diuréticos e inhibidores de la angiotensina II, en terapias combinadas.

Sin embargo, cada uno de estos fármacos puede provocar alteraciones en la fisiología renal debido a su mecanismo de acción, por lo que son potencialmente

nefrotóxicos en terapias múltiples (Hricik y Dunn, 1990; Whelton y Hamilton, 1991; Delmas, 1995; Jolobe, 2001; Schoolwerth y cols., 2001; Gambaro & Perazella, 2003; Patzer, 2008; Coca y cols., 2013) y pueden dar lugar a un Daño Renal Agudo (DRA) de tipo pre-renal. Numerosos estudios recientes relacionan el tratamiento combinado de dos o más fármacos de estas familias con un daño renal (Loboz y Shenfield, 2005; Fournier y cols., 2012; Adhiyaman y cols., 2001) y se ha demostrado que la terapia triple puede aumentar el riesgo a desarrollar un DRA un 30 %, (Lapi y cols., 2013). En este contexto, se utiliza el término “*Triple Whammy*” para referirse al riesgo asociado a desarrollar un DRA tras el tratamiento combinado de estos tres tipos de fármacos mencionados anteriormente (Thomas, 2000; Loboz y Shenfield, 2005; Lapi y cols., 2013; Onuigbo, 2013).

El DRA es un síndrome clínico en el que se produce un deterioro brusco de la función excretora del riñón como consecuencia de múltiples causas. Esta enfermedad presenta una alta morbi-mortalidad con consecuencias humanas y sociales muy importantes. Se estima que alrededor de 2 millones de personas mueren cada año como consecuencia de un DRA y aquellas que sobreviven tienen un alto riesgo de desarrollar una enfermedad renal crónica (Li y cols., 2013). El DRA de tipo pre-renal es la forma más común de DRA, entre el 60-70 % de todos los casos de DRA (Kaufman y cols., 1991) y el 40 % de los desencadenados en pacientes hospitalizados (Avenidaño, 2009). Este tipo de DRA es producido por una alteración en la perfusión renal que compromete la funcionalidad del riñón sin la existencia de daño en las estructuras renales.

La etiología del DRA es variada, siendo la nefrotoxicidad la causa del 10-20 % de los casos (Brivet y cols., 1996) ya que el 25 % de los 100 fármacos más utilizados en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCIs) son potencialmente nefrotóxicos (Taber y Mueller, 2006). En España, recientes estudios demuestran que los fármacos están relacionados con un 54 % de las hospitalizaciones como consecuencia de un DRA (Lavecchia y cols., 2015). Entre todos los fármacos, los diuréticos y los fármacos que actúan sobre el Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA) son los medicamentos mayoritarios responsables de esta patología, sobre todo en pacientes ancianos, hipertensos y/o con alguna patología cardíaca (Castellano-Cabrera y cols., 2015).

El SRAA presenta un papel fundamental en la regulación de la PA, necesaria para un correcto funcionamiento del sistema cardiovascular. Además, es esencial en la autorregulación renal, mecanismo crucial para mantener constante la función

renal en determinadas situaciones fisiológicas o fisiopatológicas. Dentro de este sistema, la angiotensina II es el mayor efector de este mecanismo de regulación, imprescindible para controlar la homeostasis renal y sistémica. Por otra parte, las prostaglandinas (PGs) son moléculas vasodilatadoras responsables de contrarrestar el efecto vasoconstrictor de la angiotensina II, jugando un papel muy importante en los mecanismos de regulación de la homeostasis renal. La acción de estas moléculas no es decisiva para una correcta función renal en situaciones normales, sin embargo, es relevante para que el riñón trabaje adecuadamente en aquellas situaciones en las que la función renal se encuentra comprometida. La inhibición de la angiotensina II mediante los IECA o los antagonistas de los receptores de la angiotensina II (ARA II) y de la síntesis de PGs mediante los fármacos AINEs sitúa al riñón en un límite sin protección en aquellas situaciones de hipoperfusión renal en las que la autorregulación renal sea requerida. Diversos estudios demuestran que la administración simultánea de ambos fármacos no produce alteraciones en la PA ni en la tasa de filtración glomerular (TFG) en individuos normotensos (Sturrock y Struthers, 1993; Boshra y cols. 2011). Sin embargo, la depleción de volumen producida por un diurético puede situar la homeostasis sistémica y renal en ese límite dependiente de las moléculas mencionadas anteriormente, por lo que su inhibición precipitaría al individuo a un DRA.

No obstante, no todos los individuos que utilizan estos fármacos de forma combinada desarrollan un DRA, pero si un porcentaje relevante de hasta el 22 % (Lapi y cols., 2013) y las dobles terapias pueden desembocar en una patología renal en determinadas circunstancias. Existen estudios poblacionales sobre el efecto de la *Triple Whammy* que demuestran que la mayor incidencia del DRA tras la administración de estos fármacos aparece en el doble tratamiento con diuréticos y AINEs. Además, verifican que la incidencia de los tratamientos dobles con diuréticos es similar a la que aparece en el triple tratamiento combinado, siempre en pacientes con enfermedades cardíacas asociadas o avanzada edad (Camin y cols., 2015). De acuerdo con este conocimiento, otros estudios publicados (Sturrock y Struthers, 1993) apoyan que la administración conjunta de los fármacos AINEs e inhibidores de la angiotensina II puede dar lugar a un DRA en situaciones de hipoperfusión renal. Este síndrome también se ha observado en pacientes tras la administración de inhibidores de angiotensina II y diuréticos (Bridoux y cols., 1992) o de AINEs y diuréticos (Braden y cols. 2004) pero siempre en pacientes con patologías asociadas (diabetes, fallo cardíaco, insuficiencia renal crónica, etc. Incluso, se utiliza el

término “*Quadruple Whammy*” para definir un DRA que resulta de la terapia combinada mencionada en el Triple Whammy en pacientes con enfermedad renal crónica (Onuigbo y Agbasi, 2014). El análisis de estas poblaciones descubre la necesidad de comprender el proceso fisiopatológico por el que se produce este síndrome, avance clave para su tratamiento y prevención.

Las situaciones de hipoperfusión renal son comunes en el área clínica, por ejemplo, en casos de deshidratación, avanzada edad, estenosis arterial, uso de determinados fármacos o ciertas patologías previas que comprometen el flujo sanguíneo renal (FSR) y por tanto, la presión de perfusión renal (PPR). El sistema cardiovascular y el sistema renal son los grandes protagonistas del proceso fisiopatológico de este síndrome renal. La figura 1 resume los principales mecanismos de regulación de ambos sistemas activados en esta situación, implicados en el mantenimiento de la PA y de una correcta función renal. Como se puede observar, dicho mantenimiento depende de una compleja red de moléculas interconectadas, por lo que el mal funcionamiento de alguna de ellas, o la desregulación del sistema puede dar lugar a una situación de hipoperfusión renal sostenida, y por tanto, a la aparición de un DRA pre-renal.

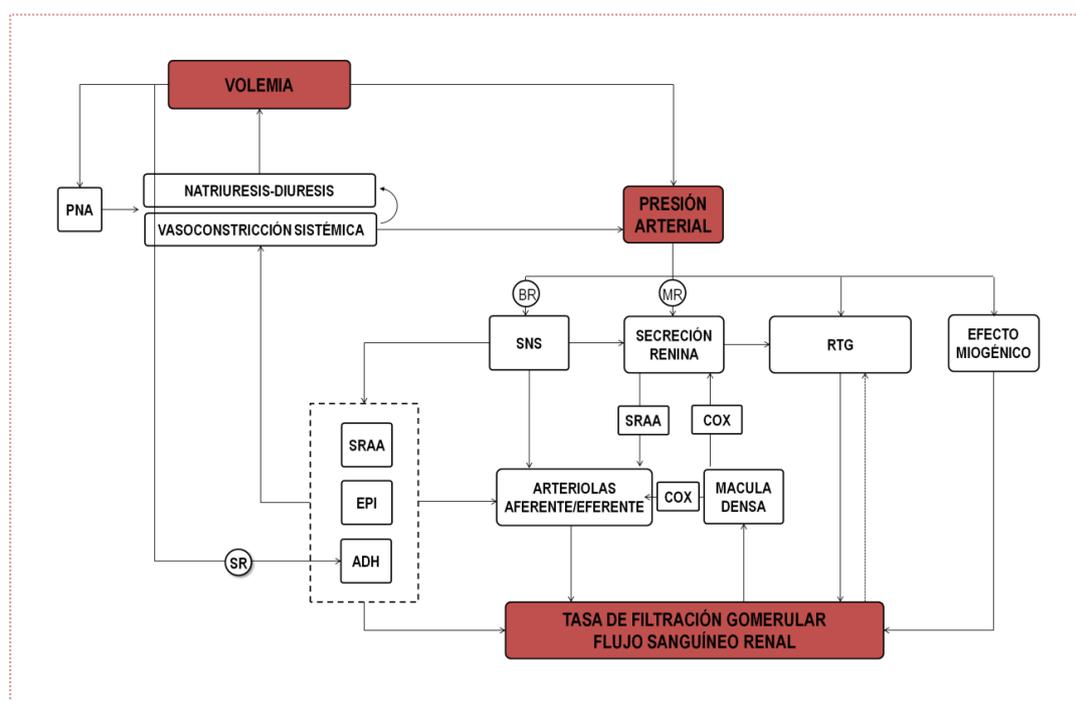


Figura 1. Mecanismos de regulación sistémica y renal activados en una situación de hipoperfusión renal (adaptada de Prieto-García y cols., 2016). SR: receptores stretch; BR: barorreceptores; MR: mecanorreceptores; PNA: péptido natriurético atrial; SRAA: sistema renina angiotensina aldosterona; SNS: sistema nervioso simpático; COX: ciclooxigenasa; EPI: epinefrina; ADH: hormona anti-diurética; RTG: retroalimentación tubuloglomerular.

1. EL SISTEMA CARDIOVASCULAR

El sistema cardiovascular en los mamíferos está formado por el corazón, que trabaja como una bomba impulsora y un sistema de vasos sanguíneos (arterias, venas y capilares) por los que circula la sangre por todo el organismo (figura 2) (Hall, 2011). Los vasos sanguíneos son conductos musculares elásticos responsables del suministro de oxígeno, nutrientes y células del sistema inmune, así como de la retirada de los productos de desecho de todos los tejidos del organismo, que se han de eliminar posteriormente, por los riñones a través de la orina y por el aire exhalado en los pulmones. La contracción o dilatación del músculo liso presente en la capa intermedia de la pared vascular de arterias pequeñas y arteriolas juega un papel principal en la regulación del flujo sanguíneo que pasa por el vaso, y por tanto, de la PA.

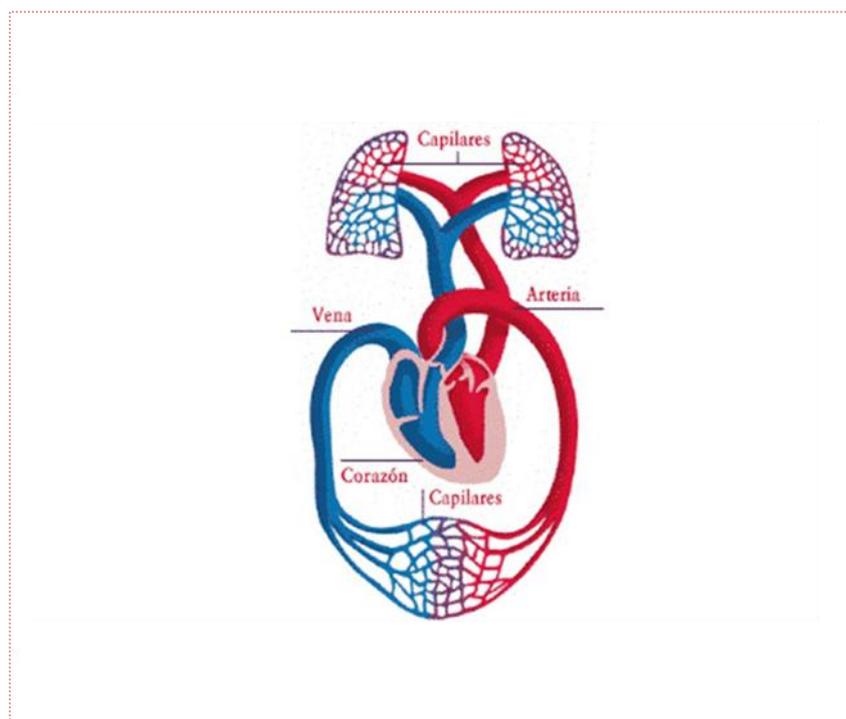


Figura 2. Esquema del sistema cardiovascular.

La PA se define como la fuerza ejercida por el torrente sanguíneo sobre las paredes de los vasos por los que circula. La PA varía continuamente a lo largo del ciclo cardíaco. El valor máximo de PA se alcanza durante el periodo de expulsión sistólica, por lo que se denomina presión arterial sistólica (PAS), y el mínimo al final del periodo de diástole, conocido como presión arterial diastólica (PAD). A partir de

estos dos valores se puede calcular la presión arterial media (PAM), según la siguiente fórmula: $PAM = PAD + (PAS - PAD)/3$, concepto utilizado en el área clínica (Tresguerres, 2010).

Desde un punto de vista físico, la presión depende de dos factores, el flujo y la resistencia. Por ello, la PA en un organismo depende de dos variables, el gasto cardíaco (GC) y las resistencias vasculares periféricas (RVP), según la siguiente fórmula $PA = GC \times RVP$. El gasto cardíaco o volumen por minuto es la cantidad de sangre expulsada por el corazón en un minuto. Se determina multiplicando la cantidad de sangre bombeada por cada ventrículo en cada latido (volumen sistólico) por la frecuencia cardíaca (fc) (Segarra, 2006). Por otra parte, la RVP hace referencia a la cantidad de resistencia que ofrece el sistema vascular al flujo de la sangre y depende principalmente del diámetro de las arteriolas, denominados vasos de resistencia, debido al grosor de su capa de músculo liso el cual le permite variar su diámetro.

Es necesario que la PA se mantenga dentro de un rango de valores para asegurar la correcta perfusión sanguínea de todos los componentes celulares de los tejidos que componen el organismo. Gracias a diferentes mecanismos de regulación, la presión arterial media (PAM) normal se mantiene, en condiciones fisiológicas, dentro de un rango entre 95 -100 mmHg (Ghai, 2013). Estos mecanismos de regulación actúan a corto, medio y largo plazo sobre el GC o las RVP con el fin de mantener la PA (Eaton y Pooler, 2009). Los mecanismos de control nervioso, como los barorreceptores, los quimiorreceptores y el sistema nervioso central, son los primeros en actuar sobre la PA. Posteriormente, el SRAA y la natriuresis por presión se activan para mantener dicho parámetro (figura 3). Estos mecanismos se explicaran detenidamente en el apartado 4.

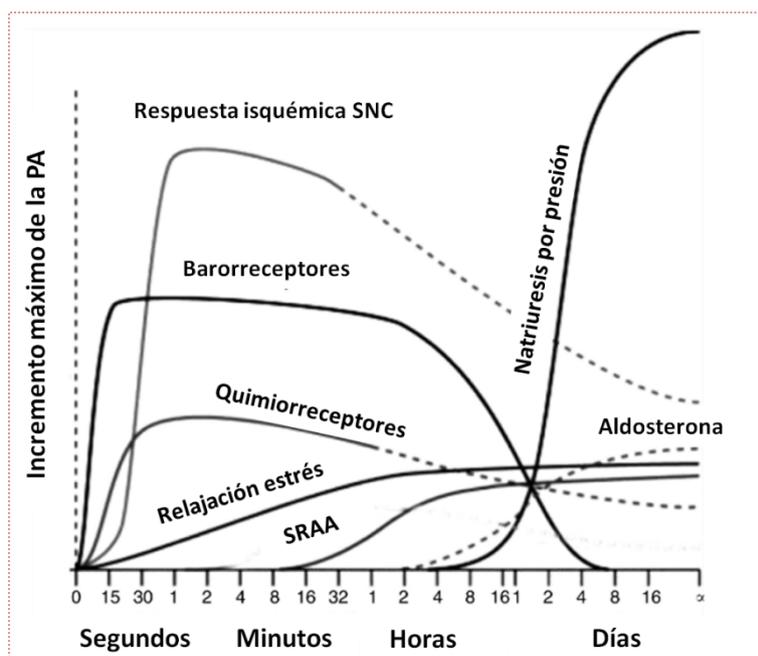


Figura 3. Resumen de los principales mecanismos de regulación de la PA inmediatos, a medio y largo plazo (adaptada de González-Toledo y Franco, 2012). SRAA: sistema renina-angiotensina-aldosterona; PA: presión arterial. La grafica representa el momento de activación tras una subida drástica de la PA y el tiempo de participación en el proceso de regulación.

2. EL SISTEMA RENAL

2.1. Descripción anatómica del sistema renal.

El aparato urinario humano está constituido por dos riñones, dos uréteres, una vejiga y la uretra (figura 4). Este conjunto de órganos trabajan en conjunto para producir, almacenar y transportar la orina.

Los riñones son unas vísceras que llevan a cabo numerosas funciones endocrinas, funcionales y bioquímicas con el fin de mantener la sangre limpia y químicamente equilibrada. Por una parte, los riñones son capaces de retirar los productos metabólicos de la sangre (urea, ácido úrico, creatinina, bilirrubina...), así como productos químicos extraños, fármacos, pesticidas, aditivos de alimentos, etc. (Vander, 1993). Además, estos órganos son los responsables de mantener la homeostasis del organismo mediante la participación en la regulación de la excreción de iones y moléculas orgánicas (como son la glucosa, aminoácidos, proteínas, urea, ácido úrico y otros) (Eaton y Pooler, 2009). Como se explicará en el apartado 4 de esta Introducción, los riñones participan en los mecanismos

reguladores de la PA y del mantenimiento del volumen sanguíneo. Por último, intervienen en la secreción y síntesis de diferentes sustancias (por ejemplo eritropoyetina, glucosa, eicosanoides, etc (Eaton y Pooler, 2009).

En una sección longitudinal de un riñón se distinguen dos regiones, la corteza en la parte externa y la médula en la parte interna. La médula está formada por varias pirámides renales también denominadas pirámides de Malpighi, unidades de aspecto cónico. Los ápices de estas pirámides se proyectan dentro de los cálices menores, cámaras del riñón por donde pasa la orina. Cada pirámide medular, coronada por una región de corteza renal constituye un lóbulo sencillo. El extremo de cada pirámide (llamada papila) se vacía en un cáliz y los cálices se vacían en la pelvis renal. La pelvis transmite la orina a la vejiga urinaria vía el uréter.

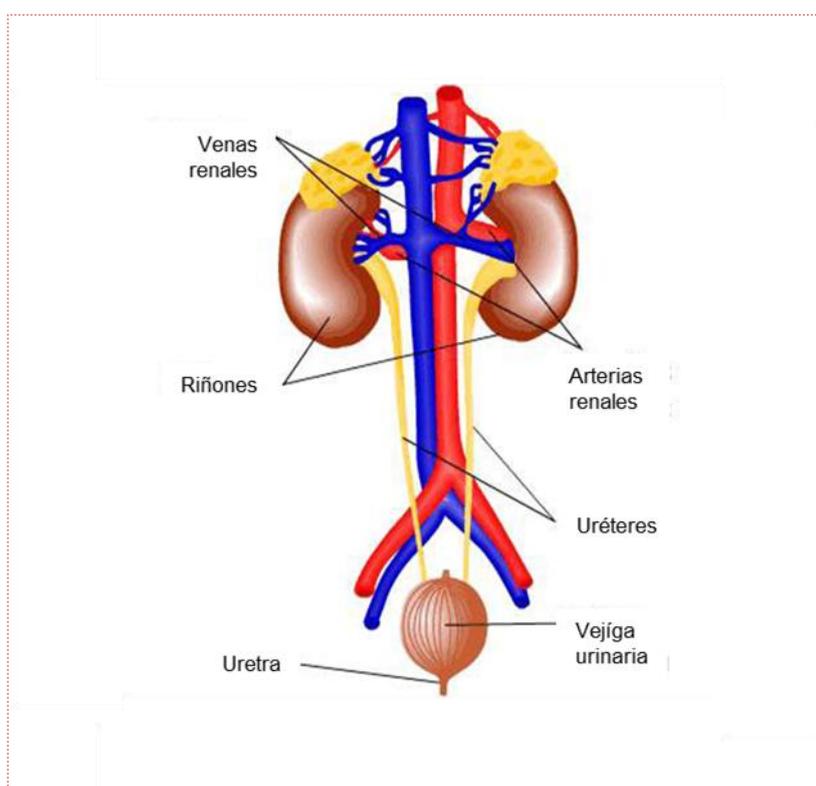


Figura 4. Esquema del sistema urinario.

2.2. Descripción anatómica y funcional de la nefrona

La nefrona es la unidad anatómica y funcional del riñón. El riñón humano está formado por cerca de un millón y medio de nefronas. Cada una de ellas consta de un corpúsculo renal y un sistema tubular que se extiende por fuera del corpúsculo renal.

El riñón lleva a cabo sus funciones mediante dos procesos fundamentales producidos en estas unidades, i) la filtración y ii) el transporte tubular (que comprende la reabsorción y secreción tubular).

El corpúsculo renal o de Malpighi es la estructura donde se produce el proceso de filtración. Está compuesto por el *glomérulo capilar* y la *cápsula de Bowman* que lo recubre (figura 5). Cada glomérulo recibe la sangre de un pequeño vaso llamado arteriola aferente, una ramificación de la arteria renal. Allí la sangre es filtrada a través de la barrera de filtración. La barrera de filtración del corpúsculo renal o membrana glomerular, consta de tres capas: i) el endotelio de los capilares glomerulares, ii) la membrana basal y iii) una capa de células epiteliales especializadas con fenestraciones denominadas podocitos. Tras filtrarse, la sangre sale del glomérulo por otro vaso llamado arteriola eferente que desemboca en una vena interlobular y el líquido filtrado procedente del glomérulo pasa a un espacio dentro de la cápsula, denominado *espacio de Bowman*.

El sistema tubular de la nefrona es el encargado de llevar a cabo los procesos de secreción y reabsorción, que determinan la composición de la orina (Madsen y Tisher, 1986). La secreción es muy importante para determinar las cantidades finales urinarias de potasio, hidrogeniones y algunas otras sustancias, mientras que la reabsorción se encarga de reabsorber casi el 90 % del agua contenida en el filtrado glomerular y prácticamente la totalidad de otros componentes del filtrado, como la glucosa, los aminoácidos y el sodio. Así, los túbulos separan las sustancias que deben ser eliminadas por la orina de las que deben ser conservadas por el organismo sin perder una cantidad excesiva de agua (Hall, 2011).

La pared de los túbulos está constituida por una sola capa de células epiteliales que descansan sobre una membrana basal. La estructura y función de esas células epiteliales varía mucho de un segmento a otro del túbulo ya que este epitelio tubular es el encargado de reabsorber y secretar de forma selectiva los distintos compuestos nombrados anteriormente. La figura 4 muestra una imagen de una nefrona, donde se pueden distinguir las diferentes porciones del sistema tubular desde el glomérulo hasta la pelvis renal: i) *túbulo contorneado proximal*, ii) *rama estrecha descendente del asa de Henle*; iii) *rama gruesa ascendente del asa de Henle*, iv) *túbulo contorneado distal* y v) *túbulo o conducto colector*. La pelvis se continúa con el uréter, y éste con la vejiga urinaria, donde la orina se almacena de manera transitoria y de la cual se elimina en forma intermitente. Después de penetrar a un cáliz, la orina ya no sufre alteraciones. A partir de ese punto, el resto del sistema

urinario sirve sólo como tubo conductor (Bulger y Doblan, 1982; Tisher, 1981).

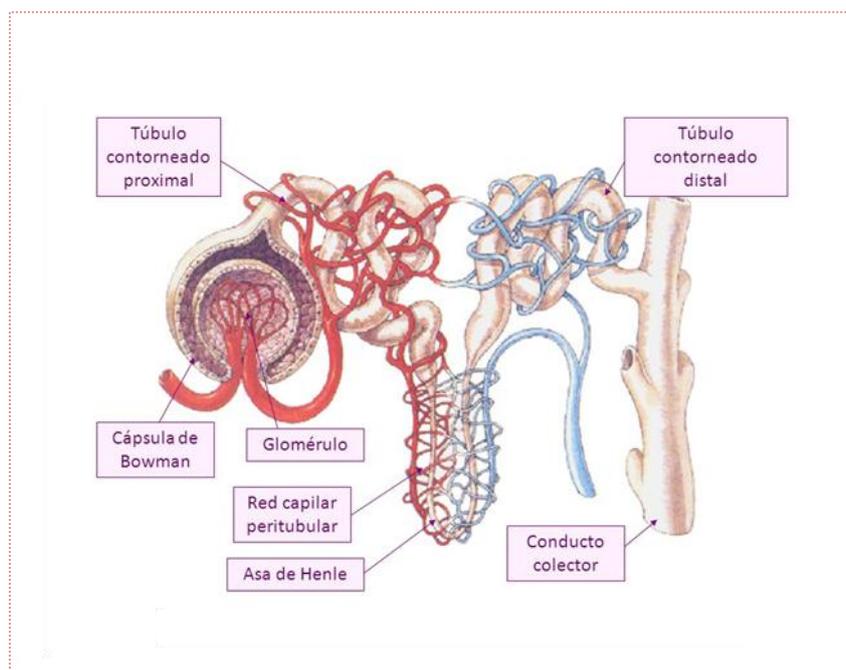


Figura 5. Imagen representativa del glomérulo y del sistema tubular de una nefrona.

3. LA FILTRACIÓN GLOMERULAR

La filtración glomerular es el primer proceso en la formación de la orina y es clave para que los riñones lleven a cabo sus funciones correctamente. Es el proceso en el cual el plasma es filtrado en los capilares glomerulares y entregado a la cápsula de Bowman dando lugar al ultrafiltrado u orina primitiva. La tasa de filtración glomerular (TFG) es la suma de la filtración de todas las nefronas funcionales de ambos riñones por unidad de tiempo. Normalmente los riñones filtran unos 125 mL de plasma por minuto (180 litros por día), lo que corresponde aproximadamente a un 20 % del plasma que pasa por el riñón. La disminución de la TFG es un elemento primordial en el DRA. Hasta ahora, se consideraba un aspecto central, sin embargo, los estudios actuales focalizados en el concepto de DRA subclínico han modificado dicha consideración. Este planteamiento puede variar según el tipo de DRA ya que en el DRA de tipo renal puede existir un daño tisular sin la presencia de un daño funcional, mientras que en el DRA de tipo pre-renal la TFG tiene un papel primordial. Esta idea será ampliamente discutida en el apartado 11.1 de esta Introducción.

3.1. Determinantes de la filtración glomerular

El proceso de formación de ultrafiltrado a través de las membranas capilares glomerulares recibe el nombre de ultrafiltración glomerular. Este proceso se rige por la ley de Starling, que describe el intercambio de líquidos a través de un capilar, según la siguiente fórmula:

$$F = K_f \times \Delta P_f = K_f \times (P_c - P_i - \pi_c - \pi_i)$$

Siendo F la cantidad de fluido filtrado, K_f el coeficiente de ultrafiltración, característica física relacionada con la permeabilidad de la barrera capilar, ΔP_f la presión neta de ultrafiltración, P_c la presión hidrostática intracapilar, P_i la presión hidrostática intersticial, π_c presión oncótica intracapilar generada fundamentalmente por las proteínas plasmáticas y π_i presión oncótica intersticial (Avendaño, 2009).

Como podemos observar en la ecuación anterior este proceso de filtración glomerular está condicionado por la suma neta de las diferentes fuerzas que se originan en los capilares glomerulares y en la cápsula de Bowman (Eaton y Pooler, 2009) (figura 6). Favorecen la filtración la presión hidrostática de los capilares glomerulares (P_c), que es la presión media en los capilares glomerulares y tiene un valor de 60 torr, y la presión oncótica de la cápsula de Bowman (π_i), sin embargo como la concentración de proteínas en la cápsula de Bowman es muy pequeña, este factor es despreciable y se considera cero. Se oponen a la filtración la presión oncótica de los capilares glomerulares (π_g), que es la presión que ejercen las proteínas del plasma no filtradas y tiene un valor de 32 torr, y la presión hidrostática de la cápsula de Bowman (P_i), que es la presión que ejerce el líquido filtrado en la cápsula de Bowman y tiene un valor de 18 torr. La *presión efectiva de ultrafiltración* (PEF), se define como la diferencia entre la presión que favorece la filtración, es decir P_g , y las que se oponen, que son P_i y π_g . Su valor aproximado es de 10 torr.

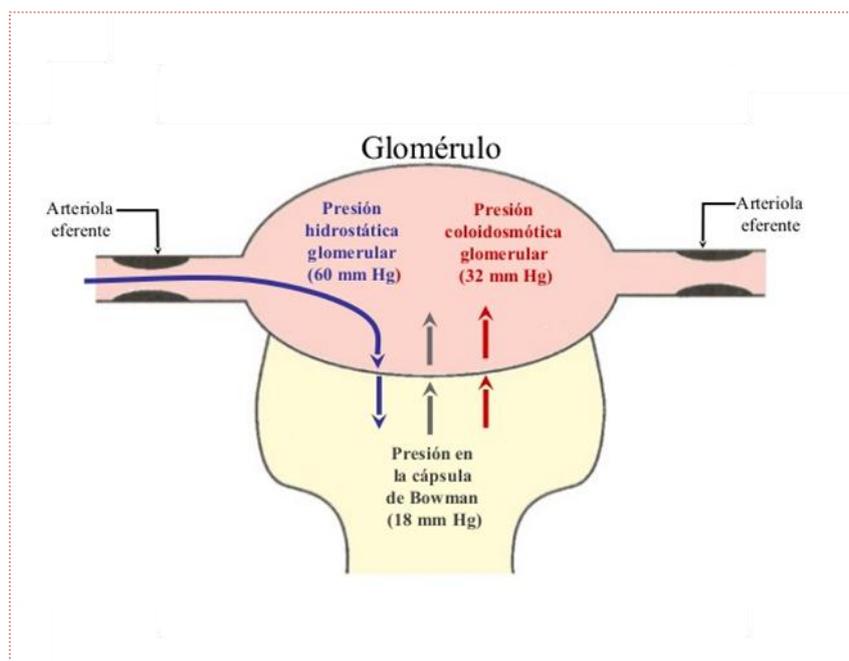


Figura 6. Parámetros determinantes de la tasa de filtración glomerular.

3.2. Regulación de los determinantes de la filtración glomerular

Según se observa en la ecuación anteriormente explicada, la tasa de formación del filtrado glomerular depende de; i) de las características de permeabilidad y superficie de la membrana glomerular, representada por la constante K_f y ii) de la hemodinámica del suministro de sangre a la nefrona, representada por ΔP_f (Avenidaño, 2009). La membrana glomerular tiene selectividad en su permeabilidad en función del diámetro, de la configuración molecular y de la carga eléctrica de las moléculas. En este contexto, el tamaño del poro de la membrana glomerular de 70 angströms determina el paso de las moléculas independientemente de su carga. Además, esta membrana está recubierta por una red de proteoglicanos cargados negativamente de forma que las moléculas catiónicas se filtran más fácilmente que las moléculas aniónicas. Por ello las proteínas, que presentan carga negativa, producen una repulsión electrostática con las paredes de los poros de la membrana glomerular (Hall, 2011). Estas características son constantes en situaciones fisiológicas aunque pueden cambiar en situaciones patológicas, lo que desembocaría en una alteración de la TFG.

La formación de ultrafiltrado en los capilares glomerulares no necesita gasto local de energía metabólica, sino que la presión necesaria se origina en el sistema cardiovascular, que proporciona la fuerza necesaria para filtrar fluido a través de la

pared capilar. Sin embargo, la hemodinámica del suministro de sangre a la nefrona puede alterarse en situaciones fisiológicas, por lo que el organismo ha desarrollado un conjunto de mecanismos de regulación sistémicos y renales para que dichos cambios hemodinámicos no se traduzcan en cambios en la TFG y no desemboken en una situación patológica. Estos mecanismos engloban tanto la autorregulación renal como los mecanismos de regulación de la PA y de la volemia del organismo. Estos mecanismos esquematizados en la figura 7 se explican detalladamente en los siguientes apartados de esta Introducción.

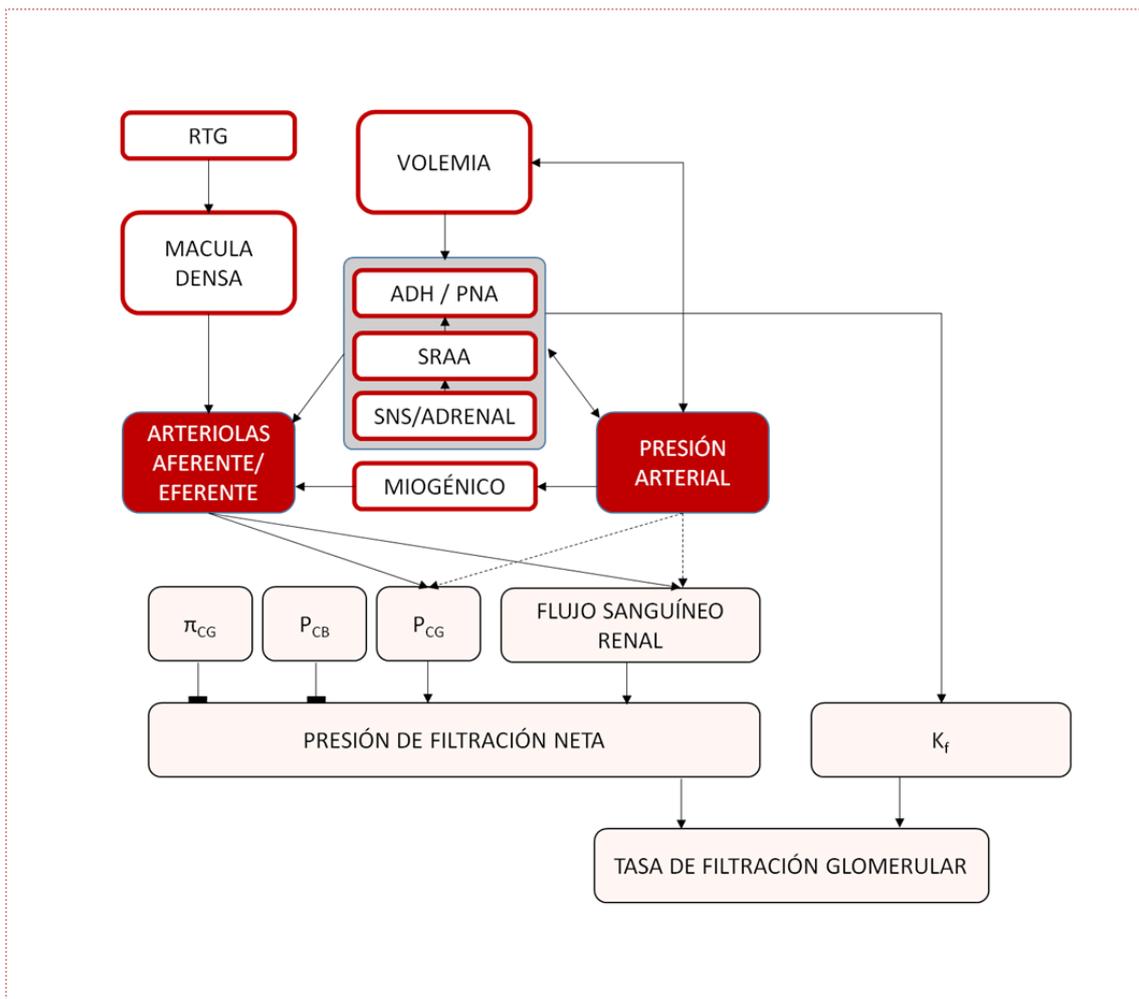


Figura 7. Regulación de los determinantes de la TFG. RTG: retroalimentación tubulo-glomerular; ADH: hormona anti-diurética; SNS: sistema nervioso central; SRAA: sistema renina angiotensina aldosterona; π_g : presión oncótica glomerular; P_{CB} : presión cápsula de Bowman; P_{CG} : presión capilar glomerular; K_f : coeficiente de ultrafiltración.

4. MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA HEMODINÁMICA SISTÉMICA Y RENAL

Es muy importante que la TFG se mantenga constante para que el riñón pueda llevar a cabo todas sus funciones. Como se ha explicado, la hemodinámica del suministro de sangre a la nefrona es determinante para ésta. Esta hemodinámica está condicionada por los *mecanismos de regulación de la PA sistémica*, que actúan sobre el corazón, las RVP o la volemia para controlar la PA. Sin embargo, el organismo no puede permitirse alteraciones en la TFG como consecuencia de cambios en la PA, que puede oscilar en un organismo dentro de un rango como respuesta a diferentes estímulos. Para ello, el propio riñón presenta unos mecanismos de *autorregulación renal* capaces de mantener una TFG constante a pesar de que la PA sistémica sufra variaciones.

4.1. El aparato yuxtaglomerular

El aparato yuxtaglomerular es un dispositivo renal fundamental para poder comprender la homeostasis cardiovascular y renal ya que en él se sintetiza la renina, enzima esencial para el SRAA y es el responsable del retrocontrol tubuloglomerular (RTG). Está situado entre la primera porción del túbulo contorneado distal y de la arteriola aferente y eferente pertenecientes al corpúsculo renal de su propia nefrona (Barajas, 1979). Está formado por tres tipos de células; i) las células yuxtaglomerulares, ii) las células de la mácula densa y iii) las células de Goormaghtigh o del lacis.

Las células yuxtaglomerulares son células mioepiteliales que rodean el final de la arteriola aferente, ricas en gránulos de secreción que producen el 90 % de la renina del organismo. Por otra parte, las células de la mácula densa son células epiteliales diferenciadas de la pared del túbulo recto distal ascendente, que controlan la secreción de renina y la velocidad de filtración glomerular. Estas células actúan como sensores de Na^+ en el túbulo distal y controlan la TFG por lo que juegan un papel fundamental en la homeostasis renal mediante el mecanismo de la RTG (apartado 4.3.2). Por último, las células del lacis son células mesangiales extraglomerulares que poseen finas prolongaciones que originan entre ellas un entramado o lacis, rodeado de una matriz extracelular amorfa. Están en íntimo contacto con el resto de formaciones del aparato yuxtaglomerular y con las células mesangiales intercapilares

del glomérulo (Avendaño, 2009). Estas células responden a múltiples mediadores y controlan la superficie de filtrado.

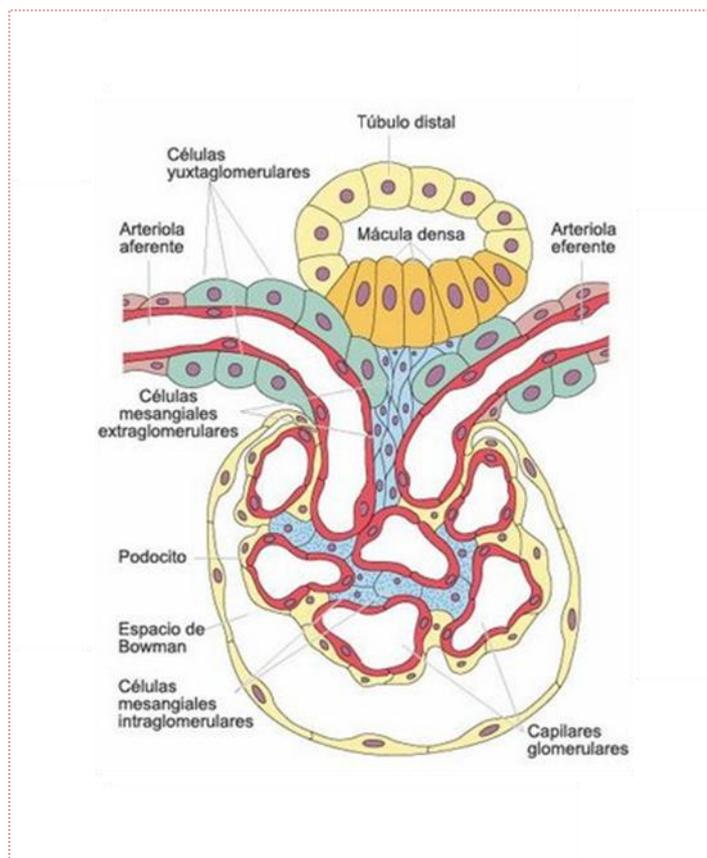


Figura 8. Aparato yuxtaglomerular (adaptada de Hall, 2011).

4.2. Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA)

El SRAA es fundamental en la regulación de la PA y en la etiología de diferentes enfermedades tales como hipertensión, daño cardíaco u otras (Yang, 2015; Steckelings y cols., 2009), cuando se encuentra alterado o desregulado (Crowley y cols., 2006). Existe un SRAA sistémico o global encargado de la regulación de la PA y algunos SRAA locales en ciertos órganos como en el riñón, en el cerebro o en el corazón, por lo que este sistema está involucrado en la regulación de la hemodinámica sistémica y renal.

El SRAA se activa tras la secreción de renina por parte de las células granulares del aparato yuxtaglomerular. Existen tres factores que determinan la cantidad de renina secretada. En primer lugar, los cambios de PA en la arteriola aferente detectados por los barorreceptores intrarrenales estimulan la secreción

directa de renina. Por otra parte, las células granulares están inervadas por fibras nerviosas que provienen del centro vasomotor simpático, que estimulan la liberación de renina en respuesta a los cambios de presión detectados por los barorreceptores arteriales (ver apartado 4.4.1). En último lugar, la macula densa es capaz de estimular la secreción de renina a través de la RTG (ver apartado 4.3.2).

La renina secretada por las células granulares alcanza el sistema vascular y transforma la molécula angiotensinógeno, proveniente del hígado, en angiotensina I. Posteriormente, ésta es transformada en angiotensina II gracias a la acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), sintetizada en las células endoteliales de la vasculatura, particularmente en el pulmón (Eaton y Pooler, 2009). La angiotensina II es una de las moléculas principales implicadas en la homeostasis renal y sistémica. Es el mayor efector del SRAA, debido a su efecto vasoconstrictor, anti-natriurético y anti-diurético: (i) se une a los receptores AT_1 de los vasos sanguíneos estimulando su contracción, aumentando de esta forma la resistencia vascular sistémica (de forma preferente en la arteriola eferente que presenta mayor cantidad de receptores AT_1); (ii) favorece la retención de Na^+ y agua mediante la activación de los transportadores de Na^+ en diferentes porciones del sistema tubular renal y mediante la estimulación de la liberación de aldosterona en la corteza adrenal; (iii) favorece la liberación de vasopresina/ hormona antidiurética/ ADH desde la pituitaria, lo que incrementa la retención de líquido; (iv) promueve la liberación de norepinefrina/noradrenalina tras estimulación simpática (Klabunde, 2011), con un potente efecto vasoconstrictor.

4.3. Autorregulación renal

Como se ha explicado anteriormente, si no existiese ningún mecanismo de regulación renal, las variaciones momentáneas en la PA ante diferentes estímulos se traducirían en cambios en el FSR, y como consecuencia, en oscilaciones en la TFG. Sin embargo, el riñón es capaz de mantener relativamente constante el FSR y, por tanto, la presión intraglomerular, ante cambios en la PA sistémica gracias a *la autorregulación renal*, dentro de un rango determinado de variación de la PAM (entre 80-160 mmHg) (figura 9).

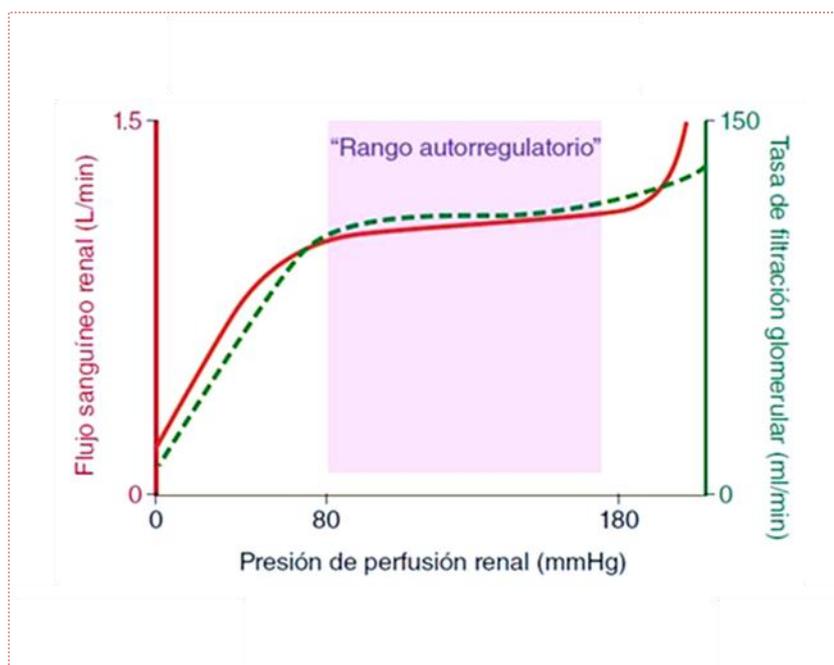


Figura 9. Autorregulación renal. Relación entre la TFG, el FSR y la PPR (adaptada de Eaton y Pooler, 2009).

Como se ha explicado, la TFG depende de las fuerzas netas producidas tanto en los capilares glomerulares como en la cápsula de Bowman. Dentro de éstas, la presión hidrostática intracapilar (P_g) depende de la presión de perfusión renal (PPR) y de las resistencias vasculares de la arteriola aferente y eferente (Brenner y Humes, 1977; Deen y cols., 1974). El FSR depende de la PPR y de las resistencias vasculares renales (RVR) según la fórmula ($FSR = PPR / RVR$) (Hall, 2011). La autorregulación renal es capaz de modificar las RVR para que los cambios en la PPR no se traduzcan en cambios en el FSR, y como consecuencia, en la presión hidrostática intraglomerular. El riñón controla las RVR principalmente mediante dos mecanismos: (i) el efecto miogénico; (ii) la retroalimentación tubulo-glomerular (RTG), aunque en la actualidad, se discute sobre la existencia de un tercer mecanismo implicado (Just, 2007). Sin embargo, se estima que la RTG y la respuesta miogénica engloban el 90 % de la autorregulación renal, siendo el 40 % de este porcentaje correspondiente al efecto miogénico (Kleinstreuer y cols., 2008).

4.3.1. Mecanismo miogénico

El mecanismo miogénico se puede definir como el fenómeno mediante el cual la propia arteriola aferente detecta los cambios en la PA actuando como un mecanorreceptor y responde dilatándose o contrayéndose para mantener el FSR, y

como consecuencia, la TFG (Clastrom y cols., 2015). Se ha demostrado que este mecanismo actúa de forma independiente a las variaciones del FSR ya que detecta las variaciones en la presión transmural del vaso, según estudios realizados en arteriolas aferentes aisladas en ausencia de flujo (Cupples y Braam, 2007).

4.3.2. Retroalimentación tubulo-glomerular

La RTG permite controlar la TFG en relación a la cantidad de Na^+ filtrado que llega a la mácula densa, mediante una mayor o menor contracción de la arteriola aferente (figura 10) (Just, 2007). Estas células presentan cotransportadores $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ (NKCC2) (Obermüller y cols., 1996) que actúan como sensores, detectan la concentración de Na^+ que llega a la parte final del asa de Henle y activan la RTG para mantener la homeostasis renal mediante vías de señalización aún no comprendidas por completo (Vallon, 2003).

En situaciones de hipoperfusión renal, la TFG se encuentra disminuida, de forma que menos Na^+ es filtrado al sistema tubular. La baja concentración de Na^+ es detectada por las células de la mácula densa y éstas activan una cascada de señalización que da lugar a la activación del SRAA. Estas vías de señalización son, actualmente, motivo de numerosos estudios. Se sugiere que, en la RTG, la liberación de renina por las células granulares del aparato yuxtglomerular es dependiente de la enzima ciclooxygenasa-2 (COX-2) (Harris & Breyer, 2001; Harris x cols., 2004; Green y cols., 2012; Harris, 2013). Diferentes estudios sugieren que la llegada de una baja concentración de Na^+ a las células de la mácula densa induce una disminución en la transcripción de los co-transportadores NKCC2, y eso provocaría un aumento del Ca^{2+} intracelular. Este Ca^{2+} estimularía la actividad de la fosfolipasa A_2 , y por tanto, la síntesis de PGs dependiente de COX-2 (ver síntesis de prostaglandinas en el apartado 6.1). Estas PGs, tendrían dos efectos: (i) favorecerían la dilatación de la arteriola aferente de forma directa; y (ii) serían las responsables de la liberación de renina, y con ello, de la activación del SRAA por parte de la RTG (Persson y cols, 2004).

En situaciones de hiperperfusión renal el escenario propuesto es completamente diferente. Alta cantidad de Na^+ alcanzaría las células de la mácula densa, y mediante la formación de diferentes mediadores, se estimularía la contracción de las células granulares (vía receptores AT_1) y se inhibiría la secreción de renina, lo que daría lugar a una disminución de la TFG (Castrop, 2007; Persson, 2004; Vallon, 2003). Diferentes estudios proponen la adenosina como principal

mediador (Osswald y cols., 1997; Ren y cols., 2004) aunque otros focalizan sus estudios en el ATP, el óxido nítrico o la angiotensina II como moduladores del proceso (Vallon, 2003).

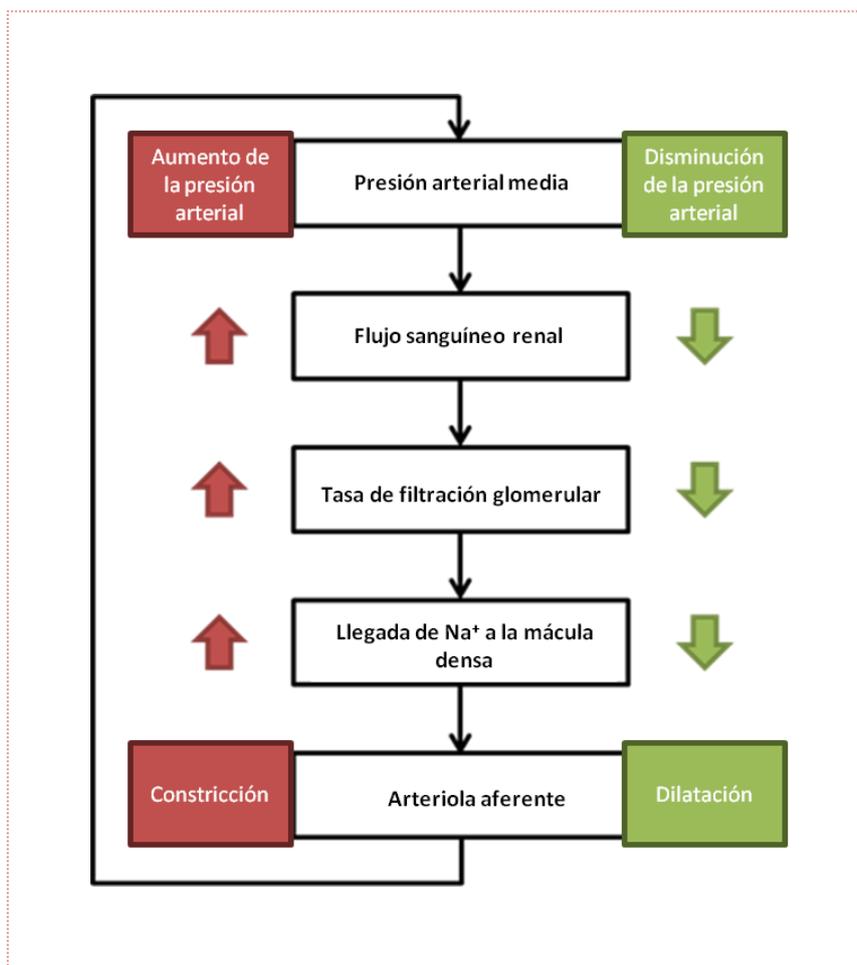


Figura 10. Representación esquemática de la respuesta de la RTG ante variaciones en la PAM (adaptada de Rhoades y Tanner 2003).

4.4. Regulación de la PA en el control de la TFG

Como se ha explicado, ante variaciones de la PA el propio riñón presenta sus mecanismos de regulación para evitar que dichos cambios alteren la función renal. No obstante, el propio organismo presenta mecanismos de regulación de la hemodinámica sistémica que repercuten de forma directa o indirecta en el mantenimiento de la TFG en el riñón. Entre ellos, podemos diferenciar, en primer lugar, diferentes mecanismos de regulación que actúan sobre el corazón y las resistencias de la vasculatura a corto y medio plazo y, en segundo lugar, mecanismos

de regulación que controlan la volemia del organismo, los cuales actúan a largo plazo.

4.4.1. Mecanismos nerviosos y hormonales sobre el corazón y las RVP

El sistema nervioso controla la circulación sanguínea y la PA gracias al sistema nervioso autónomo (SNA). El SNA está formado por el sistema nervioso simpático (SNS) y el sistema nervioso parasimpático (SNP) con efectos antagónicos. El SNS tiene un papel importante en el control de la vasculatura, mientras que el SNP tiene mayor influencia sobre la regulación cardíaca. La inervación simpática del corazón produce aumento de la fuerza de contracción y de la fc, mientras que la inervación parasimpática tiene un efecto opuesto (Estañol y cols. 2009). En la vasculatura, el SNS tiene un papel vasoconstrictor mediado por el neurotransmisor noradrenalina mientras que el SNP tiene un efecto vasodilatador mediado por el neurotransmisor acetilcolina.

Para poder detectar los cambios de PA en el organismo, el sistema cardiovascular posee receptores (barorreceptores y/o quimiorreceptores) que envían la señal al centro vasomotor perteneciente al SNC. Éste interpreta la señal y modula la fc, las RVP y la distensibilidad venosa a través de las fibras eferentes con el fin de mantener la PA. Existen dos tipos de barorreceptores involucrados en la regulación de la PA denominados arteriales y cardiopulmonares. Los barorreceptores arteriales son terminales aferentes de células nerviosas situadas en las paredes de la arteria carótida y del arco de la aorta (Eaton y Pooler, 2009) que responden a un amplio rango de oscilación de la PA entre 50-150 mmHg (Dampney y cols., 2002). Por otra parte, los barorreceptores cardiopulmonares ó receptores de distensión son receptores de baja presión situados en la aurícula cardíaca y en diferentes partes de la vasculatura pulmonar. Detectan cambios en el volumen sanguíneo (Ghai, 2013), de forma que juegan un papel principal en la regulación del volumen sanguíneo mediante la excreción de Na⁺ y agua (Eaton y Pooler, 2009). Estos dos tipos de barorreceptores tienen un efecto directo sobre la fc, las RVP y la distensibilidad venosa, y además, son capaces de activar el SRAA (aparato 4.2) y promover la liberación de diferentes hormonas (como la adrenalina, la noradrenalina...) cuando sean requeridas con el fin de mantener la PA. Ante una bajada de la PA, la estimulación del SNS no sólo provoca una activación directa a nivel cardíaco y vascular sino también promueve, por una parte, la liberación de adrenalina y

noradrenalina desde la médula suprarrenal, las cuales actúan sobre el sistema circulatorio provocando una vasoconstricción, y por otra parte, estimula la secreción de renina con la consecuente activación del SRAA.

Además, en el riñón existen unos barorreceptores renales situados en las paredes de la arteriola aferente. Estos barorreceptores no son células nerviosas, son células especializadas denominadas células yuxtaglomerulares ó granulares que forman parte del aparato yuxtaglomerular. La detección de cambios de la PA por estos barorreceptores activa el SRAA, con efectos en la vasculatura y en la excreción de Na^+ (Eaton y Pooler, 2009). En general, se considera que los barorreceptores rápidamente se adaptan y paran de enviar señales nerviosas a pesar de que el estímulo continúe (Cowley, 1992; Eckberg, 1977; López-Hernández & López-Novoa, 2006). Sin embargo, los barorreceptores renales son una excepción, al menos aquellos relacionados con la regulación de la PA. Parece ser que estos barorreceptores no se adaptan y permanecen activos mientras que el estímulo permanezca (DiBona, 2004; Lohmeier y cols., 2005; López-Hernández y López-Novoa, 2006; Johns, 2013).

Por otra parte, también existen quimiorreceptores situados en la pared de la carótida y en los cuerpos aórticos que detectan los cambios en la presión parcial de oxígeno de la sangre arterial y, mediante estimulación simpática, promueven una vasoconstricción sistémica (excepto en los vasos sanguíneos del cerebro y del corazón) y un aumento en la ventilación pulmonar con el fin de aumentar el oxígeno en la sangre arterial (Dampney y cols., 2002).

4.4.2. Homeostasis de la volemia para controlar el FSR

La regulación de la volemia juega un papel fundamental en el mantenimiento de la PA y por tanto, de la TFG. Se lleva a cabo gracias a un control sistémico (en el que actúan múltiples señales hormonales y nerviosas) y a un control local en el riñón que regula la cantidad de Na^+ y agua excretados (Hall, 2011).

Los barorreceptores arteriales detectan cambios en la PA, y el riñón interpreta estos cambios de PA como cambios en el balance total de Na^+ . Ante una disminución de la PA, estos barorreceptores envían señales al centro vasomotor, y como consecuencia se activa el SRAA. La angiotensina II resultante aumenta la reabsorción de Na^+ y agua, de forma directa, a través de la unión directa a las células tubulares

y, de forma indirecta, a través de la estimulación de la liberación de la aldosterona (Hall, 2011). Esta hormona controla la reabsorción de Na^+ en la parte distal de la nefrona (túbulos y conducto colector). Aunque el mayor punto de control de secreción de la aldosterona es la angiotensina II, su secreción también puede ser estimulada por elevadas concentraciones de K^+ en el plasma. La secreción de ADH también es favorecida por la angiotensina II. Su principal función es aumentar la permeabilidad de los conductos colectores corticales y medulares, aunque también aumenta la reabsorción de Na^+ en los conductos colectores corticales, por lo que se disminuye la excreción de agua y Na^+ . Gracias a esta hormona se puede llevar a cabo un control de la excreción de agua independientemente de la excreción de Na^+ . Existen osmoreceptores que detectan los cambios en la osmolalidad de los líquidos del organismo. Se encuentran situados en los tejidos circundantes al tercer ventrículo cerebral. Al detectar los cambios en la composición del plasma, envían señales nerviosas hasta las células del hipotálamo, y éstas promueven la liberación de la hormona ADH (Eaton y Pooler, 2009).

Por el contrario, ante un aumento de la PA, la secreción de ADH es inhibida por la acción de los barorreceptores. Asimismo, el riñón responde aumentando la excreción de Na^+ y agua mediante el proceso denominado *natriuresis y diuresis por presión*. Este se produce sin alteraciones en la TFG ni en el FSR, modificando directamente la reabsorción tubular de Na^+ . Esta respuesta parece depender del descenso de la concentración de angiotensina II intrarenal. El aumento de la PA, y como consecuencia, de la presión de perfusión intrarrenal, reduce la secreción de renina y de angiotensina II. Esto da lugar a la vasodilatación de los capilares peritubulares medulares, produciendo un aumento de la presión capilar, y como consecuencia, un aumento de la presión hidrostática intersticial que conduce a una reducción en la reabsorción tubular de Na^+ , con la subsecuente natriuresis (Avendaño, 2009).

Además, los barorreceptores cardiopulmonares o receptores de distensión detectan las variaciones en la volemia, específicamente en el GC, por lo que están involucrados en la regulación de la excreción de Na^+ y agua. Ante un aumento de la volemia, la distensión de la aurícula estimula estos barorreceptores, y éstos promueven la liberación desde el corazón de los péptidos natriuréticos, el péptido natriurético atrial (PNA) y el péptido natriurético cerebral (PNB). Estos péptidos inhiben la liberación de renina, la reabsorción de Na^+ en el túbulo colector medular y

la acción de la angiotensina II, lo que favorece una vasodilatación de la arteriola aferente y un aumento de la filtración (Eaton y Pooler, 2009)

Como se ha podido explicar, los mecanismos de regulación de la hemodinámica sistémica y renal forman una compleja red de moléculas interconectadas. La desregulación de esta compleja red puede dar lugar a ciertas patologías cardiovasculares y renales. En el caso del sistema renal, el fallo de alguna de estas vías de señalización necesarias para mantener la TFG en casos de hipoperfusión da lugar a un tipo de DRA de tipo pre-renal.

5. DAÑO RENAL AGUDO PRE-RENAL

5.1. El daño renal agudo: definición y tipos

Como se ha explicado anteriormente, el DRA es la pérdida repentina de la capacidad de los riñones de mantener un balance hidro-electrolítico adecuado y de depurar la sangre de fármacos, tóxicos y productos nocivos de desecho procedentes del metabolismo. Como consecuencia, se produce una retención de los fluidos (oliguria o anuria) y una acumulación de productos normalmente encontrados en la orina (uremia), especialmente de creatinina y urea (azotemia). La etiología clínica del DRA es variada, pudiendo ser consecuencia de la administración de fármacos, de la exposición a diferentes toxinas medioambientales, de procedimientos quirúrgicos, de la aparición de una sepsis o de una combinación de varios factores, entre otras (Bagga y cols., 2007; Melnikov y Molitoris, 2008).

Para el funcionamiento renal adecuado se necesita una perfusión renal óptima, un parénquima renal íntegro y una correcta permeabilidad de las vías excretoras. La alteración súbita de cualquiera de estas características puede ocasionar un deterioro de la función renal. Dependiendo del elemento funcional alterado podemos encontrar tres tipos de DRA: (i) DRA pre-renal, si la etiología del daño es una alteración en la perfusión renal; (ii) DRA renal o intrínseco, en el que el daño aparece como consecuencia de una alteración en el parénquima renal y (iii) DRA post-renal, si la causa del daño es la obstrucción de las vías urinarias (Avenidaño, 2009). Las causas pre-renales y renales, representan el mayor porcentaje de casos, aunque no es infrecuente observar que la etiología sea multifactorial y que un mismo agente nocivo produzca simultáneamente efectos pre-renales y renales (Esteller y

Cordero, 1998; Singri, 2003). La tabla 1 resume las principales características de los tres tipos de DRA anteriormente mencionados. El DRA más común es el DRA de tipo pre-renal ya que causa el 60-70 % de todos los casos de DRA, mientras que el DRA renal causa el 25 % y el DRA post-renal produce el 5 % de todos los casos de DRA.

TIPO DE DRA	EFFECTO PATOLÓGICO	CAUSA
DRA PRE-RENAL	Hipoperfusión renal y/o alteración de la autorregulación renal	Deshidratación Fármacos Envejecimiento Patologías
DRA RENAL	Daño del parénquima renal	Isquemia Toxinas Fármacos
DRA POST-RENAL	Obstrucción súbita del flujo de orina	Fármacos Patologías (tumores, cálculos renales...)

Tabla 1. Características principales de los tipos de DRA.

5.2. Repercusión sanitaria y socioeconómica del DRA.

Este síndrome renal es un problema sanitario y económico muy grave ya que presenta una elevada morbilidad y mortalidad. Se calcula que aproximadamente un 1-7 % de los pacientes que ingresan en los hospitales presentan un DRA (Chertow y cols., 2001; Liangos y cols., 2006) y un 2-7 % de los pacientes ya hospitalizados desarrollan un DRA (Block y Schoolwerth, 2006; Kerr y cols., 2014). Más concretamente, un 1-25 % de los pacientes ingresados en la unidad de cuidados intensivos (UCI) desarrollan un DRA en algún momento (Mendonça y cols., 2000). Además, esta patología renal tiene grandes consecuencias para la salud, no sólo en los grados de mayor severidad en los que se necesita diálisis, sino también en aquellos grados de severidad media o DRA subclínico, lo que conlleva un gran gasto socioeconómico asociado (Sancho Martínez y cols., 2015). Se estima que los gastos

directamente asociados al DRA son el 1 % del gasto sanitario total (Kerr y cols., 2014) y el 5 % de los gastos hospitalarios totales (Chertow y cols, 2005, Vandijck y cols., 2007). Este gasto proviene de la diálisis, la monitorización de los pacientes y los cuidados asociados. El 7,5 % de los pacientes hospitalizados por DRA necesitará diálisis para toda la vida (Linkermann y cols., 2014) y el 50 % necesitará atención post-hospitalaria (Fischer y cols., 2008).

5.3. El DRA pre-renal

Se considera DRA pre-renal o azotemia pre-renal a una disfunción renal transitoria producida por factores que comprometen la perfusión renal sin daño en las estructuras renales. La disminución de la PPR puede estar producida por una disminución aguda de la PA sistémica más allá de los límites de la autorregulación, o por una alteración en la autorregulación renal necesaria en una situación de hipoperfusión renal transitoria.

En la práctica clínica, el primer escenario se reproduce en casos de disminución del volumen extracelular efectivo ya sea producido por pérdidas reales (hemorragias, vómitos, diarreas, diuréticos, etc) o por redistribución (aparece en ciertas hepatopatías, peritonitis, malnutrición...) y en patologías en las que el GC se encuentra disminuido (arritmias, insuficiencia cardiaca congestiva, infarto agudo de miocardio...) (Padhi y cols., 2013). Por otra parte, la desregulación de la autorregulación renal puede producirse por vasodilatación periférica (producida por fármacos antihipertensivos, sepsis, shock anafiláctico...), por vasoconstricción renal (por inhibición de síntesis de PGs, sepsis, síndrome hepatorenal, envejecimiento, vasculopatía diabética, fracaso renal crónico...) o por vasodilatación de la arteriola eferente (producido por fármacos inhibidores de la angiotensina II) (Avendaño, 2009).

5.3.1. Fisiopatología del DRA pre-renal

Como se ha explicado en el apartado 1.4, gracias a la autorregulación renal el FSR, y por tanto, la TFG, se mantienen constantes a pesar de las oscilaciones de la PA sistémica del organismo dentro de un rango determinado de PAM. Por ello, la hipoperfusión que se presenta en un DRA de tipo pre-renal implica un fallo en los mecanismos de autorregulación renal y en los mecanismos de regulación de la PA sistémica.

Antes de la aparición del DRA tipo pre-renal, se produce en el riñón una fase de

compensación denominada “estado pre-prerenal” en la que se activan los mecanismos compensatorios tras un estado de hipoperfusión transitoria. En esta fase hay tres puntos claves: el GC, la fracción de filtración (relación entre el filtrado glomerular y el FSR) y la proporción del filtrado glomerular reabsorbido por los túbulos. Una disminución del GC se traduce en una disminución del FSR. Como se ha explicado en el apartado 4.3, ante una bajada del FSR se produce un aumento de las RVR para mantener la PPR, y con ello, la TFG. Además, en esta situación se aumenta la fracción de filtración y la fracción de fluido filtrado absorbida en la zona tubular (Macedo y Metha 2010). El SRAA, el SNS y la secreción de vasopresina/ADH tienen un papel clave en esta fase compensatoria. El fallo en cualquiera de estos mecanismos que mantienen este estado pre-prerenal desembocaría en el DRA de tipo pre-renal.

Más concretamente, como se ha mencionado en el apartado 4 existen numerosas vías de señalización implicadas. En resumen, los mecanismos de regulación sistémica y renal esenciales para contrarrestar una situación de hipoperfusión renal son los siguientes:

- Efecto miogénico: La arteriola aferente se contrae rápidamente para contrarrestar esa disminución de la presión de perfusión.
- RTG: Las células de la mácula densa detectan esa disminución en la TFG a través del Na^+ que llega a ellas. Como consecuencia, activan la liberación de renina y del SRAA.
- Liberación de renina mediada por los barorreceptores situados en las células granulares.
- Activación del SNS: Los barorreceptores situados en el arco aórtico detectan la hipovolemia. Para contrarrestar dicha situación el SNS estimula la liberación de renina en las células granulares, la liberación de ADH por parte de la glándula pituitaria, la contracción directa de la arteriola aferente y eferente (vía α -adrenoreceptores), la reabsorción de Na^+ en la zona tubular y la liberación de epinefrina (adrenalina) por las glándulas adrenales.
- La hipovolemia es detectada por los receptores de distensión situados en la aurícula derecha. No se estimula la liberación del PNA ni del PNB, lo que favorece la liberación de renina y la acción de la angiotensina II, así como una reabsorción de Na^+ en la parte tubular de la nefrona.

5.3.2. Fármacos que alteran la función renal

Los fármacos que alteran la funcionalidad renal interfieren con la capacidad del riñón para mantener la TFG, para diluir o concentrar la orina y para eliminar K^+ (Avendaño, 2009). Los fármacos más comunes con estos efectos adversos son los AINEs, los inhibidores de angiotensina II y los diuréticos, que explicaremos ampliamente en los siguientes apartados.

6. ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS

6.1. La enzima ciclooxigenasa en el riñón

Los AINEs son una de las familias de fármacos más prescritas en el mundo debido a su efecto analgésico, antipirético y antiinflamatorio. Se estima que en Estados Unidos se prescriben más de 70 millones de AINEs anualmente (Awodele y cols., 2015) ya que más de 30 millones de personas consumen diariamente algún tipo de AINE en este país. En España se venden más de 40 millones de estos fármacos según el informe fármaco-terapéutico del Sistema Nacional de Salud de España de 2009 (Loza, 2011). Existe una gran variedad de fármacos dentro de esta familia que pueden ser adquiridos sin prescripción y que se utilizan para tratar numerosas afecciones en la clínica relacionadas con dolor agudo o crónico. Los AINEs inhiben la síntesis de PGs, moléculas implicadas en los procesos inflamatorios, mediante la inhibición de la molécula ciclooxigenasa (COX), enzima clave en la síntesis de las PGs. Sin embargo, estos fármacos presentan efectos renales adversos, ya que la enzima COX tiene un papel fundamental en la homeostasis renal. La síntesis de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico se puede dividir en tres fases detalladas en la figura 11 (Dunn y Zambraski, 1980; Nasrallah y cols., 2007).

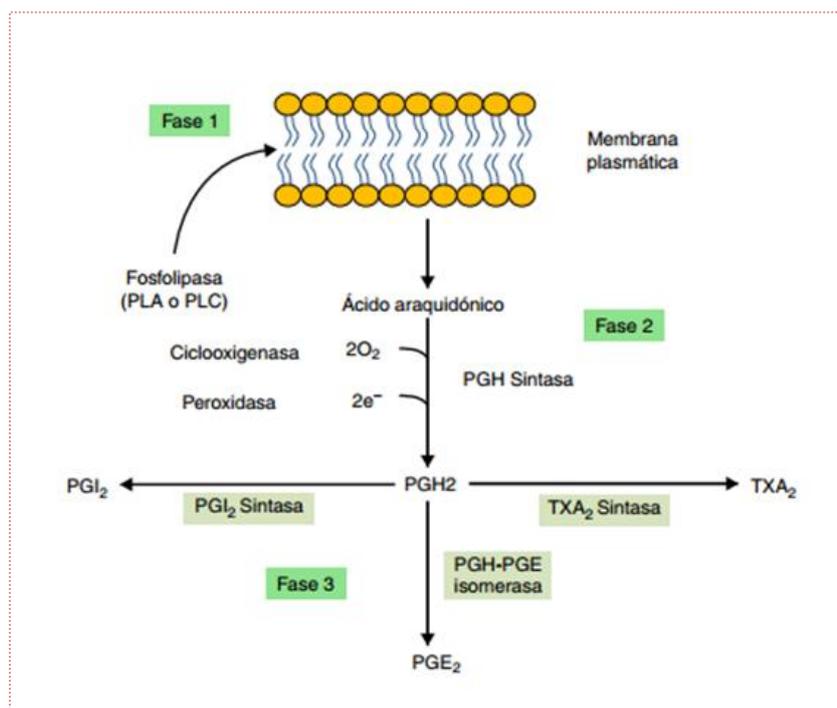


Figura 11. Esquema de la síntesis de prostanoideos (adaptada de Díaz-Casasola, 2015).

En el riñón existen dos isoformas de la enzima COX, COX-1 y COX-2. La enzima COX-1 es una enzima constitutiva que se expresa en los túbulos colectores, en las células mesangiales del glomérulo, en la vasculatura renal (Harris y Breyer, 2001), en las células epiteliales de la cápsula de Bowman y en las células intersticiales (Cheng y Harris, 2004). Esta isoenzima se encarga del control de la hemodinámica renal y de la TFG (Hörl, 2010). Por otra parte, la isoenzima COX-2 actúa como una enzima inducible que se expresa en el riñón tras un estímulo dañino o inflamatorio, aunque, en la actualidad, se ha demostrado que COX-2 también existe de forma constitutiva en el riñón de los mamíferos adultos. Se expresa abundantemente en las células intersticiales de la médula renal (especialmente en las células de la papila) (Cheng y Harris, 2004), en la rama ascendente cortical del asa de Henle y en las células de la mácula densa (Hao y Breyer, 2008; Gambaro y Perazella, 2003). Recientes estudios han demostrado que también se localiza en bajas concentraciones en los podocitos, en las células del músculo esquelético de las arteriolas renales (Harris y cols., 2013; Cheng y Harris, 2004; Harris y Breyer, 2001), en la vasa recta de la médula renal y en los túbulos colectores (Kim, 2008). Esta isoenzima se encarga de controlar la hemodinámica renal (la TFG y el FSR), la liberación de renina por parte de la mácula densa y la homeostasis de Na⁺, K⁺ y del agua en el riñón (Gambaro y Perazella, 2003).

6.2. COX-2 y la retroalimentación tubuloglomerular

Como se ha explicado en el apartado 4.3.2, la RTG se encarga de mantener constante la TFG detectando la concentración de Na^+ que alcanza la mácula densa. Recientes estudios demuestran que COX-2 juega un papel fundamental en la RTG, concretamente en la liberación de renina desde las células granulares del aparato yuxtaglomerular (Harris y Breyer, 2001; Harris y cols., 2004; Green y cols., 2012; Schnermann, 2001; Harris, 2003; Harris, 2013). Estos estudios observan que la expresión de COX-2 aumenta en la mácula densa en aquellas situaciones en las que la función renal es dependiente de PGs: por ejemplo tras la administración de inhibidores de angiotensina II, la administración de furosemida, la baja ingesta de sal o una depleción de volumen (Harris y cols., 1994; Cheng y cols., 1999).

En estas situaciones la perfusión renal está comprometida y se produce una disminución de la TFG *transitoria*, por lo que las células de la mácula densa detectan una disminución en la concentración de Na^+ en el espacio tubular. Tras detectarlo, la concentración de Ca^{2+} celular aumentaría, lo que activaría la fosfolipasa A_2 , paso limitante en la síntesis de PGs (Persson y cols., 2004). Finalmente, se sintetizarían PGE_2 y PGI_2 , prostaglandinas que estimularían la secreción de renina desde las células granulares (Harris y Breyer, 2001). Como consecuencia de esta liberación, se sintetiza angiotensina II, molécula que inhibe la liberación de renina mediante dos vías: i) modulando directamente la expresión de COX-2 a través de los receptores de angiotensina II tipo 1 AT_1 (feedback negativo) (Cheng y cols., 1999; Harris y cols., 2004; Harris, 2003; Zhang y cols., 2006) y ii) indirectamente restableciendo el tono intravascular (apartado 6.1) (Harris y Breyer, 2001).

Por otra parte, gracias a la enzima COX-2 situada en la mácula densa se sintetizan también PGI_2 y PGE_2 encargadas de producir un efecto vasodilatador en la arteriola aferente (Harris y cols., 1994) con el fin de contrarrestar la acción vasoconstrictora de la angiotensina II. Además, ciertos estudios demuestran que en los riñones en los que la función renal es dependiente de angiotensina II, las PGE_2 y PGI_2 se generan mayoritariamente por la vía de síntesis de la enzima COX-2 (Hao y Breyer, 2008).

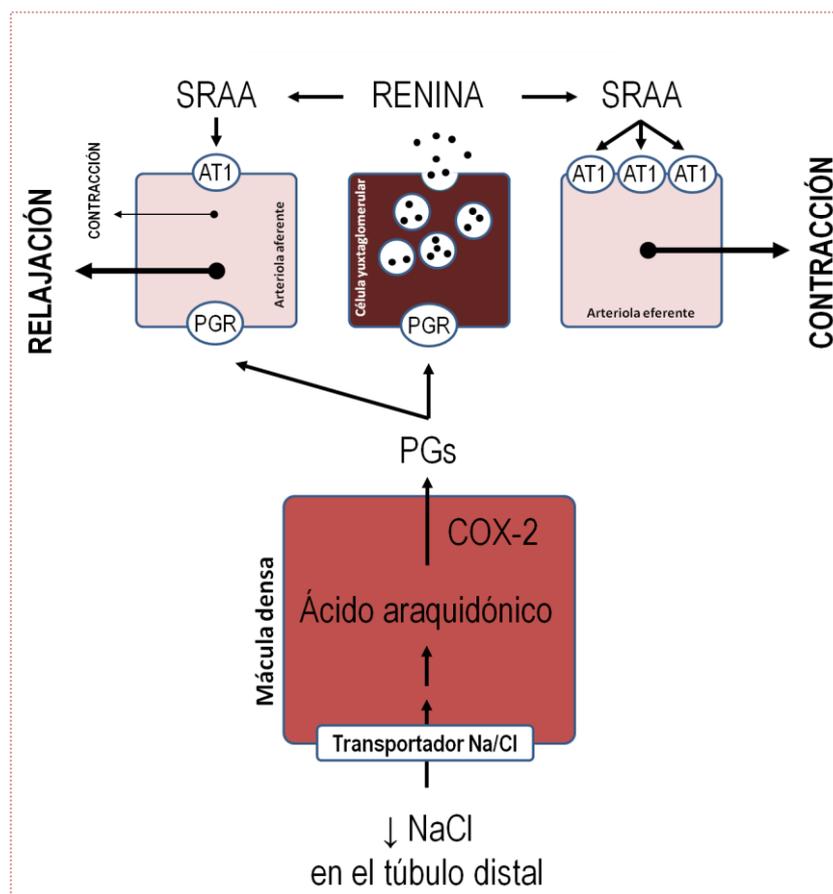


Figura 12. Papel de COX-2 en la mácula densa (adaptada de Prieto-García y cols., 2016). SRAA: sistema renina angiotensina aldosterona; COX-2: ciclooxigenasa 2; PGs: prostaglandinas; PGR: receptor de prostaglandinas; AT₁: receptores de angiotensina II 1.

6.3. AINEs y sus efectos renales adversos

Como se ha explicado en los apartados anteriores, las PGs tienen funciones muy importantes para mantener una correcta hemodinámica renal. Se sabe que en condiciones normales, sin estímulos que alteren esta hemodinámica renal, las PGs no controlan la TFG o el FSR. Sin embargo, estas moléculas tienen un papel crucial en situaciones en las que disminuye el FSR y por tanto, se produce una disminución de la perfusión renal. En este escenario, las PGs son necesarias para contrarrestar la acción de las moléculas vasoconstrictoras liberadas para mantener la PA y el FSR (Hörl, 2010, Brater, 2002, Dunn y zambraski, 1980).

En estas situaciones la administración de AINEs puede causar graves efectos adversos (Brater, 2002; Hörl, 2010; Batlouni; 2010):

- 1) Retención de Na⁺ y edema producido por una inhibición de la síntesis de PGE₂.

- 2) Retención de K^+ e hipercalcemia debido a la inhibición de la síntesis de PGI_2 , a la liberación de renina y de aldosterona.
- 3) DRA con alteración en la hemodinámica renal, en aquellas situaciones en las que la perfusión renal ya estaba comprometida y la autorregulación renal es necesaria para una correcta función renal. Esta situación puede darse en ciertas enfermedades hepáticas y cardíacas, en el síndrome nefrótico, en el daño renal crónico, al sufrir una depleción de volumen, o como consecuencia del envejecimiento.
- 4) Pueden dar lugar a DRA por necrosis tubular en presencia de factores predisponentes (Hernando, 2009).

7. INHIBIDORES DE LA ANGIOTENSINA II

La angiotensina II es una de las moléculas principales del SRAA (explicado en el apartado 4.2), mecanismo esencial en la regulación de la PA sistémica y de la autorregulación renal.

En el riñón, la angiotensina II es capaz de actuar en diversos lugares: i) interactúa con el SNS, ii) produce vasoconstricción en la arteriola aferente y eferente (mayoritariamente en la arteriola eferente) a través de los receptores AT_1 ; iii) estimula la liberación de ADH, y por tanto, la retención de agua en los túbulos colectores; y iv) promueve la retención de Na^+ y agua dependiente de aldosterona (Te Riet y cols., 2015). La consecuencia final de todos estos procesos es el aumento de la PA sistémica, del FSR y de la TFG. Además, la angiotensina II estimula la síntesis de PGs vasodilatadoras en el riñón para contrarrestar su acción vasoconstrictora.

Sin embargo, la angiotensina II presenta un papel fundamental en la patogénesis de diversas enfermedades, como la hipertensión, el fallo cardíaco y otras (Yang, 2015; Steckelings y cols., 2009), en las cuales el SRAA se encuentra desregulado (Crowley y cols., 2006). Por esta razón, la inhibición de la angiotensina II a través de los fármacos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAs) o de los antagonistas de los receptores de angiotensina II (ARA II) es la primera acción terapéutica para tratar dichas dolencias. La figura 13 resume el SRAA y los puntos de acción de ambos fármacos.

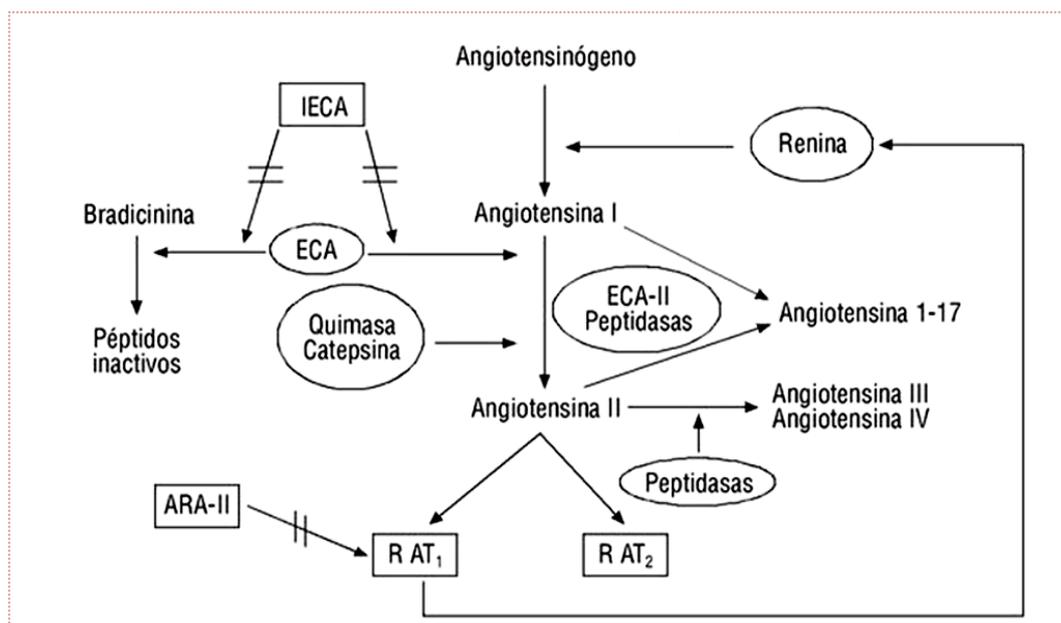


Figura 13. Resumen del SRAA y del punto de acción farmacológica de los IECA y los ARA-II para inhibirlos (adaptada de Morales-Oliva y Estañ-Yago, 2009). IECA: inhibidor de la enzima convertora de angiotensina; ARA-II: antagonistas de los receptores de angiotensina II; R AT₁: receptores de angiotensina tipo 1; R AT₂: receptores de angiotensina tipo 2.

7.1. Inhibidores de la enzima convertora de angiotensina (IECA)

Los IECA son fármacos antihipertensivos comúnmente usados para tratar la hipertensión dependiente de angiotensina II, ya que inhiben la síntesis de la angiotensina II y la degradación de la molécula bradicininina debido a la inhibición de la enzima convertora de angiotensina II (ECA) (Erdos, 1990). La ECA es una proteína glicosilada integral de membrana que actúa como una enzima dipeptidil carboxipeptidasa dependiente de zinc (Harrison y Acharya, 2014), esencial en las dos vías de señalización mencionadas anteriormente. Por un lado, esta enzima cataliza la conversión de angiotensina I en angiotensina II, con las funciones explicadas anteriormente. Además, favorece la degradación de la angiotensina 1,7, heptapéptido que se forma a partir de la angiotensina I o la angiotensina II gracias a la acción de la enzima ECA-II, homóloga de la enzima ECA. Esta molécula tiene una acción vasodilatadora, ya que favorece la liberación de óxido nítrico, de PGs y del factor hiperpolarizante endotelial (FHDE) (Schindley y Bramage, 2007). Por otra parte, es indispensable para la degradación de la bradicininina en fragmentos inactivos (figura 12). La bradicininina es un metabolito esencial del sistema caliceína-cinina que presenta diversas funciones en el riñón: i) tiene un efecto vasodilatador ya que

estimula la síntesis de las PGs renales (Schör, 1992) y ii) posee un efecto natriurético actuando directamente en los túbulos renales. Además, esta molécula es capaz de estimular la producción de óxido nítrico en la vasculatura renal, con un efecto vasodilatador en dicha arteriola (Schör, 1992). Diversos estudios sugieren que la bradicinina juega un papel fundamental en el efecto anti-hipertensivo de los fármacos IECAs ya que el tratamiento combinado de estos medicamentos con antagonistas de la bradicinina reducen su efecto anti-hipertensivo (Brown y Vaughan, 1998).

Existen tres grupos dentro de esta clase de fármacos en función del grupo por el que el ligando se une al zinc del centro activo de la enzima. El primer grupo, representado por el fármaco captopril, presenta el grupo sulfhidrilo para su unión al ligando. El segundo grupo representado por los fármacos trandolapril y enalapril, tiene un grupo con dicarboxilo en su centro activo. Por último, el tercer grupo representado por el medicamento fosinopril, se caracteriza por tener un grupo con fósforo para dicha unión. A excepción del captopril y lisinopril, la mayor parte de estos fármacos actúan como pro-fármacos que precisan de transformación previa a nivel hepático (Golan y cols., 2012).

La inhibición de la ECA tras la administración de estos fármacos produce, por una parte, la inhibición de la formación de angiotensina II y de la degradación de la bradicinina, y por otra parte, la activación de la síntesis de angiotensina 1,7. Como consecuencia, se inhibe la vasoconstricción mediada por la angiotensina II, la retención de agua y sodio mediada por la aldosterona y la reabsorción de agua en el túbulo colector llevada a cabo por la ADH. Además, se potencia una vasodilatación gracias a la síntesis de angiotensina 1,7 y a la no degradación de la bradicinina. Todo ello, produce una disminución del volumen circulante y de las RVP, lo que se traduce en una disminución de la PA.

7.2. Antagonistas de los receptores de la angiotensina II (ARAs)

Los ARA II (losartán, ibersartán, telmisartán...) son fármacos anti-hipertensivos. Impiden la unión de la angiotensina II a los receptores AT₁, los cuales están implicados en procesos de vasoconstricción, liberación de aldosterona, retención de agua y Na⁺, remodelado vascular y estrés oxidativo (Weir, 2007). En el riñón existen dos tipos de receptores para la molécula angiotensina II, los receptores de tipo AT₁ y de tipo AT₂. Siempre se ha considerado que el receptor de tipo AT₁ es el responsable

de la mayoría de los efectos biológicos de la angiotensina II en la regulación de la PA. Sin embargo, recientes estudios demuestran que el receptor de tipo AT₂ también se encuentra implicado en estos procesos (Escalante, 2004), con funciones opuestas a los de tipo AT₁ (Carey y cols., 1999). Los receptores AT₁ se distribuyen por todos los tejidos del adulto, en particular, en el corazón, los vasos, el riñón, el endotelio y el SNC. Los receptores AT₂ predominan en los tejidos fetales y disminuyen tras el nacimiento. En el adulto se pueden encontrar pequeñas cantidades en el riñón, las glándulas adrenales, el corazón, el cerebro, el útero y el testículo. El descubrimiento de que los procesos fisiopatológicos de la angiotensina II en las patologías en las que está involucrada es mediado por los receptores AT₁ fue la base para desarrollar los fármacos ARA II (Tamargo y cols., 2006).

La inhibición de los receptores AT₁ provoca una pérdida de la vasoconstricción mediada por la angiotensina II, una disminución del tono del SNS, una reducción de los niveles de ADH, aldosterona y endotelina-1. Además, la angiotensina II sintetizada puede unirse a los receptores AT₂, los cuales pueden incluso aumentar su expresión, lo que activa una respuesta vasodilatadora, antiproliferativa, anti-inflamatoria y natriurética mediada por el óxido nítrico y la bradicinina (Carey, 2017; Tamargo y cols., 2006). En su conjunto, se produce una reducción de las RVP y del volumen circulante, y como consecuencia, una disminución de la PA.

7.3. IECA/ARA II y sus efectos renales

Los fármacos que inhiben la angiotensina II (IECA o ARA II) presentan efectos renales beneficiosos en diversas patologías cuando la perfusión renal no se encuentra alterada. En muchas enfermedades renales, tales como la nefropatía diabética o la insuficiencia renal crónica, el uso de estos fármacos es muy común para paliar la proteinuria (Marín y cols., 2008). El SRAA está íntimamente relacionado con la filtración de proteínas a través de la barrera de filtración glomerular debido a los receptores de angiotensina II situados en los podocitos. La unión de la angiotensina II a los receptores AT₁ produce un cambio en el citoesqueleto de estas células y como consecuencia, cambios en la integridad de la barrera de filtración (Schiebl y Castrop, 2013) los cuales favorecen el paso de proteínas. Por ello, la inhibición de este sistema produce una disminución de las proteínas que atraviesan la barrera de filtración glomerular.

Sin embargo, como se ha explicado anteriormente, en diversas situaciones el mantenimiento de la TFG es dependiente de la angiotensina II ya que la PPR está comprometida (por ejemplo ante una depleción de volumen, un fallo cardiaco, una estenosis renal o ante el tratamiento con agentes vasoconstrictores tales como un AINE o la ciclosporina). En este escenario este tipo de fármacos puede desencadenar una DRA en el que los parámetros hemodinámicos se encuentren alterados (Hricik y Dunn, 1990; Brown y Vaughan, 1998). En una situación de hipoperfusión renal, la inhibición de la angiotensina II produce una disminución de la RVR debido a la falta de su efecto vasoconstrictor. Este tipo de DRA se conoce como una insuficiencia renal reversible (Schoolwert, 2001) o DRA de tipo pre-renal que será reversible tan pronto como el fármaco se elimine.

Estos fármacos también se encuentran asociados a la aparición de hipercalemia, debido a la disminución en la síntesis de aldosterona en la glándula suprarrenal, al descenso de la llegada de Na^+ en la parte distal de la nefrona, a una función anormal del túbulo colector y a una absorción excesiva de K^+ (Raebel, 2012).

8. Diuréticos

8.1. Generalidades de los diuréticos

Los diuréticos son una clase químicamente heterogénea de fármacos utilizados para tratar diversas enfermedades renales y cardiovasculares relacionadas con edema o hipertensión. Además, se utilizan para tratar algunas formas de DRA (Ejaz y Mohandas, 2014; Prowle y cols., 2014). El efecto final de todas las clases de los diuréticos es la reducción del volumen extracelular, debido a la inhibición de la reabsorción de solutos y agua a lo largo de la parte tubular de la nefrona. Esta familia de fármacos se clasifica según su potencia farmacológica en tres grandes grupos: i) diuréticos de máxima eficacia (diuréticos del asa); ii) diuréticos de eficacia media (aquellos que actúan en el túbulo distal); iii) diuréticos de eficacia ligera (llevan a cabo su acción en el túbulo proximal). Además, según su mecanismo de acción para inhibir la reabsorción tubular, se pueden diferenciar cinco tipos de diuréticos. La tabla 2 resume la clasificación, el mecanismo de acción y diversos ejemplos de los tipos de diuréticos principales (Roush y cols., 2014).

CLASIFICACIÓN	TIPO DE DIURÉTICO	MECANISMO DE ACCIÓN	EJEMPLOS
DIURÉTICOS DE MÁXIMA EFICACIA	Diuréticos del asa	Inhibición del cotransportador NKCC (asa de Henle y la mácula densa)	Furosemina, torasemida
	Tiazidas	Inhibición del cotransportador NaCl (túbulo contorneado distal)	Hidroclorotiazida
DIURÉTICOS DE EFICACIA MEDIA	Ahorradores de potasio	Antagonista de la aldosterona	Espironolactona, eplerenona,
	Inhibidores de la anhidrasa carbónica	Inhibición de la disociación del HCO_3^- en agua y CO_2	Acetazolamida
DIURÉTICOS DE EFICACIA LIGERA	Diuréticos osmóticos	Alteración de la osmosis a lo largo del túbulo renal	Manitol

Tabla 2. Mecanismo de acción de los principales grupos de diuréticos.

La depleción de volumen que producen los diuréticos es detectada por el organismo con el fin de activar todos los mecanismos reguladores para evitar una disminución de la PA sistémica (Petersen, 1999):

- Los barorreceptores situados en el arco aórtico y en los senos carotídeos detectan la disminución de volumen extracelular, por lo que estimulan la liberación de vasopresina/ADH desde el hipotálamo y epinefrina/adrenalina en la médula adrenal.
- Los receptores de distensión situados en la aurícula detectan una disminución del GC por lo que se inhibe la liberación del PNA.
- Los mecanorreceptores y los quimiorreceptores situados en el riñón detectan la disminución del FSR y activan el SNS. Como consecuencia, se produce vasoconstricción sistémica, liberación de renina y reabsorción de iones y agua. Además, como se ha explicado anteriormente, estos barorreceptores renales son capaces de inducir directamente la liberación de renina.

8.2. Los diuréticos y sus efectos renales

En el área clínica, los diuréticos se utilizan en muchas ocasiones para aumentar el flujo urinario en diversas formas de DRA, con el fin de conseguir eliminar los desechos del organismo, evitar la obstrucción tubular e impedir que se produzcan acúmulos de fluidos no filtrados en el intersticio renal.

Además, existen diversos estudios que demuestran que el DRA asociado a oliguria tiene un peor pronóstico que aquel en el que no se observa disminución del flujo urinario (Avendaño, 2009). Por otro lado, los diuréticos del asa disminuyen el consumo de oxígeno de las células tubulares renales, de forma que podrían disminuir el riesgo de sufrir un daño isquémico en esta zona renal (Karajala y cols., 2009). Sin embargo, numerosos estudios demuestran que los diuréticos, aún aumentando el flujo urinario de los pacientes, no favorecen la recuperación de la función renal, pudiendo llegar a ser incluso perjudiciales en determinadas situaciones (Ejaz y Mohandas, 2014). Además, la combinación de estos fármacos con otros medicamentos como AINEs, medios de contraste, antibióticos o inhibidores de la angiotensina II pueden dar lugar a un DRA (Wu y cols., 2014). Por otra parte, los diuréticos pueden producir alteraciones en el balance de los electrolitos y del agua debido a su mecanismo de acción y desembocar en patologías tales como hipocalcemia, hipercalcemia, alcalosis o acidosis metabólica e hiponatremia.

BLOQUE II: NUEVOS HORIZONTES EN EL DIAGNÓSTICO DEL DRA

Como se ha explicado en el apartado anterior, el DRA es una pérdida repentina de la función renal. Este estado de disfunción puede permanecer largos periodos de tiempo, lo que puede dar lugar al deterioro de otros órganos como los pulmones, el hígado o el cerebro, pudiendo ocasionar un fallo multiorgánico y comprometer la vida del paciente (Sancho Martínez y cols., 2015). De acuerdo con los tres sistemas de estratificación más usados para clasificar el grado de DRA, denominados RIFLE, KDIGO y AKIN (Sutherland y cols., 2015; Thomas y cols., 2015), no se considera DRA hasta que la concentración de creatinina plasmática aumenta respecto a la concentración plasmática basal (Thomas y cols., 2015), por lo que el diagnóstico de esta patología se basa en este parámetro. Sin embargo, es necesario que la TFG se reduzca un 60-70 % para que la creatinina aumente en el plasma, por lo que el síndrome es detectado cuando la lesión está instaurada en el riñón (figura 14). Por ello, la creatinina plasmática presenta grandes limitaciones para detectar la disfunción renal y puede ser inexacta en muchas ocasiones. Estos datos, junto con el hecho de que no se conoce ninguna terapia más que la diálisis para el DRA (Westenfelder, 2011), reflejan la necesidad de desarrollar procedimientos diagnósticos que permitan detectar precozmente este síndrome, con el fin de disminuir la morbimortalidad asociada.

En la actualidad, la investigación se centra en el estudio de otros biomarcadores, tanto urinarios como plasmáticos, capaces de diagnosticar el DRA de forma precoz y diferenciar la etiología del mismo. Algunas de estas moléculas motivo de estudio, como NGAL (del inglés *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*) o KIM-1 (del inglés *kidney injury molecule-1*) se están validando en estudios clínicos (Haase y cols., 2009; Torregrosa y cols., 2015; Shinke y cols., 2015), tras cientos de estudios en modelos animales y celulares (Kaucsar y cols., 2016; Palm y cols., 2016; Sinha y cols., 2013). Sin embargo, estas proteínas son de baja especificidad y no son capaces de discernir el tipo de DRA.

Además, el DRA aparece comúnmente en individuos enfermos que pueden presentar patologías asociadas u otros factores que pueden actuar como factores de riesgo a desarrollar dicha patología renal. La deshidratación, el envejecimiento, la existencia de ciertas patologías asociadas (como la diabetes, la enfermedad renal crónica o la insuficiencia cardíaca) o la administración de fármacos, pueden predisponer al individuo a desarrollar un DRA en determinadas circunstancias, como

por ejemplo, ante la administración de otro fármaco potencialmente nefrotóxico o ante un procedimiento quirúrgico.

Por ello, la capacidad de identificar ese riesgo asociado sería de gran utilidad clínica para llevar a cabo un diagnóstico preventivo y personalizado que permitiría disminuir la incidencia de esta enfermedad. Como se ha mencionado en el apartado anterior, la nefrotoxicidad juega un papel crucial en la incidencia del DRA. La administración de fármacos potencialmente nefrotóxicos en dosis no tóxicas para el riñón puede sensibilizar al individuo a desarrollar un daño renal. Este nuevo concepto de riesgo o susceptibilidad al desarrollo de esta patología se ha reproducido en diferentes modelos de ratas de laboratorio en nuestro grupo de investigación con fármacos potencialmente nefrotóxicos (Quiros y cols., 2010; Vicente-Vicente y cols., 2015) y con la exposición crónica a sustancias medioambientales potencialmente nefrotóxicas (Vicente-Vicente y cols., 2013). Además, en estos estudios de susceptibilidad renal se han identificado en la orina potenciales biomarcadores capaces de predecir el riesgo al desarrollo de este síndrome renal.

Todos estos estudios muestran un nuevo horizonte en el diagnóstico preventivo del DRA. Ser capaces de detectar qué individuos son más sensibles a desarrollar este síndrome permitiría minimizar notablemente la aparición y el desarrollo de esta patología.

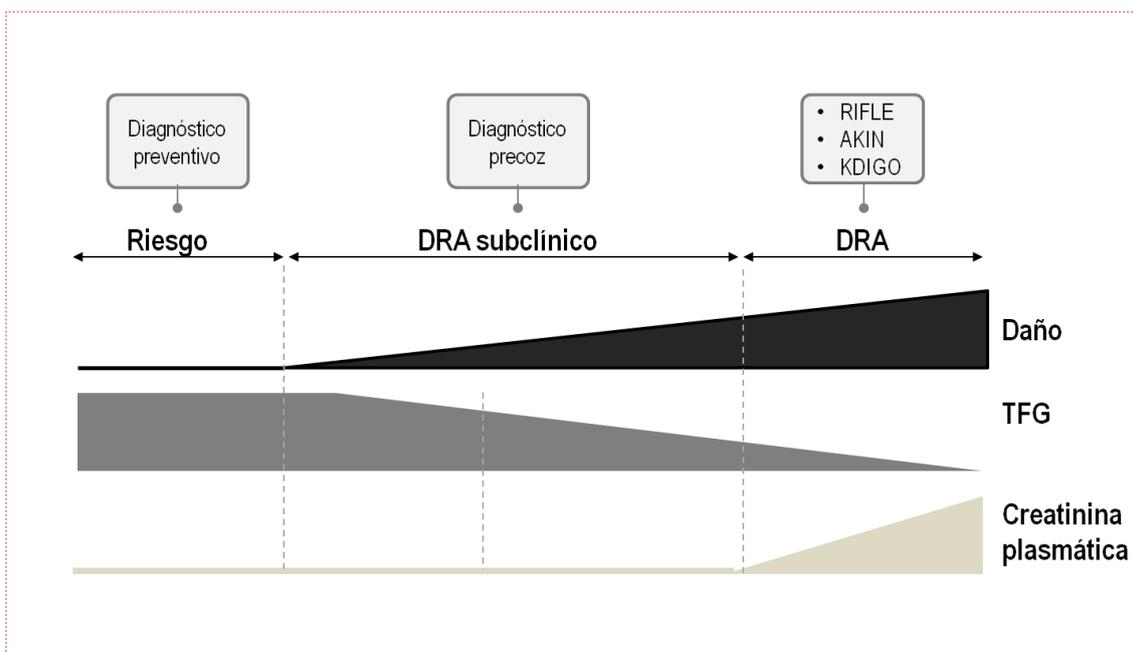


Figura 14. Concepto de DRA según los criterios de KDIGO, RIFLE y AKIN, su diagnóstico preventivo y precoz (adaptada de Prieto-García L. y cols., 2016).

9. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DEL DRA

De acuerdo a la definición de DRA explicada en el apartado 1.5, la disminución de la TFG y el aumento de los compuestos nitrogenados en la sangre es el primer análisis diagnóstico de este síndrome. Sin embargo, discernir la etiología de dicho síndrome y, por tanto, determinar el tipo de DRA es un proceso complejo en el área clínica. La valoración clínica debe tener en cuenta que el DRA es un proceso multifactorial, dinámico y en muchas ocasiones con etiologías múltiples.

El proceso diagnóstico del DRA puede englobar diferentes estudios: i) determinaciones analíticas básicas en sangre y orina; ii) técnicas de imagen; iii) estudio histopatológico del tejido renal; iv) aparición de biomarcadores urinarios o plasmáticos relacionados con el DRA (Avendaño, 2009).

9.1. Determinaciones analíticas básicas en sangre y orina

Son muchas las determinaciones analíticas básicas que se pueden realizar en sangre y orina para diagnosticar un DRA y diferenciar el tipo del mismo.

La *diuresis* se considera un factor determinante en la diagnosis del DRA. En el área clínica, se denomina oliguria a un volumen urinario inferior a ≤ 0.5 mL/kg/día y anuria a la ausencia de diuresis. Los criterios RIFLE y AKIN utilizan la diuresis junto a los valores de creatinina plasmática y de la TFG para evaluar el grado de daño funcional renal. Sin embargo, el volumen urinario tiene escasa importancia en el diagnóstico diferencial del DRA, ya que todos los tipos de DRA pueden cursar con disminución del volumen urinario y alrededor de un 40 % de los DRA actuales son no oligúricos (Avendaño, 2009).

Como la definición de DRA lo indica, la *TFG* es un parámetro esencial para el diagnóstico de dicho síndrome. Se puede medir directamente calculando el aclaramiento de la inulina (sustancia exógena) o de la creatinina (producto endógeno derivado de la musculatura esquelética), pues ambas sustancias se filtran fácilmente y no se reabsorben ni secretan en gran medida. Las *concentraciones de la urea y de la creatinina en plasma* son marcadores indirectos de la filtración glomerular. Así, un aumento de su concentración en sangre sugiere una disminución de la filtración glomerular (Meola y cols., 2016).

La concentración de la *creatinina plasmática* es el valor de referencia para la diagnosis de un DRA, de acuerdo con su definición. Además, las escalas de RIFLE y

AKIN utilizan dicho valor para graduar el daño renal. Sin embargo, su uso en el área clínica presenta grandes limitaciones, como se ha mencionado en los apartados anteriores (Pfaller y Gstraunthaler, 1998).

En la orina, la presencia de proteínas o el análisis de los electrolitos pueden ayudar al diagnóstico diferencial del DRA y facilitar el conocimiento de los procesos fisiopatológicos por los que se ha producido el daño. En condiciones fisiológicas, la concentración de proteínas en la orina es mínima debido al correcto funcionamiento de la barrera de filtración glomerular que solamente permite el paso de una baja concentración de proteínas de bajo peso molecular. Sin embargo, el daño a dicha barrera o a las estructuras tubulares de la nefrona provoca la aparición de grandes cantidades de proteínas en la orina, concepto que se denomina proteinuria. Este parámetro permite diferenciar el DRA de tipo pre-renal, en el cual no existe ningún daño estructural, de aquellos en los que si se produce. Ante un daño estructural, diversos estudios sugieren correlaciones entre la localización de la lesión renal y la presencia de determinadas proteínas en la orina. La tabla 3 muestra las proteínas excretadas en la orina y la lesión renal que sugieren según diferentes estudios (Gazapo y cols., 1996 Onopiuk y cols., 2014; Lisowska-Myjak, 2010; Santos y cols., 2010). Sin embargo, la especificidad de estos marcadores es muy relativa y además, no diferencian la etiología del DRA.

PROTEÍNA EXCRETADA	LESIÓN
Albúmina	Lesión glomerular
B-2-microglobulina	Lesión túbulo proximal
α-1- microglobulina Proteína unida a retinol (RBP) Cistatina C Tamm-Horsfall (THP)	Proteinuria tubular
Fosfatasa alcalina (FAL) Gamma-glutamyl-transferasa (GGT)	Lesión borde en cepillo de la célula tubular
Lactatodeshidrogenasa (LDH), Glutación transferasa (GST) Alanina-aminopeptidasa (AAP),	Lesión celular generalizada

Tabla 3. Resumen de la correlación entre proteínas excretadas y la lesión renal que podrían marcar según diferentes estudios.

Por otra parte, el análisis de la *osmolalidad urinaria* así como la *concentración de los electrolitos* ayuda a diferenciar el DRA pre-renal de los demás tipos de DRA (apartado 9.4).

9.2. Técnicas de imagen

Este tipo de técnicas tienen un papel determinante en el diagnóstico diferencial del DRA. Permiten estudiar la morfología renal, conocer el patrón de perfusión en dicho órgano y valorar la existencia de una obstrucción en las vías urinarias. Dentro de estas técnicas podemos destacar la ecografía, la ecografía doppler, la radiografía simple de abdomen o la tomografía computarizada. Sin embargo, su capacidad de resolución y de penetración es muy baja, por lo que es un campo que se encuentra actualmente en desarrollo.

9.3. Estudio histopatológico del tejido renal

El estudio histopatológico del riñón es útil para determinar la presencia o ausencia de daño estructural y poder identificar la localización, naturaleza e intensidad de la lesión. La biopsia renal es poco frecuente en la práctica clínica, aunque el diagnóstico de algunas patologías renales requiere este análisis, como en el caso de la nefritis tubulointersticial aguda (Avendaño, 2009). La mera observación de una preparación de tejido renal, debidamente procesada y teñida (normalmente con hematoxilina y eosina) proporciona una idea de las estructuras más afectadas. Mediante estudios histoquímicos e inmunocitoquímicos puede detectarse la presencia o ausencia de antígenos marcadores de daño menos evidente, de forma muy localizada en cada estructura y tipo celular.

9.4. Diagnóstico diferencial del DRA pre-renal

La diferenciación entre un DRA pre-renal y un DRA intrínseco es complicada en la práctica clínica debido a que el DRA puede ser multifactorial. Además, en ciertas patologías como en una sepsis puede ser difícil definir la barrera entre el daño funcional y el daño estructural y en la isquemia el DRA pre-renal es la antesala a la aparición de una NTA (Avendaño, 2009).

Las características clínicas de este tipo de DRA son un gran aumento de los niveles de la creatinina y de la urea en plasma debido a esa disminución en la TFG por la situación de hipoperfusión sostenida. Además, se produce un aumento en el ratio urea/creatinina plasmática y una disminución del volumen de orina excretado debido a la reabsorción de urea y agua producida por los niveles elevados de ADH (Blantz, 1998). La fracción excretada de Na^+ es un parámetro que se encuentra disminuido en un DRA pre-renal debido a la reabsorción elevada de agua favorecida por la ADH y por el aumento en la secreción de aldosterona secundaria a la hipovolemia (Macedo y Metha, 2010). La osmolalidad urinaria es evaluada en muchas ocasiones para diferenciar entre el DRA renal y pre-renal ya que una osmolalidad urinaria disminuida indica un daño tubular temprano. La tabla 4 resume los principales parámetros estudiados para diferenciar ambos tipos de DRA.

PARÁMETRO	DRA PRE-RENAL	DRA RENAL/INTRÍNSECO
EFNa (%)	<1	>2
Na ⁺ urinaria (mEq/L)	<20	>40
Osmolalidad urinaria (mOsm/kg)	>400	<350
Cru/Crp	>20	<15
Uu/Upl	>10	<10

Tabla 4. Parámetros estudiados para diferenciar el DRA de tipo pre-renal del renal o intrínseco. EFNa: excreción fraccional de sodio; Cru: creatinina urinaria; Crpl: creatinina plasmática; Uu: urea urinaria; Upl: urea plasmática.

10. DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DIFERENCIAL

Además de conocer el tipo de DRA que se produce en un individuo, poder conocer la causa que está produciendo la patología mejoraría el diagnóstico de este síndrome y su tratamiento. Diferenciar el daño renal causado por un fármaco o agente determinado del ejercido por otros (Cataldi y cols., 2002) sería de gran utilidad en el área clínica, sobretodo en pacientes polimedicados o con comorbilidades asociadas. La identificación de biomarcadores que permitan conocer el agente causante del daño renal facilitaría un tratamiento individualizado con un mayor pronóstico de recuperación. Nuestro grupo de investigación ha identificado dos potenciales biomarcadores urinarios capaces de diferenciar el daño producido por dos fármacos potencialmente nefrotóxicos. En este estudio se demostró que las proteínas gelsolina y Reg-III-B (del inglés *regenerating islet-derived protein III*) aparecían en la orina de ratas con daño renal producido tras la administración de gentamicina y sin embargo no estaban presentes en la orina de ratas con daño renal producido por la administración de cisplatino (Ferreira y cols., 2011). Estos resultados abren un nuevo horizonte en la investigación en el diagnóstico etiológico diferencial del DRA y apoyan la utilidad de la búsqueda de biomarcadores que puedan

facilitar y delimitar el diagnóstico de esta patología.

11. DIAGNÓSTICO TEMPRANO Y PREVENCIÓN DEL DRA

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

El biomarcador ideal para el DRA sería aquella molécula que: i) se pueda medir de forma rápida y no invasiva (en plasma u orina); ii) posea alta sensibilidad para facilitar la detección temprana del síndrome; iii) sea altamente específica con el fin de diferenciar el DRA pre-renal, el DRA intrínseco y la enfermedad renal crónica; iv) sea capaz de predecir el pronóstico de la enfermedad (gravedad y duración del DRA); v) pueda guiar en el inicio de la terapia a seguir y vi) facilite la monitorización de la respuesta a las diferentes intervenciones (Devarajan, 2011). Sin embargo, es difícil pensar que una única molécula sea capaz de indicar todo lo anteriormente descrito. Por ello, en la actualidad las investigaciones en el diagnóstico preventivo y temprano del DRA se centran en el estudio de un panel de marcadores que, en su conjunto, puedan describir todas las características mencionadas.

11.1. Diagnóstico temprano del DRA

Antes de la aparición del DRA como su concepto lo indica, en el riñón se producen un conjunto de alteraciones estructurales y funcionales, estado conocido como “DRA subclínico” (Sancho y cols., 2015). En los últimos años numerosos estudios intentan correlacionar la presencia de diferentes moléculas en el plasma o en la orina con los procesos fisiopatológicos tempranos que ocurren en dicho estadio de DRA subclínico. Muchos de estos nuevos biomarcadores aparecen en estos fluidos biológicos como respuesta temprana al estrés producido en el riñón, antes de que se produzca un aumento de la concentración de la creatinina plasmática como consecuencia de una función renal deteriorada (Devarajan y Murray, 2014). La tabla

5 resume las principales moléculas estudiadas como posibles biomarcadores de un DRA temprano, su procedencia y su función fisiológica en el organismo.

BIOMARCADOR	PROCEDENCIA	FUNCIÓN
NGAL	Túbulo distal y túbulo colector	Regula el transporte de hierro. Promueve la supervivencia celular del túbulo.
KIM-1	Túbulo proximal	Promueve la regeneración epitelial. Regula la apoptosis.
Cistatina C	Células nucleadas	Se reabsorbe por las células renales del túbulo proximal
IL-8	Túbulo proximal	Promueve la apoptosis y la necrosis de las células tubulares
L-FABP	Túbulo proximal	Antioxidante Inhibe el daño túbulo-intersticial
Fetuin A	Sintetizada en el hígado y secretada a la circulación	Evita la formación de calcificaciones en el músculo esquelético
β2M	Células nucleadas	Se reabsorbe por las células renales del túbulo proximal
Calbindina	Túbulo distal	Promueve el transporte de Ca ²⁺
Nefrina	Podocitos	Forma parte de la barrera de filtración glomerular
IGFBP-7	Ubicuo	Actúa como supresor tumoral Regula la senescencia tumoral
TIMP-2	Ubicuo	Regula la parada del ciclo celular en la fase G1
PAI-1	Endotelio	Inhibe la fibrinólisis
NAG	Células del túbulo proximal	Cataliza la hidrólisis de los enlaces glucosídicos

Tabla 5. Principales biomarcadores correlacionados con el DRA temprano (Devarajan y Murray, 2014; Alge y Arthut, 2015; Vanmassenhove y cols., 2013; Camici, 2007; Adiyanti y Loho, 2012) NGAL: lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos; KIM-1: molécula de daño renal 1; IL-8: Interleukina 8; L-FABP: proteína hepática fijadora de ácidos grasos; IGFBP-7: proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina; TIMP-2: Inhibidor tisular de la metaloproteinasa 2; PAI-1: Inhibidor del activador de plasminógeno; NAG, N-acetyl-beta-D-glucosaminidasa; β2M: β-2-microglobulina.

Como se puede observar en la tabla, son muchos las moléculas sugeridas por la comunidad científica como potenciales marcadores del DRA en su fase inicial. De todos ellos, los biomarcadores NGAL o KIM-1 son los más estudiados en fase clínica (Haase y cols., 2009; Torregrosa y cols., 2015; Shinke y cols., 2015), y en modelos animales y celulares (Kaucsar y cols., 2016; Palm y cols., 2016; Sinha y cols., 2013). Diferentes estudios han demostrado que la molécula KIM-1 es un buen marcador para diferenciar el DRA (especialmente asociado a la NTA) y otros tipos de daño renal, como la enfermedad renal crónica (Coca y cols., 2008). Por otra parte, numerosos estudios verifican el papel de la proteína NGAL como biomarcador diagnóstico temprano del DRA, en multitud de situaciones clínicas comunes (Devarajan, 2011). Además, se están desarrollando nuevas tecnologías que permitan medir estos biomarcadores fácilmente en el área preclínica y clínica.

Sin embargo, NGAL y KIM-1 aparecen en la orina cuando el insulto ha producido un daño estructural que no conlleva pérdida de la función renal. En este contexto, existen otros biomarcadores como, por ejemplo, IGFB-7 (del inglés *insulin like growth factor binding protein 7*) o TIMP-2 (del inglés *tissue inhibitor of metalloproteinase 2*), proteínas relacionadas con la parada del ciclo celular, que aparecen en la orina antes de que se produzca un daño estructural, hecho que los convierte en biomarcadores realmente útiles para la detección precoz del DRA. Existen estudios clínicos que han verificado el poder de estas dos proteínas para predecir el DRA en un estadio muy temprano en pacientes tras una cirugía cardíaca (Meersch y cols., 2014) o una cirugía no cardíaca (Goczce y cols., 2015). Además, se ha desarrollado un rápido test denominado *Neprhocheck* que ya se está comercializando en Estados Unidos (Edwards, 2015), que permite medir las concentraciones de ambas proteínas en la orina con el fin de predecir el DRA en los pacientes antes de que se desarrolle.

Sin embargo, estos biomarcadores no poseen las características de biomarcador ideal mencionadas anteriormente. La gran mayoría de los marcadores descritos no son capaces de identificar la causa que produce el DRA. NGAL presenta una baja selectividad ya que aparece en síndromes inflamatorios, por lo que se considera un potencial biomarcador en otros tipos de patologías como en la preeclampsia, en las alergias o en el daño renal crónico (Giasson y cols. 2011). Además NGAL o KIM-1 también se han relacionado con las fases de recuperación del tejido renal tras el

insulto (Sinha y cols., 2013), lo que demuestra su baja especificidad como marcadores precoces de DRA.

Debido a la dificultad de encontrar una única molécula que determine el estado renal ante diferentes insultos, los estudios científicos intentan encontrar un panel de biomarcadores que reflejen en su conjunto toda la información requerida en el concepto de biomarcador ideal anteriormente descrito (McCaffrey y cols., 2015; Parikh y cols., 2013). El organismo presenta una gran red de vías de señalización que se activan y modulan según los requisitos fisiológicos y fisiopatológicos. Por ello, es lógico pensar que el estudio de los niveles de diferentes moléculas en los fluidos biológicos, y no de una única molécula, pueda describir los procesos fisiopatológicos que están ocurriendo en el interior del organismo.

Hasta el momento podemos considerar que la aparición de estas moléculas en la orina sugieren la alteración de las estructuras renales y/o del metabolismo celular fisiológico. Aunque su utilidad en el diagnóstico precoz del DRA se encuentra en proceso de validación, estos biomarcadores pueden utilizarse para discernir el tipo de DRA precozmente, diferenciando aquellos en los que se produce un daño de las estructuras renales y/o en el metabolismo celular, de aquellas en las que el parénquima renal se mantiene íntegro.

11.2. Diagnóstico del riesgo de desarrollar un DRA

La figura 15 define el concepto de riesgo o sensibilización de desarrollar un DRA, situado en el punto en el que el daño renal no se ha instaurado en el órgano pero ya aparecen complicaciones que lo diferencian de su estado sano. Existen determinados factores que se asocian con un mayor riesgo de que un paciente desarrolle un DRA. Dentro de estos factores de riesgo podemos diferenciar los indicadores de riesgo relacionados con el paciente y aquellos relacionados con el procedimiento diagnóstico y terapéutico (Avendaño, 2009).

Las características innatas de un paciente, tales como su sexo o sus factores genéticos, pueden aumentar el riesgo de sufrir un DRA. Aparte de esta predisposición innata, cada individuo posee una predisposición de desarrollar este síndrome adquirida a lo largo de su vida, como respuesta a comorbilidades, a tratamientos con fármacos potencialmente nefrotóxicos aún en dosis no tóxicas para el riñón y/o a la exposición ambiental de diferentes toxinas. Además, la aparición de un DRA es común en personas que ya presentan otras patologías asociadas. Como se ha

mencionado anteriormente, la deshidratación o ciertas patologías (cardíacas, renales...) hacen que una correcta función renal sea dependiente de los mecanismos de autorregulación, de forma que la inhibición de las moléculas principales de la misma por diversos fármacos, precipitará al individuo a desarrollar un DRA. Por ejemplo, la administración de los contrastes iodados, fármacos potencialmente nefrotóxicos, causa un DRA en hasta un 20 % de los pacientes de riesgo. Además, una gran parte de estos pacientes con patologías cardíacas asociadas están siendo tratados con AINEs (Goldenberg y cols., 2005).

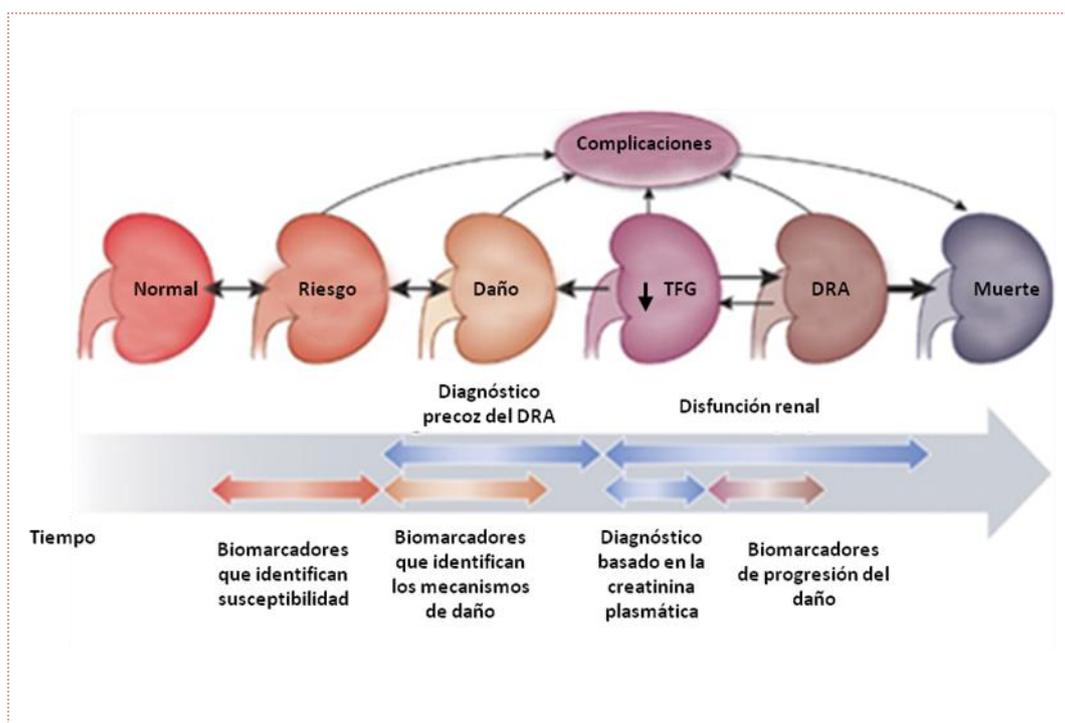


Figura 15. Concepto de riesgo o sensibilización de desarrollar un DRA (adaptada de Murray y cols., 2014).

Por otra parte, la edad es un factor de riesgo de desarrollar un DRA debido a los cambios estructurales que sufre el riñón con el envejecimiento, similares a los que sufre el riñón en una enfermedad renal crónica (Anderson y cols., 2011). Múltiples estudios en la literatura demuestran que el DRA es más común en personas mayores, ciertas estadísticas muestran que la incidencia anual del DRA es de 17 por millón en los adultos menores de 50 años, mientras que asciende a 949 por millón en ancianos con una edad comprendida entre los 80-89 años (Rosner, 2009). Además, este grupo poblacional suele presentar comorbilidades asociadas y comúnmente se someten a procedimientos invasivos y a terapias con múltiples fármacos

potencialmente nefrotóxicos. Sin embargo, no todos los pacientes de una elevada edad poseen la misma susceptibilidad a desarrollar un DRA.

Por otra parte, la nefrotoxicidad presenta un papel crucial en la susceptibilidad renal a desarrollar un DRA. Como se ha mencionado en el apartado 5.1, la nefrotoxicidad es la causa de un elevado porcentaje de los casos de DRA (Brivet y cols., 1996). En este sentido, los tratamientos con fármacos potencialmente nefrotóxicos en dosis no tóxicas para el riñón suponen un factor de riesgo de desarrollar un DRA, si esta administración se produce de forma conjunta con otros fármacos potencialmente nefrotóxicos en dosis subnefrotóxicas, o si dichos tratamientos se asocian con otros factores de riesgo explicados anteriormente.

Como se indica en la figura 12, durante la fase de riesgo existen complicaciones en el órgano que lo diferencian del riñón sano. Esas alteraciones producidas pueden hacer aparecer determinadas moléculas en los fluidos biológicos que nos pueden dar información acerca de los cambios ocurridos en el riñón. Actualmente, los estudios se centran en la identificación de esas moléculas capaces de identificar dicha susceptibilidad. La correlación de esta predisposición a desarrollar un DRA con la aparición de un biomarcador o un conjunto de biomarcadores en la sangre o en la orina es fundamental para llevar a cabo un diagnóstico preventivo de la enfermedad. Estudios previos en nuestro grupo de investigación (Quiros y cols., 2010) demostraron que las dosis subnefrotóxicas del antibiótico gentamicina predisponen al individuo a desarrollar un DRA tras la administración de un segundo fármaco potencialmente nefrotóxico, también administrado en dosis no tóxicas para el riñón por sí mismas. Además, este estudio correlacionó el riesgo de sufrir un DRA tras la administración a la gentamicina con la aparición de la proteína GM_2AP , del inglés *ganglioside M2 activator protein*. En el caso del fármaco antineoplásico cisplatino, nuestro grupo evidenció que su administración en dosis sub-nefrotóxicas en ratas de laboratorio sensibilizaba al riñón a desarrollar un DRA y aumentaba la excreción de la proteína fumarilacetoacetasa (Vicente-Vicente y cols., 2015).

Por otra parte, la exposición crónica a sustancias medioambientales nefrotóxicas, puede ser considerada un factor de riesgo de desarrollar este síndrome. Vicente-Vicente y colaboradores demostraron que la exposición crónica a uranio predispone a los animales de laboratorio a desarrollar un DRA y esta predisposición crónica puede estar correlacionada con la excreción urinaria de cuatro proteínas denominadas hemopexina, albúmina, transferrina y vitamina D (Vicente-Vicente y cols., 2015). Todos estos estudios muestran un nuevo horizonte en el diagnóstico

preventivo del DRA. Ser capaces de detectar qué individuos son más sensibles a desarrollar este síndrome permitiría minimizar notablemente la aparición y el desarrollo de esta patología.

OBJETIVOS

En la actualidad no existen modelos animales de experimentación capaces de reproducir un DRA de tipo pre-renal, que representa el 60-70 % de todos los casos de DRA en el área clínica. El riesgo de aparición de este tipo de daño renal tras la administración conjunta de tres tipos de fármacos que alteran el estado hemodinámico sistémico y renal se incrementa hasta el 20 %, riesgo denominado *Triple Whammy*. Sin embargo, existen estudios que igualan este riesgo al producido tras la administración conjunta de dos de esos fármacos, hecho que demuestra la necesidad de esclarecer los mecanismos fisiopatológicos implicados en este síndrome.

Además, múltiples estudios han identificado biomarcadores relacionados con el DRA intrínseco, en el que se produce un daño en las estructuras renales. Asimismo, no existen estudios capaces de relacionar la presencia de alguna proteína en la orina con el DRA de tipo pre-renal ni con el riesgo de desarrollarlo, avance que ayudaría a su diagnóstico preventivo y diferencial.

Con estos antecedentes nos marcamos los siguientes objetivos para este trabajo de investigación:

1. Poner a punto un modelo experimental animal que reproduzca un DRA de tipo pre-renal tras la administración conjunta de fármacos que alteren la hemodinámica sistémica y renal (AINEs, inhibidores de la angiotensina II y diuréticos).
2. Estudiar los mecanismos fisiopatológicos asociados a este tipo de daño renal. Caracterizar el papel de los mecanismos de regulación de la presión arterial y de la autorregulación renal en la terapia individual, doble y triple.
3. Identificar en este modelo experimental de rata, por un lado, biomarcadores urinarios capaces de diferenciar el DRA de tipo pre-renal de otros tipos de DRA y por otro lado, identificar biomarcadores urinarios capaces de predecir el riesgo de desarrollar un DRA de tipo hemodinámico.
4. Validar el valor pronóstico y diagnóstico de los biomarcadores urinarios identificados en nuestro modelo experimental en pacientes procedentes del Servicio de Nefrología del Hospital Universitario de Salamanca.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ESQUEMA METODOLÓGICO GENERAL

Puesta a punto del modelo experimental animal de DRA

- Mantenimiento y manipulación de los animales.
- Preparación y administración de fármacos.
- Recogida de orina mediante jaulas metabólicas.
- Recolección de muestras de sangre.
- Determinación de la concentración de la creatinina plasmática.

Caracterización del tipo de DRA reproducido en el modelo experimental animal

- Estudio de la función renal mediante la determinación de:
 - La concentración de la creatinina en plasma/orina.
 - La concentración de urea plasmática.
 - La concentración de proteínas en la orina.
 - La osmolalidad urinaria.
 - La concentración de Na⁺ en plasma y orina.
 - La excreción urinaria de N-acetilglucosamina.
- Histología: Tinción hematoxilina-eosina.

Estudio de la hemodinámica sistémica y renal en el

- Determinación de la presión en la cola.
- Determinación del flujo sanguíneo renal por sonda Transonic.
- Determinación de la perfusión de la corteza renal por láser doppler.
- Estudio de la expresión génica de renina y COX-2 por rtPCR.

Identificación de nuevos marcadores urinarios

- Proteómica diferencial.
- Validación mediante la técnica del Western Blot.

Validación clínica de los potenciales biomarcadores identificados

- Análisis de la función renal
- Estudio del patrón de aparición de biomarcadores urinarios asociados a DRA mediante la técnica del Western Blot.

Este esquema metodológico general se presenta para facilitar la comprensión de la aplicación de cada una de las técnicas utilizadas. A continuación, se detalla cada una de estas técnicas agrupadas en los siguientes apartados: i) modelo experimental animal; ii) técnicas experimentales in vivo; iii) determinaciones bioquímicas; iv) histología y v) proteómica diferencial.

2. MODELO EXPERIMENTAL ANIMAL

2.1. Mantenimiento y manipulación de los animales

Para la realización de este trabajo de investigación se utilizaron ratas Wistar macho de 230-250 g de peso al comienzo de cada experimento procedentes del Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Salamanca. Los animales se mantuvieron en régimen de confinamiento controlado en el animalario del SEA durante todo el periodo experimental. Estas instalaciones presentan unas condiciones ambientales constantes (20 °C de temperatura, 60 % de humedad ambiental, sistemas de renovación y filtrado de aire, ciclos de luz y oscuridad cada 12 horas) que facilitan la reproducibilidad de los experimentos. Los animales se manipularon siguiendo las recomendaciones de la Declaración de Helsinki y los principios del cuidado y la utilización de los animales de experimentación estipulados en las regulaciones internacionales y en las siguientes instituciones europeas y nacionales: la Directiva Europea 2010/63/UE, la Ley del Estado Español 32/2007 de cuidado de los animales y los Reales Decretos RD1201/2005 y RD 53/2013 sobre la protección de los animales utilizados en experimentación y en otros fines científicos.

Todos los animales se alimentaron con una dieta estándar (AØ4, *Panlab*), con la siguiente composición: proteína bruta (17,62 % del total), materias grasas brutas (2,50 %), celulosa bruta (4,05 %), cenizas brutas (4,38 %), almidón (43,30 %), calcio (0,66 %), fósforo (0,49 %), sodio (0,14 %), humedad (10,54 %), lisina (0,85 %), metionina (0,29 %), vitamina A (19.900 UI/kg), vitamina D (1.500 UI/kg) y vitamina E (tocoferol) (110 mg/kg).

2.2. Modelo experimental animal Triple Whammy

Con el fin de reproducir el concepto clínico “Triple Whammy” (explicado en el bloque I de la Introducción) en un modelo experimental animal de laboratorio se diseñaron los siguientes grupos experimentales (figura 16):

- I. **Grupo control:** animales sin tratamiento utilizados para establecer los valores normales de los parámetros estudiados durante todo el periodo de experimentación. Ratas tratadas con el vehículo (suero salino 0,9 %) y agua de bebida sin ningún fármaco *ad libitum*.
- II. **Grupo Ibuprofeno (I):** Ratas tratadas con el AINE ibuprofeno (*Sigma -Aldrich*) en el agua de bebida a una dosis de 400 mg/kg/día durante 10 días.
- III. **Grupo Trandolapril (T):** Ratas tratadas con el IECA trandolapril (*Abcam*) en el agua de bebida a una dosis de 0,7 mg/kg/día durante 10 días.
- IV. **Grupo Furosemida (F):** Ratas tratadas con furosemida (20 mg/kg/día) (*Sigma-Aldrich*) vía intraperitoneal durante 6 días.
- V. **Grupo Ibuprofeno+ Trandolapril (I+T):** Ratas tratadas conjuntamente con ibuprofeno (400 mg/kg/día) y trandolapril (0,7 mg/kg/día) en el agua de bebida durante 10 días.
- VI. **Grupo Ibuprofeno+ Furosemida (I+F):** Ratas tratadas con ibuprofeno (400 mg/kg/día) en el agua de bebida durante 10 días y furosemida (20 mg/kg/día) vía intraperitoneal durante 6 días a partir del día 4 de tratamiento con ibuprofeno.
- VII. **Grupo Trandolapril+ Furosemida (T+F):** Ratas tratadas con trandolapril (0,7 mg/kg/día) en el agua de bebida durante 10 días y furosemida (20 mg/kg/día) vía intraperitoneal durante 6 días a partir del día 4 de tratamiento con trandolapril.
- VIII. **Grupo Ibuprofeno+ Furosemida+ Trandolapril (I+T+F):** Ratas tratadas de forma simultánea con ibuprofeno (400 mg/kg/día) y trandolapril (0,7 mg/kg/día) en el agua de bebida durante 10 días y furosemida (20 mg/kg/día) vía intraperitoneal durante 6 días a partir del día 4 del tratamiento combinado de ibuprofeno y trandolapril.

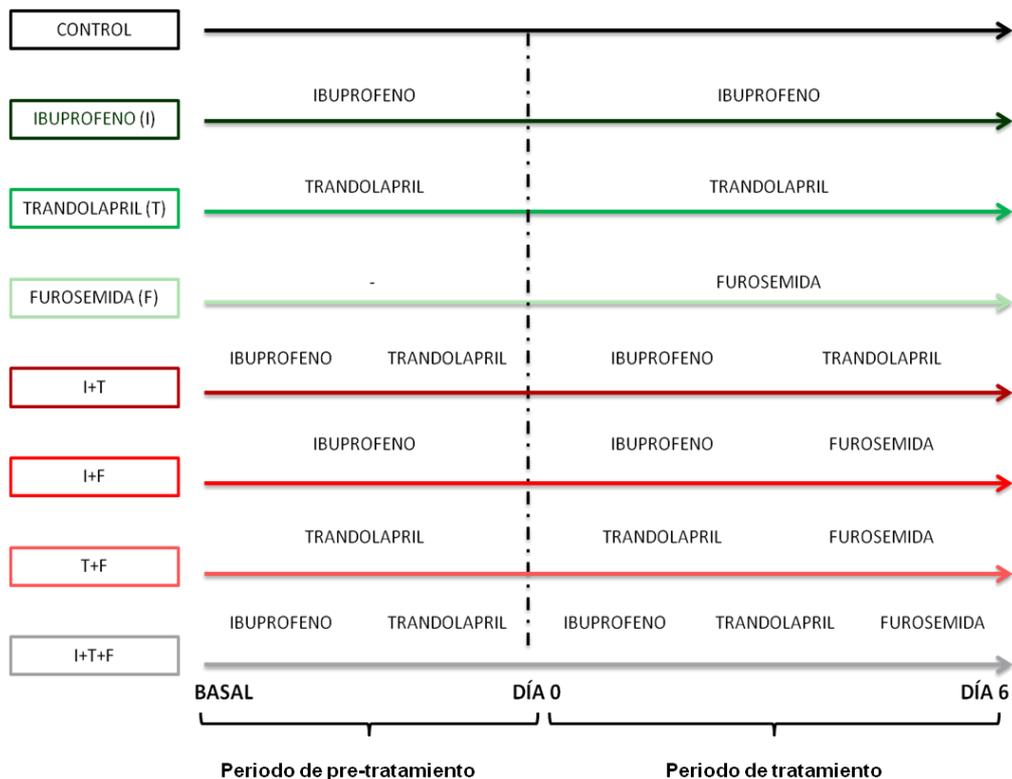


Figura 16. Esquema de los grupos experimentales.

Para poder comprender el modelo experimental es necesario definir la denominación de los diferentes periodos y días de tratamiento y recogida de muestras:

- Día basal: Día en el que se comienza el periodo de pre-tratamiento. Se recolectan muestras de sangre y orina antes de comenzar cualquier tratamiento farmacológico.
- Periodo de pre-tratamiento (4 días): Periodo comprendido entre el día basal y el día 0, en el que se realiza el tratamiento de ibuprofeno, trandolapril, ambos fármacos o ninguno de ellos dependiendo del grupo experimental.
- Día 0: Día en el que se finaliza el periodo de pre-tratamiento y se comienza el tratamiento con la furosemida.
- Periodo de tratamiento (6 días): Periodo entre el día 0 y el día 6 en el que se trata a las ratas con furosemida sin cesar el tratamiento con los otros fármacos, en aquellos grupos experimentales en los que sea requerido.
- Día 2, 4 y 6: Días de tratamiento con la furosemida dentro del periodo de tratamiento.

2.3. Preparación y administración de fármacos

La tabla 6 detalla la preparación de cada fármaco utilizado para llevar a cabo el modelo experimental animal anteriormente descrito:

FÁRMACO	V.A.	MEDIO DE DISOLUCIÓN	DOSIS ADMINSTRADA	CONCENTRACIÓN STOCK	OBSERVACIONES
Ibuprofeno	O	Agua	400 mg/kg/día	4 g/L	-
Trandolapril	O	Agua	0,7 mg/kg/día	7 mg/L	-
Furosemida	I.P	NaCl 0,9 %	20 mg/kg/día	10 mg/mL	pH 9,3 (ajustar con NaOH 1 N)
Gentamicina	I.P	NaCl 0,9 %	150 mg/kg/día	150 mg/mL	-
Minoxidil	O	Agua	15 mg/kg/día	0,15 mg/mL	-
Hidralazina	O	Agua	20 mg/kg/día	210 mg/L	-

Tabla 6. Preparación de los fármacos utilizados en el modelo experimental animal. V.A.: vía de administración; I.P.: intraperitoneal; O: oral; I.G; intragástrica.

3. TÉCNICAS EXPERIMENTALES IN VIVO

3.1. Recogida de orina de 24 horas: jaulas metabólicas.

Durante el desarrollo del modelo experimental se utilizaron jaulas metabólicas individuales (*Panlab*) para la recogida de la orina de 24 horas de los animales. Estas jaulas están perfectamente diseñadas para separar de forma efectiva la orina de las heces del animal en tubos externos a la jaula (Kurien y cols., 2004). Los animales se sitúan en un habitáculo de policarbonato transparente donde disponen de comida y bebida *ad libitum*. Este habitáculo presenta un suelo de rejilla que permite la caída de las heces y de la orina a un embudo especialmente diseñado para la separación entre el líquido y el sólido. Este método para la recolección de orina resulta estresante para los animales, de forma que debe realizarse un periodo de acostumbramiento de 24 a 48 horas antes de la recogida de las muestras y de los datos, para que el animal pueda acostumbrarse al habitáculo. Aún así, las jaulas

metabólicas se deben utilizar el menor tiempo posible, para evitar la generación de estrés en los animales y la alteración en los resultados del estudio. Antes de la recogida de la orina se debe añadir aceite mineral (*Panreac*) al correspondiente colector para evitar la evaporación de la orina y azida sódica al 0,1 % para evitar la contaminación bacteriana de la muestra.

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

En nuestro modelo experimental se mantuvo a los animales en las jaulas metabólicas durante un máximo de 6 días para recoger su orina cada 2 días. Durante el pre-tratamiento realizado con los diferentes fármacos según el grupo experimental, los animales se mantuvieron en jaulas colectivas para minimizar el estrés producido.

3.2. Control de la ingesta de la bebida

Se controló la ingesta de bebida de cada animal durante los 10 días de tratamiento. Durante el periodo de pre-tratamiento los animales se mantuvieron en jaulas colectivas, por lo que se estimó la ingesta de bebida individual mediante la media de la ingesta de bebida colectiva. Durante el periodo de tratamiento, los animales se mantuvieron en las jaulas metabólicas, lo que nos permitió llevar un control individual del volumen ingerido por cada uno de los animales todos los días.

Se estimó el balance hídrico diario de cada animal teniendo en cuenta los ingresos líquidos diarios (volumen de agua ingerido) y las pérdidas de líquidos cuantificables (volumen de orina excretada). Este cálculo nos refleja solamente una estimación aproximada del balance hídrico de cada animal ya que para un cálculo exacto se deben tener en cuenta otras variables tanto de los ingresos de líquidos (comida, metabolismo celular...) como de la salida de líquidos (heces, sudoración, piel, vías respiratorias...).

$$\text{Balane hídrico} \cong \text{Ingresos líquidos} - \text{egresos líquidos}$$

3.3. Recolección de muestras de sangre y plasma

Se recolectaron muestras de sangre de los animales mediante la canulación de la vena caudal situada en la cola del animal. Se anestesió a los animales con anestesia inhalatoria isofluorano (*Vetflurane, Virbac*) al 4 % para inducir y del 1,5 al 3 % para mantener a los animales anestesiados (Zuñiga y cols., 2008), con el fin de evitar dolor al animal y facilitar la manipulación al investigador. Para canular la vena caudal se utilizó un catéter de 25 G (*BD Insyte*) y se recogió la sangre directamente del catéter con la ayuda de capilares heparinizados o sin heparinizar (*Deltalab*) dependiendo de los requerimientos experimentales. Su contenido fue depositado en tubos tipo *ependorf* y éstos fueron centrifugados a $7.000 \times g$, $4^\circ C$ durante 4 minutos para la obtención del plasma y de los restos celulares. El plasma fue conservado a $-20^\circ C$ para su posterior análisis.

3.4. Determinación de la presión arterial en la cola por esfigmomanometría

La PAS se determinó mediante un método no invasivo de medida en la cola del animal. Es un método simple y no traumático que permite trabajar con el animal despierto y realizar un seguimiento del mismo durante un largo periodo de tiempo. Sin embargo, es necesario habituar al animal a este tipo de manipulación para minimizar su estrés y obtener resultados fiables y reproducibles. Se utilizó un equipo NIBP, que consta de un equipo base conectado a un pletismógrafo (*LE 5002, Panlab*), asociado a un software específico instalado en un equipo informático adecuado. El pletismógrafo está formado por un manguito neumático hinchable y un detector de infrarrojos (figura 17) capaz de detectar la señal en la cola del animal.

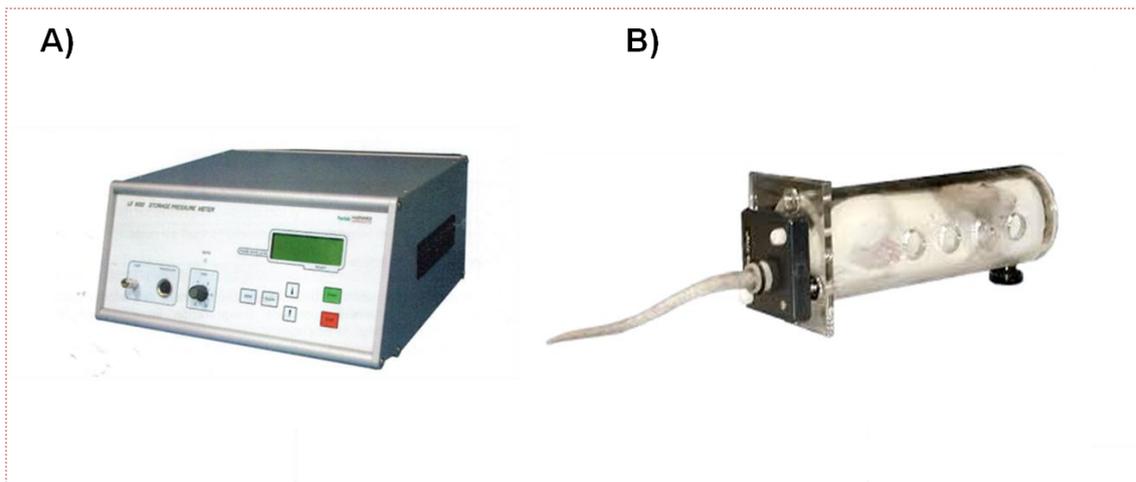


Figura 17. Equipo NIBCHARTLE5002 Panlab (A) y cepo necesario para inmovilizar al animal (B).

Para facilitar la captación de la señal es necesario favorecer la dilatación de la arteria caudal de la cola del animal mediante la aplicación de calor. Los animales son situados en unos cepos específicos (*LE 5022, 180x54 mm, Panlab*) que permiten inmovilizar al animal y dejar la cola libre para la correcta colocación del plestismógrafo.

El fundamento de la medida de la presión arterial en la cola de la rata consiste en la oclusión completa de la arteria caudal mediante el uso de un manguito neumático que, al inflarse con presión creciente, en cierto punto llega a impedir completamente el paso de sangre (figura 18, punto 1). A continuación se va reduciendo la presión ejercida poco a poco. Cuando se produce el mínimo flujo sanguíneo por la arteria en respuesta a un descenso en la oclusión, un detector infrarrojo situado en la cola del animal transforma la señal mecánica en eléctrica y se monitoriza por medio de un ordenador para obtener el valor de presión al que comienza a reestablecerse el flujo (figura 18, punto 2), que es equivalente a la PAS (Pffefer y cols, 1971). Además, el registro de la onda pulsátil permite medir simultáneamente la frecuencia cardíaca en pulsaciones (latidos) por minuto (lpm), a partir de este registro.

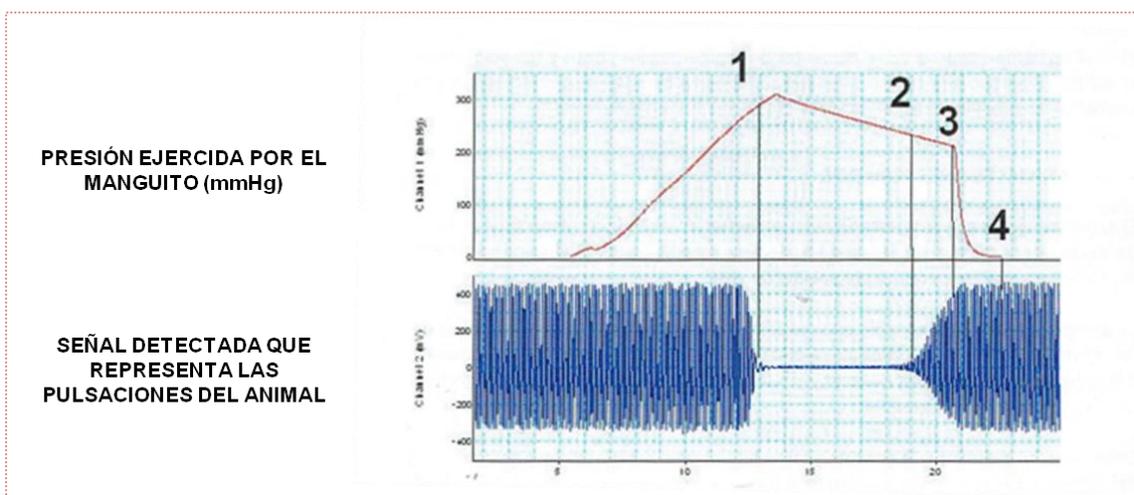


Figura 18. Imagen de la pantalla de registro de presión medida en cola. Se especifican cada uno de los pasos: 1) La presión del manguito aumenta y la amplitud de las pulsaciones empieza a disminuir hasta llegar a cero; 2) la presión del manguito empieza a reducirse y se detectan las pulsaciones de nuevo, dicha presión del punto 2 corresponde a la presión sistólica; 3) la presión continúa decreciendo hasta que las pulsaciones detectadas recuperan su amplitud original, punto de presión que equivale a la presión diastólica; 4) la bomba del manguito está preparada para realizar una nueva medida.

Este método requiere un acostumbramiento del animal cuatro días previos al comienzo de la toma de datos para que se habitúe al cepo y a la compresión de la cola producida por el manguito neumático. Se debe realizar siempre a la misma hora con el fin de evitar la variabilidad procedente de los ciclos circadianos propios del animal, en una habitación aislada de ruido y con temperatura constante. Se deben realizar varias medidas consecutivas a cada animal y se descartarán aquellas en las que el animal se mueva, se observe alterado o exista algún estímulo externo que pueda estresarlo. El valor de presión del animal se obtendrá a partir de 10 valores consecutivos que no difieran más de 10 mmHg entre sí y se establecerá el valor de la PAS como la medida media entre esos 10 valores.

3.5. Determinación del flujo sanguíneo renal in vivo

Para la determinación del flujo sanguíneo de la arteria renal se utilizó una sonda ultrasónica (*Transonic*) que debe situarse alrededor de la arteria renal del animal correctamente aislada. Es un método invasivo e indirecto que se realiza con el animal anestesiado y que permite conocer el flujo sanguíneo renal a tiempo real in vivo.

Este medidor del flujo caudal se basa en el principio *del tiempo de tránsito*, que apoya que el tiempo de tránsito de una señal acústica a lo largo de una trayectoria conocida es constante y solo puede ser alterado por la velocidad del fluido en el que se desplaza. Este aparato consta de una sonda con dos transductores ultrasónicos situados a ambos lados del vaso sanguíneo a estudiar y un reflector acústico fijo situado en la parte central. Como se indica en la figura 19, los transductores emiten una onda de ultrasonido que se reflejará en el transductor opuesto gracias al reflector acústico, midiendo el tiempo de tránsito en ambas direcciones. Según este método de medición, la velocidad de flujo se determina por la diferencia entre la velocidad de propagación de la onda de sonido a favor y en contra del flujo según la siguiente ecuación:

$$Q = \frac{k \times (t1 - t2)}{(t1 \times t2)}$$

Donde t1 es el tiempo de tránsito de la señal t1 (en el sentido de la corriente), t2 es el tiempo de tránsito de la señal t2 (contra corriente) y k es una constante que tiene en cuenta diferentes parámetros (longitud del camino acústico, razón entre las distancias radiales y axiales de los sensores, distribución de velocidades (perfil de velocidades de flujo) y sección transversal).

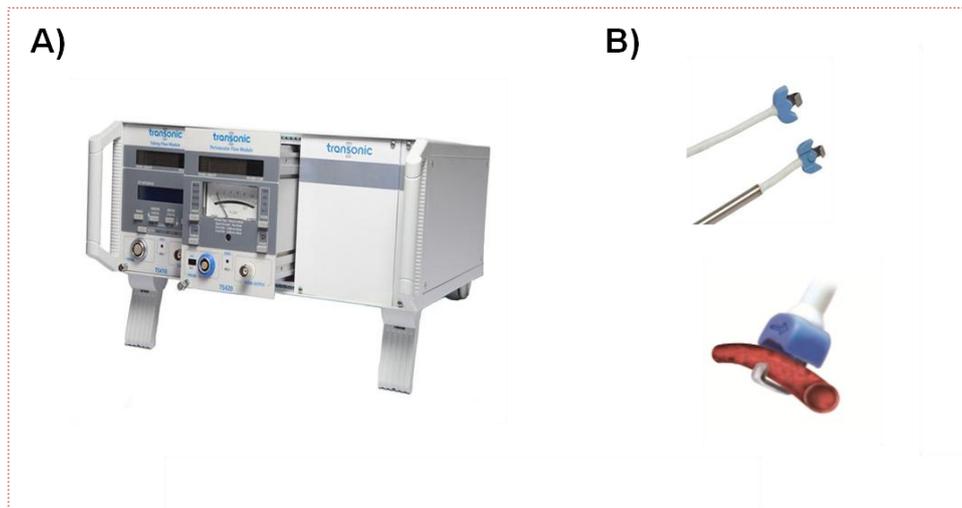


Figura 19. Esquema de la sonda de ultrasonidos Trasonic para medir el flujo sanguíneo renal.

Para preparar al animal, se anestesió con pentobarbital sódico (*Dolethal*, *Vetoquinol*) a una dosis de 50 mg/kg y se dispuso en una mesa de cirugía previamente acondicionada a 37 °C para mantener las condiciones fisiológicas del

animal y evitar que tanto la anestesia, como la cirugía del animal, modificasen condiciones fisiológicas que alterasen nuestros parámetros de estudio.

Se realizó una laparotomía media y se retiraron las vísceras para exponer el pedículo renal. Se desecó la arteria y la vena renal con la ayuda de bastoncillos humedecidos en suero salino y se separaron ambos vasos sanguíneos. No se manipuló el riñón en ningún momento con el fin de evitar alteraciones en el tejido. La sonda de ultrasonidos impregnada en un gel que facilitase la transmisión de la señal (*Quick Eco-Gel, Lessa*), se situó alrededor de la arteria renal y se esperó 15 minutos hasta que el flujo detectado se estabilizase en el equipo Transonic para la recogida de datos.

3.6. Determinación de la perfusión de la corteza renal con láser Doppler

Para la determinación de la perfusión de la corteza renal se utilizó el equipo *Laser Doppler Moor LDLS*. Esta técnica no invasiva se basa en el *efecto doppler*, que determina que la frecuencia de la luz láser reflejada fluctúa de forma proporcional al desplazamiento del fluido de la superficie enfocada que lo refleja. En nuestro estudio, la frecuencia reflejada aumenta de forma proporcional al flujo sanguíneo detectado en la corteza renal.

Este equipo presenta dos sensores; el primer sensor emite una onda de ultrasonidos por el fluido a una frecuencia determinada y el segundo recibe la onda reflejada. La variación producida en la frecuencia del haz de ondas sonoras reflejadas es directamente proporcional a la velocidad del flujo sanguíneo según la siguiente fórmula:

$$Q = k \times \Delta f$$

Donde Δf es la variación de la frecuencia ($f_1 - f_2$) y K es una constante que hace referencia al ángulo de incidencia/reflexión, posición de la partícula reflejante y a la sección transversal.

Para poder medir la perfusión de la corteza renal mediante esta técnica es necesario exponer el tejido renal ya que, por el contrario, las capas externas del animal y sus vísceras impedirían su estudio. Esta técnica se realizó en los animales anestesiados con pentobarbital sódico tras medir el flujo sanguíneo renal con la sonda ultrasónica (explicado en el apartado 2.5). Como en el caso anterior, se

trabajó en una mesa de cirugía previamente acondicionada a 37 °C para evitar alteraciones en el animal producidas por el método de experimentación.

Nuestro equipo dispone de dos fuentes de luz: una visible, de 658 nm de longitud de onda, y otra próxima al infrarrojo, de 785 nm. El aparato produce una única línea láser con los haces visible e infrarrojo coaxiales. Gracias a un espejo controlado por un motor, el láser hace un barrido de la superficie expuesta del animal. Los tejidos serán la superficie que refleje el haz de luz, que será filtrado para eliminar la luz exógena y recibido por un fotodetector. Al ser la sangre la única superficie en movimiento del animal anestesiado, la modificación de la frecuencia de la luz reflejada dependerá directa y exclusivamente del flujo sanguíneo. Para facilitar la medición de la superficie a estudiar y obtener imágenes del riñón sin que influyera el flujo sanguíneo de los tejidos subyacentes, se colocó un fondo negro alrededor del riñón.

El software acoplado al láser permite, mediante un algoritmo, transformar la frecuencia de la luz recibida por el fotodetector en unidades de flujo arbitrarias, que son representadas en una imagen bidimensional a través de un código de colores (figura 17). El programa permite cuantificar en esta imagen el promedio de unidades arbitrarias de flujo por cada píxel de un área seleccionada.

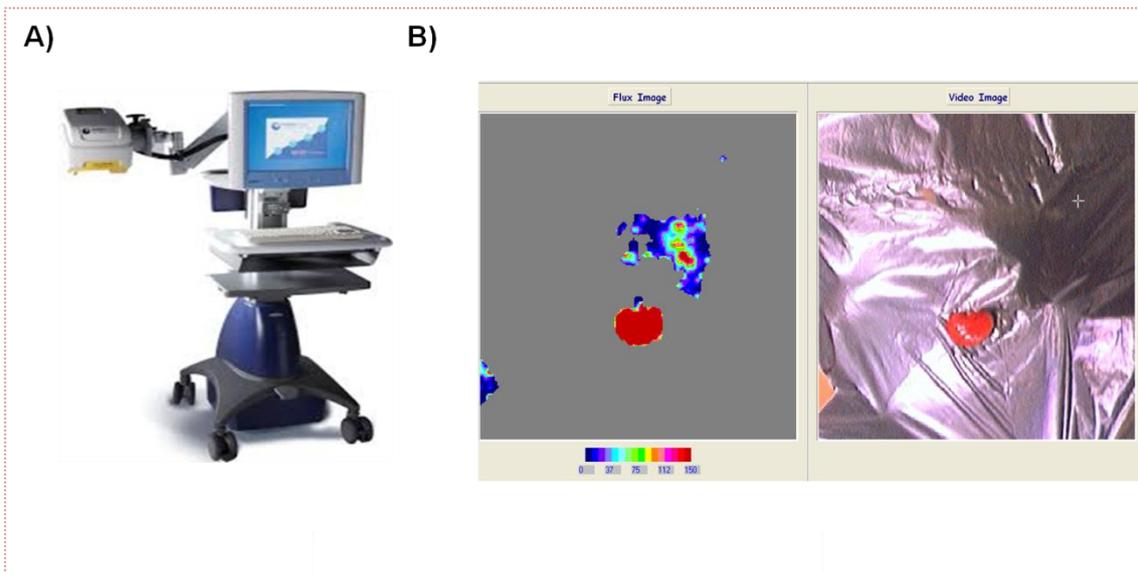


Figura 20. Determinación de la perfusión de la corteza renal con el láser Doppler.
A) Equipo Láser Doppler Moor LDLS; B) Utilización del software asociado para medir la perfusión de la corteza renal de rata.

3.7. Perfusión y recogida de los órganos

Tras realizar la medición del flujo sanguíneo renal y de la perfusión de la corteza renal por las técnicas explicadas en los apartados 2.5 y 2.6, se perfundió a los animales con suero salino 0,9 % para recoger los riñones antes de sacrificarlos.

La perfusión con suero salino 0,9 % es la sustitución de la sangre en los órganos del animal por suero salino con el fin de limpiar los tejidos para facilitar su posterior análisis. Para llevar a cabo esta técnica se utilizó una bomba de infusión (*Dinko Instrumentes D-21V*, 80 rxm, cánula de 0,8 mm) (figura 18). Este tipo de aparatos te permite perfundir los órganos del animal a la velocidad fisiológica de perfusión, con el fin de evitar posibles alteraciones en el tejido por el método experimental. Realizamos la perfusión del animal a través de la introducción de un catéter en la ramificación femoral de la arteria aorta. Tras la perfusión, la descapsulación y recogida de los riñones debe de ser rápida para evitar la degradación del ácido ribonucleico (ARN) y del ácido desoxirribonucleico (ADN). Uno de los riñones se incluyó en formaldehído al 3,7 %, pH 7 (*Panreac*), para estudios histológicos, y el otro riñón fue ultracongelado en nitrógeno líquido y conservado a -80 °C para su posterior análisis por diferentes técnicas (rtPCR y Western blot).

4. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

4.1. Determinación de la creatinina en plasma y en orina.

Aclaramiento de creatinina

La creatinina es un metabolito muscular que se acumula excesivamente en la sangre cuando disminuye la filtración glomerular y, paralelamente, disminuye su excreción urinaria, ya que el 80-85 % de su eliminación se debe a la filtración glomerular, y el 15-20 % restante a su secreción tubular. Además, el aclaramiento de creatinina es un valor utilizado para estimar la TFG, debido a que esta molécula no se absorbe ni se secreta en grandes cantidades a lo largo de la nefrona, por lo que la cantidad de creatinina que aparezca en la orina dependerá directa y únicamente de la filtración glomerular (Delanghe y Speeckaert, 2011). Para la determinación de la concentración de la creatinina en el plasma y en la orina se utilizó un kit comercial (*Quantichrom creatinine assay kit, BioAssay System*). Esta técnica se fundamenta en

el método colorimétrico-cinético conocido como *reacción de Jaffé* (Husdan y Rapoport, 1968). La creatinina es capaz de unirse al ácido pícrico en medio alcalino y dar lugar a un complejo coloreado (complejo de Janvosky), cuya intensidad es proporcional a la concentración de creatinina.

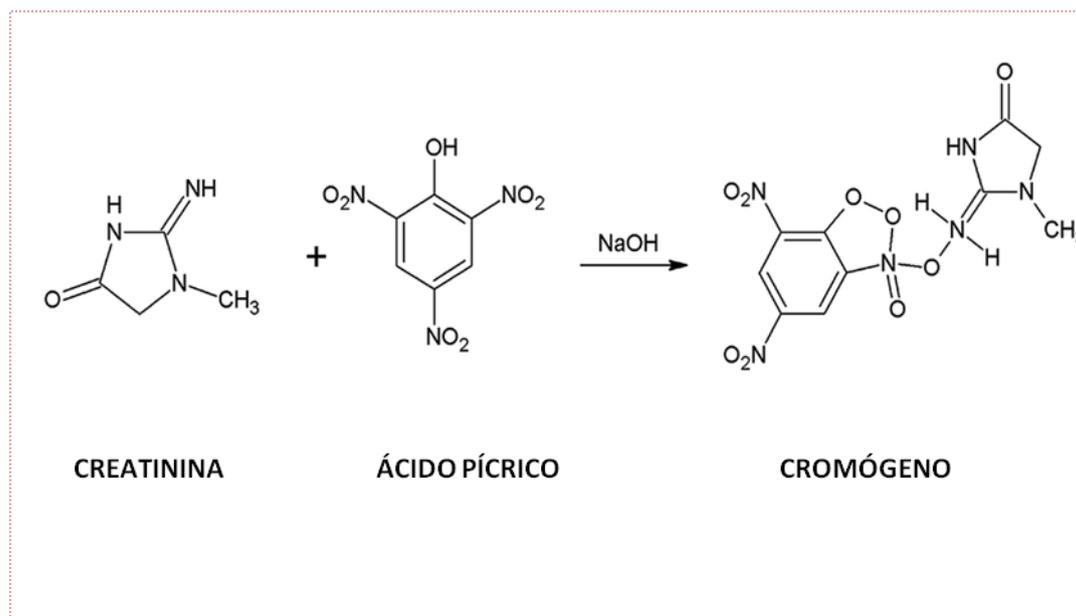


Figura 21. Reacción de Jaffé.

Se utilizó este kit comercial para medir la concentración de la creatinina en las muestras de plasma y orina, siguiendo el protocolo sugerido para cada tipo de muestra. En el caso de las muestras de plasma, se pipeteó 30 μL del plasma y de los patrones de la recta estándar preparada (rango 0,25-10 mg/dL de creatinina) en una placa de 96 pocillos. Se añadieron 200 μL de la mezcla de reactivos A y B del kit comercial (proporción 1:1) y se midió la absorbancia en un lector de placas a 490 nm tras añadir los reactivos (OD_0) y tras cinco minutos (OD_5). En el caso de las muestras de orina, se pipeteó 5 μL de cada una de las muestras de estudio previamente diluidas 1/10 y de la recta estándar de creatinina (rango 0,25-50 mg/dL). Se añadieron 200 μL de la mezcla de reactivos A, B y agua destilada (proporción 1:1:2) y se midió la absorbancia siguiendo los pasos explicados anteriormente. En ambos casos, se determinó la concentración de creatinina siguiendo los siguientes pasos: i) se calculó la diferencia entre $\text{OD}_5 - \text{OD}_0$ de las muestras y de los calibradores de la recta estándar; ii) se determinó la recta estándar a partir de las absorbancias obtenidas para cada calibrador utilizado; iii) se extrapoló la concentración de

creatinina de cada una de las muestras y se tuvo en cuenta el factor de dilución en cada caso.

Como se ha explicado en el apartado 7.1 de la Introducción de este trabajo de investigación, el aclaramiento de la creatinina es un fiable estimador de la tasa de filtración glomerular. Se puede calcular según la siguiente fórmula:

Creatinina filtrada = Creatinina excretada

$$TFG = \frac{(FU \times Cro)}{Crpl} = Clc$$

Donde TFG es la tasa de filtración glomerular, Clc es el aclaramiento de creatinina (ml/min), FU es el flujo urinario (ml/min), Cro es la concentración de creatinina en orina (mg/dl) y Crpl es la concentración de creatinina en plasma (mg/ml).

4.2. Determinación de la urea plasmática

La urea es un metabolito hepático que se acumula excesivamente en la sangre cuando disminuye la filtración glomerular. Para la determinación de la concentración de urea en el plasma se utilizó un kit comercial (*Quantichrom Urea Assay Kit, BioAssay System*). Este kit comercial se fundamenta en el método colorimétrico propuesto por Jung (Jung y cols., 1975), que describe la reacción que se produce entre la urea, y dos moléculas, el ortoftalaldehído (OPA) y el N-naptileno diamida (NED) para dar lugar a un compuesto coloreado cuya intensidad será directamente proporcional a la concentración de urea. Según el protocolo comercial, se pipeteó 5 µL de las muestras plasma previamente diluidas 1/10 en una placa de 96 pocillos (Becton Dickinson Labware) y de los calibradores de la recta estándar de urea (0 a 50 mg/dL de urea). Se añadieron 200 µL de la mezcla de reactivos A-B del kit comercial (proporción 1:1) a cada pocillo y se incubó la placa durante 20 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente, se midió la absorbancia de los pocillos en un lector de placas (ELx800, *Bio-Tek Instruments*) a 520 nm. Tras obtener las absorbancias correspondientes a cada calibrador de la recta estándar, se extrapola la concentración de urea de cada una de las muestras de plasma analizadas y se tuvo en cuenta el factor de dilución.

4.3. Determinación de la concentración de proteínas en la orina

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

La concentración de proteínas en las muestras de orina de los animales del estudio no nos reporta información relevante sobre su función renal, ya que es necesario tener en cuenta el volumen de orina en el que se han excretado dichas proteínas, es decir, la excreción de proteínas. Para evaluar la función renal de nuestros animales se determinó la excreción de proteínas totales por día, con el fin de valorar si éstos presentaban proteinuria (presencia de proteínas en la orina en un valor superior al normal, detallado en el apartado 9.1 de la Introducción). Se calculó la excreción total de proteínas por día según la siguiente fórmula:

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

Donde C_{po} es la concentración de proteínas en la orina y FU.

4.4. Determinación de la excreción urinaria de N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG)

El marcador de daño tubular N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG) es una enzima lisosomal encargada de catalizar la hidrólisis de enlaces glucosídicos. Para

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

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

$$\text{Excreción urinaria de NAG } \left(\frac{\text{UA}}{\text{día}} \right) = \text{Co NAG } \left(\frac{\text{UA}}{\text{mL}} \right) \times \text{FU } \left(\frac{\text{mL}}{\text{día}} \right)$$

Donde Co NAG es la concentración de NAG en la orina obtenido por el kit comercial y FU es el flujo urinario.

4.5. Determinación de la osmolaridad urinaria: Osmómetro

La osmolalidad urinaria es un parámetro ampliamente utilizado para diferenciar el DRA renal del DRA pre-renal. Para su cálculo se utilizó un osmómetro crioscópico (*Osmomat 030*, figura 22), equipo de lectura automática que mide la osmolalidad de las soluciones basándose en *el método del punto de congelación y del descenso crioscópico*. El descenso crioscópico de una disolución es la disminución de la temperatura del punto de congelación que experimenta una disolución respecto a la del disolvente puro. La magnitud de este descenso solo depende de la naturaleza del disolvente y de la cantidad de soluto disuelto, por lo que la evaluación de ese

descenso permitirá estimar la osmolalidad de la disolución. El equipo enfría la disolución a estudiar por debajo de la temperatura de congelación e inyecta pequeños cristales de hielo en la muestra para que ésta llegue a su punto de congelación. Es necesario calibrar el aparato con diferentes soluciones de osmolaridad conocidas relacionadas con su punto de congelación para que éste pueda calcular la osmolalidad de la muestra de estudio a partir del punto de congelación obtenido.

Para ello, se prepararon 50 μL de las muestras de orina a analizar diluidas 1/10 en tubos tipo *ependorf*. Se colocaron en el aparato y se introdujeron en la zona del osmómetro que se encuentra a $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$, donde las muestras fueron congeladas y tras esperar varios segundos, la osmolalidad de la muestra fue visualizada en una pantalla situada en la parte superior del medidor.



Figura 22. Equipo Osmomat 030, osmómetro crioscópico utilizado para determinar la osmolalidad en muestras de orina.

4.6. Determinación de la concentración de Na^+ en orina y en plasma

La concentración de Na^+ en orina y plasma se utiliza, como en el caso anterior, para diferenciar el DRA de tipo intrínseco del DRA pre-renal. Se evaluó en muestras biológicas de plasma y orina mediante la utilización de un medidor de Na^+ compacto (*LAQUATWin B-722, Horiba Scientific*). El principio de medición de este sensor

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

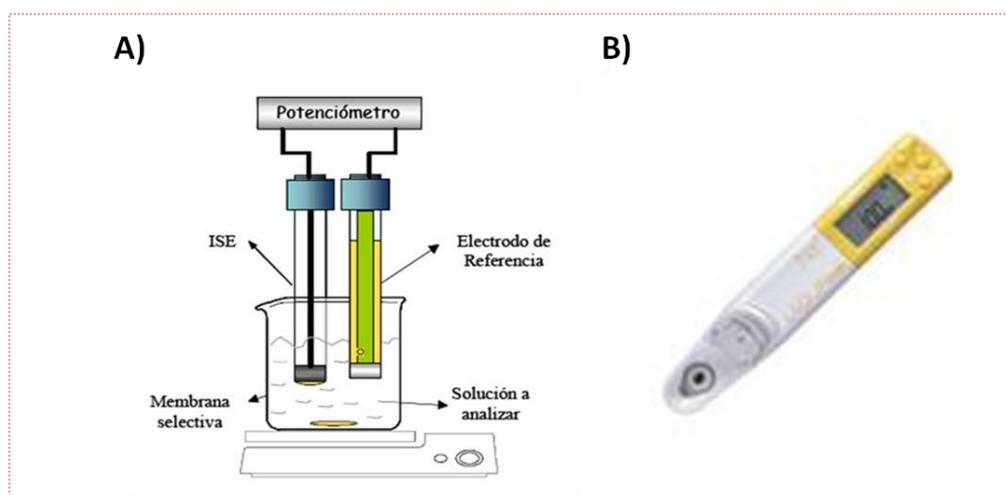


Figura 23. Potenciómetro para medir iones Na⁺. A) Fundamento teórico del medidor de Na⁺ utilizado. B) Equipo LAQUATWin B-722. ISE: electrodo selectivo de iones.

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

$$FeNa = \frac{(Na_o \times Crpl)}{Nap \times Cro} \times 100$$

Donde N_{ao} es concentración de Na^+ en orina, Cr_{pl} es la concentración de la creatinina en el plasma, N_{ap} es la concentración de Na^+ en el plasma y Cr_o es la concentración de la creatinina en la orina.

4.7. Determinación de la fracción excretada de glucosa

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

$$FeGlc = \frac{(Glc_o \times Cr_{pl})}{(Glc_p \times Cr_o)} \times 100$$

Donde Glc_o es la concentración de glucosa en la orina, Cr_{pl} es la concentración de la creatinina en el plasma, Glc_p es la concentración de la glucosa en el plasma y Cr_o es la concentración de la creatinina en la orina.

4.7.1. Determinación de la glucosa en el plasma

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

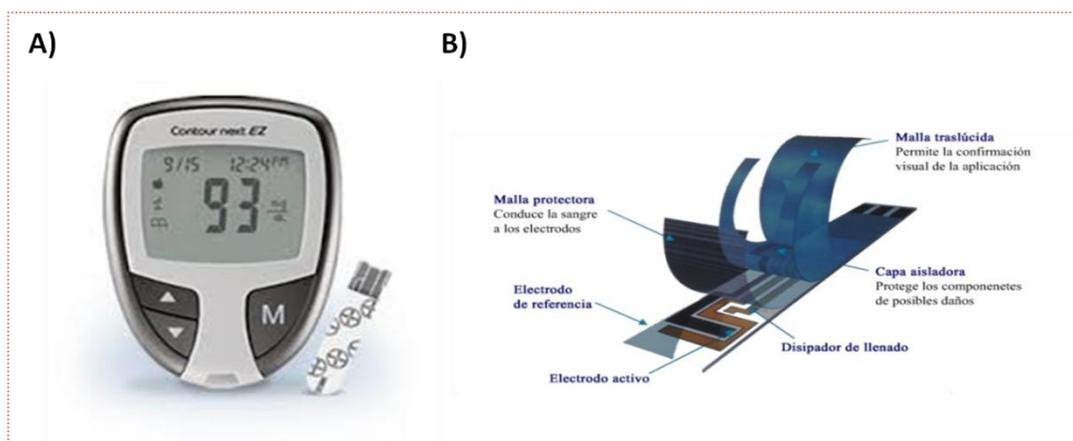


Figura 24. Medidor de la concentración de glucosa en plasma. A) Dispositivo medidor de la concentración de glucosa en plasma y sus tiras reactivas; B) componentes de las tiras reactivas necesarios para la medición de la glucosa.

4.7.2. Determinación de la glucosa en la orina

La concentración de la glucosa en la orina recolectada se analizó mediante el método de la O-toloudina. Este método analítico se fundamenta en la condensación de la glucosa y las aminas aromáticas primarias en un medio de ácido acético. El producto coloreado final es el resultado de la reacción de la o-toloudina (amina aromática) con la glucosa, formándose glucosilamina y la correspondiente base de Schiff. Este producto coloreado tiene un máximo de absorción a 625-635 nm (Brilla y cols., 1977). Para ello, se pipetearon 25 μL de la muestra a analizar y de la recta patrón de concentraciones conocidas de glucosa en tubos tipo *ependorf* de 2 mL. Se añadieron 125 μL de ácido tricloroacético (TCA del inglés *trichloroacetic acid*) al 3 % por pocillo y 1.350 μL de la amina aromática o-toloudina. Esta mezcla fue hervida a 100 °C en un baño húmedo (*Indelab*) durante 12 minutos y tras enfriarse, se pipetearon 250 μL de cada uno de los *ependorf* por triplicado en una placa de 96 pocillos. Se midió la absorbancia resultante a 630 nm de longitud de onda. Tras obtener las absorbancias correspondientes a los calibradores de la recta patrón, se extrapolaron la concentración de glucosa en las muestras de orina en mg/mL.

4.8. Identificación de proteínas: técnica Western blot

El *Western blot* es una técnica basada en la separación de proteínas mediante electroforesis en función de su peso molecular, que, una vez separadas, se pueden identificar, localizar y cuantificar por su capacidad para unirse a anticuerpos específicos (Towbin y cols., 1979). Los anticuerpos están acoplados a sistemas de

detección, que permiten localizar las proteínas y establecer una relación entre la intensidad de la señal del sistema de detección y la cantidad relativa de la proteína en las diferentes muestras. Esta técnica se utilizó para la evaluación de diferentes proteínas en muestras de tejido renal y muestras de orina (recolección explicada en los apartados 2.1 y 2.7, respectivamente).

4.8.1. Extracción de proteínas del tejido renal

El tejido renal se conservó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tras su ultracongelación en nitrógeno líquido (apartado 2.7). Se obtuvo un extracto de las proteínas del tejido renal para poder analizar por Western blot. Para ello, se pesó entre 50-100 mg de tejido renal previamente pulverizado y se lisó con un tampón de lisis específico (NaCl 140 mM, EDTA 50 mM, glicerol 10 %, NP-40 1 %, Tris 20 mM pH 7.5, leupeptina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, aprotinina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonyl del inglés *o*-toluensulphonylfluoride) 1 mM, NaF 5 μM , Na_3VO_4 1 mM) utilizando un homogeneizador para su completa disgregación. Se centrifugó el lisado obtenido a 15.000 G, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos y se conservó el sobrenadante a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

4.8.2. Cuantificación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas de los lisados se determinó siguiendo el protocolo de un kit colorimétrico de BioRad, basado en el método de Lowry (Lowry y cols., 1951). Este método consta de dos etapas: 1) la reacción de Biuret en la que los grupos Cu^{2+} se unen a los grupos aminopeptídicos de las proteínas en un medio alcalino y forman unos complejos de coordinación de color violeta. Además, rompen la estructura tridimensional de la proteína y los residuos fenólicos de tirosina quedan expuestos; 2) la reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu en la que se forma un complejo de color azul oscuro producido por la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu por los grupos fenoles expuestos. La intensidad del color de dicho complejo azulado es directamente proporcional a la concentración de proteínas.

Se pipetearon 5 μL de las muestras diluidas 1/20 y de los calibradores de una recta patrón de ASB de concentraciones conocidas (0-1 mg/mL) en una placa de 96 pocillos. Se añadieron 25 μL de la mezcla de reactivos A+S y 200 μL de reactivo B a cada pocillo. Se midió la absorbancia a 720 nm en un lector de placas de ELISA (ELx800, *Bio-Tek Instruments*) y se analizaron los resultados con el programa Gen

5.0. A partir de la recta patrón de concentraciones conocidas de ASB se extrapolaron las concentraciones de proteínas de las muestras de estudio.

4.8.3. Preparación de las muestras de orina

En el análisis de las proteínas de la orina de los animales tratados con los diferentes fármacos, la técnica del Western blot se utilizó para estudiar el patrón de aparición de determinadas proteínas relacionadas con el DRA. Para la preparación de las muestras se diferenció dos tipos de estudio:

1. *Estudio de la excreción de las proteínas en la orina:* Se determinó la cantidad de orina que se cargó en los pocillos del Western blot por el flujo urinario diario de cada animal, considerando la relación existente entre el volumen excretado y la concentración de la orina.
2. *Estudio de la composición relativa de la orina:* Se midió la concentración de proteínas en las muestras de orina (apartado 3.3) y se cargó 5 ug de proteínas de las muestras en los pocillos del Western blot.

4.8.4. Preparación de las muestras, electroforesis y transferencia

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

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

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

4.8.5. Incubación con los anticuerpos

Ya que las proteínas son capaces de unirse a la membrana de forma inespecífica, fue necesario bloquear los posibles espacios que quedasen libres para evitar uniones inespecíficas durante la inmunodetección. Se utilizó ASB al 3 % durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación.

Tras el bloqueo, se incubó las membranas con el anticuerpo primario, capaz de unirse a la proteína que deseamos detectar a la dilución adecuada, disuelto en ASB al 1 % durante toda la noche a 4 °C en un agitador rotatorio (*Biocomp Navigator*). La tabla 7 muestra los anticuerpos primarios utilizados y la dilución óptima para su detección.

Tras lavar la membrana con tampón de lavado (Tween-20 al 0,1 %, NaCl 150 mM, Tris 20 mM, pH 7,5, *Sigma Aldrich*) se incubó con el anticuerpo secundario, capaz de reconocer una región específica del anticuerpo primario. Se disolvió en ASB al 3 % a la dilución correspondiente, durante 30 minutos a temperatura ambiente. La tabla 6 muestra los anticuerpos secundarios utilizados y la dilución óptima de uso.

El anticuerpo secundario está unido a la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP, del inglés *horseradish peroxidase*), que en presencia de peróxido de hidrógeno y luminol, es capaz de catalizar una reacción luminiscente. Las membranas se incubaron durante 1 minuto en una solución ECL (Tris-HCl 1M, pH 9,35; luminol 2,2 mM, p-iodofenol 2,2 mM) suplementada con H₂O₂ al 0,03-0,06 %. La HRP cataliza el H₂O₂ y libera O₂ que oxida el luminol, y éste oxidado produce una señal luminosa proporcional a la cantidad de anticuerpo secundario, e indirectamente, a la cantidad de proteína. Esta señal se detectó en la oscuridad en una película de autorradiografía FUJIFILM (Fuji Medical X-Ray Film, Super RX), que fue revelada

mecánicamente (máquina de revelado Medical X Ray Processor *Kodak*) y digitalizada (Adobe Photoshop CS6) para su posterior cuantificación con el programa *Scion Image*.

Figura no publicada por proceso de patente

Tabla 7. Relación de anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la técnica de Western Blot.

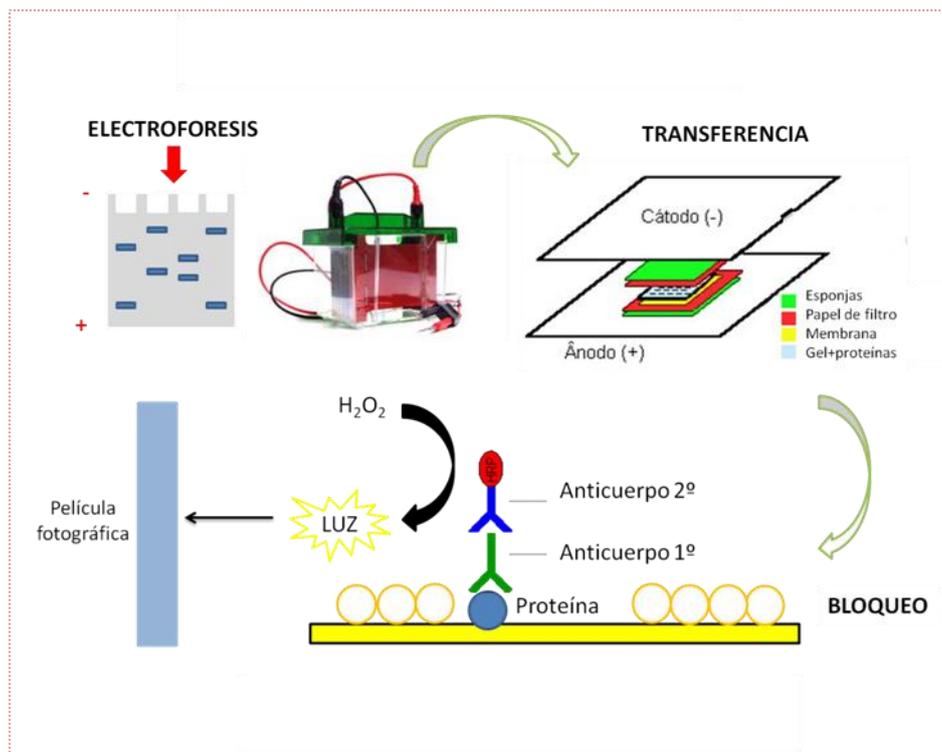


Figura 25. Representación esquemática Western Blot.

4.9. Estudio de la expresión génica: q-PCR/PCR a tiempo real

Se estudió la expresión génica en el tejido renal de dos moléculas implicadas en la regulación sistémica y renal, la renina y la COX-2, mediante la técnica de PCR cuantitativa o qPCR o Q-PCR, del inglés *quantitative polymerase chain reaction*, también conocida como rt-PCR (del inglés *real time PCR*).

4.9.1. Extracción de RNA del tejido renal

Para la obtención del ARN de las muestras de tejido renal extraídas y ultracongeladas (apartado 2.7) se utilizó un kit comercial *NucleoSpin®RNA II* (*Macherey-Nagel*). Esta técnica de extracción se basa en la separación 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 una membrana de sílica.

En primer lugar se disgregó el tejido renal previamente pulverizado y se lisaron las células con el reactivo RA1 del kit comercial suplementado con β -mercaptoetanol (necesario para eliminar ribonucleasas liberadas durante la lisis celular y así prevenir su digestión durante el proceso). Tras filtrar el lisado con la ayuda de unas columnas específicas, el ARN se unió a la membrana de sílica de unas columnas determinadas al ajustar las condiciones de unión entre el ARN y la membrana. Se añadieron rDNAsas para eliminar la posible contaminación de ADN en la membrana de sílica. Finalmente, el ARN se eluyó de la membrana con agua libre de ARN, capaz de devolver la capa hidratante de agua alrededor de estos ácidos nucleicos y liberarlos así de la membrana en la que estaban retenidos.

La concentración de ARN de los extractos obtenidos se cuantificó en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (*Thermo Fisher Scientific*).

4.9.2. Obtención de ADNc

Se obtuvo ADN complementario (ADNc) mediante la técnica de transcripción reversa (RT-PCR) que permite sintetizar ADNc a partir de ARN gracias a la enzima transcriptasa reversa.

Para llevar a cabo dicha reacción se incubaron 2 μg de ARN extraído en el paso anterior (apartado 4.9.1) a 65 °C durante 3 minutos para su desnaturalización. A continuación, se añadió la siguiente mezcla con los reactivos necesarios para la reacción: 2 μl de dNTPs (10 mM), 8 μl de tampón M-MLV (5 %) (*BioRad*), 1 μl de oligodT, 0,5 μl de Rnasin[®] (40 U/ μl) (*Promega*) y 1 μl de retrotranscriptasa (RT M-MLV, *BioRad*) y se incubó a 42 °C durante 90 minutos para que se produjese la retrotranscripción.

4.9.3. PCR cuantitativa o PCR a tiempo real

Este método permite la amplificación de una determinada secuencia de ADN basada en la capacidad de la enzima ADN polimerasa para replicar el ADN. Está formado por tres etapas: (1) etapa de desnaturalización en la que la doble hélice de ADN se abre; (2) etapa de hibridación necesaria para que los cebadores específicos se unan a las hebras de ADN; (3) etapa de elongación en la que se sintetizará la secuencia del ADN a amplificar gracias a la acción de la ADN polimerasa. Se denomina reacción en cadena porque estas etapas se repiten durante sucesivos ciclos, dando lugar a una amplificación exponencial del producto final. Además, se puede conocer la amplificación de la secuencia al final de cada ciclo debido a la

adición de un fluoróforo capaz de unirse al ADN de doble hélice cuando este se une tras la amplificación.

Para llevar a cabo la reacción de PCR se mezcló 1 µL de ADNc, 10 µL de la Supermix iQ™ SYBR ® Green (BioRad), 0,4 µL de cada cebador y 8,2 µL de H2O mQ. Se utilizó un termociclador iQ™ 5 (Biorad) con el siguiente protocolo para llevar a cabo las diferentes etapas de la reacción: 95 °C durante 5 minutos (pre-incubación), seguidos de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C (desnaturalización), 30 segundos a la temperatura de anillamiento específica y 30 segundos a 72 °C para la elongación.

Los resultados obtenidos se analizaron mediante un software específico acoplado al termociclador, capaz de calcular la expresión relativa de los genes de estudio en cada una de las muestras analizadas. La tabla 8 muestra los cebadores utilizados y las condiciones necesarias para su uso en la PCR.

GEN DIANA	SECUENCIA DE LOS CEBADORES (5' → 3')	Tª ANILLAMIENTO
Renina	AAGTCATCTTTGACACGG TTACCACATCTTGGCTGA	62
COX-2	CGGGATCCGAAATGGCTGCAGAGTG GGAATTCTCATCTAGTCTGGAGTGG	62
A-actina	CCGCCCTAGGCACCAGGGTG GGCTGGGGTGTGAAGGTCTCAA	62

Tabla 8. Cebadores utilizados y condiciones empleadas en la técnica de PCR.

4.10. Técnica de ELISA

La técnica ELISA, acrónimo del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, es un inmunoensayo que emplea dos componentes acoplados, anticuerpos y enzimas, para detectar un antígeno específico.

Se utilizó el kit comercial ELISA para detectar Angiotensina I (*IBL International*), diseñado específicamente para medir la actividad de renina en

plasma. Como se ha detallado en el apartado 2.2 de la Introducción, la renina es la enzima responsable de la formación de angiotensina I a partir de la molécula angiotensinógeno. Se realizó la cuantificación de la cantidad de renina en el plasma de una forma indirecta, midiendo la cantidad de angiotensina I formada en las condiciones óptimas para ello. Se llevó a cabo un primer paso de producción de angiotensina I en las muestras de estudio y posteriormente, se midió la concentración de angiotensina I formada en cada una de ellas mediante la técnica de ELISA.

4.10.1. Obtención del sustrato de renina e incubación

Es necesario incubar el plasma extraído con EDTA (etilendiaminotetracético) (apartado 2.3) con un sustrato de renina, plasma con angiotensinógeno libre de renina. Para obtener este plasma se realizó una nefrectomía bilateral en ratas y se exanguinaron tras 24 horas.

Para realizar la nefrectomía bilateral de cada animal, se anestesió con la mezcla anestésica ketamina-xilacina (Ketolar, Pfizer; hidrocloreuro de xilacina, Bayer) a una dosis de 80-10 mg/kg (Zuñiga y cols., 2008). Se realizó una laparotomía media y se extirparon ambos riñones tras ocluir el pedículo renal para evitar que el animal se desangrase. Tras 24 horas, se anestesió al animal con pentobarbital sódico (50 mg/kg), se canuló la aorta en la bifurcación femoral y se procedió a su exanguinación.

La sangre fue procesada (7.000 x g, 4 °C durante 4 minutos) y el plasma obtenido se conservó a -20 °C. El plasma de las muestras de estudio y el sustrato de renina fueron incubados a 37 °C durante 90 minutos en las condiciones óptimas para que se produjese la formación de angiotensina I. A su vez, se incubó la misma mezcla de plasma-sustrato en las mismas condiciones a 4 °C como control negativo de la cantidad de angiotensina I inicial de cada muestra de estudio.

4.10.2. Inmunoensayo de angiotensina I

Esta técnica para detectar angiotensina I se basa en un método de competición en el que la angiotensina I de las muestras compitió con moléculas de angiotensina I marcadas con biotina por la unión con el anticuerpo de angiotensina I situado en cada uno de los pocillos de la placa de ELISA que se utilizó. Para ello, se pipetearon 50 µL de la muestra a analizar incubada a 37 °C o a 4 °C, de la recta patrón y de los controles en la placa de ELISA facilitada por la casa comercial. Se añadieron 100 µL de angiotensina I marcada con biotina y se incubó 1 hora a 18-25 °C en agitación. Posteriormente, tras lavar la placa se produjo una incubación de 30 minutos con un

MATERIALES Y MÉTODOS

conjugado de estreptavidina y HRP (150 µL), que se unió específicamente a la angiotensina etiquetada con biotina unida al anticuerpo debido a la alta afinidad de unión entre la biotina y la estreptavidina. Finalmente, tras varios lavados este complejo de unión se detectó al añadir en cada pocillo 150 µL de un substrato colorimétrico para la enzima HRP. Tras 15 minutos de incubación, se añadieron 50 µL de un reactivo específico necesario para parar la reacción. El color producido por la acción de dicha enzima en el substrato fue medido en un lector de placas, siendo la intensidad del color directamente proporcional a la unión de la angiotensina I biotinilada al anticuerpo, y por tanto, inversamente proporcional a la angiotensina I contenida en las muestras de estudio. Se utilizaron una serie de calibradores y estándares de angiotensina I para que la cantidad de angiotensina I de las muestras pudiera ser cuantificada directamente.

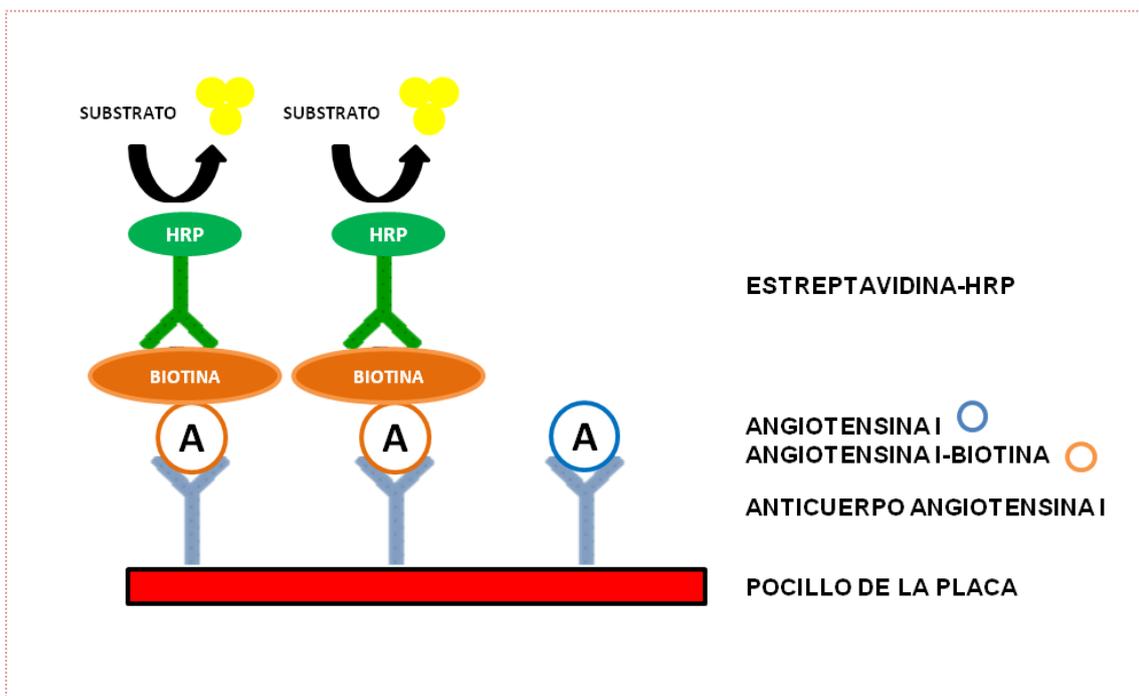


Figura 26. Esquema representativo del ELISA indirecto llevado a cabo para determinar la concentración de angiotensina I en muestras de plasma. HRP: peroxidasa de rábano picante.

Tras obtener la concentración de angiotensina I en cada una de las muestras, la actividad de renina en el plasma (ARP) se cuantificó según la siguiente fórmula:

$$ARP = \frac{Ang I (37^{\circ}C) - Ang I (0^{\circ}C)}{tiempo (h)} \times 1,11$$

Donde ARP es actividad de renina en el plasma, Ang I (37 °C) es la concentración de angiotensina I obtenida en el ensayo en las muestras incubadas a 37 °C, Ang I (0 °C) es la concentración de angiotensina I obtenida en el ensayo en las muestras incubadas a 0 °C y el tiempo (h) es el tiempo de incubación en la fase de generación de angiotensina I (apartado 4.10.1).

5. HISTOLOGÍA

Se realizó un estudio histológico del tejido renal obtenido tras su perfusión mediante una tinción de hematoxilina-eosina y una inmunofluorescencia de la renina y la COX-2.

El riñón destinado para dicho estudio se fijó con formaldehído tamponado al 3,7 % (*Panreac*) durante al menos 24 horas, capaz de evitar la degradación del tejido. Posteriormente, se deshidrató con diferentes soluciones de etanol, de gradación creciente hasta el 100 %, para que la parafina pudiera penetrar en el tejido ya que no es miscible con el agua. Tras la deshidratación se sumergió el tejido en xileno, miscible en etanol absoluto y también en parafina, para sustituir al alcohol en el tejido deshidratado, y así, facilitar la infiltración de la parafina en el siguiente paso. Después, el tejido se incluyó en parafina en una estufa a 60 °C durante 24 horas para obtener bloques. Finalmente, se realizaron cortes de 5 µm con un microtomo (*HM-310, Micron*) y se colocaron en un portaobjetos que fueron secados en una estufa durante 24 horas.

Antes de realizar las diferentes tinciones, se lavó los cortes de riñón colocados en portaobjetos con xileno para eliminar los restos de parafina y se rehidrató el tejido con soluciones de isopropanol (desde el 100 % hasta el 76 %) hasta finalizar con agua destilada.

5.1. Tinción hematoxilina-eosina

Esta tinción histológica permite el estudio de la morfología de las células que conforman el tejido de estudio debido a los dos tintes utilizados, así como de las estructuras tisulares en conjunto. La hematoxilina se une intensamente a los ácidos, por lo que se unirá a los ácidos nucleicos y marcará el núcleo celular de un tono azulado. La eosina, compuesto cargado negativamente, presenta avidez por los

compuestos básicos, de forma que delimita el citoplasma de la célula de un tono rosado.

Para obtener esta tinción se introdujo el tejido deshidratado 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.

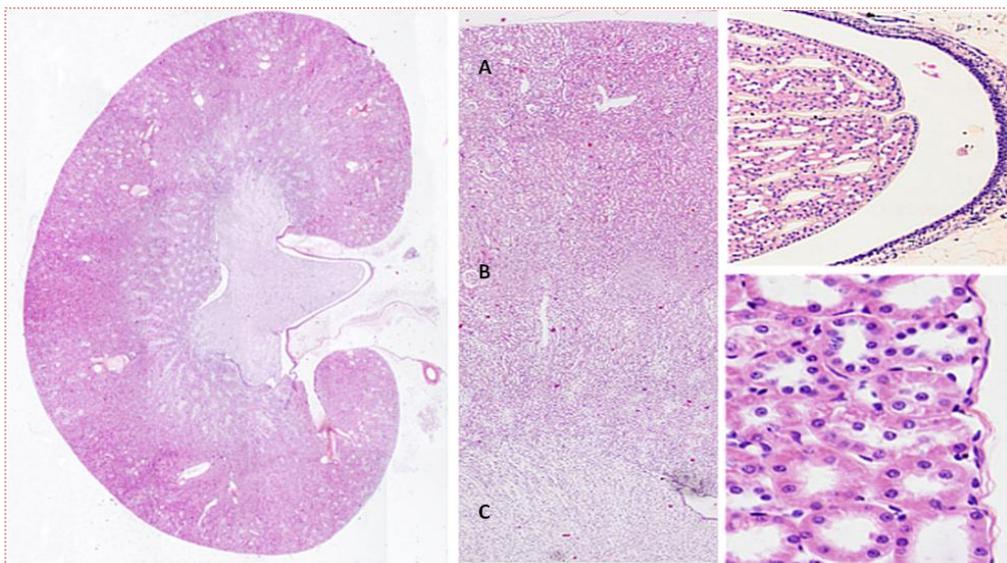


Figura 27. Imagen representativa de un corte longitudinal de un riñón de rata teñido con hematoxilina-eosina. Se diferencian las tres partes que se estudiarán detenidamente: A) corteza; B) médula C) papila.

Se realizó un análisis del daño tisular observado en la corteza, médula y papila renal de todos los animales incluidos en el estudio, con el fin de evaluar la presencia o ausencia de daño en el tejido renal tras el tratamiento farmacológico. Para ello, se utilizaron 3 cortes renales teñidos de hematoxilina-eosina provenientes de animales controles negativos (sin ningún tipo de tratamiento farmacológico) y 3 cortes renales con la misma tinción provenientes de ratas tratadas con un fármaco que produce daño renal cortico-medular, utilizados como controles positivos de daño. La tabla 9 adjunta muestra las características de daño evaluadas en las cuatro estructuras fundamentales del riñón: los glomérulos, los túbulos, el intersticio renal y los vasos

sanguíneos así como su valor numérico asociado. Se evaluaron las características histológicas renales en cada grupo experimental animal. Para ello, se dividió la parte renal a analizar (corteza, médula o papila) en diez campos visuales observados con el microscopio y se evaluó la presencia de alguna alteración en cada una de las estructuras citadas. Tras analizar los diez campos visuales, se adjudicó el valor numérico correspondiente a cada estructura renal de acuerdo con el estudio observacional realizado.

ESTRUCTURA RENAL	VALOR NUMÉRICO 0	VALOR NUMÉRICO 1	VALOR NUMÉRICO 2
GLOMÉRULOS	Sin alteraciones	Proliferación mesangial focal	Aparición de glomérulos hialinizados/ esclerosados
TÚBULOS RENALES	Sin alteraciones	Aparición de microvacuolas citoplasmáticas Incremento en la celularidad Cambio de orientación/ conformación de los túbulos	Hinchamiento células tubulares Vacuolización Pérdida del borde en cepillo Presencia material hialino Pérdida de los núcleos
INTERSTICIO RENAL	Sin alteraciones	Proliferación estromal focal	Pérdida de los núcleos celulares Proliferación estromal Alteraciones inflamatorias Fibrosis
VASOS SANGUÍNEOS	Sin alteraciones	Leve engrosamiento de las paredes vasculares	Engrosamiento de las paredes vasculares Aparición de trombos proteicos Infiltrado inflamatorio

Tabla 9. Características de daño renal evaluadas y valor numérico asociado.

5.2. Tinción inmunohistoquímica de fluorescencia

Esta técnica de inmunohistoquímica se basa en la detección y localización de una determinada proteína en el tejido de estudio mediante un complejo formado por

anticuerpos. El primer anticuerpo utilizado es capaz de unirse a la proteína que se desea evaluar, mientras que, el anticuerpo secundario reconoce, por una parte, al anticuerpo primario, y por otra, se encuentra unido a un fluorocromo, capaz de emitir fluorescencia en el espectro visible tras ser excitado con diferentes longitudes de onda. Además, esta técnica te permite estudiar múltiples proteínas en un mismo tejido de forma simultánea, gracias a la utilización de anticuerpos secundarios unidos a fluorocromos diferentes.

Tras la hidratación del tejido renal anteriormente descrita fue necesario hervir las muestras en Tris-EDTA (10 mM Tris Base; 1 mM EDTA; 0,05 % tween; pH 9) a 100 °C durante 45 minutos con el fin de romper las uniones químicas intraproteicas e interproteicas producidas por el formaldehído en la etapa de fijación, que pudieran impedir la fijación de los anticuerpos a las proteínas (Salvadó-Usach y cols., 2001). Después se bloqueó el tejido renal con leche al 5 % (*Sigma Aldrich*) durante 20 minutos a temperatura ambiente para saturar los posibles sitios de unión inespecífica de los anticuerpos y se incubó el anticuerpo primario durante toda la noche a 4 °C. Finalmente, se incubó el anticuerpo secundario en la solución de bloqueo durante 90 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. La tabla 10 muestra las condiciones de bloqueo, de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados.

ANTICUERPO PRIMARIO	DILUCIÓN	ANTICUERPO SECUNDARIO	DILUCIÓN	FLUORÓFORO
Anti-COX-2	1:200	Anti-conejo	1:400	Cy3
Anti-renina	1:400	Anti-pollo	1:400	Cy2
Anti-actina	1:600	Anti-ratón	1:400	Cy5

Tabla 10. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados y condiciones de uso.

Tras la incubación, se añadió medio de montaje DPX (*Sigma Aldrich*) y se cubrió los cortes del tejido con un cubreobjetos para protegerlos. Se esperó al menos una hora tras el montaje para poder observar las preparaciones en un microscopio de fluorescencia. Se utilizó un microscopio confocal de fluorescencia (*Axiovert 200M, Carl Zeiss*) para evaluar la expresión y localización de las proteínas de estudio (figura

28). Se realizaron fotografías a diferentes aumentos (10x, 20x y 40x) y se obtuvieron imágenes representativas de cada grupo del corte renal completo mediante la realización de un mosaico con múltiples fotografías a un aumento de 10x (15 columnas, 25 filas, 5 % de superposición, 911 ms de exposición) con un microscopio óptico de fluorescencia (*Axiovert 200M*, Zeiss).

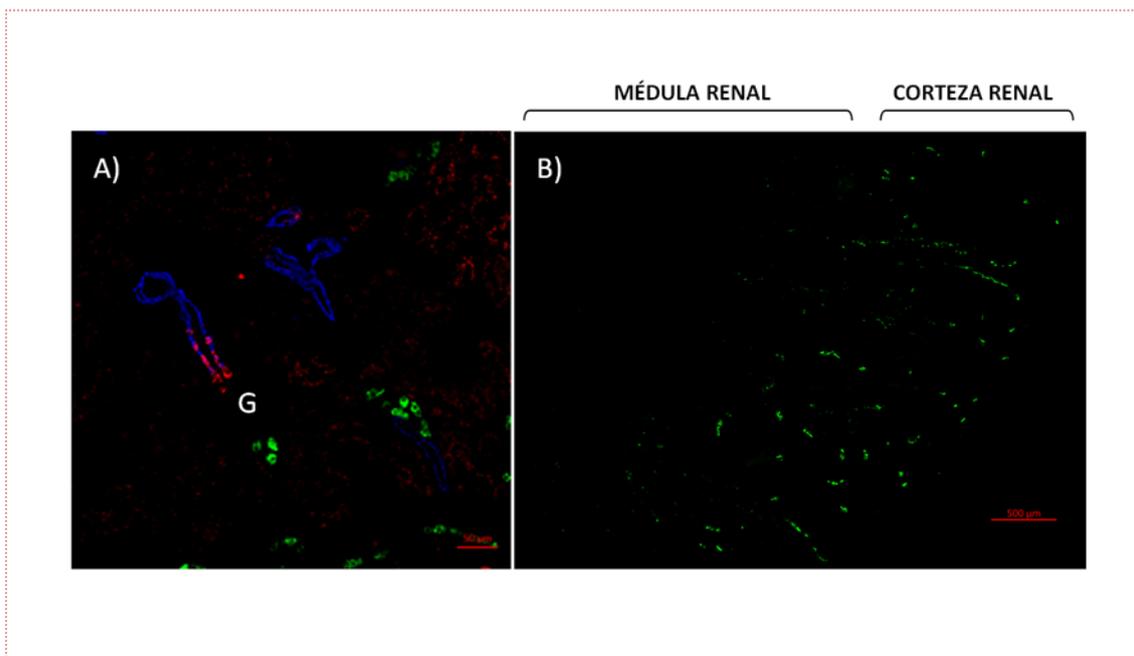


Figura 28. *Imágenes obtenidas mediante inmunofluorescencia en tejido renal de rata; A) imagen representativa (10x) de un glomérulo renal (G); fluoróforo verde: COX-2; fluoróforo rojo: renina y fluoróforo azul: actina; B) visión global de la expresión de la proteína de COX-2 en la corteza renal mediante la obtención de múltiples imágenes a un aumento de 20x.*

6. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE UN ANÁLISIS PROTEÓMICO

La proteómica es el estudio y la caracterización del conjunto de proteínas expresadas en un proteoma. Se utilizó este conjunto de técnicas de análisis proteómico con el fin de identificar proteínas en la orina de nuestros animales, estudiar su patrón de excreción y establecer una posible correlación con los diferentes parámetros fisiológicos y fisiopatológicos estudiados.

En primer lugar, se aplicó una técnica para analizar globalmente el proteoma y separar sus proteínas. Una vez separadas, éstas fueron identificadas y analizadas individualmente.

6.1. Medida de la concentración de proteínas de la muestra

La orina es un fluido biológico que no contiene una alta concentración de proteínas en unas condiciones fisiológicas. Por ello, se concentraron 10 mL de las muestras de orina en un volumen final de 200 μ L mediante unas columnas de ultrafiltración que contienen unos filtros específicos de unión a proteínas con un tamaño de poro de 10 kDa (*Amicon Ultra, Millipore*). Las muestras fueron centrifugadas en estas columnas a 4.000 G durante 60 minutos. Una vez obtenida la muestra concentrada, se midió la concentración de proteínas en cada una de ellas mediante el kit comercial (*Quantichrom Protein Assay, BioRad*) basado en el método colorimétrico de Bradford (apartado 4.3).

6.2. Preparación de las muestras mediante el kit “Clean up”

Antes de utilizar las muestras, se concentraron y se limpiaron de impurezas mediante la utilización de un kit comercial (*Clean up kit, GE Healthcare*) con el fin de mejorar los resultados obtenidos con la electroforesis bidimensional. Según el protocolo del producto, se incubaron en hielo 100 μ g de proteínas de cada muestra con 300 μ L de un agente precipitante durante 15 minutos. Posteriormente, se añadieron 600 μ L de un agente co-precipitante y se centrifugaron a 12.000 G durante 5 minutos. Tras repetir esta acción y lavar el pellet, éste se dejó secar antes de ser rehidratado y resuspendido en una solución específica de rehidratación (7 M urea, 2 M tiourea, 4 % CHAPS (del inglés *3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propane-sulfonate*), 0.5 % anfolitos, 50 mM DTT y azul de bromofenol).

6.3. Electroforesis bidimensional (2D)

Las muestras previamente preparadas (apartado 6.2) se cargaron en una tira IPG (del inglés *immobilized pH gradient*) (*GE Healthcare*) con un gradiente de pH de 3 a 11, con el fin de separarlas de acuerdo a su punto isoeléctrico, electroforesis conocida como *isoelectroenfoque*. Al introducir las proteínas en un gradiente de pH y aplicar un campo eléctrico, éstas son capaces de variar su carga eléctrica dependiendo del pH del entorno hasta migrar hacia un pH que coincida con su punto isoeléctrico. El punto isoeléctrico de una proteína es el valor específico de pH en el que la carga neta de la proteína es 0 de forma que no se desplaza al aplicar un campo eléctrico y se detendrá en ese punto del gel. Para ello, se utilizó un aparato

específico (*IPGphor-apparatus*, *GE Healthcare*), donde las tiras con la muestras se rehidrataron (a 30-60 V durante 12 horas) y se les aplicó un voltaje creciente de forma gradual desde 500 V hasta 8.000 V, en el que se mantuvieron de forma constante durante 6 horas. Posteriormente, las tiras se equilibraron en un tampón específico (50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 6 M urea, 30 % glicerol, 2 % SDS, 0.01 % azul de bromofenol) durante 15 minutos suplementado con 1 % DTT, seguidos de otros 15 minutos en el mismo tampón suplementado con 2,5 % de iodoacetamida. En segundo lugar, las tiras IPG se situaron en un gel de poliacrilamida del 12 % (Tris base 0,4 M, pH 8.8; APS al 0,1%, TEMED al 0,08% y acrilamida) donde las proteínas fueron separadas según su peso molecular mediante una electroforesis SDS-PAGE convencional (explicada en el apartado 3.9.4) a 40 mA en una cubeta SE 600 Ruby (*GE Healthcare*).

6.4. Tinción del gel y captura de las imágenes

Una vez obtenido el mapa proteico de cada una de las muestras de estudio, fue necesario teñir los geles de poliacrilamida para facilitar el proceso de análisis. Las proteínas de los geles fueron fijadas con metanol al 50 % - ácido acético al 7 % durante 30 minutos. Posteriormente, éstos fueron teñidos con un colorante fluorescente (*Sypro Ruby*, *Molecular Probes*) capaz de unirse selectivamente a los aminoácidos básicos de las proteínas, durante toda la noche. Finalmente, se procesó a la captura de imágenes con el escáner *Ettan DIGE Imager* (*GE Healthcare*) tras realizar varios lavados con metanol 10 %- ácido acético 7 % y agua destilada. La figura 24 muestra una imagen representativa de un gel obtenido en el análisis de muestras tras la electroforesis bidimensional.

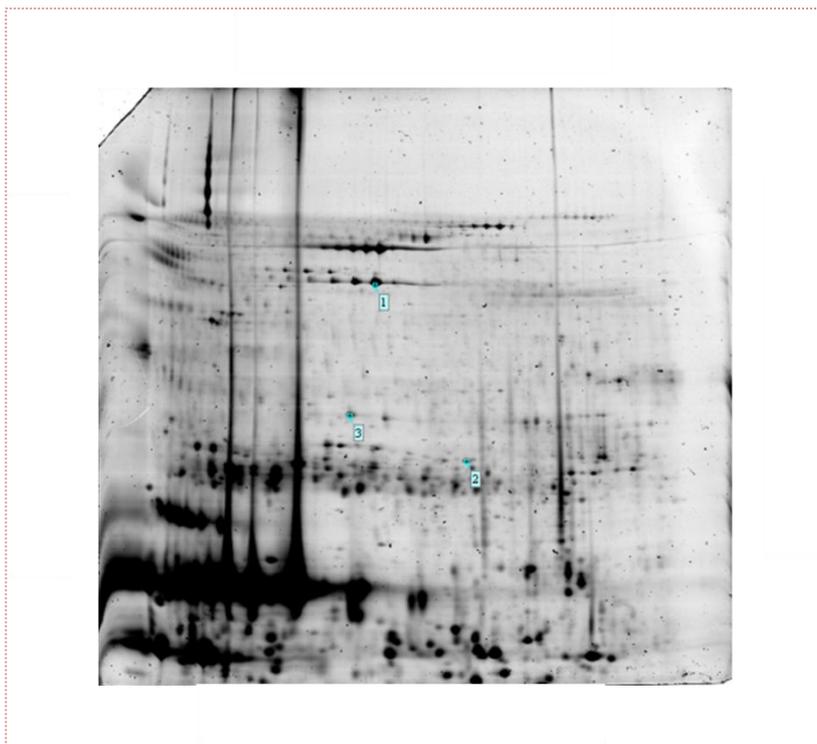


Figura 29. Imagen representativa de un gel de poliacrilamida, obtenida con el escáner Ettan DIGE Imager tras la realización de la electroforesis bidimensional.

Tras capturar las imágenes, se analizaron mediante la utilización del software *Image Master 2D Platinum*, gracias al cual se identificaron las coordenadas de las proteínas que aparecían en el mapa proteico de las orinas de nuestros animales de estudio y que no aparecían en los provenientes de los animales controles.

Una vez encontradas dichas diferencias, fue necesario realizar geles aumentado la concentración de proteínas cargadas con el fin de aislarlas e identificarlas. Para ello, se cargó 1 mg de proteínas de cada muestra previamente preparadas (apartado 6.2) y se realizaron los geles siguiendo los mismos pasos descritos anteriormente (apartado 6.3 y 6.4).

6.5. Recorte de puntos y digestión de las proteínas

Tras realizar el nuevo con una mayor concentración de proteínas, se recortó la parte del gel dónde aparecía la proteína de interés de forma manual, proceso conocido como *picado de spots*. Los fragmentos de gel aislados fueron lavados con agua destilada e incubados durante periodos de 20 minutos en i) una solución específica (25 mM NH_4HCO_3), ii) suplementada con 50 % acetonitrilo (ACN) o iii)

suplementada con 50 % de etanol. Posteriormente, los geles fueron deshidratados en etanol durante 15 minutos y secados. Se incubaron en una solución de 50 mM NH_4HCO_3 suplementada con 10 mM DTT, durante 1 hora a 56 °C. Posteriormente, se incubaron en la misma solución suplementada con 55 mM de iodoacetamida durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Tras realizar dos lavados con la solución de 50 mM NH_4HCO_3 (15 minutos) o suplementada con 50 % ACN (30 minutos), fueron deshidratados y secados de nuevo como se ha descrito anteriormente. Los geles resultantes fueron rehidratados (con 25 mM NH_4HCO_3) y digeridos con la enzima tripsina porcina (Tripsin Gold, MS Grade, Promega) a 37 °C durante toda la noche. Los péptidos resultantes fueron extraídos del gel con ACN durante 30 minutos a 37 °C y más tarde con 0.2 % ácido trifluoroacético (ATF) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La solución se evaporó en una centrífuga de vacío (*Biogen*) y los péptidos fueron resuspendidos en una solución 0.1 % ATF/ACN (proporción 2:1).

6.6. Identificación de proteínas mediante la huella de masas peptídica

Los péptidos resultantes de la digestión se analizaron mediante espectrometría MALDI-TOF/TOF (por sus siglas en inglés MALDI *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*; y TOF *Time-Of-Flight*). Esta técnica es capaz de ionizar la muestra, acelerar los iones por un campo eléctrico, dispersar éstos según su carga/masa, detectarlos y producir una señal eléctrica que será recogida en forma de espectrograma. Se utilizó el equipo *Autoflex III TOF-TOF (Bruker Daltonics)* en modo reflector con un voltaje para acelerar los iones de 21.000 V.

Antes de ionizarlas, una determinada cantidad de las muestras digeridas (1 μL) fue situada en una placa específica (*Pre-spotted AnchorChip targets, Bruker Daltonics*) en contacto con una matriz de CHCA (del inglés *cyano-4-hydroxycinnamic acid*) (*Bruker Daltonics*) con el fin de evitar la destrucción de los péptidos y facilitar la evaporación e ionización.

Tras realizar lavados con un tampón específico (10 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0.1 % TFA) se aplicaron pulsos cortos de láser al preparado con el fin de ionizar la muestra. Finalmente, el detector TOF acoplado al espectrómetro de masas detectó la masa de cada secuencia de péptidos ionizada midiendo el periodo de tiempo desde la aceleración de los iones en la fuente hasta impactar con el detector, mediante el uso de dos software, FlexControl 3.0 y Flex Analysis 3.0 (*Bruker Daltonics*). El equipo fue

previamente calibrado con señales de masa protonadas dentro del rango 1.000-4.000 m/z (relación carga-masa).

Además, las secuencias obtenidas por dicho análisis de MS fueron fragmentadas de nuevo y sometidas al mismo estudio previamente explicado, con el fin de verificar los resultados obtenidos en el primer análisis.

Las masas obtenidas en ambos estudios fueron utilizadas para identificar proteínas por su huella peptídica de masas tras asociar los péptidos obtenidos en el estudio con los péptidos teóricos que conforman cada proteína en una base de datos. Para ello, se utilizó el programa Mascot, donde las masas obtenidas se compararon con dos bases de secuencias proteicas: i) Swiss prot (que contiene 548.454 secuencias y 195.409.447 residuos) y ii) NCBI nr (que contiene 90.327.714 secuencias y 33.244.920.493 residuos) en la categoría taxonómica de *Rattus Norvegicus* (Swiss prot con 7.935 secuencias y NCBI nr con 84.371 secuencias contenidas).

Una vez identificadas las proteínas se estudió su patrón de excreción mediante la técnica de Western blot (apartado 4.8).

7. RECOGIDA Y ANÁLISIS DE MUESTRAS DE ORINA DE PACIENTES CON DRA

Se recogieron muestras de orina de 25 pacientes con DRA procedentes del Servicio de Nefrología del Hospital Universitario de Salamanca (HUSA) con el fin de verificar los resultados obtenidos en el análisis de los biomarcadores de DRA en nuestro modelo experimental animal. Las muestras fueron recogidas a la llegada de los pacientes al hospital antes de recibir ningún tratamiento y fueron almacenadas en el Biobanco del Complejo Hospitalario Universitario de Salamanca hasta su análisis. El Servicio en colaboración nos cedió los datos demográficos, datos de la caracterización de la función renal, el diagnóstico y otros parámetros de interés con los que se creó una base de datos. Además, se analizó la presencia de 12 de los marcadores estudiados en el modelo experimental animal mediante Western blot (apartado 4.8).

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados se expresaron como la media \pm error estándar de la media (EEM). Se utilizaron 3 animales por grupo en las terapias individuales, 13 animales por grupo en las terapias dobles y 30 animales en la terapia triple.

Se aplicó el test de Kolmogorov-Smirnov a los diferentes conjuntos de datos para comprobar si su distribución se ajustaba a una campana de Gauss. En caso afirmativo, se aplicaron test estadísticos paramétricos. Se utilizó el test estadístico t-student para comparar dos grupos de datos en un mismo día de estudio y el test estadístico de análisis de la varianza (ANOVA) para determinar las diferencias significativas en un mismo grupo en los diferentes días de tratamiento. Consideramos significativo un valor de $p < 0,05$. En caso de encontrar diferencias significativas en el estudio del ANOVA, empleamos el test de Dunnett para las comparaciones “post hoc”.

En el caso en el que los conjuntos de datos no presentaban una distribución normal, se utilizaron test estadísticos no paramétricos. Se empleó el test de Mann-Whitney para comparar dos grupos en un mismo día de tratamiento y el test de Kruskal-Wallis para encontrar diferencias en un mismo grupo en los diferentes días de tratamiento. Consideramos significativo un valor de $p < 0,05$. En este caso, el post-test utilizado fue el test de Dunn's.

Tabla 11. Relación de reactivos y productos utilizados.

REACTIVO/PRODUCTO	REFERENCIA	CASA COMERCIAL
Aceite mineral	141003.1211	Panreac
Albúmina bovina sérica	0332	VWR Life Science
Aprotinina	A-1153	Sigma-Aldrich
APS (persulfato de amonio)	A3678	Sigma Aldrich
Azida sódica	6688	Merck
Azul de bromofenol	B8026	Sigma Aldrich
Capilares heparinizados	7301	Deltalab
Cebadores qPCR	-	Isogen Life Science
Colorante Sypro ruby	S4942	Sigma Aldrich
Cubreobjetos	200x200	Thermo Fischer Scientific
DC Protein Assay (lowry)	5000112	Biorad
Dieta estandarizada	-	Panlab
DMSO (dimetil sulfósido)	154938	Sigma Aldrich
dNTPs	11277049001	Roche
Dodecil sulfato sódico 20 % (SDS)	161-0418	Biorad
Dolethal	3064369	Vetoquinol
EDTA (etilendiaminotetracético)	E5134	Sigma-Aldrich
ELISA angiotensina I	DB52011	IBL
Eosina surgipath	353501601	Casa Álvarez
Etanol 95 %	100983	Merk
Filtros amicon	H3569	Molecular Probes
Formaldehído	252931.12.14	Panreac

Furosemida	F4381	Sigma Aldrich
Gentamicina	G3632	Sigma Aldrich
Glicerol	D4751	Sigma Aldrich
HCl	H/1200/PB15	Thermo Fischer
Hematoxilina de Harris	10-2332	Casa Álvarez
Heparina 5 %	6547533	Hospira
Hidralazina	H1753	Sigma Aldrich
Ibuprofeno	I1892	Sigma Aldrich
Igepal CA630	13021	Sigma Aldrich
iScript RT Supermix	170-8841	Biorad
Isoflorano (IsoFlo)	34009XU	Esteve
Jeringuillas 1 mL	9161406V	Braun
Ketamina	CN776211H	Pfizer
Kit comercial NAG	DZ062A-K	Diazyme Laboratories
Leche en polvo	M-7409	Sigma Aldrich
Leupeptina	L-2023	Sigma-Aldrich
Luminol	A8511	Sigma Aldrich
Marcador pesos moleculares <i>PageRuler™</i>	26616	Thermo Fisher Scientific
Material quirúrgico	-	Fine Science Tools (FST)
Medidor Na ⁺	B-722Na ⁺	Horiba
Medio de montaje DPX	10-8500	Casa Álvarez
Membrana de PVDF	IPVH00010	Millipore
Metanol	20846.292	VWR Chemicals

MATERIALES Y MÉTODOS

Minoxidil	M4145	Sigma Aldrich
Na ₃ VO ₄	S-6508	Sigma-Aldrich
NaCl	S3014	Sigma-Aldrich
NaF	56776	Sigma-Aldrich
NucleoSpin® RNA II	T40955	Machery Nagel
Parafina	-	Casa Álvarez
Película fotográfica	47410	Fuji Medicals
Peróxido de hidrógeno	H6520	Sigma Aldrich
p-iodofenol	I10201	Sigma-Aldrich
PMSF (fluoruro de fenilmetil sulfonilo)	P-1585	Sigma-Aldrich
Portaobjetos	76x26	ThermoFischer
Puntas micropipeta con filtro	-	Neptune
Puntas micropipeta sin filtro	2000/80 /16	Deltalab
Quantichrom™ kit creatinina	DICT-500	BioAssay Systems
Quantichrom™ kit proteínas	QTPR-100	BioAssay Systems
Quantichrom™ kit urea	DIUR-500	BioAssay Systems
Supermix IQ™SYBR® Green	170-8882	Bio-Rad
Sutura 5/0 no absorbible	CO765074	Braun
TEMED (tetrametil-etilendiamina)	142093	Panreac
Trandolapril	Ab142955	Biorad
Tris-Glicina 10x	1610771	Biorad
Tubos de plástico de 10 y 15 mL	4092.7N	Deltalab
Tubos de plástico de 15 y 50 mL	-	Corning

Tween-20	P7949	Sigma-Aldrich
Xilacina	CN5721262	Bayer
B-mercaptoetanol	M6250	Sigma-Aldrich

Tabla 12. Anticuerpos utilizados, referencia y casa comercial (información no disponible por proceso de patente).

	4052-05	Southern Biotech
	6300-05	Southern Biotech
	Sc-1747	Santa Cruz Biotechnology
	711-026-152	IR Laboratories
	Sc-20872	Santa Cruz Biotechnology
	-	Casero
	JM-3819-100	MBL
	A130-201P	Bethyl Laboratories
	AF3488	RD Systems

1034-05	Southern Biotech
-	Casero
Ab7817	Abcam

Tabla 13. Relación de equipos y aparatos utilizados.

EQUIPO/APARATO	CASA COMERCIAL
Agitador	Grant BOEKEL
Agitador rotatorio Navigator	Dinko Instruments
Baño húmedo	Indelab
Baño seco	Termolyne, modelo 17600
Bomba de infusión	Dinko Instrumentes
Cassette de revelado	Amersham
Centrífugas	Eppendorf
Cepos rata	Panlab
Equipo de Western blot Mini-Protean®III	Bio-Rad
Escáner	Canon
Estufa	BioTek
Fuente de alimentación Power Pac 3000	Bio-Rad
Jaulas metabólicas	Panlab

Láser Doppler	Moor LDLS
Lector de placas ELISA	BioTek
Máquina anestesia inhalatoria	MSS Isoflurane
Máquina de revelado Medical X Ray Processor	Kodak
Máquina presión arterial	Panlab
Medidor de Na ⁺ compacto	Horiba Scientific
Microscopio confocal	Carl Zeiss
Microscopio de fluorescencia Axiovert 200M	Carl Zeiss
MyCycler™ Bio-Rad	Bio-Rad
Nanodrop (ND-1000)	Thermo Fisher Scientific
Osmómetro	Gonotec
Politrón Ultra-turrax T8	IKA Labortechnik
Sonda flujómetro	Transonic
Soporte agitador rotatorio	Dinko Instruments
Termociclador iQ™ 5	Bio-Rad
Ultracongelador	Thermo Fisher Scientific

Tabla 14. Programas y software informáticos utilizados

PROGRAMAS / SOFTWARES INFORMÁTICOS	CASA COMERCIAL
Adobe Photoshop 7.0	Adobe
Carl Zeiss	Zeiss
Ednote Program	Ednote
Fiji (Image j)	Fiji
Gen 5.0	Bio-Tek
GraphPad Prism 6	GraphPad
Microsoft Excel 2016	Microsoft
Primer Blast	NCBI (National Center for Biotechnology Information)
Scion Image	Scion Corporation

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

BLOQUE 1: MODELO EXPERIMENTAL ANIMAL DE *TRIPLE WHAMMY*

El rápido incremento de las enfermedades crónicas y el envejecimiento de la población mundial han provocado un aumento en el número de individuos polimedcados. Rollason y Vogt observaron que hasta el 20 % de la población mayor de 70 años toma 5 medicamentos o más de forma conjunta (Rollason y Vogt, 2003). Dentro de las enfermedades crónicas, la hipertensión afecta al 40 % de la población mayor de 25 años. Dada la etiología multifactorial de esta dolencia, se necesitan dos o más fármacos anti-hipertensivos para controlarla (Frank, 2008). Por otra parte, los AINEs son los fármacos más prescritos en el mundo para tratar el dolor agudo o crónico, por lo que es común encontrar individuos polimedcados con antihipertensivos y AINEs. Sin embargo, esta asociación de fármacos puede tener efectos secundarios renales graves. Diferentes estudios relacionan la administración conjunta de los diuréticos, los inhibidores de la angiotensina II y los AINEs con un riesgo a desarrollar un DRA, conocido en clínica como efecto *Triple Whammy*.

Los diuréticos y los inhibidores de la angiotensina II pueden provocar alteraciones renales de tipo hemodinámico que desemboquen en un DRA de tipo pre-renal, pero no se relacionan con la aparición de otros tipos de DRA, incluso, se han utilizado en algunos estudios como herramientas para tratar y prevenir ciertas enfermedades renales (Marín y cols., 2008; Ejaz y Mohandas, 2014; Prowle y cols., 2014). Sin embargo, los efectos renales de los AINEs pueden ser catalogados en dos grupos. Por un lado, los AINEs se consideran fármacos nefrotóxicos que pueden dañar las estructuras renales y desembocar en un DRA de tipo renal. Concretamente, estos fármacos pueden producir una nefritis intersticial aguda acompañada de un síndrome nefrótico. La nefritis tubulointersticial es una enfermedad inflamatoria que se desarrolla en el intersticio renal y en los túbulos renales, que puede cursar con alteraciones en el intersticio, como edema o fibrosis y en los túbulos, como daño tubular agudo o atrofia. El mecanismo por el cual los fármacos producen este tipo de daño renal es de carácter inmunológico ya que, al unirse a las estructuras renales, estimulan una respuesta inflamatoria que producen una activación de los linfocitos y un daño de las estructuras renales, lo que desemboca en un DRA (Calderón-Ospina y cols., 2010). Este daño suele ir acompañado de un síndrome nefrótico, en el que se producen lesiones glomerulares mínimas.

Además, el uso prolongado de los AINEs puede dar lugar a una necrosis papilar que puede desembocar en una insuficiencia renal crónica (Zadrazil, 2006). El

mecanismo de acción de estos fármacos para llevar a cabo este daño no está completamente dilucidado. Se plantean dos posibles mecanismos de acción primarios: i) un efecto tóxico directo sobre las células de la médula renal o ii) una isquemia renal prolongada como consecuencia de las alteraciones hemodinámicas producidas al inhibir la síntesis de PGs (Brix, 2002).

Por otra parte, los AINEs inhiben la síntesis de PGs, moléculas capaces de mantener una correcta hemodinámica renal en situaciones en las que la perfusión renal se encuentra comprometida. La inhibición de estas moléculas en estas situaciones clínicas puede desembocar en un DRA de tipo pre-renal. El DRA que aparece tras la administración de los AINEs representa el 15,6 % de los casos de DRA producido por fármacos (Delmas, 1995), de forma que la detección de estas alteraciones es fundamental para la prevención y el uso adecuado de estos medicamentos.

1. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL ANIMAL DE DAÑO RENAL AGUDO *TRIPLE WHAMMY*

Con estos antecedentes, se quiso desarrollar un modelo experimental animal que reprodujese el concepto de *Triple Whammy* para caracterizar el daño renal producido por la terapia combinada y estudiar los mecanismos fisiopatológicos involucrados. Además, se quiso estudiar el concepto de riesgo en el modelo propuesto. El riesgo o sensibilización de desarrollar un DRA se sitúa en el punto en el que el daño renal no se ha instaurado en el órgano pero ya aparecen complicaciones que lo diferencian de su estado sano. La nefrotoxicidad presenta un papel crucial en la susceptibilidad renal a desarrollar un DRA, ya que los fármacos pueden ser administrados en dosis no nefrotóxicas por si solas pero que pueden producir alteraciones no detectables y desembocar en un DRA si se combinan con otros fármacos también administrados en dosis no tóxicas para este órgano.

Se administró un AINE, un diurético y un inhibidor de angiotensina II de forma individual, en doble y triple terapia. Asimismo, se definió un esquema de tratamiento que nos permitiera estudiar las posibles alteraciones subyacentes producidas por la combinación de dos fármacos, que se hicieran evidentes tras la administración del tercer medicamento.

1.1. Caracterización de la función renal

1.1.1. Análisis de la creatinina y de la urea plasmática

Los riñones son los órganos encargados de depurar la sangre de los desechos y sustancias tóxicas, que se eliminarán a través de la orina. Cuando la función renal se encuentra deteriorada, se produce una acumulación de dichos productos en la sangre, especialmente de compuestos nitrogenados como la creatinina o la urea. Por ello, la determinación de la concentración de estos metabolitos secundarios en el plasma es utilizada para estimar la función renal. La creatinina es el parámetro principal utilizado en el área clínica para diagnosticar un fallo renal. Es el producto final del metabolismo de la creatina, molécula situada en el tejido muscular. Por su parte, la urea es una sustancia tóxica resultante de la degradación de las sustancias nitrogenadas del organismo.

La figura 30 representa el análisis de la creatinina y de la urea plasmática a lo largo del tratamiento. La triple terapia produce un aumento claramente significativo de la creatinina (figura 30.A) y de la urea plasmática (figura 30.B) a día 6 respecto a su basal. Estos resultados indican la presencia de un fallo en la función renal de los animales tratados con la triple terapia, incapaces de eliminar estos compuestos nitrogenados de su organismo. Sin embargo, las terapias individuales y dobles no alteran estos parámetros. Otros estudios también han demostrado que la administración conjunta de estas familias de fármacos no produce un aumento de estas variables (Kose y cols., 2010; Cheng y cols., 1999; Pritchard y cols., 1997).

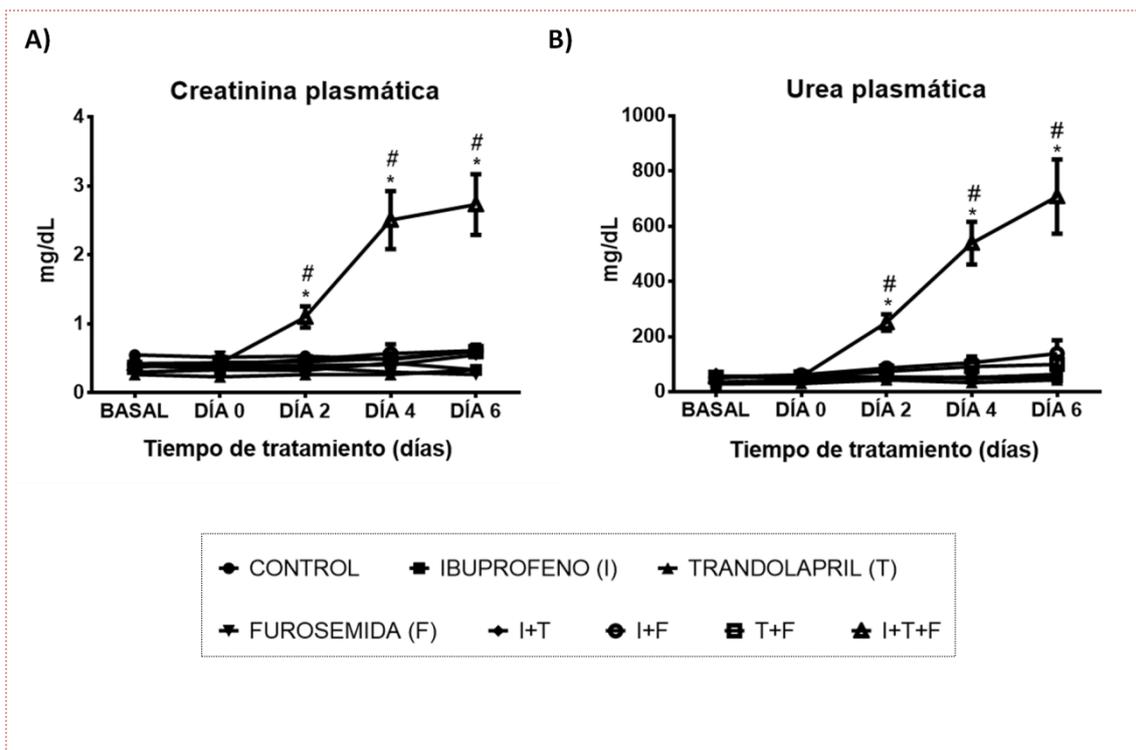


Figura 30. Evolución de la creatinina (A) y de la urea plasmática (B) durante el tratamiento de los tres fármacos de forma individual, doble o triple. Los datos representan la media \pm EEM. * $p < 0.05$ respecto a la muestra basal del grupo, # $p < 0.05$ respecto al grupo control en el mismo día de tratamiento.

1.1.2. Estimación de la tasa de filtración glomerular

El aclaramiento de creatinina es el parámetro más directo para estimar la TFG, ya que la cantidad de este metabolito en la orina depende mayoritariamente de una correcta filtración glomerular. Las figuras 31 y 32 muestran su análisis, donde cada gráfica representa la variación en porcentaje del aclaramiento de creatinina respecto a la muestra basal, valor considerado como 100 %. Los datos se han representado en porcentaje debido a su variabilidad dentro del rango normal, con el fin de facilitar su comparación y observar el grado de disminución por el efecto de cada fármaco. Los colores verdes representan las terapias individuales, los colores rojos señalan las terapias dobles y el color gris marca la terapia triple.

Las terapias individuales (figura 31) no producen una alteración de la TFG, ya que el aclaramiento de creatinina plasmática no varía de forma significativa respecto al control. Podemos observar una disminución estadísticamente significativa en el grupo de ibuprofeno a día 4. Esta variación no se mantiene en los siguientes días de

tratamiento, por lo que puede ser causada por el aumento de la TFG en el grupo control a día 4, variación debida a un factor meramente experimental.

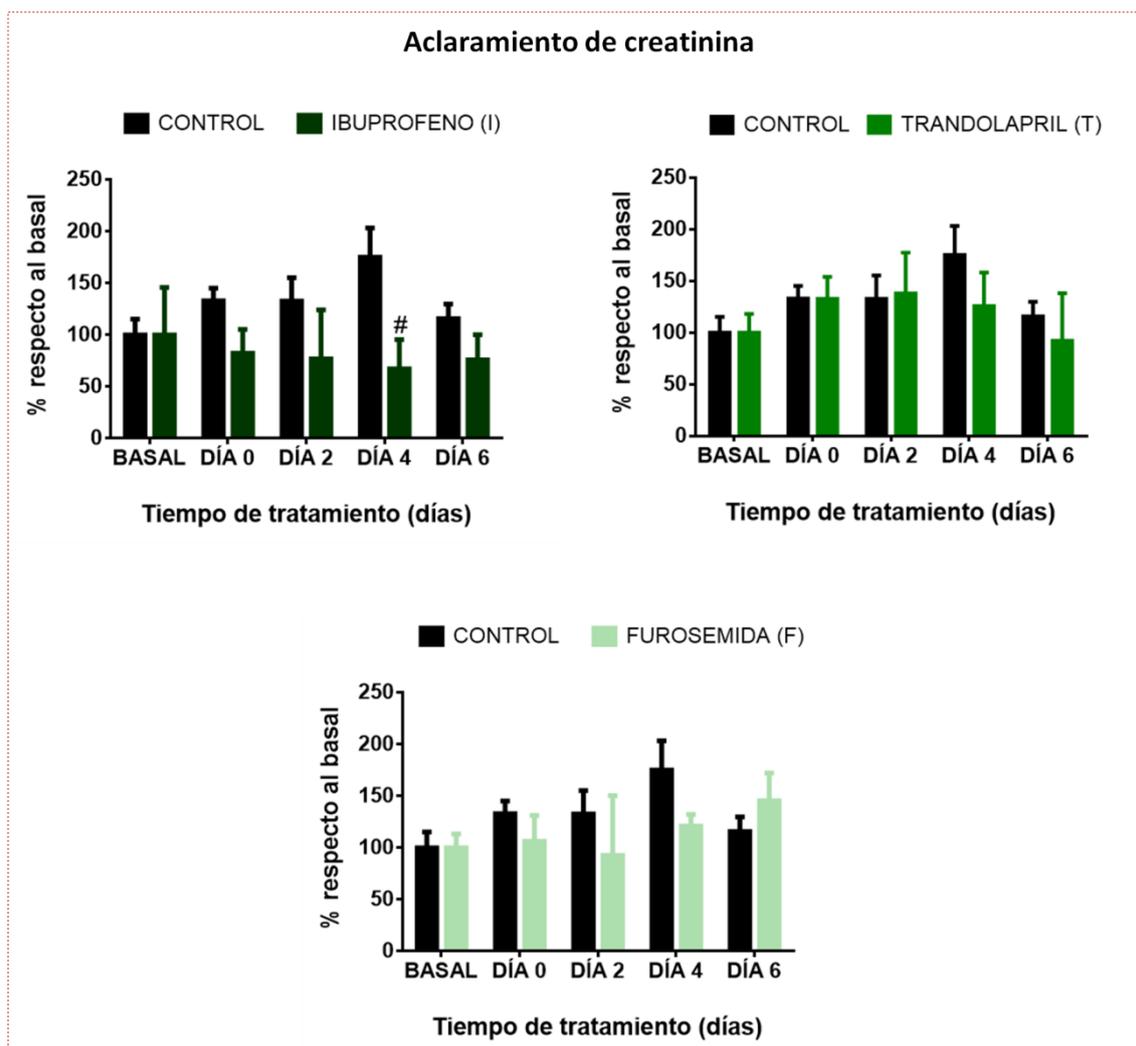


Figura 31. Representación del aclaramiento de creatinina analizada en los tratamientos individuales. Los datos representan la media \pm EEM. * $p < 0.05$ respecto a la muestra basal del grupo, # $p < 0.05$ respecto al grupo control en el mismo día de tratamiento.

Sin embargo, las dobles terapias con el AINE producen una alteración en la TFG (figura 32). El tratamiento I+T produce una disminución del aclaramiento de creatinina tras 4 días de administración farmacológica (muestra día 0), que se mantiene hasta finalizar el experimento. La terapia I+F produce una disminución de esta variable tras la segunda dosis de furosemida hasta el día 6. En ambos casos, el porcentaje de disminución de la TFG se encuentra alrededor del 50-60 %. Esta disminución de la TFG demuestra una alteración en la función renal, alteración que no da lugar a un aumento de la creatinina plasmática. Estos datos verifican que es

necesario que la TFG se reduzca un 60-70 % para que la creatinina plasmática aumente en el plasma (Thomas y cols., 2015). La doble terapia de T+F no produce una alteración de dicho parámetro, aunque las diferencias de los datos resulten estadísticamente significativas a día 4, debido posiblemente a la variabilidad de los datos en el grupo control en dicha muestra.

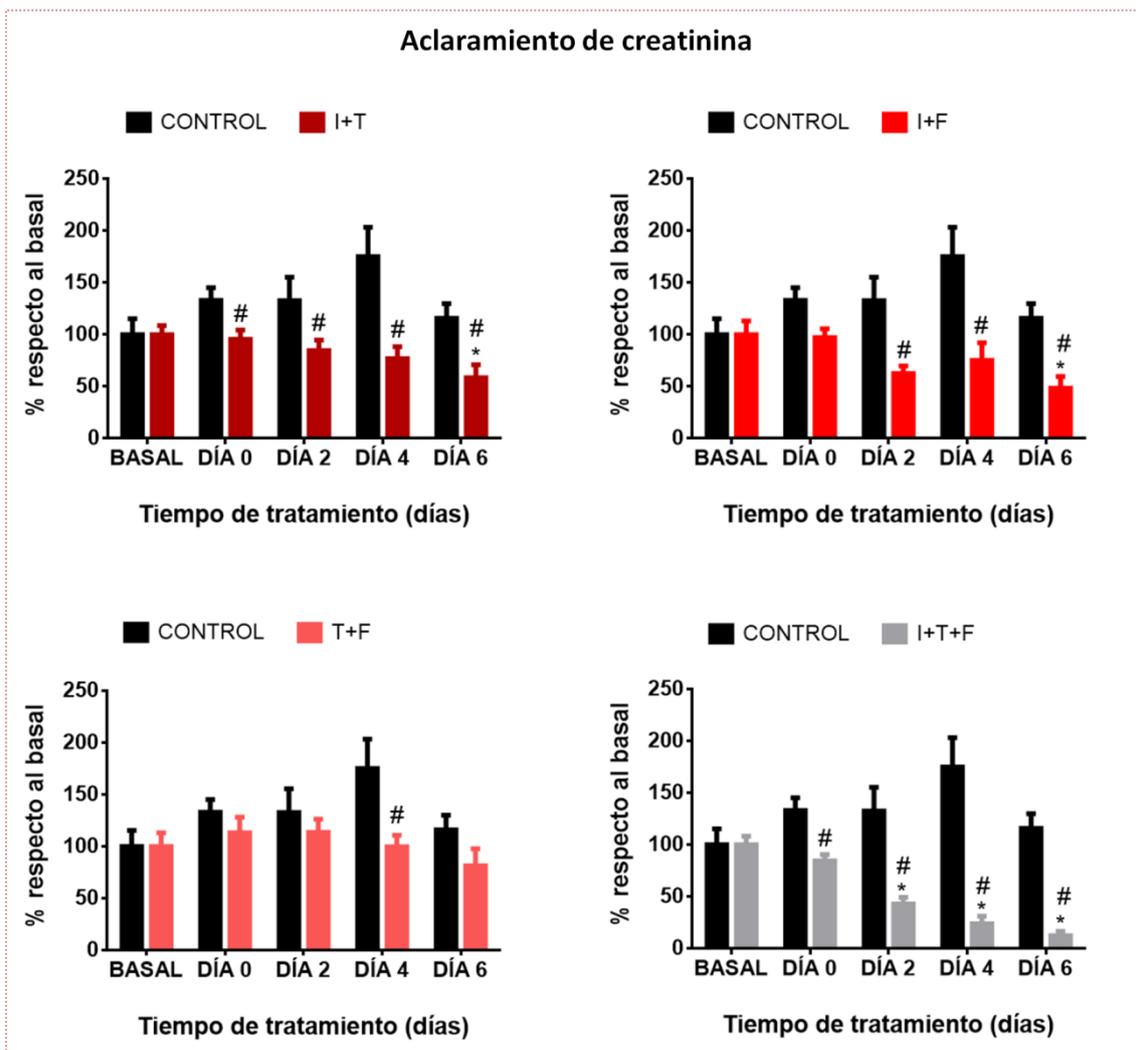


Figura 32. Representación del aclaramiento de la creatinina analizada en la terapia doble y triple. Los datos representan la media ± EEM. * $p < 0.05$ respecto a la muestra basal del grupo, # $p < 0.05$ respecto al grupo control en el mismo día de tratamiento.

En el grupo de la triple terapia se observa una reducción de la TFG de aproximadamente el 60 % tras la segunda dosis de furosemida, que llega casi al 90 % tras seis dosis de dicho fármaco. En este caso, esta disminución se asocia con el aumento de la creatinina plasmática observada en este grupo desde el día 2 al día 6 de tratamiento (figura 32).

La triple terapia reproduce experimentalmente un DRA, definido por un aumento de la creatinina y de la urea plasmática, acompañado de una disminución altamente significativa de la TFG. Las dobles terapias con un AINE pueden reproducir un DRA subclínico, ya que presentan una disminución de la TFG, que no desemboca en un aumento de la creatinina plasmática.

1.2. Caracterización del tipo de DRA del modelo animal

Tras reproducir un DRA en los animales tratados con la triple terapia y un posible DRA subclínico en dos de los grupos experimentales de la doble terapia, decidimos analizar diferentes parámetros con el fin de dilucidar el tipo de DRA reproducido en nuestro modelo.

1.2.1. Concentración de proteínas en la orina

En condiciones normales un individuo excreta una pequeña cantidad de proteínas en la orina, debido a que las proteínas que se filtran (que es solo una parte de las que contiene el plasma), son mayoritariamente reabsorbidas en el túbulo. Sin embargo, un daño o alteración funcional en la barrera de filtración glomerular, o en los túbulos provoca el filtrado descontrolado de estas moléculas o una deficiente reabsorción, respectivamente, que provocará un aumento de la proteinuria, es decir, de la cantidad de proteínas excretadas en la orina. En la necrosis tubular aguda (NTA), el tipo de daño más común de DRA de tipo renal, diferentes elementos nocivos pueden provocar la necrosis de las células del sistema tubular de la nefrona, por lo que se produce una disminución en la reabsorción tubular y como consecuencia, aparece proteinuria. Como control positivo de este tipo de alteración renal hemos utilizado orina procedente de un animal tratado con dosis nefrotóxicas del aminoglucósido gentamicina. La gentamicina es un antibiótico ampliamente utilizado en la práctica clínica para el tratamiento de infecciones por microorganismos gram negativos y de la endocarditis bacteriana. La nefrotoxicidad es su principal limitación terapéutica, que afecta a un 10-25 % de los pacientes tratados con este fármaco, y puede dar lugar a un DRA de tipo renal. Este fármaco produce un daño en las estructuras tubulares de la nefrona (muerte celular de las células del

epitelio tubular y alteraciones funcionales en el transporte de solutos y agua), en el glómerulo renal (contracción de las células mesangiales) y en la vasculatura renal (vasoconstricción) (López-Novoa y cols., 2011).

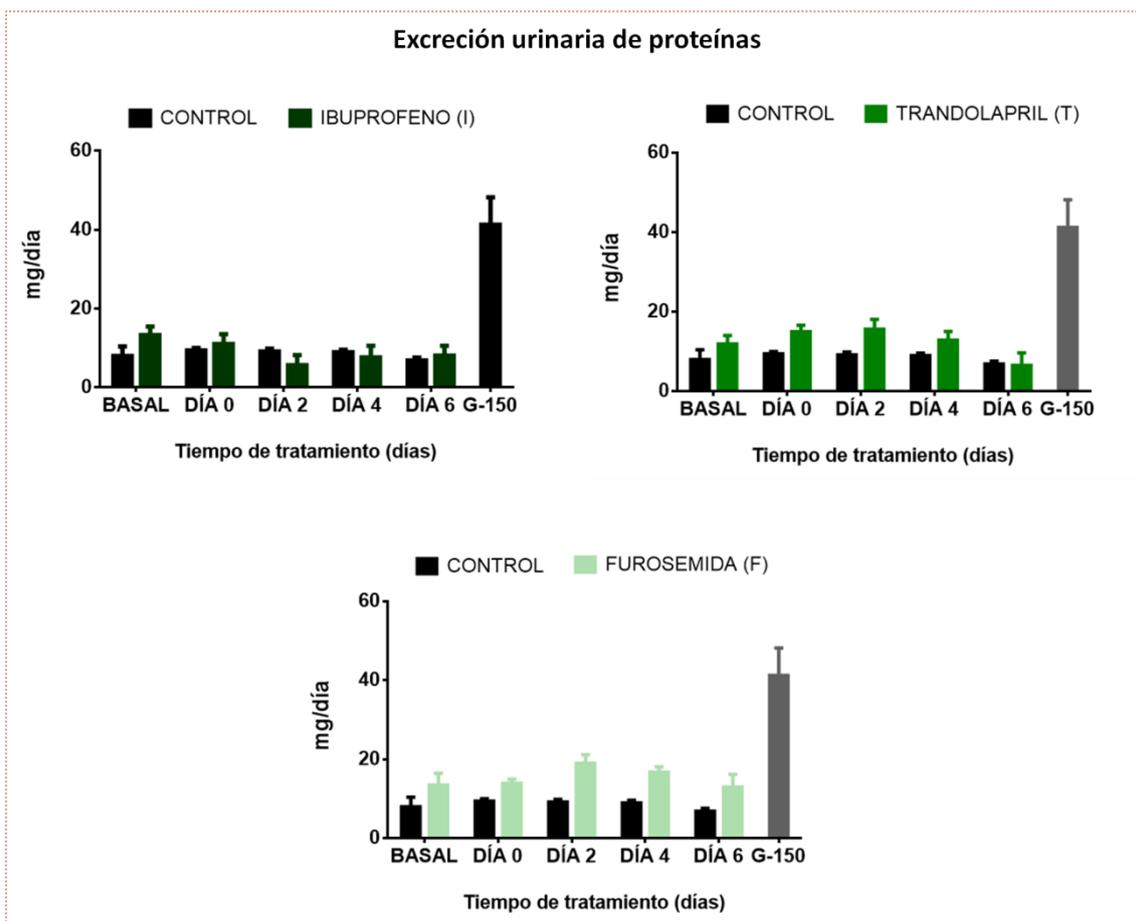


Figura 33. Excreción urinaria de proteínas en la terapia individual. Los datos representan la media \pm EEM. * $p < 0.05$ respecto a la muestra basal del grupo, # $p < 0.05$ respecto al grupo control en el mismo día de tratamiento.

El rango normal de excreción urinaria de proteínas en una rata de laboratorio se encuentra ente 10-15 mg/día. Este parámetro puede aumentar hasta 60 mg/día en modelos de necrosis tubular. El tratamiento con una dosis de gentamicina de 150 mg/kg/día (G-150) durante 6 días provoca la aparición de una elevada cantidad de proteínas excretadas en la orina, como se puede ver en todas las gráficas de la figura 33. Las terapias individuales (figura 33) no producen una alteración significativa de la excreción urinaria de proteínas en los animales de laboratorio, aunque el trandolapril o la furosemida tienden a aumentar esta variable en la orina siempre dentro del rango fisiológico.

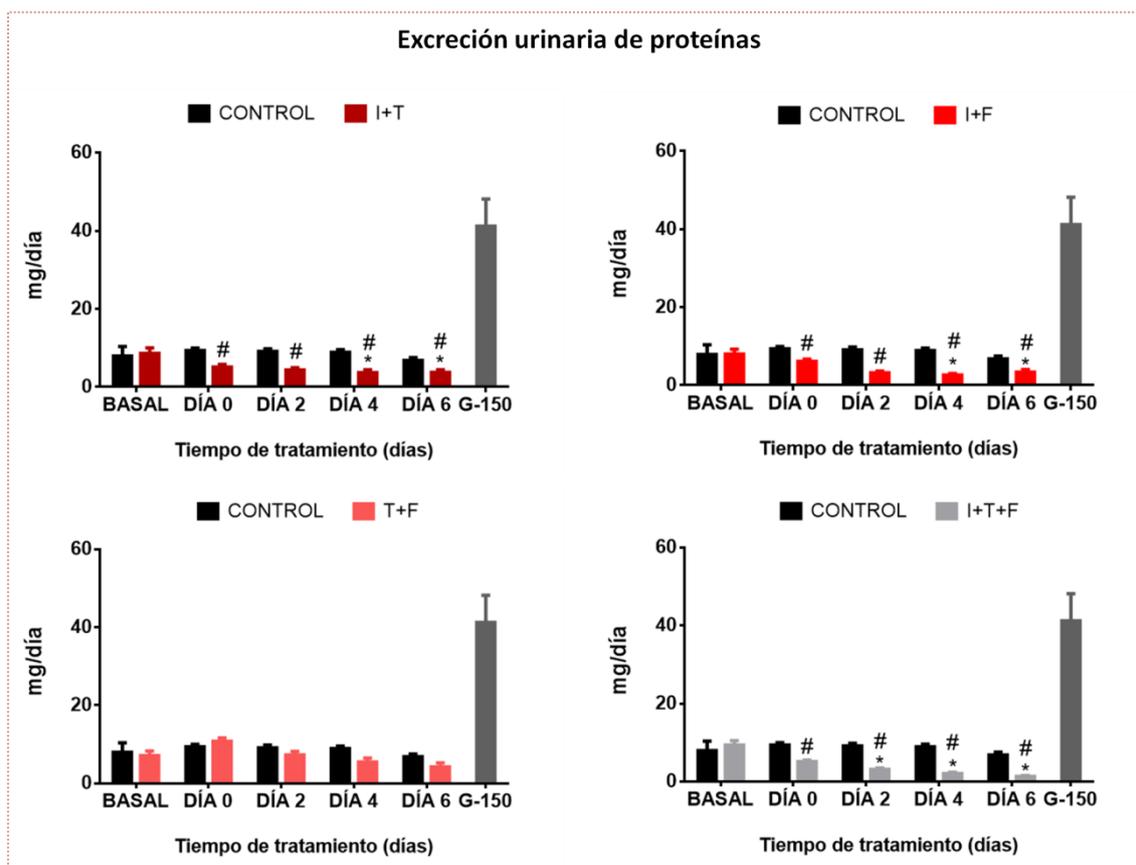


Figura 34. Excreción urinaria de proteínas en la terapia doble y triple. Los datos representan la media \pm EEM. * $p < 0.05$ respecto a la muestra basal del grupo, # $p < 0.05$ respecto al grupo control en el mismo día de tratamiento.

Las terapias dobles que contienen el AINE producen una disminución significativa de la excreción urinaria de proteínas (figura 34), que comienza a día 0 de tratamiento y se hace más evidente a día 6. Estos grupos también presentan una disminución de la TFG, datos que sugieren una alteración en la función renal. La triple terapia produce una disminución de la excreción de proteínas más drástica que en las dobles terapias con el AINE (figura 34). Estos resultados sugieren que el AINE es el mayor responsable de la disminución de la excreción urinaria de proteínas, siempre que se administre en doble o triple terapia, ya que no se observa disminución ninguna en la terapia individual. Múltiples estudios describen el efecto anti-proteinúrico de los AINEs y de los inhibidores de la angiotensina II debido a la disminución de la presión intraglomerular que provocan al inhibir las PGs y la angiotensina II, respectivamente (Vogt y cols., 2010). Nuestros resultados indicarían que dicho efecto se observa en los individuos en los que la función renal es dependiente de estas moléculas. Por ello, estas terapias se han utilizado para

disminuir la proteinuria en pacientes con diversas enfermedades (Stosic y cols., 1995; Sarafidis y cols., 2017).

No se produce un aumento de este parámetro en ningún grupo experimental, diferencia clara respecto al grupo de gentamicina, en el que se observa un claro aumento de la proteinuria. Estos resultados sugieren que el DRA observado en el grupo tratado con los tres fármacos no presenta alteraciones estructurales que provoquen un aumento de la proteinuria.

1.2.2. Estado hidro-electrolítico

El DRA se caracteriza por la incapacidad de regular la homeostasis del organismo (equilibrio ácido-base e hidro-electrolítico) y su análisis puede ayudar a determinar el tipo de DRA. En el DRA de tipo renal la alteración de este equilibrio es consecuencia de un daño en las estructuras de la nefrona, mientras que en el DRA de tipo pre-renal su modificación es debida a un cambio en los mecanismos de regulación de la homeostasis del organismo. Para analizar el estado hidro-electrolítico del modelo animal se evaluaron diferentes parámetros: i) la osmolalidad urinaria; ii) el balance hídrico; iii) la fracción excretada de glucosa; iv) la excreción urinaria de Na^+ y v) la excreción fraccional de Na^+ .

La osmolalidad urinaria depende del número de iones osmóticamente activos y de las moléculas disueltas en los fluidos del organismo. El Na^+ , el K^+ , el Cl^- , el HCO_3^- , la glucosa y la urea son los solutos más importantes desde un punto de vista osmótico. En clínica, su análisis es utilizado para valorar la función y la actividad renal. En condiciones normales, los riñones sanos son capaces de concentrar la orina de forma que su osmolalidad sea cuatro veces mayor que la del plasma. La concentración de la orina se lleva a cabo por las células tubulares de la nefrona, encargadas de intercambiar solutos y agua entre el lumen tubular y el líquido intersticial. Diferentes factores como la deshidratación, el exceso o defecto de ingesta de líquidos, la hipernatremia o un DRA pueden alterar la osmolalidad en la orina. En el caso de un DRA de tipo renal, las células tubulares se encuentran dañadas por lo que no pueden concentrar la orina y su osmolalidad disminuye hasta igualarse a la osmolalidad plasmática, con valor aproximado de 300 mOsm/kg (Agaba y cols., 2012). En el caso de un DRA de tipo pre-renal no se altera este parámetro ya que las células tubulares no están dañadas y pueden llevar a cabo su función de concentración de la orina. La osmolalidad urinaria de los grupos experimentales es mayor de 500 mOsm/kg (tabla 15), lo que se traduce en un

correcto funcionamiento de las células tubulares de la nefrona. Estos datos son importantes en los grupos en los que hemos observado un DRA, ya que contribuyen a pensar que no existe daño en las estructuras tubulares de la nefrona.

Sin embargo, los fármacos utilizados pueden alterar esta variable. Las PGs son fundamentales en el control del efecto anti-diurético de la hormona ADH en la parte distal de la nefrona. En ausencia de la ADH la porción final del túbulo contorneado distal y del túbulo colector son impermeables al agua, mientras que en su presencia la permeabilidad aumenta drásticamente, lo que permite reabsorber agua libre de solutos e incrementar la osmolalidad de la orina (Catalá-Bauset y cols., 2007). Las PGs antagonizan el efecto de esta hormona en esta parte distal de la nefrona, de forma que su inhibición tras la administración de un AINE produce un incremento de la osmolalidad urinaria. Por otra parte, la furosemida impide al riñón regular la reabsorción de solutos y agua, lo que se traduce en una disminución de este parámetro.

	Osmolalidad urinaria (mOsm/kg)	Balace hídrico (mL/día)	Fracción excretada de glucosa (mg/dL)
CONTROL	1.281 ± 77	27,3 ± 4,1	0,0 ± 0,0
IBUPROFENO (I)	2.573 ± 473,1	18,5 ± 0,8	0,0 ± 0,0
TRANDOLAPRIL (T)	960 ± 138,6	18,8 ± 2,8	0,0 ± 0,0
FUROSEMIDA (F)	666,7 ± 103,7	19,1 ± 2,1	0,0 ± 0,0
I+T	2.230 ± 437,6	13,4 ± 2,2	0,0 ± 0,0
I+F	1.240 ± 198,4	11,2 ± 5,8	0,0 ± 0,0
T+F	820 ± 80,7	21 ± 4	0,0 ± 0,0
I+T+F	995 ± 231	9,6 ± 3,2 #	0,0 ± 0,0

Tabla 15. Osmolalidad urinaria, balace hídrico y fracción excretada de glucosa evaluada en los grupos a día 6 de tratamiento. Los datos representan la media ± EEM. # p<0.05 respecto al grupo control en el mismo día de tratamiento.

El estado hídrico estimado de los animales (tabla 15) indica un balace hídrico positivo, lo que demuestra que no se encuentran deshidratados. Sin embargo, los animales de la triple terapia presentan una disminución significativa de este balace respecto al control, ya que su estado hídrico disminuye un 70 % respecto a dicho

grupo. Además, los grupos analizados con un posible DRA subclínico, aquellos tratados con I+T o I+F, también presentan una disminución no significativa de su balance hídrico, que podría influir en el desarrollo del DRA.

La fracción excretada de glucosa permite evaluar el funcionamiento del transporte tubular de la nefrona. La glucosa es un metabolito que no debe aparecer en orina, ya que se filtra libremente a través del glomérulo pero se reabsorbe en su totalidad a lo largo de la porción tubular de la nefrona. La presencia de glucosa en la orina implica: i) que los mecanismos de transporte de las células tubulares se encuentran dañadas, como ocurre en el daño renal; ii) que la concentración de glucosa en el ultrafiltrado sobrepasa el umbral renal de glucosa y el sistema tubular no es capaz de reabsorber el exceso del metabolito (Brodehl y cols., 1987). En el modelo se observa que la fracción excretada de este metabolito es 0 en todos los grupos, lo que verifica el correcto funcionamiento de las células tubulares renales.

La excreción urinaria de Na^+ y su excreción fraccional (EFNa) son dos variables útiles para evaluar la integridad tubular (tabla 15). En individuos sanos la EFNa es inferior al 1 %, al igual que en un DRA de tipo pre-renal, lo que indica un funcionamiento normal de los mecanismos recaptadores de Na^+ a lo largo de la nefrona, y por extensión, del funcionamiento y la homeostasis tubular, ya que el funcionamiento de la mayoría de los transportadores tubulares está directa o indirectamente acoplado al de los otros. Sin embargo, este valor aumenta por encima del 1 % en individuos con un DRA de tipo renal, debido a que las células tubulares dañadas son incapaces de reabsorber correctamente dicho electrolito. Este valor puede ser también elevado en pacientes con un DRA de tipo pre-renal tratados con diuréticos, ya que el diurético inhibe su reabsorción de forma directa o indirecta y desacopla el retrocontrol glomérulo-tubular que ajusta la reabsorción tubular a la filtración glomerular.

Cabe recalcar que en el modelo experimental se utilizan fármacos que alteran los mecanismos de transporte de este electrolito. La furosemida es un diurético del asa que lleva a cabo su efecto mediante la inhibición del cotransportador $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ situado en el asa de Henle. Por otra parte, las PGs están encargadas de inhibir la absorción de Na^+ en el asa de Henle y en el túbulo colector de forma que su inhibición produce un aumento de la reabsorción del electrolito. En el caso de los IECAs, la inhibición de la síntesis de la angiotensina II produce una disminución de la síntesis de la aldosterona, y por tanto, una reducción en la reabsorción de Na^+ en el túbulo contorneado distal.

	Excreción urinaria de Na ⁺ (mEq/día)	EFNa (%)
CONTROL	1,2 ± 0,8	0,8 ± 0,1
I+T	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,2
I+F	0,4 ± 0,1 #	0,6 ± 0,1
T+F	0,8 ± 0,1	0,6 ± 0,1
I+T+F	0,08 ± 0,04 #	0,6 ± 0,1

Tabla 16. Análisis del manejo del Na⁺ al finalizar el tratamiento (día 6) en el modelo animal. EFNa: Excreción fraccional de Na⁺. Los datos representan la media ± EEM. # p<0.05 respecto al grupo control en el mismo día de tratamiento.

La excreción urinaria de Na⁺ disminuye significativamente en el grupo experimental I+F y drásticamente en el grupo I+T+F respecto al grupo control (tabla 16). Esta bajada puede ser debida a la baja ingesta de agua, y por tanto del electrolito, unida a una inhibición en su reabsorción producida por el diurético. No obstante, los valores de la EFNa son inferiores al 1 % en todos los grupos, lo que demuestra que no existe alteración en el transporte del electrolito en las células tubulares, y por tanto en su estructura. En todo caso, la triple terapia provoca una disminución muy acentuada de la concentración de Na⁺ en la orina, que posiblemente, se equilibre gracias al aumento de otros solutos osmóticamente activos para mantener la osmolalidad en un rango fisiológico.

1.2.3. Estudio histológico del riñón

Se analizaron las características histológicas de los riñones de todos los grupos con el fin de estudiar la presencia de alteraciones histológicas renales. Se evaluó la existencia de modificaciones en las cuatro estructuras fundamentales del riñón: en los glomérulos, en los túbulos renales, en los vasos sanguíneos y en el intersticio renal. Como control positivo de daño en el tejido renal se utilizaron riñones procedentes de animales tratados con una dosis nefrotóxica de gentamicina durante 6 días. Este fármaco produce una NTA, con pérdida de células epiteliales tubulares. Los restos celulares se depositan en el lumen y producen obstrucción tubular, que aparece como un cúmulo de material hialino en la tinción. Aunque este fármaco no produce grandes cambios morfológicos en la zona glomerular, a altas dosis provoca

un ligero incremento de su tamaño asociado a una alteración en la barrera de filtración glomerular con infiltración de neutrófilos (López- Novoa y cols., 2010). Este antibiótico produce una reducción en el FSR debido a un incremento en las resistencias, pero no se observan alteraciones morfológicas vasculares.

Las terapias individuales y las dobles no producen alteraciones ni en la corteza, ni en la médula y ni en la papila (figura 35 y 36). Los cortes representativos de estas estructuras son similares al grupo control y difieren drásticamente del grupo de animales tratado con gentamicina 150 mg/kg/día, utilizado como control positivo. No obstante, la papila perteneciente al grupo T+F presenta un pequeño cambio de conformación y configuración en sus túbulos.

Asimismo, la tripe terapia tampoco produce alteraciones obvias en la corteza y en la médula (figura 37). Sin embargo, aparece un claro cambio en la configuración de la papila renal que no se ha observado en ninguno de los grupos anteriormente analizados. Además, la coloración del citoplasma de los túbulos de esta zona renal varía respecto a los otros grupos del estudio. Aunque se desconoce la repercusión de este cambio de conformación de los túbulos renales en la función renal, estas estructuras mantienen visiblemente su integridad y no se detectan otros cambios que puedan sugerir un daño estructural. En su conjunto, esta alteración no parece ser la causa que provoque el fallo en la función renal.

Por otra parte, las demás estructuras analizadas conservan su estructura, sin observar alteraciones inflamatorias en el intersticio o engrosamiento en las paredes de los vasos sanguíneos.

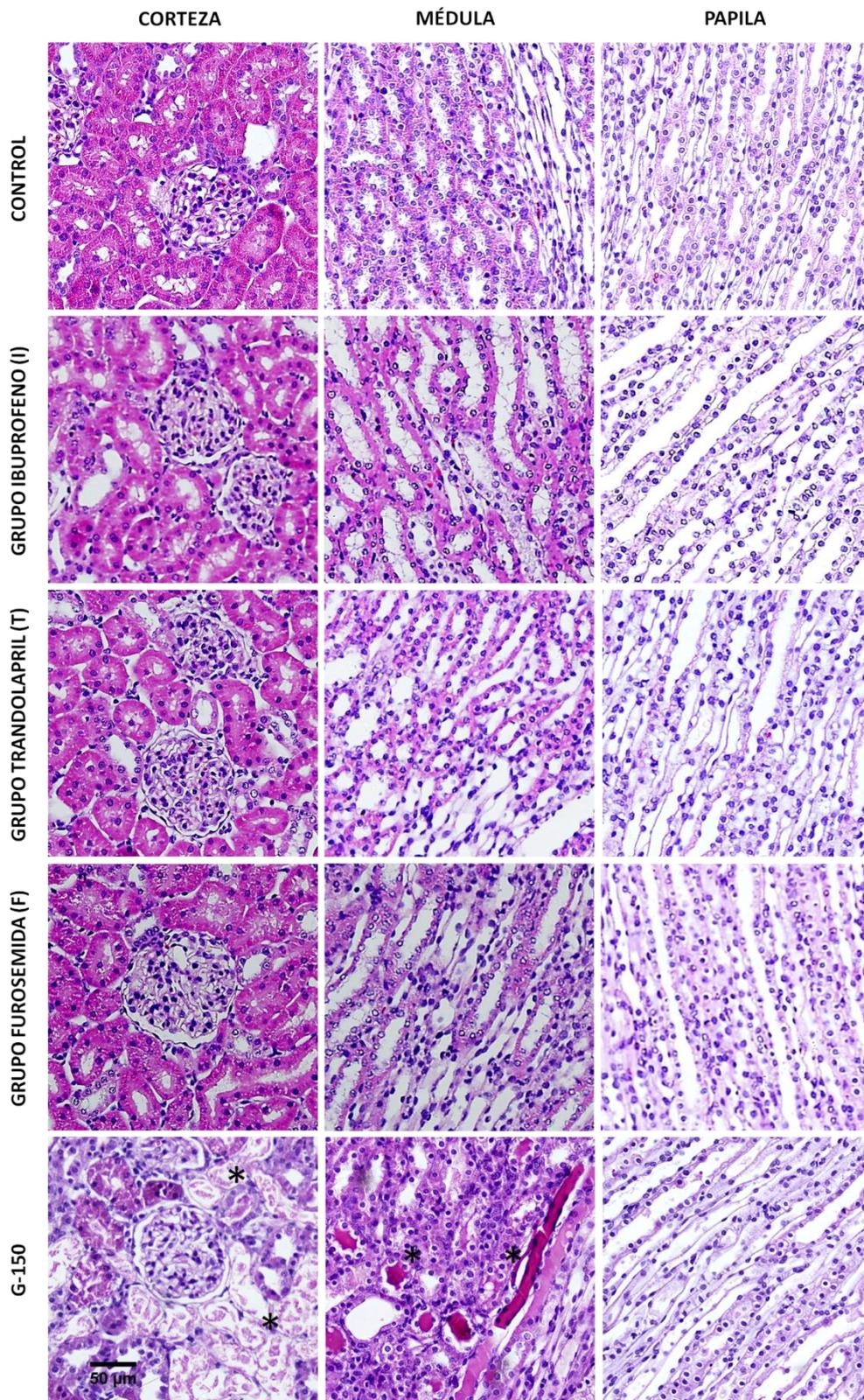


Figura 35. Imágenes representativas de cortes histológicos (20x) teñidos con hematoxilina-eosina procedentes de la corteza, la médula y la papila renal de los grupos experimentales tratados con ibuprofeno, trandolapril o furosemida de forma individual. Los * marcan las alteraciones producidas por la gentamicina 150 mg/kg/día durante 6 días.

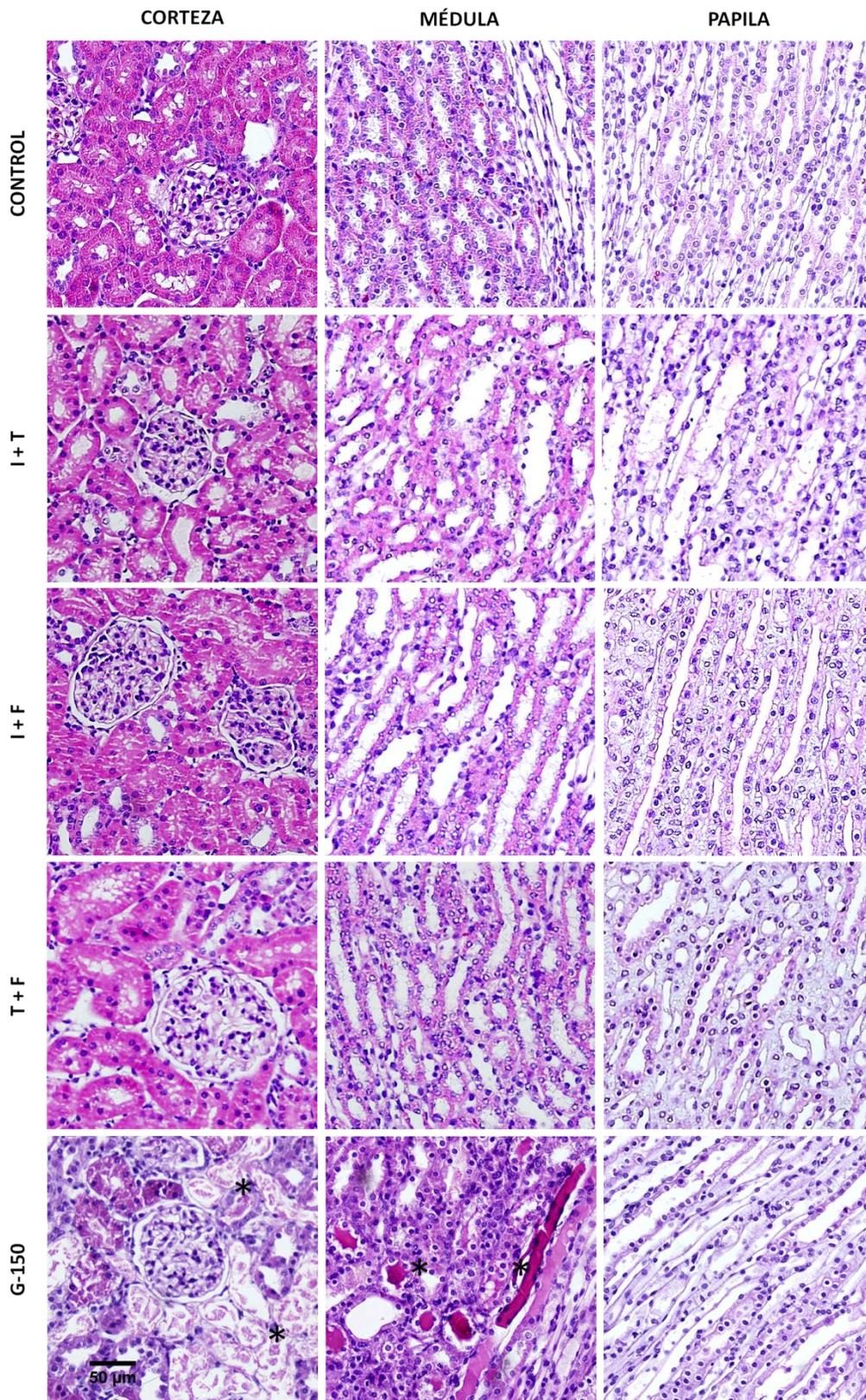
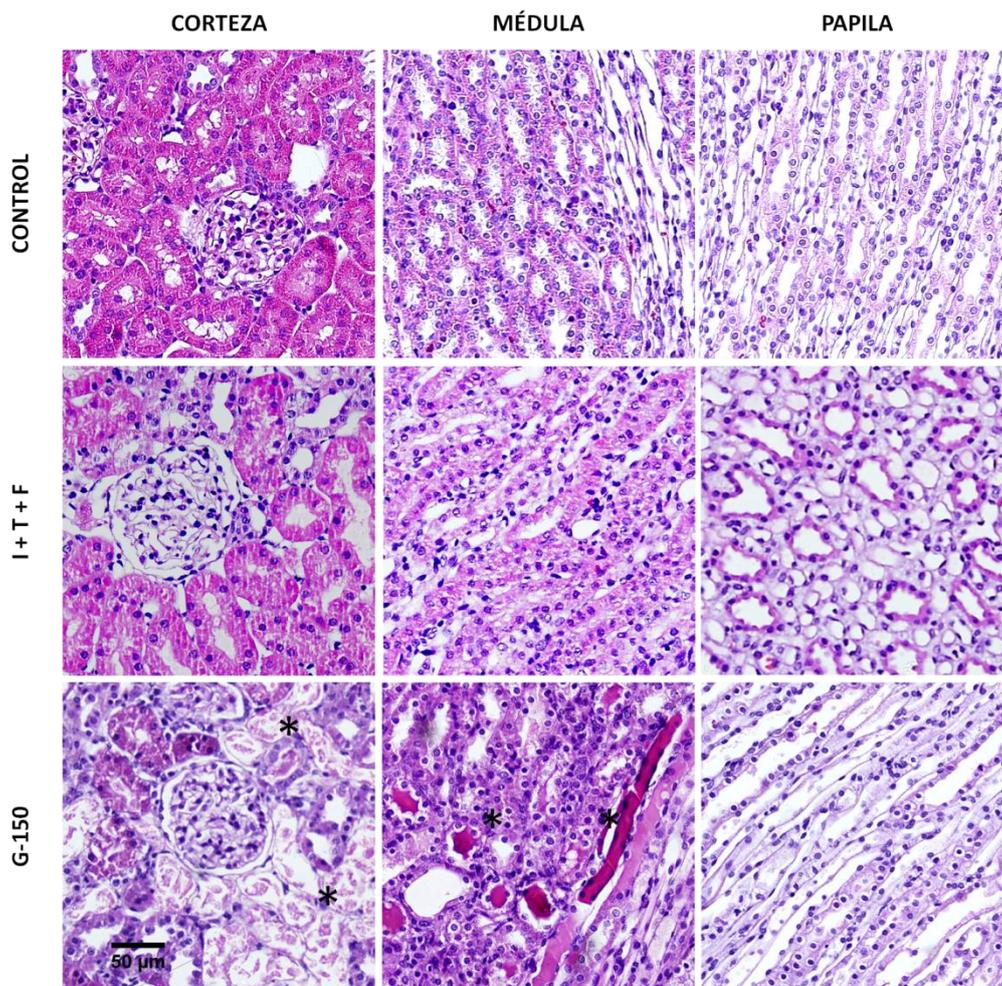


Figura 36. Imágenes representativas de cortes histológicos (20x) teñidos con hematoxilina-eosina procedentes de la corteza, la médula y la papila renal de los grupos experimentales tratados con las terapias dobles (I+T, I+F o T+F). Los * marcan las alteraciones producidas por la gentamicina 150 mg/kg/día durante 6 días.



*Figura 37. Imágenes representativas de cortes histológicos (20x) teñidos con hematoxilina-eosina procedentes de la corteza, la médula y la papila renal de los grupos experimentales tratados con el triple tratamiento (I+T+F). Los * marcan las alteraciones producidas por la gentamicina 150 mg/kg/día durante 6 días.*

La triple terapia no produce proteinuria ni altera visiblemente la integridad de la estructura renal, datos que sugieren que el DRA reproducido no es consecuencia directa de un daño en las estructuras renales. La correcta osmolalidad urinaria y una EFNa por debajo del 1 % muestran un adecuado funcionamiento de los túbulos renales. En su conjunto, estos resultados parecen indicar que el DRA observado no es intrínseco o renal.

2. ESTUDIO DEL PÁTRÓN DE MARCADORES URINARIOS ASOCIADOS A DAÑO RENAL AGUDO EN EL MODELO TRIPLE WHAMMY

El parámetro globalmente utilizado para diagnosticar un DRA según las escalas de estratificación internacionalmente aceptadas (RIFLE, AKIN y KDIGO)¹ es la creatinina plasmática (Thomas y cols., 2015). Este parámetro identifica este síndrome cuando la TFG ha disminuido un 60-70 %, con consecuencias graves para el correcto funcionamiento renal. Identificar nuevos parámetros capaces de reconocer este síndrome durante esa ventana en la que la TFG se encuentra disminuida, actualmente complicado en la práctica clínica, es un objetivo importante debido a su enorme importancia en el diagnóstico preventivo, manejo y resolución de esta enfermedad. La presencia de proteínas en la orina denota una alteración de la estructura o en la función renal. Por ello, numerosos estudios actuales tienen como objetivo relacionar la presencia de determinadas proteínas en la orina con el inicio de un DRA, su diagnóstico diferencial etiológico y etiopatogénico, e incluso, el riesgo de padecerlo en determinadas circunstancias. En este contexto, proteínas como biomarcador 1, biomarcador 2 o biomarcador 3 se relacionan con un daño tubular y biomarcador 4 se asocia a una alteración en la filtración glomerular (Hertzberg y cols., 2017). Otros estudios vinculan el biomarcador 4 con un daño glomerular (Camici, 2007) o la presencia de biomarcador 5 en la orina con un daño vascular (D'Elia y cols., 2016). El análisis de estas proteínas en la orina de los animales del estudio puede ayudar a evaluar las posibles alteraciones presentes en las estructuras renales, no detectadas en los análisis previos. De nuevo, se utilizó orina procedente de animales tratados con dosis nefrotóxicas de gentamicina, como control positivo de un modelo animal de DRA intrínseco, con el fin de comparar este tipo de daño con el reproducido en nuestro modelo animal. Por ello, los datos se representan en porcentaje respecto a este control positivo, utilizado como dato de referencia.

A continuación, se presenta la determinación de 12 proteínas, previamente relacionadas con distintos aspectos del diagnóstico precoz y diferencial del DRA, en la orina de los animales tratados con la doble y la tripe terapia.

¹ **RIFLE**: Risk, Injury, Failure, Loss y End Stage Kidney Disease; **AKIN**: Acute Kidney Injury Network; **KDIGO**: Kidney Disease: Improving Global Outcomes.

2.1. Biomarcadores urinarios relacionados con un daño tubular

La presencia de altas cantidades de ciertas proteínas en la orina, tales como biomarcador 1, biomarcador 2, biomarcador 3, biomarcador 4, biomarcador 5, biomarcador 6 o biomarcador 7 se relacionan con un daño en las estructuras tubulares de la nefrona, por lo que se consideran marcadores de tipo renal, en el que se encuentra implicado un daño tisular, con o sin aumento de la creatinina plasmática.

2.1.1. Biomarcador 1

Información no publicada por proceso de patente.

En condiciones basales, el plasma contiene una baja cantidad de biomarcador 1 que es filtrado debido a su bajo peso molecular y a su carga positiva, y es reabsorbido a nivel del túbulo proximal donde es degradado en lisosomas. En un riñón dañado, la expresión de esta proteína se encuentra aumentada en las células tubulares dañadas de la nefrona, lo que se traduce en un aumento significativo de esta proteína en la orina (). En nuestro modelo animal, el biomarcador 1 no aparece a lo largo del tratamiento doble o triple en la orina de las ratas, incluso en los animales de la triple terapia que a día 6 presentan un claro daño renal, mientras que se observa su presencia en la orina de la rata utilizada como control positivo de DRA de tipo renal (figura 38). La cuantificación realizada en el grupo T+F retrata la variabilidad del grupo, pero las imágenes representativas muestran la ausencia de esta proteína.

Figura no publicada por proceso de patente

*Figura 38. Presencia urinaria del biomarcador 1 en la orina de las ratas tratadas con la doble y triple terapia. Imagen representativa de la presencia del biomarcador 1 en la orina de los animales del estudio. La gráfica representa la cuantificación de las imágenes obtenidas. Los datos representan la media \pm EEM, n=4. * $p<0.05$ respecto a la muestra basal del grupo.*

2.1.2. Biomarcador 2

Debido a la estrecha relación entre su aparición en la orina y la NTA, el biomarcador 2 es un claro marcador de daño en el parénquima renal, por lo que su ausencia podría indicar la integridad del tejido renal. Los resultados obtenidos en nuestro estudio (figura 39) demuestran la ausencia de esta proteína en la orina de todos los grupos analizados, incluso en aquellos en los que existe un aumento de la creatinina plasmática. En el control positivo se detecta el biomarcador 2, datos que apoyarían la correlación existente entre la presencia de un daño tisular y la aparición de esta proteína en la orina.

Figura no publicada por proceso de patente

Figura 39. Presencia urinaria del biomarcador 2 en la orina de las ratas tratadas con la doble y triple terapia. Imagen representativa de la presencia del biomarcador 2 en la orina de los animales del estudio. La gráfica representa la cuantificación de las imágenes obtenidas. Los datos representan la media \pm EEM, n=4. * $p < 0.05$ respecto a la muestra basal del grupo.

Información no publicada por proceso de patente.

2.1.3. Biomarcador 3

Debido a su pequeño tamaño (14 KDa) esta proteína se filtra libremente pero es reabsorbida totalmente por el túbulo proximal (Noiri y cols., 2009). Actualmente, numerosos estudios proponen esta molécula como biomarcador con valor pronóstico y predictivo en enfermedades renales. Nuestros resultados muestran que dicha proteína no aparece en la orina de los animales tratados con los fármacos de estudio mientras que aparece fuertemente en el modelo de DRA por gentamicina (figura 40). Aunque su potencial como biomarcador de daño renal se encuentra en las primeras fases de desarrollo y se relaciona con otros tipos de daño, su ausencia en nuestro modelo podría confirmar la integridad de las estructuras renales de nuestros animales.

Figura no publicada por proceso de patente

*Figura 40. Presencia urinaria del biomarcador 3 en la orina de las ratas tratadas con la doble y triple terapia. Imagen representativa de la presencia del biomarcador 3 en la orina de los animales del estudio. La gráfica representa la cuantificación de las imágenes obtenidas. Los datos representan la media \pm EEM, n=4. * $p < 0.05$ respecto a la muestra basal del grupo.*

Información no publicada por proceso de patente.

2.1.4. Biomarcador 4

Esta proteína no se puede considerar un marcador exclusivamente renal, pero puede predecir el estado funcional de este órgano a partir de sus valores en los fluidos biológicos: i) en plasma serviría como un índice del estado de la filtración glomerular, ii) en orina marcaría el estado del sistema tubular.

Está presente en pequeñas cantidades en la orina de algunos grupos del modelo (figura 41). En el grupo I+F aparece un alto valor en la muestra basal, con un amplio error debido a la variabilidad de los datos. Tras analizar todos los resultados esta presencia parece deberse a valores atípicos o *outliers*, ya que solamente se encuentra en la orina basal de dos animales. En los grupos T+F e I+T+F aparece un ligero aumento no significativo a lo largo del tratamiento. Esto podría indicar un daño incipiente en los mecanismos de reabsorción de los túbulos renales no detectado mediante otros análisis, aunque estas conclusiones son meramente especulativas debido al mínimo aumento de la proteína en relación con el control positivo.

Figura no publicada por proceso de patente

Figura 41. Presencia urinaria del biomarcador 4 en la orina de las ratas tratadas con la doble y triple terapia. Imagen representativa de la presencia del biomarcador 4 en la orina de los animales del estudio. La gráfica representa la cuantificación de las imágenes obtenidas. Los datos representan la media \pm EEM, $n=4$. * $p<0.05$ respecto a la muestra basal del grupo.

Información no publicada por proceso de patente.

2.1.5. Biomarcador 5

Esta proteína se ha detectado en el interior de los exosomas urinarios y se ha demostrado su potencial papel como biomarcador temprano de DRA, relacionado específicamente con el daño tubular (). En nuestro modelo el biomarcador 5 tampoco aparece en la orina de los animales analizados, mientras que aparece de forma marcada en el controles positivo de DRA (figura 42). Se observa un pequeño aumento no significativo en la muestra de día 0 del grupo doble I+F, que no se mantiene durante el resto de tratamiento.

Figura no publicada por proceso de patente

*Figura 42. Presencia urinaria del biomarcador 5 en la orina de las ratas tratadas con la doble y triple terapia. Imagen representativa de la presencia del biomarcador 5 en la orina de los animales del estudio. La gráfica representa la cuantificación de las imágenes obtenidas. Los datos representan la media \pm EEM, n=4. * $p<0.05$ respecto a la muestra basal del grupo.*

Información no publicada por proceso de patente.

2.1.6. Biomarcador 6

Este marcador es capaz de predecir de forma temprana la aparición de un DRA y su pronóstico, de forma que altas concentraciones de esta proteína en la orina parecen indicar una alta probabilidad de que los pacientes necesiten diálisis o se desemboque en la muerte (). En nuestro estudio, todos los grupos del modelo presentan una excreción del biomarcador 6 similar a la del grupo control, alrededor de 0,5 u.a/día. Asimismo, este parámetro disminuye durante el tratamiento triple, posiblemente producido por la reducción total de la proteinuria. En todo caso, los animales del modelo animal excretan mínimas cantidades de esta enzima, en comparación con el grupo de la gentamicina que excreta hasta 2 u.a/día (figura 43).

Información no publicada por proceso de patente.

Figura no publicada por proceso de patente

*Figura 43. Excreción urinaria del biomarcador 6 en el modelo animal Triple whammy. Los datos representan la media \pm EEM. * $p < 0.05$ respecto a la muestra basal del grupo, # $p < 0.05$ respecto al grupo control en el mismo día de tratamiento. u.a: unidades arbitrarias.*

2.1.7. Biomarcador 7

La concentración de esta proteína en el plasma sanguíneo es muy estable y su eliminación es exclusivamente renal. Es fácilmente filtrada debido a su bajo peso molecular (16 KDa) y a su carga, por lo que su concentración en el plasma es un indicador de la TFG más sensible que la creatinina sérica (). En la orina, esta proteína presenta muy baja concentración, entre 0,03-0,3 mg/l, debido a su catabolismo tubular renal total post-filtración (). Se reabsorbe totalmente en el túbulo renal, de forma que la presencia de altas concentraciones en la orina denotaría un daño en dichas estructuras renales. El tratamiento con el antibiótico provoca su aparición en la orina, posiblemente debido a la NTA que altera los mecanismos de reabsorción. Sin embargo, no aparece en nuestro modelo animal, dato que sugiere, de nuevo, que los tratamientos utilizados no alteran la estructura

de los túbulos renales, los cuales llevan a cabo el proceso de reabsorción sin ningún tipo de modificación (figura 44).

Figura no publicada por proceso de patente

Figura 44. Presencia urinaria del biomarcador 7 en la orina de las ratas tratadas con la doble y triple terapia Imagen representativa de la presencia del biomarcador 7 en la orina de los animales del estudio. La gráfica representa la cuantificación de las imágenes obtenidas. Los datos representan la media \pm EEM, n=4. * $p < 0.05$ respecto a la muestra basal del grupo.

Información no publicada por proceso de patente.

2.2. Biomarcadores urinarios relacionados con un daño glomerular

2.2.1. Biomarcador 8

Información no publicada por proceso de patente.

La presencia en la orina de este biomarcador marca un daño directo en los podocitos, y por tanto, un daño glomerular. En enfermedades como la diabetes, se ha detectado esta proteína en la orina de pacientes incluso con normoalbuminuria, por lo que podría ser un marcador de daño podocitario temprano ().

La figura 45 muestra la ausencia de esta proteína en todos los grupos de nuestro modelo, lo que indicaría una ausencia de daño glomerular en todos ellos.

Figura no publicada por proceso de patente

*Figura 45. Presencia urinaria del biomarcador 8 en la orina de las ratas tratadas con la doble y triple terapia. Imagen representativa de la presencia del biomarcador 8 en la orina de los animales del estudio. La gráfica representa la cuantificación de las imágenes obtenidas. Los datos representan la media \pm EEM, n=4. * $p < 0.05$ respecto a la muestra basal del grupo.*

2.3. Biomarcadores relacionados con un daño vascular

2.3.1. Biomarcador 9

Aunque se ha relacionado con diversas enfermedades, como la diabetes o la obesidad, también se estudia el posible papel del biomarcador 9 como biomarcador en la insuficiencia renal ya que sus niveles aumentan en relación con la inflamación tras el daño vascular renal (). Esta proteína no aumenta significativamente en la orina tras el tratamiento doble y triple (figura 46) en relación con la presencia obvia en el grupo del aminoglucósido. Sin embargo, se observa un ligero aumento no significativo en los grupos del estudio. Es claramente reconocida la relación existente entre el SRAA y el sistema fibrinolítico. Estudios en cultivos celulares renales demuestran que la angiotensina II y otros componentes de este sistema, como la renina o la aldosterona, aumentan la expresión de TGF- β (), y éste a su vez, promueve la síntesis del biomarcador 9 (). Además, los fármacos inhibidores de la ECA disminuyen los niveles de esta proteína en el plasma (). Estos hechos podrían tener alguna relación con nuestros resultados, en los que se observa un ligero aumento del biomarcador 9 en la orina de aquellos grupos en los que el SRAA está activado, aunque el tratamiento con el trandolapril, pudiera enmascarar o disminuir dicho aumento.

Información no publicada por proceso de patente.

Figura no publicada por proceso de patente

*Figura 46. Presencia urinaria del biomarcador 9 en la orina de las ratas tratadas con la doble y triple terapia. Imagen representativa de la presencia del biomarcador 9 en la orina de los animales del estudio. La gráfica representa la cuantificación de las imágenes obtenidas. Los datos representan la media \pm EEM, n=4. * $p < 0.05$ respecto a la muestra basal del grupo.*

2.4. Nuevos biomarcadores en estudio

2.4.1. Biomarcador 10

Información no publicada po proceso de patente.

Esta proteína se ha propuesto como biomarcador diferencial de daño, ya que aparece en la orina de animales tratados con gentamicina a dosis nefrotóxicas, pero está ausente en la orina de aquellas ratas que presentan un DRA producido por el neoplásico cisplatino (). En nuestro modelo esta proteína no aparece en ningún grupo, lo que apoya la hipótesis de marcador diferencial de DRA (figura 47). En el grupo de triple terapia aparece un pequeño aumento no significativo a día 4 y 6.

Figura no publicada por proceso de patente

Figura 47. Presencia urinaria dl biomarcador 10 en la orina de las ratas tratadas con la doble y triple terapia. Imagen representativa de la presencia del biomarcador 10 en la orina de los animales del estudio. La gráfica representa la cuantificación de las imágenes obtenidas. Los datos representan la media \pm EEM, n=4. * $p < 0.05$ respecto a la muestra basal del grupo.

2.4.2. Biomarcador 11

Estudios previos en nuestro grupo de investigación () demostraron que las dosis subnefrotóxicas del antibiótico gentamicina predisponen al individuo a desarrollar un DRA tras la administración de un segundo fármaco potencialmente nefrotóxico, también administrado en dosis no tóxicas para el riñón por sí mismas. Además, este estudio correlacionó el riesgo de sufrir un DRA tras la administración de gentamicina con la aparición en la orina del biomarcador 11. Este estudio abre las puertas a un nuevo campo de investigación, la búsqueda de biomarcadores que puedan predecir el daño antes de que se produzca. Esta proteína no aparece en la orina de los animales del estudio, mientras que se observa fuertemente en la orina del control positivo (figura 48).

Figura no publicada por proceso de patente

*Figura 48. Presencia urinaria del biomarcador 11 en la orina de las ratas tratadas con la doble y triple terapia. Imagen representativa de la presencia del biomarcador 11 en la orina de los animales del estudio. La gráfica representa la cuantificación de las imágenes obtenidas. Los datos representan la media \pm EEM, n=4. * $p < 0.05$ respecto a la muestra basal del grupo.*

Información no publicada por proceso de patente.

2.4.3. Biomarcador 12

Estudios recientes demuestran que la expresión del biomarcador 12 aumenta de forma significativa en el riñón dañado tras la administración de gentamicina y el grado de expresión parece ser dependiente del tipo de daño, la vía de administración del aminoglucósido y del periodo de tiempo tras la inducción del daño (

). En nuestro estudio, el grupo de la triple terapia presenta un incremento muy variable del biomarcador 12 en la orina, aunque los resultados no permiten obtener conclusiones debido a su alta variabilidad, el porcentaje de presencia alcanza casi el 20 % a día 6, lo que podría indicar un daño incipiente. Esta proteína aparece de

forma marcada en nuestro control positivo de G-150, lo que podría indicar la correlación entre un daño estructural y la presencia del biomarcador 12 en la orina (figura 49).

Figura no publicada por proceso de patente

*Figura 49. Presencia urinaria del biomarcador 12 en la orina de las ratas tratadas con la doble y triple terapia. Imagen representativa de la presencia del biomarcador 12 en la orina de los animales del estudio. La gráfica representa la cuantificación de las imágenes obtenidas. Los datos representan la media \pm EEM, n=4. * $p < 0.05$ respecto a la muestra basal del grupo.*

Información no publicada por proceso de patente.

2.5. Tabla resumen biomarcadores DRA pre-renal

La tabla 17 muestra un resumen de la ausencia o presencia de los 12 marcadores analizados con el fin de obtener una huella péptidica para el DRA *Triple Whammy*, que pueda diferenciar este tipo de daño de otros. Los valores se representan en porcentaje en relación al control positivo de G-150, el cual adquiere

en todos los casos el 100 %, ya que las proteínas analizadas aparecen fuertemente en esta muestra. Para facilitar su comprensión, se establece un código de colores para marcar cada rango de porcentajes, donde el valor 0 se marca de color blanco y el valor 100 se marca de color negro. El resto de porcentajes comprendidos entre estos valores se etiquetan en diferentes colores grises. Así, se observa como la huella proteica resultante del análisis de estos marcadores en el el grupo control es practicamente blanca, ya que los marcadores no aparecen en la orina de animales sanos. Sin embargo, la huella peptídica del control positivo G-150 es completamente negra, ya que estos marcadores aparecen fuertemente en los animales con un DRA de tipo intrínseco.

Figura no publicada por proceso de patente

Tabla 17. Tabla resumen de la presencia o ausencia de los potenciales marcadores de DRA analizados en el modelo experimental animal Triple Whammy en comparación con un modelo de DRA intrínseco (G-150). Los datos de excreción urinaria de cada proteína, expresados en porcentaje respecto al control positivo se representan mediante un código de colores. El valor 0 se marca de color blanco y el valor 100 se marca de color negro. El resto de porcentajes comprendidos entre estos valores se etiquetan en diferentes colores grises.

Los resultados obtenidos en el modelo *Triple whammy* muestran una ausencia casi total de estos marcadores, lo que corrobora nuestra hipótesis de que representa un DRA en el que no existe daño de las estructuras renales que sean la causa del fallo renal. Algunas proteínas como el biomarcador 7 o el biomarcador 12 aparecen en pequeñas cantidades (en menos de un 20 %) en algunos días de tratamiento o incluso en las muestras basales. Este pequeño porcentaje de presencia también se observa en el grupo control en otras proteínas, por lo que estos resultados podrían reflejar la variabilidad aleatoria que marca el rango de normalidad. La huella proteica de los animales tratados con la doble y la triple terapia se asemeja a la representada para los animales controles y difiere firmemente de aquella delineada para el grupo de DRA de tipo renal. En su conjunto, estos resultados sugieren de nuevo que el DRA reproducido por nuestro modelo animal *Triple Whammy* es de tipo pre-renal.

Determinar la ausencia de los potenciales marcadores daño renal en el DRA pre-renal podría suponer un avance para diferenciar el tipo de daño. En clínica, podría facilitar la identificación del daño y evitar así fallos en la clasificación y en el posterior tratamiento de este síndrome. Sin embargo, son muchos los factores implicados y alterados en el DRA de tipo pre-renal, por lo que el desafío es identificar los metabolitos claves que puedan describir el estado de las vías fisiológicas ó fisiopatológicas implicadas y junto con la ausencia de estas proteínas en la orina, englobar una huella peptídica que pueda identificar este tipo de daño renal.

La ausencia de estos biomarcadores en el modelo sugiere que el tipo de DRA reproducido es de tipo pre-renal, en el que no existe daño en las estructuras renales que sea la causa de la disfunción renal. Su análisis nos ha permitido delinear una huella proteica para este tipo de daño que lo diferencia de la huella proteica presente en el DRA de tipo renal.

En su conjunto, los resultados analizados en este bloque nos permiten alcanzar las siguientes conclusiones parciales:

- La administración conjunta de ibuprofeno, trandolapril y furosemida produce un DRA en los animales, caracterizado por un aumento de la creatinina y de la urea plasmática unido a una disminución de la TFG.
- La ausencia de proteinuria y de los biomarcadores relacionados con un DRA de tipo renal sugiere que el daño reproducido es de tipo pre-renal.

BLOQUE 2: ESTUDIO HEMODINÁMICO SISTÉMICO Y RENAL EN EL MODELO TRIPLE WHAMMY

En el DRA pre-renal la TFG disminuye debido a una alteración hemodinámica sistémica y renal. En condiciones normales, la TFG se mantiene constante gracias a la autorregulación renal, capaz de sostener la perfusión renal ante variaciones de la PA sistémica. Por ello, la hipoperfusión renal sostenida presente en un DRA pre-renal es el resultado de: i) una disminución de la PA sistémica por debajo de los límites de la autorregulación renal; o ii) una alteración en los mecanismos de la autorregulación renal incapaces de llevar a cabo dicha regulación.

Se realizaron estudios hemodinámicos en el grupo de la terapia triple en el que aparece un claro fallo renal y en los grupos de las dobles terapias que podrían presentar un posible daño renal sub-clínico. Se analizó el estado hemodinámico sistémico y renal y se evaluaron algunas las moléculas claves implicadas en su regulación.

3. ESTADO DE LA HEMODINÁMICA SISTÉMICA Y RENAL EN EL MODELO TRIPLE WHAMMY

Los fármacos utilizados en el modelo animal pueden alterar la PAS ya que activan sus mecanismos de regulación, como lo hacen los diuréticos, e interfieren con las moléculas claves de dicha regulación, como es el caso de los inhibidores de la angiotensina II y de los AINEs. Esos cambios en la PAS pueden dar lugar a cambios en la PPR si los mecanismos de regulación implicados no trabajan adecuadamente. Para conocer el perfil hemodinámico de cada grupo, se analizó la evolución de la PAS durante el tratamiento y se evaluó el FSR de cada animal a día 6.

3.1. Evolución de la presión arterial sistólica

El rango normal de PAS en una rata Wistar de laboratorio se encuentra alrededor de 110-120 mmHg. El tratamiento con I+T produce una disminución de aproximadamente 20 mmHg en la fase de pre-tratamiento, que se mantiene sin variaciones hasta el día 6 (figura 50). Como se ha explicado en la Introducción, las PGs y la angiotensina II no parecen tener un papel fundamental en el mantenimiento

de la PA cuando no existen alteraciones que activen los mecanismos de regulación. Nuestros resultados corroboran dicho planteamiento, ya que su inhibición no produce una caída drástica de los valores de la PAS. Sin embargo, existe una disminución respecto al basal, resultados que sugieren la implicación de estas moléculas en la conservación de este parámetro. Se sabe que la inhibición de la angiotensina II no altera la PA en individuos normotensos (Harding y cols., 2002) y que la administración conjunta de estos fármacos no tiene efectos adversos para los riñones en situaciones de perfusión renal normal (Sturrock y Struthers, 1993).

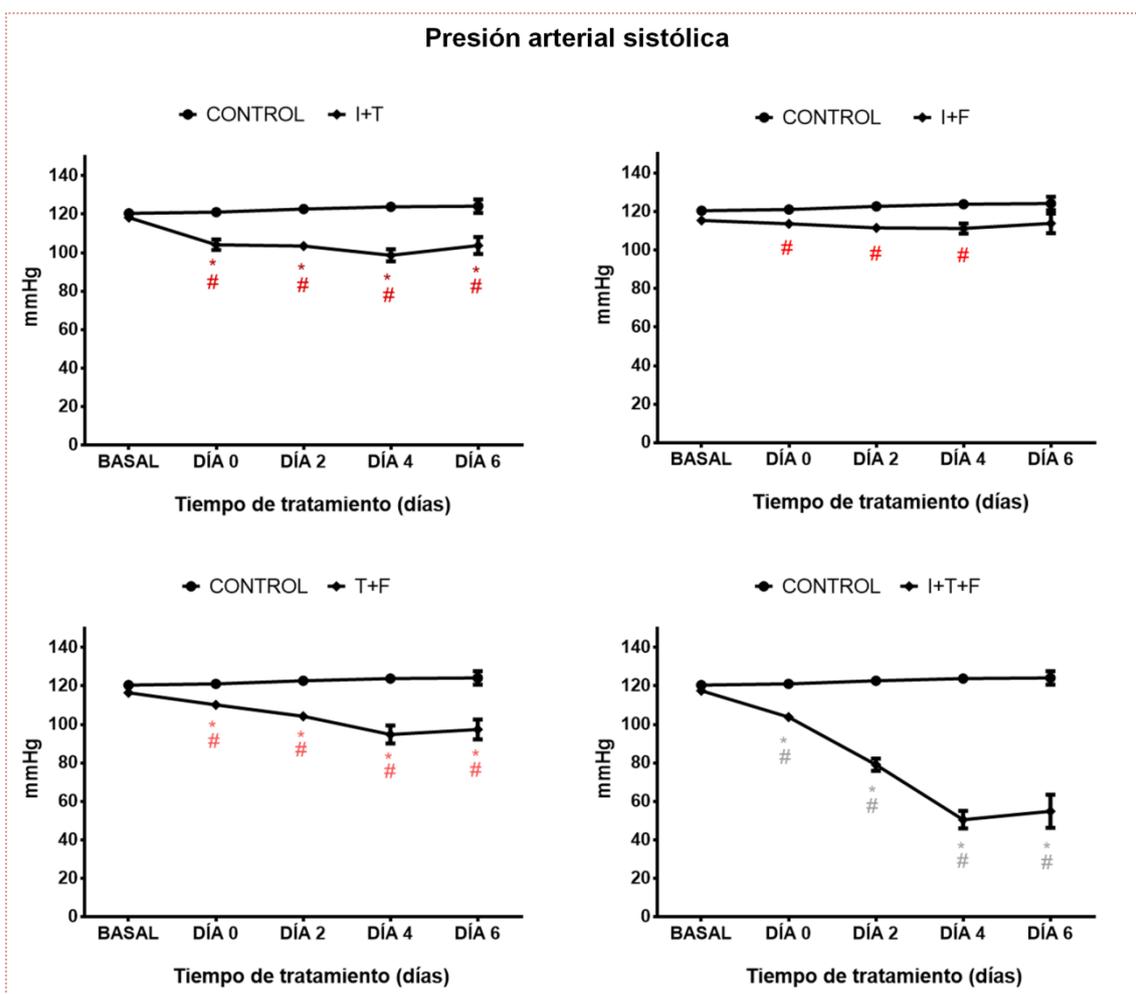


Figura 50. Evolución de la PAS de los animales del modelo experimental animal tratados con doble y triple terapia. Los datos representan la media \pm EEM. * $p < 0.05$ respecto a la muestra basal del grupo, # $p < 0.05$ respecto al grupo control en el mismo día de tratamiento.

El tratamiento con I+F produce pequeñas variaciones significativas de la PAS, pero se mantiene dentro de un rango de normalidad. El diurético se caracteriza por

producir una disminución de la volemia, hecho que activa los mecanismos de regulación de la PA, para evitar que dicha reducción de volumen se traduzca en una disminución de la PA. La inhibición de las PGs no parece alterar esos mecanismos de regulación, ya que éstos son capaces de mantener la PA casi sin variaciones. Nuestros resultados apoyan esta hipótesis y corroboran los resultados obtenidos por otros grupos de investigación, en los que la administración de fármacos de estas familias no produce alteraciones en la PA (Passmore y cols., 1990; Wilson y cols., 1993; Birk y cols., 2000).

Sin embargo, el escenario cambia completamente cuando a la administración de la furosemida se asocia un inhibidor de la angiotensina II, ya que la PA disminuye progresivamente a lo largo del tratamiento hasta alcanzar valores de 90 mmHg. Diferentes estudios muestran que la administración conjunta de estos fármacos produce hipotensión, hecho que no se observa en los tratamientos individuales (Lane y cols., 1998; Sechi y cols., 1990; Esnault y cols., 2008; Good y cols., 1994). En este caso, los mecanismos de regulación de la PA activados tras la depleción de volumen no serían capaces de mantener este parámetro sin oscilaciones drásticas, debido a la inhibición de una de sus moléculas fundamentales, la angiotensina II.

Por último, en el grupo de la triple terapia, la inhibición de las PGs añadida al planteamiento anteriormente presentado no mejora la situación fisiológica, ya que provoca una caída de la PA mucho más drástica que en la doble terapia T+F, notablemente significativa tras dos dosis del diurético, donde la PAS llega a valores de 80 mmHg y que alcanza valores extremos tras seis dosis de dicho fármaco. Estos resultados abren nuevas interrogaciones a nuestro estudio. Por un lado, el papel de las PGs en el mantenimiento de la PA en situaciones límites en las que la angiotensina II está inhibida, y por otro lado, el papel de la autorregulación renal en el grupo de la triple terapia.

La tripe terapia produce una hipotensión aguda desde el día 2 que alcanza valores extremos a día 6, mientras que las dobles terapias I+T y T+F producen una hipotensión mantenida con valores de 90-100 mmHg durante todo el tratamiento.

3.2. Presión arterial límite en la autorregulación renal

La autorregulación renal mantiene la TFG constante ante variaciones de la PA, dentro de un rango de variación de PAM de 80-180 mmHg, aunque el modelo matemático de Layton sugiere que estos mecanismos también trabajan por debajo de ese límite inferior (Layton, 2015).

Ante los resultados obtenidos en el grupo de la triple terapia, pueden existir dos opciones: i) que la PA de los animales disminuya por debajo de los límites de la autorregulación, ii) que la autorregulación esté comprometida debido a la inhibición de una de sus moléculas fundamentales y no sea capaz de mantener la PA. Para conocer el límite exacto de PAS que mantiene activos los mecanismos de autorregulación renal en una rata Wistar, se trató a los animales con una combinación de fármacos hipotensores que no interfiriese con el SRAA. El minoxidil es un derivado de la pirimidina usado en el tratamiento de la hipertensión ya que reduce la RVP por vasodilatación. El metabolito activo del minoxidil activa los canales de K^+ modulados por ATP, por lo que se produce un flujo de salida de K^+ , hiperpolarización y relajación del músculo liso. Por su parte, la hidralazina es un vasodilatador de acción directa en las arterias sistémicas, disminuye la resistencia periférica por efecto dilatador arteriolar que implica una disminución de la poscarga.

El minoxidil en monoterapia (figura 51.A) produce una disminución de la PAS hasta 100 mmHg aproximadamente tras dos días de tratamiento, que rápidamente se restaura aunque se continúe con la terapia. Posiblemente, debido a que los mecanismos de regulación de la misma están activos y se encargan de restablecer el parámetro hasta niveles basales lo antes posible. Al añadir la hidralazina al tratamiento, con el fin de potenciar el efecto vasodilatador, se provoca una caída de la PAS por debajo de 80 mmHg. Este grupo de animales presenta una PAS de 70 mmHg aproximadamente y sus valores de creatinina plasmática son de 0,5 mg/dL (figura 51.B) lo que denota que a esos niveles de PAS aún se mantiene una TFG correcta debido seguramente al trabajo realizado por los mecanismos de la autorregulación renal.

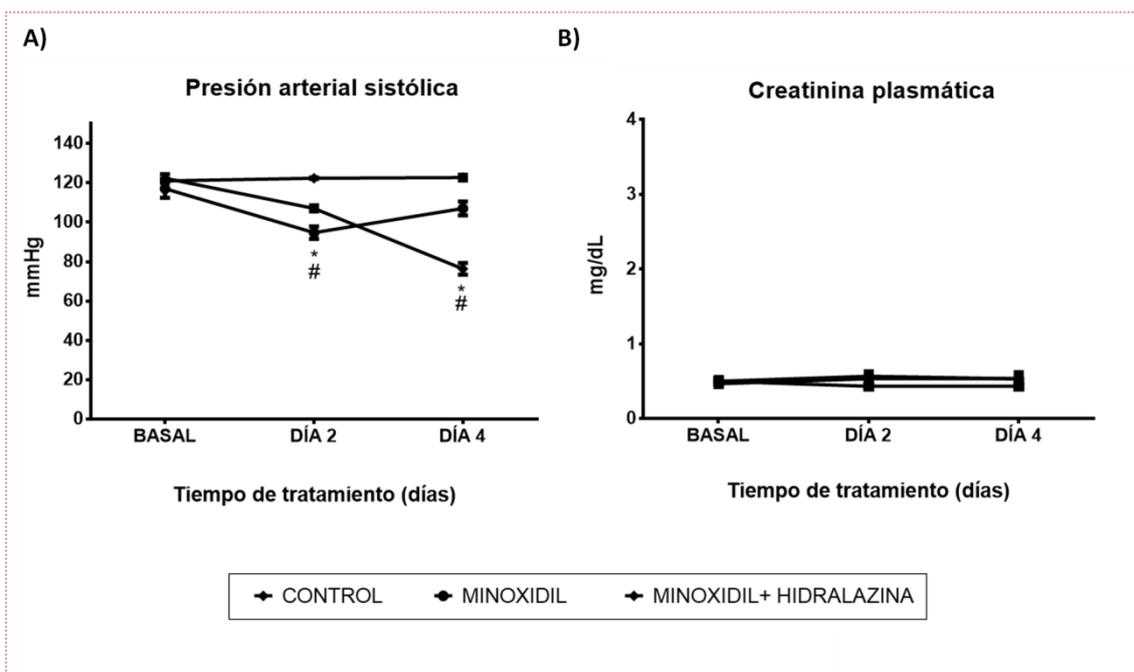


Figura 51. Evolución de la PAS (A) y de la creatinina plasmática (B) en animales tratado con minoxidil y minoxidil+hidralazina. Los datos representan la media \pm EEM. * $p < 0.05$ respecto a la muestra basal del grupo, # $p < 0.05$ respecto al grupo control en el mismo día de tratamiento.

El tratamiento con fármacos hipotensores que no interfieren con el SRAA produce una bajada de la PAS hasta 70 mmHg, pero no repercute en un aumento la creatinina plasmática. Estos resultados sugieren que la autorregulación renal está todavía activa a esos valores de PAS y es capaz de mantener la función renal.

3.3. Relación de la creatinina plasmática y la PAS

La figura 52 representa la correlación existente entre la creatinina plasmática (Crpl) y la PAS en los diferentes días de tratamiento doble y triple. Junto a los datos del modelo animal se han evaluado los resultados obtenidos en el apartado anterior, que sugerían que una rata Wistar mantiene su autorregulación renal a una PAS de 70 mmHg.

Antes de comenzar el tratamiento con el diurético (día 0) todos los grupos experimentales presentan una Crpl normal y su PAS varía desde 90 a 120 mmHg debido a los tratamientos administrados en la fase de pre-tratamiento (explicado en el apartado 3.1, figura 50). Sin embargo, tras dos días de tratamiento con la

furosemida (día 2) la PAS de los animales tratados con la triple terapia disminuye drásticamente y su Crpl aumenta considerablemente hasta valores patológicos, lo que denota la existencia de un DRA (figura 52). Sin embargo, los resultados obtenidos en los animales tratados con el minoxidil+hidralazina reflejan que a esos mismos valores de PAS este grupo mantiene su TFG. Estos resultados sugieren que los animales tratados con los tres fármacos presentan una autorregulación renal bloqueada, que impide mantener la función renal constante ante la bajada de la PAS producida por la administración del diurético y de los inhibidores del SRAA.

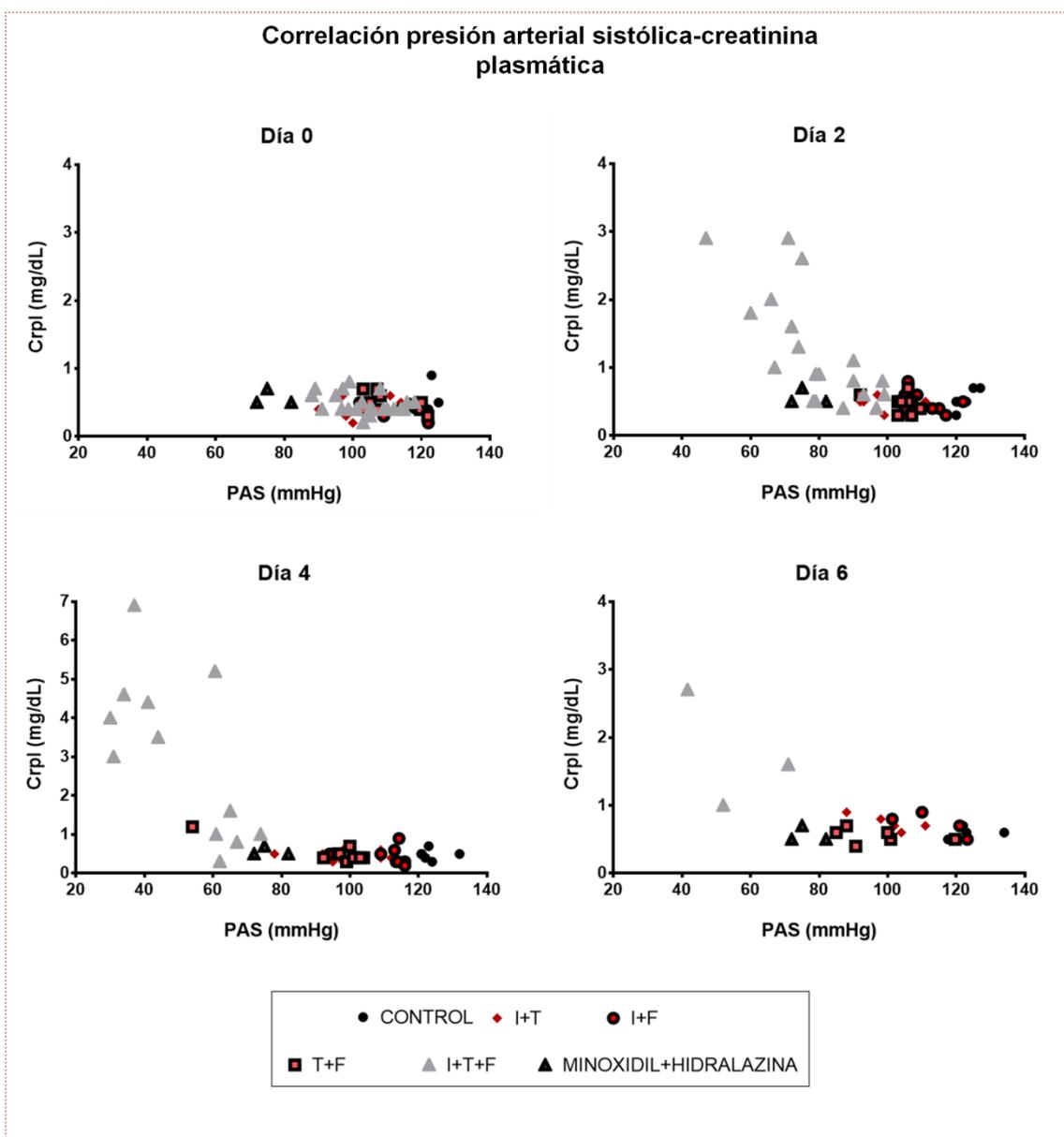


Figura 52. Análisis de la correlación existente entre el aumento de la Crpl y la disminución de la PAS tras la administración de dos y tres fármacos.

Ante el bloqueo de los mecanismos de regulación de la PA y aquellos encargados de mantener la TFG, podemos observar como la Crpl aumenta drásticamente y la PAS disminuye precipitadamente en el grupo de la triple terapia tras 4 y 6 dosis del diurético. Estas alteraciones no se observan en los demás grupos experimentales, en los que se mantienen unos valores normales de PA, de Crpl o de ambos gracias a los mecanismos de regulación anteriormente citados.

3.4. Flujo sanguíneo renal

Tras determinar el estado de hipotensión en algunos de los grupos del estudio, se evaluó la repercusión de esas alteraciones de la PA en la perfusión del riñón. Al finalizar el periodo de tratamiento, se analizó el FSR en la arteria renal (figura 53.A) y el flujo sanguíneo de la corteza renal (figura 53.B y C) en los grupos tratados con la doble y la triple terapia.

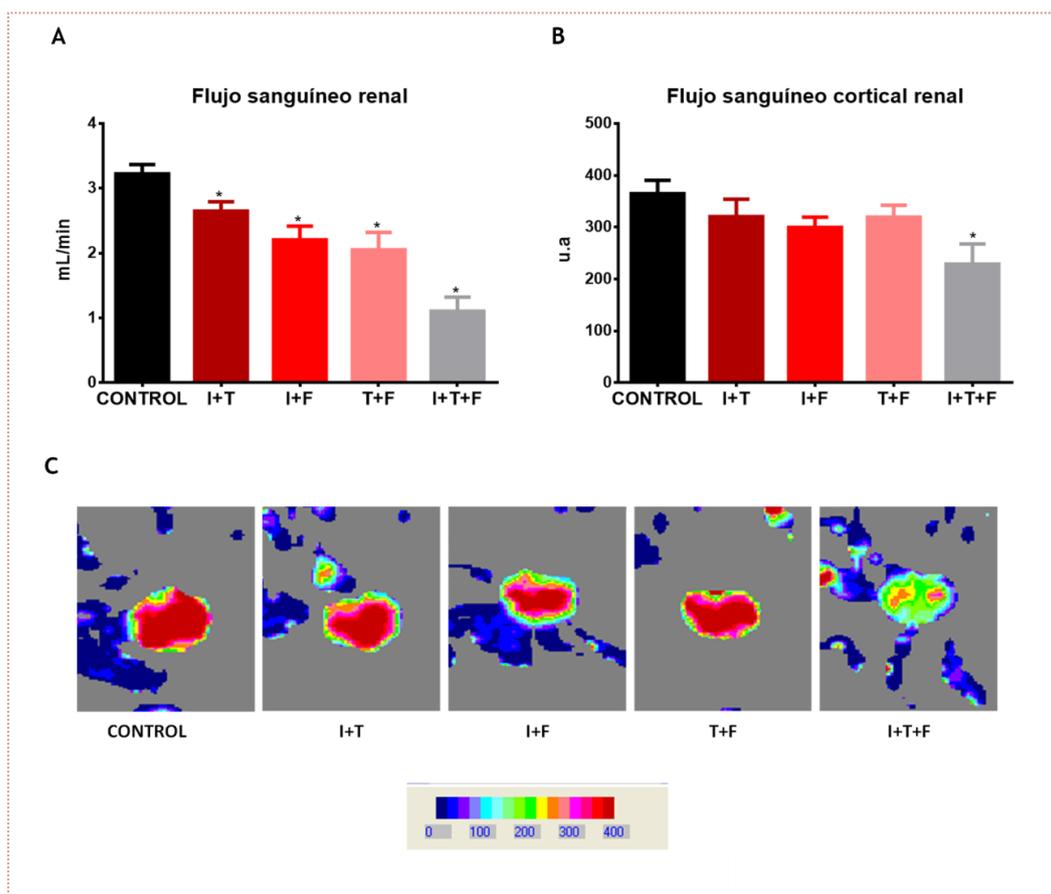


Figura 53. Evaluación del FSR a día 6 de tratamiento. A) FSR; B) Cuantificación del flujo sanguíneo de la corteza renal C) Imágenes representativas del análisis del flujo sanguíneo de la corteza renal. Los datos representan la media \pm EEM. * $p < 0.05$ respecto al grupo control.

El flujo sanguíneo que pasa por la arteria renal en una rata Wistar sana tiene un valor aproximado de 3 mL/min. Los tres tratamientos dobles producen una disminución del FSR hasta llegar, en algunos casos a 2 mL/min. Dicha reducción se hace mucho más drástica en los animales tratados con los tres fármacos, en los que alcanza valores de 1 mL/min. Sin embargo, los resultados del análisis del flujo sanguíneo cortical no muestran alteraciones significativas en la perfusión de los riñones de los animales tratados con la doble terapia, mientras que corroboran la hipoperfusión renal provocada por la triple terapia. La variabilidad de los resultados en los dobles tratamientos puede ser debido a la sensibilidad de las técnicas de análisis, ya que la sonda transonic es capaz de determinar pequeñas variaciones de flujo debido a su alta sensibilidad. Sin embargo, lo más probable es que la reducción del flujo renal producida por los tratamientos dobles solo involucre zonas internas de los riñones, mientras que la triple terapia afecte también incluso a la zona cortical más superficial. Esto podría contribuir a explicar la mayor repercusión del tratamiento triple en la TFG. Con carácter meramente argumentativo, se podría pensar que la afectación de la perfusión cortical afectase más a la TFG que la alteración de la perfusión más interna. Mientras que la primera comprometería directamente la perfusión glomerular, la segunda afectaría más a la perfusión de los túbulos.

Teóricamente, el FSR se mantiene constante a pesar de las variaciones en la PA gracias a la autorregulación renal. Sin ella, el FSR disminuiría de forma proporcional a la PA. Nuestros resultados muestran una pérdida absoluta de la autorregulación renal en el grupo de la triple terapia como se sugería en el apartado anterior. Se observa una hipoperfusión sostenida debido, probablemente, a la hipotensión provocada y a la inhibición de dos de las moléculas más importantes de la autorregulación renal. Sin embargo, los resultados obtenidos en las dobles terapias indican una variación del FSR, lo que indica que la autorregulación renal está siendo parcialmente inhibida y no puede trabajar al 100 %.

A continuación, se muestra una tabla resumen con las características más relevantes evaluadas a día 6, para poder comprender el estado renal y hemodinámico en el que se encuentra cada grupo (tabla 18).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Grupo	Crpl	TFG	PAS	FSR	FSCR	Conclusión
I+T	Normal	Reducida	Reducida	Reducido	Normal	Autorregulación renal parcialmente inhibida
I+F	Normal	Reducida	Normal	Reducido	Normal	Autorregulación renal parcialmente inhibida
T+F	Normal	Normal	Reducida	Reducido	Normal	Autorregulación renal parcialmente inhibida
I+T+F	Elevada	Reducida	Reducida	Muy reducido	Reducido	Pérdida absoluta de la autorregulación renal

Tabla 18. Resumen de los principales parámetros analizados en los grupos de estudio. El análisis conjunto de los parámetros de la función renal y del estado hemodinámico nos permite evaluar la autorregulación renal en cada grupo. Crpl: creatinina plasmática; TFG: tasa de filtración glomerular; PAS: presión arterial sistólica; FSR: flujo sanguíneo renal; FSCR; flujo sanguíneo cortical renal.

En el grupo I+T la PAS de los animales baja 10 mmHg y tanto las PGs como la angiotensina II están inhibidas, por lo que esa pequeña variación de PA se traduce en una bajada del FSR respecto al control de forma significativa. En la doble terapia I+F los valores de PAS son normales, pero existe una disminución en el FSR. La reducción de volumen producida por el diurético no provoca una bajada de la PA debido a la activación del SRAA. La angiotensina II potencia la síntesis de PGs en la arteriola aferente para contrarrestar su efecto vasoconstrictor. La inhibición de estas moléculas por la administración del antiinflamatorio puede producir una vasoconstricción mantenida que repercutirá en una disminución de la TFG y del FSR por activación de la autorregulación renal parcialmente inhibida. Por otra parte, la disminución de la PAS hasta 90 mmHg tras el tratamiento con T+F repercute en cambios directos en el FSR, lo que demuestra la falta parcial de autorregulación renal.

Los datos sugieren que la autorregulación renal se encuentra completamente inhibida en el grupo de la triple terapia. Por ello, la hipotensión observada se traduce en una hipoperfusión sostenida que desemboca en un daño renal. Por otra parte, las dobles terapias podrían tener la autorregulación renal parcialmente inhibida.

4. MECANISMOS REGULADORES DEL ESTADO HEMODINÁMICO SISTÉMICO Y RENAL

Una vez determinadas las alteraciones producidas en el estado hemodinámico sistémico y renal, quisimos conocer el mapa de activación o inhibición de las vías de regulación implicadas, con el fin de esclarecer un perfil hemodinámico en cada grupo de estudio. La angiotensina II es un efector importante del SRAA, muy implicado en el mantenimiento de la PAS. Por otra parte, la enzima COX-2 parece tener un lugar primordial en la activación de la RTG en la mácula densa y es la responsable de la síntesis de las PGs en el riñón en situaciones de hipoperfusión renal.

4.1. Aparato yuxtaglomerular

La renina y la COX-2 son dos moléculas fundamentales en el aparato yuxtaglomerular, elemento clave para el control de la homeostasis cardiovascular y renal. La renina es la enzima responsable de la síntesis de angiotensina I, y como consecuencia de angotensina II. Se expresa en las células yuxtaglomerulares del aparato yuxtaglomerular encargadas de la secreción del 90 % de la renina del organismo. La enzima COX-2 se expresa en las células de la mácula densa de este aparato, pero también se expresa en las células intersticiales de la médula renal (especialmente en las células de la papila) y en la rama ascendente cortical del asa de Henle (Cheng y Harris, 2004). El aparato yuxtaglomerular de cada ovillo glomerular fue localizado mediante inmunofluorescencia en cortes histológicos de tejido renal, con el fin de estudiar las posibles diferencias en la expresión de estas proteínas. Se detectó la renina (marcada en rojo), la COX-2 (marcada en verde) y la α -actina (marcada en azul). La α -actina se utilizó como marcador del músculo liso, con el fin de marcar la arteriola aferente y eferente de cada uno de los glomérulos (figura 54 y 55).

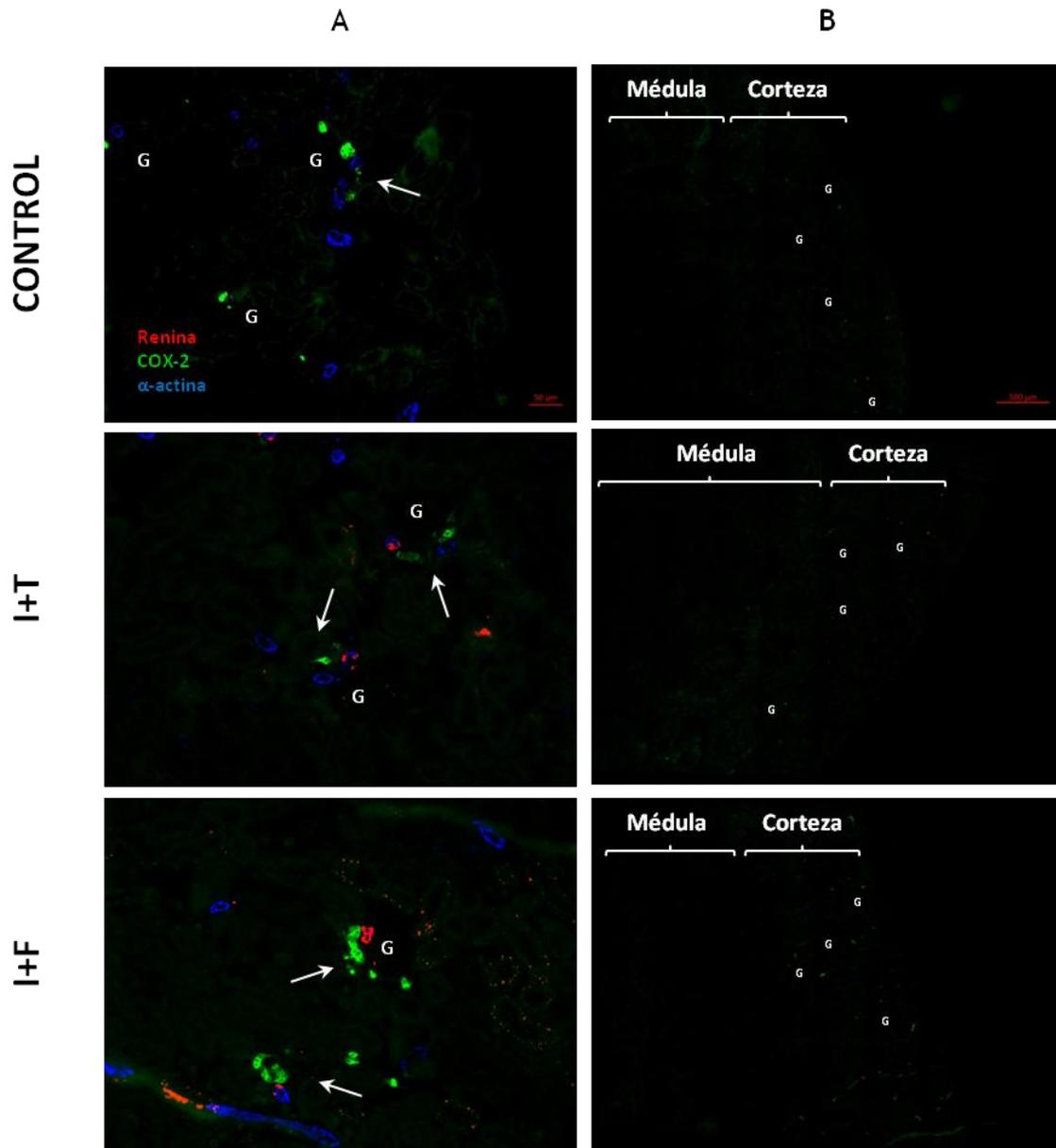


Figura 54. Imágenes representativas obtenidas mediante inmunofluorescencia para estudiar la expresión y la localización renal de la renina y de la enzima COX-2 en animales sin tratamiento (control), en el grupo I+T y en el grupo I+F. El fluoróforo rojo marca la renina, el verde la enzima COX-2 y el azul la proteína α-actina. A) Imágenes 10x de la corteza renal de los diferentes grupos de estudio, G: glomérulo; las flechas marcan el sistema tubuloglomerular. B) Mosaico del tejido renal realizado tras agrupar 25 imágenes tomadas a 10x en el que podemos observar la corteza y la médula renal.

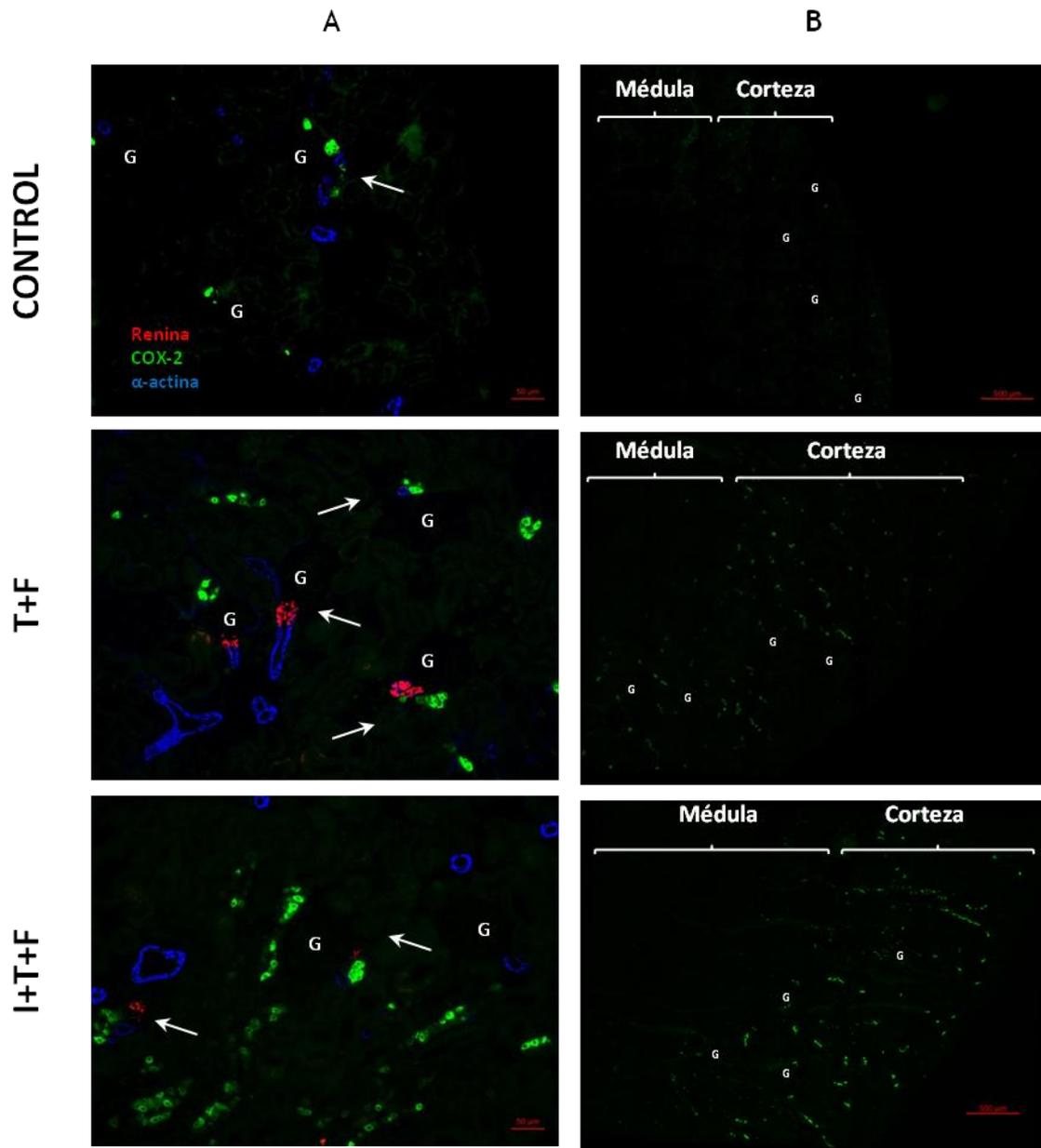


Figura 55. Imágenes representativas obtenidas mediante inmunofluorescencia para estudiar la expresión y la localización renal de la renina y de la enzima COX-2 en animales sin tratamiento (control), en el grupo T+F y en el grupo I+T+F. El fluoróforo rojo marca la renina, el verde la enzima COX-2 y el azul la proteína α -actina. A) Imágenes 10x de la corteza renal de los diferentes grupos de estudio, G: glomérulo; las flechas marcan el aparato yuxtaglomerular. B) Mosaico del tejido renal realizado tras agrupar 25 imágenes tomadas a 10x en el que podemos observar la corteza y la médula renal.

Se localizó el aparato yuxtaglomerular en todos los grupos y se pudo comparar la expresión de ambas proteínas. La expresión de la renina parece aumentar en el grupo de la doble terapia T+F, mientras que se mantiene sin cambios en los demás grupos de estudio. La expresión de la COX-2 aumenta débilmente en la macula densa en el grupo I+F (figura 54) y sufre grandes modificaciones con la doble terapia T+F y

la triple terapia, como se puede observar en las imágenes (figura 55.A) y más visualmente en el mosaico de la corteza renal (figura 55.B). Mientras que en los demás grupos no se observan grandes diferencias en su expresión respecto al control, en el grupo T+F se visualiza un aumento en la expresión de COX-2 en la mácula densa y también comienza a expresarse en toda la zona tubular de la corteza. Estos cambios se hacen mucho más evidentes en la triple terapia, en los que hay un aumento considerable de la expresión de esta enzima en el aparato yuxtaglomerular y en parte de la zona tubular de la corteza, probablemente la rama ascendente del asa de Henle (figura 55), donde es conocida la expresión de esta enzima en determinadas circunstancias.

La expresión de la COX-2 aumenta tras la administración de T+F en el aparato yuxtaglomerular y se expande por toda la zona tubular de la corteza. Esta expresión se acentúa enormemente tras la adición de un AINE a esta combinación.

4.2. Expresión de la COX-2 y la renina en el tejido renal

El análisis de la expresión de la COX-2 mediante PCR (figura 56.B) y el mosaico de las imágenes de inmunofluorescencia obtenido del riñón completo corroboran los resultados del apartado anterior. El análisis de la expresión génica muestra un pequeño aumento de la expresión de COX-2 en el grupo I+F, mientras que los grupos de T+F e I+T+F triplican el valor obtenido en el grupo control. Sin embargo, los datos no son estadísticamente significativos debido a la alta variabilidad. Las imágenes del riñón completo localizan el aumento de la expresión de la COX-2, marcado con el fluoróforo verde. Estas imágenes hacen más evidente lo observado anteriormente, la expresión de esta proteína se expande por toda la corteza, dibujándola perfectamente, en el grupo de la doble terapia T+F y de la triple terapia. El porcentaje de la COX-2 cortical representa solamente el 20 % del total expresado en el riñón completo, ya que el 80 % restante se encuentra en la zona papilar. Estos datos podrían explicar las diferencias obtenidas entre el análisis de expresión de la COX-2 por PCR y por inmunofluorescencia, ya que la COX-2 papilar podría enmascarar las diferencias observadas en la corteza renal al analizar homogenado de tejido renal completo.

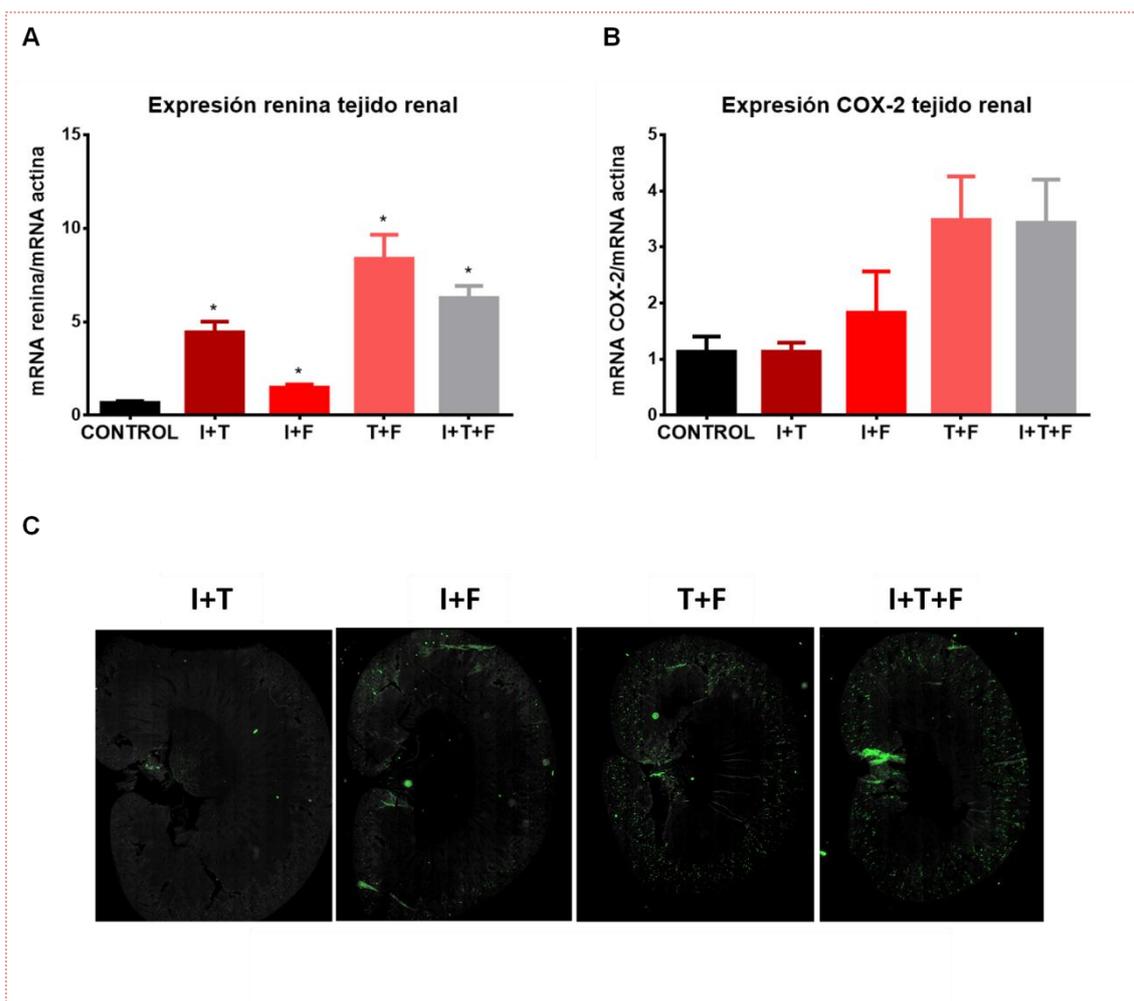


Figura 56. Expresión de las proteínas renina y COX-2 en el tejido renal de los animales tratados con la doble y triple terapia. A) Estudio de la expresión de la proteína renina mediante PCR en el tejido renal. B) Estudio de la expresión de la enzima COX-2 mediante PCR en el tejido renal. C) Mosaico representativo de la expresión de COX-2 y su localización en el tejido renal mediante la unión de múltiples fotografías a 10x (15 columnas, 25 filas, 5 % de superposición, 911 ms de exposición).

Se ha demostrado que la administración de un inhibidor de la angiotensina II aumenta moderadamente la expresión basal de la COX-2 y potencia enormemente su expresión en situaciones en las que ésta se encuentra estimulada, lo que sugiere un retrocontrol negativo entre la angiotensina II y la COX-2 (Harris y Breyer, 2001, Castrop y cols, 2003). Además, el bloqueo del cotransportador NKCC por la furosemida provoca un incremento en la expresión de la COX-2 en la mácula densa y en las células de la rama ascendente del asa de Henle cortical, posiblemente relacionado con el aumento de la secreción de renina ante dicha situación (Mann y

cols., 2001). Al añadir un inhibidor de la COX-2 a la terapia se produce un aumento de la señal de esta enzima, de acuerdo con ciertos estudios que proponen la existencia de un retrocontrol negativo entre COX-2 y las PGs sintetizadas en la parte gruesa del asa de Henle (Vio y cols, 2012).

La expresión de la renina (figura 56.A) en el tejido renal aumenta fuertemente en los grupos dobles I+T, T+F y en la triple terapia. Los inhibidores de la angiotensina II provocan un aumento en su expresión debido a la retroalimentación negativa existente entre ambas moléculas (Schweda y cols., 2007). Asimismo, la furosemida activa la retroalimentación tubuloglomerular y por tanto, la secreción de renina (Mann y cols., 2001) La administración conjunta de ambos fármacos provoca un aumento en su expresión debido, por una parte, a la hipotensión sistémica provocada y por otra parte, a la inhibición del retrocontrol negativo de la angiotensina II. La inhibición de la COX-2 en este escenario no disminuye de forma significativa la expresión de la renina en el tejido renal, de acuerdo con otros estudios en los que se demuestra que la COX-2 podría estar implicada en la secreción de la renina pero no en su expresión (Kammerl y cols., 2001b).

La expresión de la renina y de la COX-2 en el tejido renal aumenta tras la administración conjunta de trandolapril y furosemida y se mantiene tras añadir un AINE a la terapia. Estos resultados sugieren que la homeostasis renal de ambos grupos es completamente dependiente de estas dos moléculas y que su inhibición conjunta desembocaría en un daño renal.

4.3. Sistema-renina-angiotensina-aldosterona

El SRAA es fundamental en el control de la hemodinámica sistémica y renal y se activa directamente tras la secreción de la renina por parte de las células yuxtaloglomerulares del aparato yuxtaloglomerular. Tras reacciones encadenadas a partir de esta enzima se sintetiza la angiotensina II, primordial efector del sistema. Además de estudiar la expresión de la renina en el tejido renal a día 6, se analizó la actividad de la renina en el plasma (ARP) (figura 57) con el fin de determinar el estado del SRAA sistémico durante todo el tratamiento.

De acuerdo con los resultados de la expresión de la renina en el tejido renal, observamos un aumento de su actividad en el plasma en los grupos dobles I+T, T+F y en el grupo de la triple terapia. Sin embargo, observamos diferencias en la actividad del sistema entre el grupo T+F y la triple terapia a lo largo del tratamiento. Aunque su actividad es similar a día 0 en ambos grupos, ésta se dispara tras las sucesivas administraciones del diurético en el grupo de la triple terapia, datos que sugieren la alta dependencia de este grupo con el SRAA para intentar mantener la homeostasis sistémica y renal. Numerosos estudios sitúan a la COX-2 como la enzima clave en la secreción de la renina en determinadas situaciones (apartado 1.4.3. de la Introducción), entre ellas la depleción de volumen producida tras la administración de un diurético (Mann y cols., 2001). Nuestros resultados sugieren que la COX-2 no es la única vía responsable de su secreción en la triple terapia, ya que su actividad aumenta tras la inhibición de la COX-2. Otros mecanismos, como la inervación simpática o la acción directa de los barorreceptores intrarrenales, pueden estar implicados en este proceso tras la administración de los fármacos utilizados.

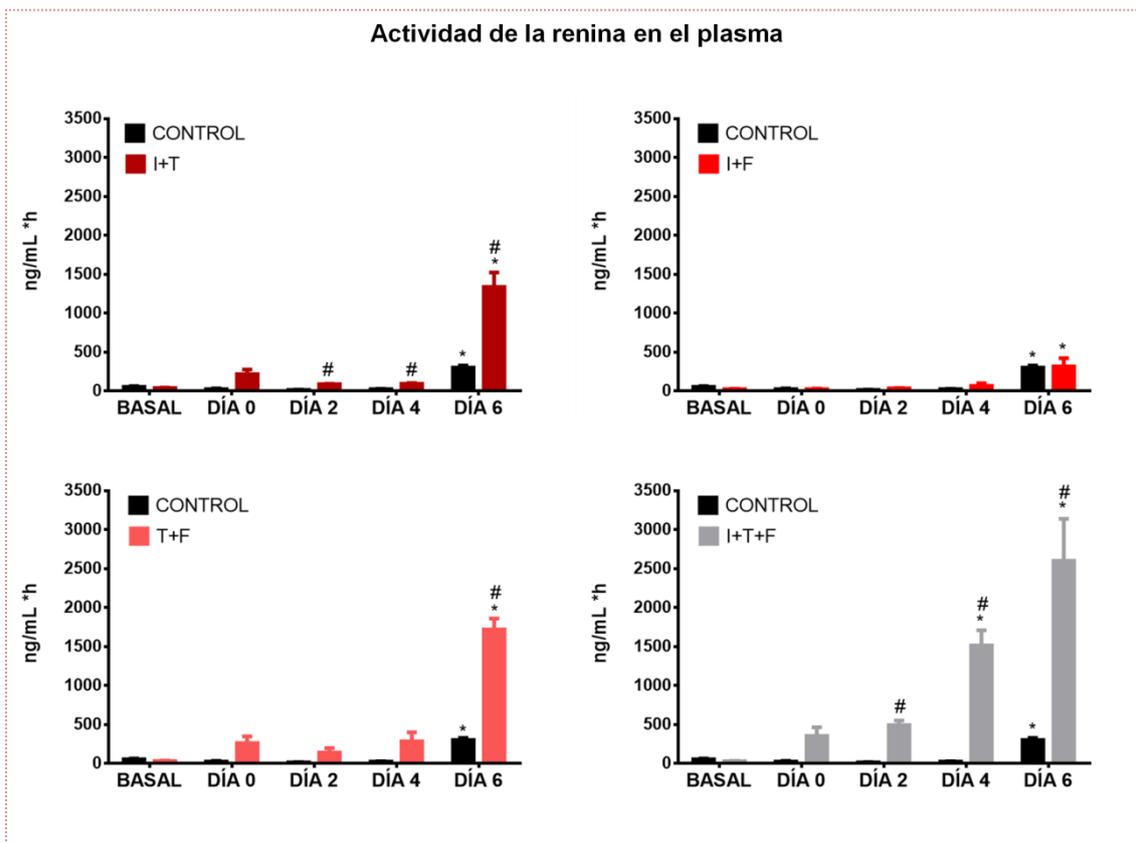


Figura 57. Evolución de la actividad de la renina en el plasma de los animales del estudio. Los datos representan la media ± EEM. * $p < 0.05$ respecto a la muestra basal del grupo, # $p < 0.05$ respecto al grupo control en el mismo día de tratamiento.

4.4. Estado hemodinámico global, una visión integradora

En conjunto, nuestros resultados del estudio hemodinámico verifican la hipótesis del estado de hipoperfusión renal que provoca la triple terapia, lo que desemboca en un DRA de tipo pre-renal. Es un modelo experimental capaz de reproducir este tipo de daño renal, primer paso para estudiar todos los procesos fisiopatológicos involucrados en el desarrollo de esta enfermedad. Los resultados obtenidos en las dobles terapias sugieren que estos grupos pueden ser útiles como modelos de DRA de tipo pre-renal subclínico o de riesgo. La alteración de estos sistemas de regulación provoca: i) la disminución de la TFG sin repercusión en un aumento de la creatinina plasmática, como en los grupos I+T o I+F, o ii) un estado de hipotensión completamente dependiente del SRAA, donde el mantenimiento de la función renal se produce gracias a las PGs, como en el grupo T+F.

A continuación se muestra una tabla resumen con las características evaluadas de la función renal y del estado hemodinámico de cada grupo (tabla 19).

Grupo	Crpl	TFG	Proteinuria	Biomarcadores	PAS	FSR	FSCR	Renina	COX-2
I+T	Normal	↓	↓	Ausentes	↓	↓	Normal	↑	Normal
I+F	Normal	↓	↓	Ausentes	Normal	↓	Normal	Normal	↑
T+F	Normal	Normal	Normal	Ausentes	↓	↓	Normal	↑↑	↑↑
I+T+F	↑	↓	↓↓	Ausentes	↓	↓↓	↓	↑↑	↑↑

Tabla 19. Resumen integrador que refleja las características de la función renal, los biomarcadores analizados y las características hemodinámicas analizadas en cada grupo experimental. Las flechas rojas marcan una disminución respecto al valor normal y las flechas verdes un aumento respecto al mismo. Crpl: creatinina plasmática; TFG: tasa de filtración glomerular; PAS: presión arterial sistólica; FSR: flujo sanguíneo renal; FSCR: flujo sanguíneo cortical renal; COX-2: ciclooxigenasa-2.

El estado de estos parámetros en cada grupo de estudio delinea un perfil hemodinámico que podría ser útil, junto con el estudio de los biomarcadores anteriormente realizados, en el diagnóstico preventivo y diferencial de este síndrome y del riesgo de desarrollarla. Suma información a la huella proteica y fisiológica

presentada en el apartado anterior y permite determinar qué estados hemodinámicos se encuentran en el límite del desarrollo de un daño renal.

En su conjunto, los resultados analizados en este bloque nos permiten alcanzar las siguientes conclusiones parciales:

- En la triple terapia, la furosemida y el trandolapril provocan una hipotensión, que se traduce en una hipoperfusión renal sostenida debido a una inhibición de las prostaglandinas, responsables del mantenimiento de la autorregulación renal en dichas circunstancias.
- Las dobles terapias provocan alteraciones en los mecanismos de la regulación de la PA, de la autorregulación renal, o de ambos. Sin embargo, las PGs o el SRAA activos en cada situación son capaces de contrarrestar la inhibición de los sistemas de regulación y mantener la función renal parcial o totalmente.

BLOQUE 3: IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS BIOMARCADORES URINARIOS ASOCIADOS AL DRA PRE-RENAL

La búsqueda de nuevos biomarcadores capaces de identificar el DRA tempranamente y de diferenciar su etiología es la base de numerosas investigaciones. En la actualidad no existen en la literatura estudios que relacionen marcadores específicos con el DRA de tipo pre-renal. Tras esclarecer la ausencia o débil presencia de un amplio número de biomarcadores de DRA renal y delimitar el perfil hemodinámico de cada grupo, quisimos identificar proteínas en la orina que pudieran ser útiles en el diagnóstico preventivo y diferencial del DRA de tipo pre-renal.

En este contexto, se llevó a cabo la identificación de proteínas en la orina de los animales mediante proteómica diferencial. Se analizaron las orinas recogidas durante el tratamiento en dos tiempos determinados del estudio; i) a día 0 de tratamiento con el fin de estudiar su posible papel en el diagnóstico precoz y preventivo y ii) a día 6 de tratamiento con el fin de estudiar su papel en el diagnóstico diferencial del DRA.

5. IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES URINARIOS DEL RIESGO DE DESARROLLAR UN DRA DE TIPO PRE-RENAL

El periodo que hemos denominado de *pre-tratamiento* en el modelo experimental se encuentra comprendido entre el día basal y el día 0 del estudio, donde se administra a los animales el antiinflamatorio (el ibuprofeno), el IECA (el trandolapril), ambos o ninguno. La hipótesis inicial plantea que los animales tratados con ambos fármacos a día 0 presentan una predisposición a desarrollar un DRA, alteración que no se encuentra presente en los tratamientos individuales. El desafío planteado es poder identificar proteínas en la orina de estos animales que puedan correlacionarse con ese riesgo o predisposición a desarrollar un daño renal. Con este fin se analizaron las diferencias en la presencia o en los niveles de proteínas en la orina del día 0 mediante la comparación de los geles de poliacrilamida realizados de los cuatro grupos experimentales mencionados (figura 58).

El primer estudio llevado a cabo comparó el grupo control y el grupo I+T. La tabla 20 muestra las proteínas presentes en el grupo I+T y ausentes en el grupo control.

Figura no publicada por proceso de patente

Figura 20. Proteínas identificadas en la orina de los animales tratados con I+T durante cuatro días (día 0) ausentes en la orina del grupo control. n=3, se aceptaron diferencias significativas si $p < 0.01$. ID: identificación; MS: espectrometría de masas; MS/MS: espectrometría de masa tándem; PM: peso molecular.

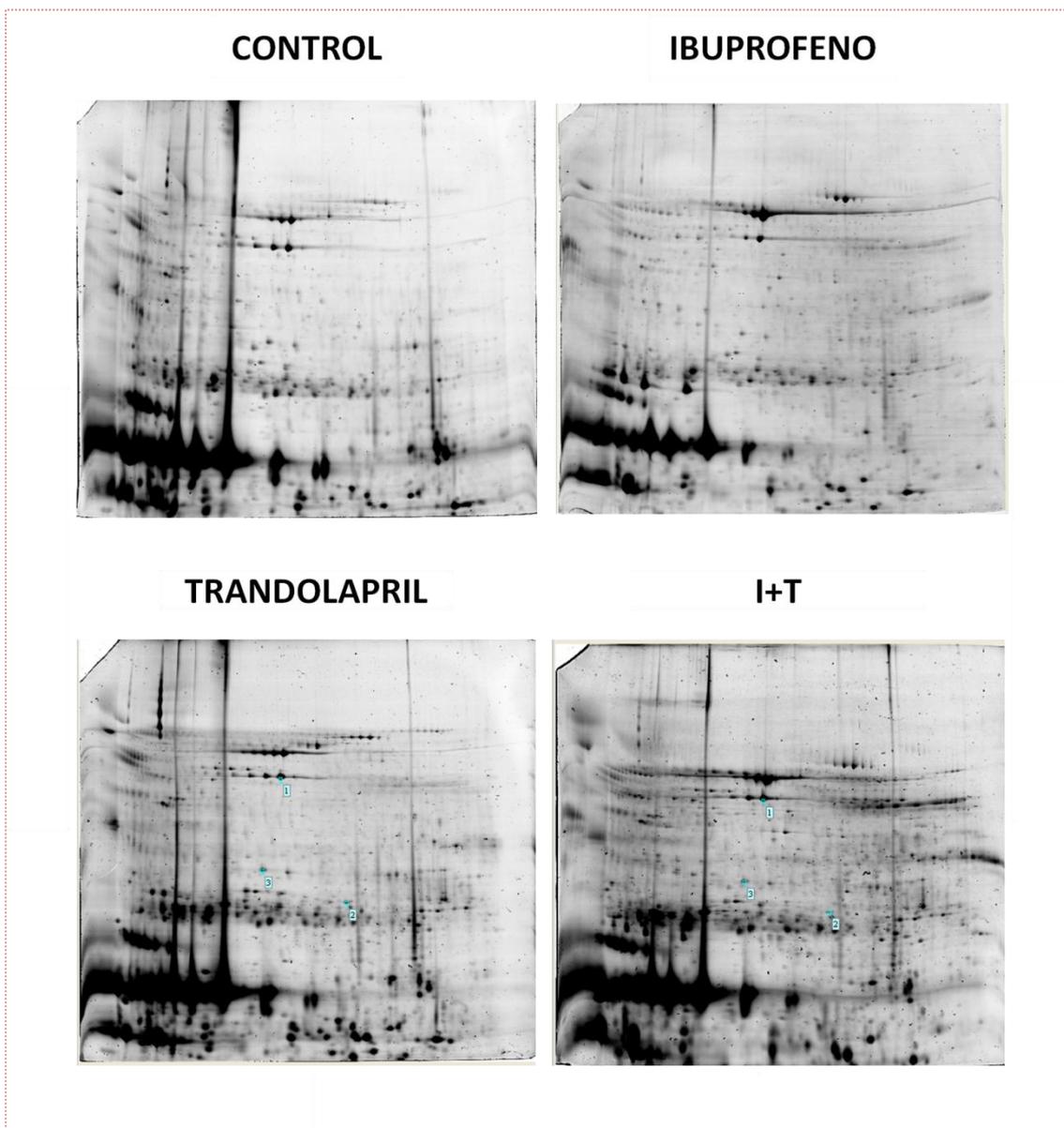


Figura 58. Imágenes representativas de los geles de poliacrilamida obtenidos tras la electroforesis bidimensional. Se analizaron 3 geles por cada grupo experimental y se analizaron sus diferencias mediante el software Image Master 2D Platinum.

Posteriormente, se analizó si estas proteínas identificadas estaban presentes en los grupos de monoterapia y el resultado fue positivo para todas ellas en el grupo de ibuprofeno. Estos resultados demuestran que las proteínas identificadas no son marcadores específicos del grupo I+T, y por tanto, no identifican la predisposición a desarrollar un DRA de este grupo. En todo caso, estas proteínas marcarían la exposición de los animales al ibuprofeno. Sin embargo, la presencia de estas proteínas en la orina podría, no solo marcar la exposición al fármaco, sino que

también podría identificar las alteraciones hemodinámicas que produce este fármaco. En el riñón, las PGs actúan como moléculas vasodilatadoras, están involucradas en el correcto funcionamiento de la autorregulación renal y de la homeostasis de Na⁺, K⁺ y del agua (Gambaro y Perazella, 2003). Con esta hipótesis inicial, se necesitarían estudios para evaluar si estas proteínas aparecen en la orina en situaciones en las que estas funciones están alteradas sin la administración de los fármacos antiinflamatorios.

El análisis de la huella proteica urinaria no identificó ningún marcador asociado al riesgo. Cabe recalcar que en esta fase de predisposición a un DRA no existen alteraciones tubulares ni glomerulares, por lo que puede ser poco probable que se produzcan cambios significativos en la composición de la orina. Más aún en nuestro modelo animal, ya que estudiamos una fase de predisposición a desarrollar un DRA de tipo pre-renal en el que el componente fundamental alterado no es estructural sino hemodinámico.

6. IDENTIFICACIÓN DE POTENCIALES BIOMARCADORES URINARIOS ASOCIADOS A UN DRA DE TIPO PRE-RENAL

Se realizó el mismo análisis de proteómica diferencial que en el apartado anterior, pero en la orina del día 6 de tratamiento de los animales del grupo I+T+F, grupo que desarrolló un DRA de tipo pre-renal, frente a un grupo control (figura 59).

La siguiente tabla muestra las proteínas identificadas en el grupo de daño renal tras 6 dosis de furosemida, ausentes en la orina de los animales controles. Todas las proteínas determinadas aparecen también a día 0, como la proteína biomarcador 13 o el biomarcador 14, que se encuentran de forma muy abundante en diferentes lugares de extracción de muestra o picados.

Figura no publicada por proceso de patente

Tabla 21. Proteínas identificadas en la orina de los animales tratados con I+T+F a día 6 ausentes en la orina del grupo control. n=3, se aceptaron diferencias significativas si $p < 0.01$. ID: identificación; MS: espectrometría de masas; MS/MS: espectrometría de masa tándem; PM: peso molecular.

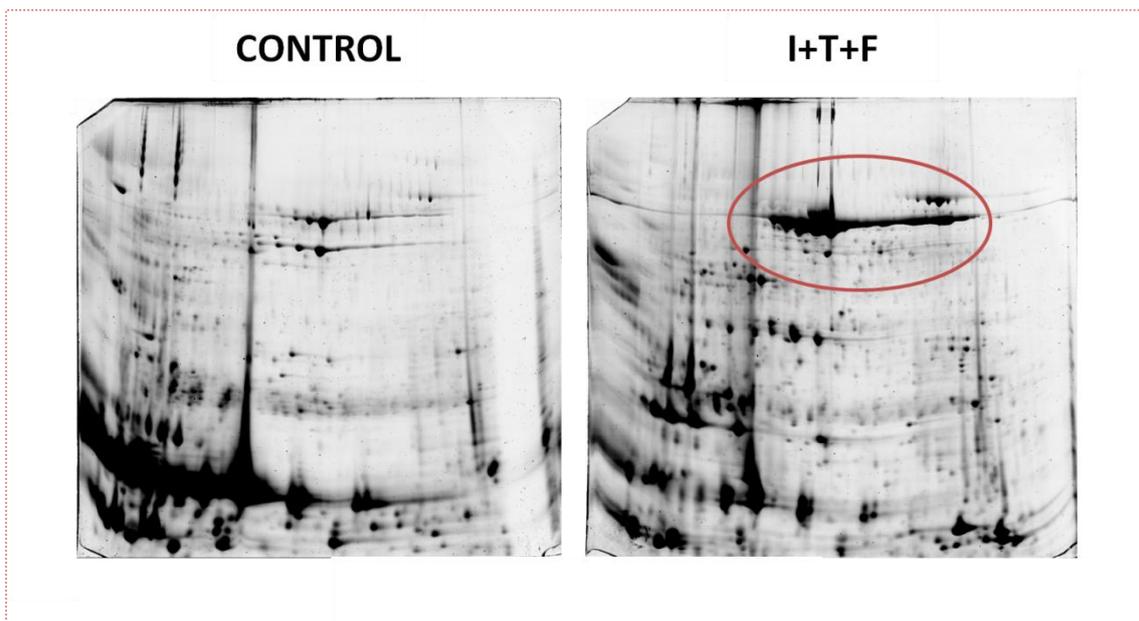


Figura 59. Imágenes representativas de los geles de poliacrilamida obtenidos tras la electroforesis bidimensional. Se analizaron 3 geles por cada grupo experimental y se analizaron sus diferencias mediante el software Image Master 2D Platinum. El color granate marca las evidentes diferencias encontradas entre los geles de ambos grupos de estudio.

7. VALIDACIÓN DE LAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR PROTEÓMICA DIFERENCIAL

Ambos resultados se validaron mediante la técnica de Western blot. Se analizaron todas las proteínas identificadas a lo largo del tratamiento para evaluar el perfil de aparición de cada una de ellas. De todas las proteínas identificadas solo pudieron ser validadas 3: i) el biomarcador 13; ii) el biomarcador 14 y el biomarcador 15 ya que las demás proteínas presentaban un patrón sin explicación biológica o no pudieron ser detectadas ni por *Western blot*, ni por otras técnicas de estudio como PCR o ELISA. En todos los análisis se incluyó una muestra de orina representativa de un DRA de tipo renal (G-150), con el fin de identificar posibles diferencias entre ambos tipos de daño. Los resultados de la cuantificación de las imágenes de Western blot se representaron en porcentaje respecto a este grupo. Todas las proteínas identificadas aparecen en este control de DRA de tipo renal, lo que les resta valor como potenciales marcadores relacionados con un DRA de tipo pre-renal en su unidad.

Los animales del estudio que desarrollan un DRA de tipo pre-renal presentan una disminución drástica de la excreción urinaria de proteínas en la orina a día 6 de tratamiento (figura 34). Esto puede enmascarar los resultados obtenidos en el estudio de proteómica diferencial, realizado por composición relativa de la orina. Por esta razón, se realizó el análisis de validación según la excreción urinaria de proteínas y la composición relativa de la orina para no perder ni enmascarar información relevante.

7.1. Biomarcador 13

El biomarcador 13 constituye la mayor familia de proteínas capaces de reducir los radicales superóxido gracias a su sitio de acción, constituido por un residuo de cisteína. Los radicales oxidan dicho residuo de cisteína, denominado Cp, y éste a su vez, reacciona con otro residuo de cisteína, conocido como Cr, para completar el ciclo catalítico. Atendiendo a la localización del residuo Cr se pueden distinguir tres subfamilias (2-Cys, atípica 2cys, 1-cys) aunque en la actualidad se ha realizado una nueva clasificación según sus características bioquímicas, estructurales y su distribución filogenética, diferenciando 6 subfamilias entre las que se encuentra el biomarcador 13 (). Estas proteínas están involucradas en el control de

numerosas funciones fisiológicas como el crecimiento celular, la diferenciación celular, la apoptosis, el desarrollo embrionario, el metabolismo lipídico, la respuesta inmune o la homeostasis celular (). Su papel en diversas dolencias como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares o renales es motivo de numerosos estudios (). En la fibrosis tubulointersticial, el biomarcador 13 inhibe la apoptosis en las células epiteliales tubulares en el riñón de rata y en el humano () y cols., proponen esta proteína como un potencial biomarcador de hidronefrosis en el feto de ratón, ya que se produce una sobreexpresión de la misma en el tracto urinario de los animales con hidronefrosis (). En el área clínica, se ha demostrado que la expresión de esta proteína junto con otras de su familia se relaciona con la duración de la diálisis en pacientes con carcinoma de las células renales ().

Esta proteína fue identificada mediante proteómica diferencial en la orina de los animales del grupo I+T a día 0 de tratamiento, y posteriormente, en el grupo de ibuprofeno.

7.1.1. Estudio de la excreción urinaria del biomarcador 13

El biomarcador 13 aparece en la orina de día 0 de todos aquellos grupos a los que se les administra ibuprofeno (figura 60). Aunque existen diferencias significativas en el grupo I+F y en el grupo I+T+F respecto al basal, los resultados no son biológicamente relevantes ya que en ese punto, estos grupos son metodológicamente iguales que el grupo de ibuprofeno e I+T, respectivamente, en los que el aumento de esta proteína no es tan pronunciado.

Figura no publicada por proceso de patente

*Figura 60. Imágenes representativas de Western blot y cuantificación de la excreción urinaria del biomarcador 13 en la orina de las ratas del modelo experimental a lo largo del tratamiento. Los datos representan la media \pm EEM en porcentaje respecto a la cantidad del biomarcador 13 presente en la muestra del control positivo G-150. * $p < 0.05$ respecto a la muestra basal del grupo.*

7.1.2. Estudio de la composición relativa de la orina

Esta proteína se encuentra presente en la orina de todos aquellos grupos a los que se les administra ibuprofeno. Sin embargo, el biomarcador 13 aparece en la terapia individual en los días 0 y 2 y disminuye o desaparece en los posteriores días de tratamiento. En las dobles terapias con el AINE, se mantiene en la orina desde el día 0 hasta el día 4. La suma del tercer fármaco a la terapia provoca que esta proteína se mantenga en la orina durante todo el tratamiento. Los resultados presentados en la figura 61 no son estadísticamente significativos debido a la alta

variabilidad de los mismos. Además, en el grupo de T+F esta proteína se presenta en la orina de un único animal del grupo en los días 2 y 4 de tratamiento. Estos resultados sugieren que la presencia de esta proteína podría ser útil según un análisis individual, ya que existen grandes variaciones de un animal a otro, datos que podrían tener un significado fisiológico o fisiopatológico.

Cabe destacar que esta proteína se encuentra presente en los grupos de doble terapia donde se observa un posible DRA de tipo subclínico, en la triple terapia en la que existe un claro DRA y en el grupo tratado solamente con ibuprofeno, en el que posiblemente se produzcan alteraciones tras la administración del fármaco. Además, la presencia en la orina parece ser proporcional al grado de alteración renal presente. De acuerdo a su papel celular, la presencia de esta proteína antioxidante podría marcar el estado de estrés celular presente en cada grupo. Los resultados no parecen indicar que el biomarcador 13 urinario marque solamente la administración del ibuprofeno, ya que su presencia en la orina no es proporcional a la cantidad de fármaco administrado. Por el contrario, parece que su presencia podría estar relacionada con las alteraciones que el fármaco produce en el organismo, tanto a nivel sistémico como renal, aunque estas conclusiones son meramente especulativas y serían necesarios numerosos estudios para poder correlacionar ambos hechos. De ser así, este potencial biomarcador en el DRA de tipo pre-renal sería de gran interés y utilidad clínica.

Figura no publicada por proceso de patente

*Figura 61. Imágenes representativas de Western blot y cuantificación de la presencia del biomarcador 13 en la orina de las ratas de los diferentes grupos de estudio. Los datos representan la media \pm EEM en porcentaje respecto a la cantidad del biomarcador 13 presente en la muestra del control positivo G-150. * $p < 0.05$ respecto a la muestra basal del grupo.*

7.2. Biomarcador 14

El biomarcador 14 es la proteína plasmática con mayor afinidad al grupo hemo, siendo el principal mecanismo para transportar y eliminar el grupo hemo del plasma. Tras la proteína haptoglobina, es la segunda línea de defensa contra el estrés oxidativo mediado por la hemoglobina durante la hemólisis intravascular (

). Gracias a su mecanismo “limpiador” del grupo hemo, se ha

relacionado como principal mecanismo de defensa en enfermedades inflamatorias tales como la arterosclerosis, lo que sitúa a esta proteína como una potencial terapia protectora frente a estas enfermedades (). , demostraron en 2012 que esta proteína sintetizada en el hígado aumenta en la orina en todo DRA que genere un estrés hepático, la cual alcanza y se acumula en los túbulos renales ().

Nuestros resultados de proteómica diferencial localizan esta proteína en la orina del grupo I+T a día 0 y en la orina del grupo I+T+F a día 6.

7.2.1. Estudio de la excreción urinaria del biomarcador 14

EL biomarcador 14 se excreta de forma abundante en el grupo ibuprofeno y en el grupo I+T desde el día 0 al día 6. Sin embargo, aparece solamente a día 0 en el grupo I+F y en la triple terapia. Esta proteína, aunque con variaciones, se comporta de forma similar al biomarcador 13 ya que solamente se excreta en aquellos grupos en los que se administra el antiinflamatorio.

Figura no publicada por proceso de patente

*Figura 62. Imágenes representativas de Western blot y cuantificación de la excreción urinaria del biomarcador 14. Los datos representan la media \pm EEM en porcentaje respecto a la cantidad del biomarcador presente en la muestra del control positivo G-150. * $p < 0.05$ respecto a la muestra basal del grupo.*

7.2.2. Estudio de la composición relativa de la orina

Los resultados obtenidos en este estudio completan la información aportada en el apartado anterior. El biomarcador 14 aparece de forma más abundante en los grupos de ibuprofeno y de I+T. Además, el grupo de la triple terapia presenta esta proteína desde día 0 hasta día 6. En algunos casos los resultados no son estadísticamente significativos debido a la variabilidad intragrupo.

Figura no publicada por proceso de patente

*Figura 63. Imágenes representativas de Western blot y cuantificación de la presencia del biomarcador 14. Los datos representan la media \pm EEM en porcentaje respecto a la cantidad del biomarcador 14 presente en la muestra del control positivo G-150. * $p < 0.05$ respecto a la muestra basal del grupo.*

7.3. Biomarcador 15

EL biomarcador 15 es la proteína más abundante del plasma (50 %) y es producida exclusivamente por el hígado. Realiza múltiples funciones entre las que podemos destacar el mantenimiento de la presión oncótica de la sangre, el transporte de diversas moléculas (hormonas tiroideas, hormonas liposolubles,

bilirrubina, ácidos grasos, fármacos y drogas...), la unión competitiva con iones de calcio y el control del pH. Además, tiene un gran poder antioxidante ya que reacciona con las especies reactivas de oxígeno y reduce su producción debido a su unión con el Cu^{2+} (). Múltiples estudios relacionan sus variaciones en las concentraciones de plasma y orina con diversas patologías. La disminución de la concentración del biomarcador 15 en el plasma se vincula con enfermedades hepáticas, que impedirían la correcta síntesis de la molécula (). En la orina, el estudio de la excreción de esta proteína se ha correlacionado con la severidad del daño glomerular en la progresión de daño renal crónico (). En el DRA, los estudios sugieren que el biomarcador 15 es un perfecto marcador del DRA de tipo renal con daño tubular. Los túbulos proximales dañados serían incapaces de reabsorber el biomarcador 15 que alcanza esta parte del túbulo renal, lo que desembocaría en . Según estos estudios esta proteína estaría presente en la orina de un DRA de tipo renal y ausente en aquellos de tipo pre-renal y post-renal ().

El biomarcador 15 se identificó por proteómica diferencial a día 0 y a día 6. Sin embargo, los resultados obtenidos en relación al estudio de la excreción urinaria contradicen estos resultados.

7.3.1. Estudio de la excreción urinaria del biomarcador 15

El grupo utilizado como control positivo de DRA de tipo renal presenta una alta cantidad de esta proteína. Esto está en concordancia con todos los estudios que apoyan que el biomarcador 15 es un marcador diferencial de este tipo de daño. Sin embargo, también se excreta en menor medida en los grupos a los que se les administra el ibuprofeno solo o de forma combinada. En el grupo del antiinflamatorio en monoterapia aparece una pequeña cantidad de biomarcador 15 a día 0, que aumenta a lo largo del tratamiento de forma no significativa sin alcanzar más de un 20 % respecto al control positivo. Aunque se detecta en los demás grupos con el inhibidor de la COX, los resultados son variables y las diferencias mínimas, que no permiten obtener ninguna conclusión.

Figura no publicada por proceso de patente

*Figura 64. Imágenes representativas de Western blot y cuantificación de la excreción urinaria del biomarcador 15 en la orina de las ratas del modelo experimental a lo largo del tratamiento. Los datos representan la media \pm EEM en porcentaje respecto a la cantidad del biomarcador presente en la muestra del control positivo G-150. * $p < 0.05$ respecto a la muestra basal del grupo.*

7.3.2. Estudio de la composición relativa de la orina

Los datos de este estudio completan la información aportada en el apartado anterior. Esta proteína aparece en la orina de los animales con ibuprofeno en terapia simple, en el grupo I+T y en la triple terapia con un patrón similar. Aparece suavemente a día 0 y aumenta su presencia progresivamente hasta día 6.

Figura no publicada por proceso de patente

*Figura 65. Imágenes representativas de Western blot y cuantificación de la presencia del bioarcador 15 en la orina de las ratas de los diferentes grupos de estudio. Los datos representan la media \pm EEM en porcentaje respecto a la cantidad del biomarcador presente en la muestra del control positivo G-150. * $p < 0.05$ respecto a la muestra basal del grupo.*

En conjunto, los resultados obtenidos no permiten esclarecer un papel concreto de forma individual del biomarcador 15 en este modelo experimental, ya que aparece en tres de los grupos de estudio con un patrón similar. Estos grupos, a priori, presentan características fisiológicas o fisiopatológicas muy dispares. La causa de la aparición de esta proteína en la orina abre nuevos interrogantes a nuestra investigación. Aparece en el grupo I+T+F que representa un claro daño renal, en el grupo I+T que posiblemente tenga un DRA sub-clínico y por último, en el grupo ibuprofeno en el que no se han obtenido otros parámetros que indiquen una fisiología alterada. Además, su famosa relación con un daño en las células tubulares renales

ampliamente estudiado (), sugiere la posibilidad de que exista una lesión incipiente en estas estructuras.

7.4. Huella proteica del DRA de tipo pre-renal

La siguiente tabla resume los resultados obtenidos en la validación de las proteínas identificadas por proteómica diferencial a día 0 y a día 6 de tratamiento. De todas las proteínas identificadas solamente se han podido validar tres de ellas, el biomarcador 1, el biomarcador 2 y el biomarcador 3. La evaluación de la composición relativa de la orina nos aporta una información más completa que el estudio de la excreción de estas proteínas, donde los resultados obtenidos son más débiles y variables. Los porcentajes de presencia o excreción de cada proteína se han representado en un código de colores, en el que el color blanco marca la ausencia de la proteína (0-5 %) y el color negro la máxima determinación obtenida (100 %), encontrada en todas las proteínas en el grupo de G-150. La presencia de estas proteínas en el grupo de DRA de tipo renal determinaría el escaso valor de las mismas como potenciales marcadores de la etiología del daño renal, por lo menos, de cada una de ellas por separado.

Los grupos con mayor determinación de las tres proteínas son el grupo de la terapia simple de ibuprofeno, el grupo doble de I+T y el grupo de la triple terapia. En el grupo de la doble terapia I+F aparecen dos de las proteínas con ciertas alteraciones a lo largo del tratamiento que no nos permiten sacar conclusiones contundentes. En los demás grupos de estudios, estas proteínas se encuentran prácticamente ausentes. La presencia de estas moléculas también en el grupo de ibuprofeno desde el día 0, en el que no hemos identificado ningún rasgo de daño renal clínico ni subclínico, devalúa el poder de estas proteínas para determinar el riesgo de desarrollar un daño renal de este tipo. Sin embargo, hemos obtenido una huella proteica específica de cada grupo determinada por la presencia o ausencia de estas tres proteínas en la orina.

Figura no publicada por proceso de patente

Tabla 22. Tabla resumen de los resultados obtenidos en la validación de las proteínas identificadas por proteómica diferencial. Se resumen el estudio de la excreción urinaria y de la composición relativa de la orina. Los datos de ambos estudios están expresados en porcentaje respecto al control positivo. Los porcentajes de presencia o excreción se representan mediante un código de colores. El valor 0 se marca de color blanco y el valor 100 se marca de color negro. El resto de porcentajes comprendidos entre estos valores se etiquetan en diferentes colores grises. Los resultados se han referido en porcentaje respecto a la aparición de dichas proteínas en el control positivo de G-150. I: ibuprofeno; T: trandolapril; F: furosemida.

Aunque, a priori, estas proteínas no aporten una información relevante sobre el diagnóstico diferencial y preventivo, pueden ser de gran utilidad en el análisis del conjunto de marcadores que puedan delinear una huella proteica para cada tipo de daño renal. Como se ha explicado en la Introducción, es difícil pensar que una sola molécula sea capaz de englobar todas las características de un biomarcador ideal. La complejidad del organismo nos lleva a pensar que las alteraciones producidas en las diferentes enfermedades provocan la desregulación de muchas moléculas, capaces de sobreexpresarse o suprimir su síntesis con el fin de mantener el equilibrio fisiológico en cada situación. El desafío se encuentra en descifrar el complejo

conjunto de vías alteradas en cada dolencia que den lugar a un mapa de moléculas que sean capaces de reflejar dicha alteración.

En este trabajo hemos determinado que la mayoría de las proteínas presentes en los modelos de DRA de tipo renal se encuentran ausentes o aparecen débilmente en nuestro grupo de la triple terapia, que representaría un DRA de tipo pre-renal. Además, hemos identificado tres proteínas que se encuentran en la orina de los animales con este daño. Su identificación en otros grupos del modelo les resta valor como potenciales marcadores para determinar el daño pre-renal por sí mismas de forma temprana, pero sí tienen utilidad en el diagnóstico diferencial de este síndrome renal junto con la evaluación de otros parámetros. Como muestra la tabla 23, la unión de esta información a los valores de la creatinina y de la urea en plasma puede diferenciar claramente los tres escenarios propuestos, discernir los grupos de daño renal de aquellos que no lo presentan y dentro de la presencia del daño renal, clasificar el tipo de daño renal presente.

Figura no publicada por proceso de patente

Tabla 23. Resumen de las diferencias encontradas para discernir el tipo de DRA según los resultados obtenidos en nuestro modelo experimental animal.

No obstante, la causa de la presencia de estas proteínas en la orina de ciertos grupos experimentales abre nuevos interrogantes a la investigación. La mayoría de los marcadores relacionados con el DRA de tipo renal se encuentran en la orina como consecuencia del daño producido en las estructuras renales, desencadenante primario del desarrollo de la patología. En el caso de un DRA de tipo pre-renal, la hipoperfusión sostenida que provoca la aparición del daño es provocada por la alteración de los sistemas de regulación de la homeostasis sistémica y renal. Esto sugiere que las proteínas que aparecen en la orina de los animales con un DRA de tipo pre-renal reflejen la desregulación de dichos mecanismos. De ser así, esto podría explicar la presencia de estos marcadores en la orina de animales que no presentan un DRA de tipo pre-renal, pero que si tienen los mecanismos de regulación alterados, como podría ser el caso del grupo de ibuprofeno o el de la doble terapia I+T. Sin embargo, nuevos estudios deben ser realizados para poder comprender el significado fisiológico o fisiopatológico de estas proteínas en la orina de nuestros animales.

Además, hay que destacar que las tres proteínas identificadas en el modelo trabajan en el organismo como antioxidantes con el fin de paliar los efectos negativos de las especies reactivas de oxígeno producidas por el estrés oxidativo. La posible hipoxia provocada en las células renales por el estado de hipoperfusión puede desencadenar todo este proceso.

8. ESTUDIO DE LA HUELLA PEPTÍDICA URINARIA EN PACIENTES PROCEDENTES DEL SERVICIO DE NEFROLOGÍA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE SALAMANCA

El estudio de los biomarcadores relacionados con el DRA de tipo renal junto con la identificación de nuevas proteínas probablemente relacionadas con el DRA de tipo pre-renal nos ha permitido esquematizar una huella proteica capaz de diferenciar el DRA de tipo pre-renal del renal o intrínseco en las ratas de laboratorio. La siguiente tabla resume esa huella proteica delineada para cada tipo de DRA según un código de colores.

Figura no publicada por proceso de patente

Figura 66. Huella peptídica obtenida en el modelo experimental animal de DRA de tipo pre-renal que diferencia este daño del DRA intrínseco. Se resumen los resultados obtenidos en el análisis de los biomarcadores urinarios relacionados con el DRA y aquellas proteínas identificadas en nuestro modelo experimental animal. Los datos de cada proteína, expresados en porcentaje respecto al control positivo, se representan mediante un código de colores. El valor 0 se marca de color blanco y el valor 100 se marca de color negro. El resto de porcentajes comprendidos entre estos valores se etiquetan en diferentes colores grises.

El diagnóstico diferencial del DRA es un punto de inflexión en el área clínica que determina en cada caso individual el tratamiento del síndrome renal, el manejo y seguimiento del paciente, el pronóstico de la enfermedad, y muy probablemente su morbimortalidad en el corto, medio y largo plazo. Existen diversos parámetros utilizados actualmente para distinguir el tipo de DRA, como la osmolalidad urinaria, la concentración de Na⁺ urinaria o el EFNa. Aunque parece que estas variables son capaces de determinar el diagnóstico en numerosos casos, existen muchas excepciones que restan valor a su poder en el diagnóstico diferencial. Además, ciertos fármacos como los diuréticos pueden alterar estos parámetros con independencia de un daño renal. En otras ocasiones, estas variables se encuentran

normalizadas mientras que los marcadores de daño tisular resultan positivos (Okusa y cols., 2013).

Con estos antecedentes quisimos evaluar el poder de la huella proteica propuesta en el diagnóstico diferencial del DRA en el área clínica. Para ello, utilizamos 26 muestras de orina de pacientes procedentes del Servicio de Nefrología del Hospital Universitario de Salamanca. El hospital nos proporcionó los datos de su función renal y el diagnóstico a la llegada de cada paciente al centro. Se estudiaron 12 de los 16 biomarcadores urinarios evaluados en el modelo experimental animal para delinear un perfil proteico en cada caso individual.

8.1. Caracterización de la función renal de cada paciente

Todos los pacientes incluidos en este estudio piloto fueron derivados al Servicio de Nefrología ya que presentaban un DRA. La siguiente tabla muestra las características principales de los pacientes, así como el diagnóstico a su llegada al Servicio. La mayoría de los pacientes son personas de edad avanzada, con comorbilidades asociadas tales como dislipemia, hipertensión, diabetes, enfermedades cardiovasculares o insuficiencia renal aguda previa. En muchos casos estos individuos están siendo tratados con uno, dos o tres de los fármacos motivo de nuestro estudio: AINEs, inhibidores de la angiotensina II y diuréticos. Como podemos observar en la tabla XX, la mayoría de los diagnósticos determinados por el Servicio de Nefrología son “DRA pre-renal”.

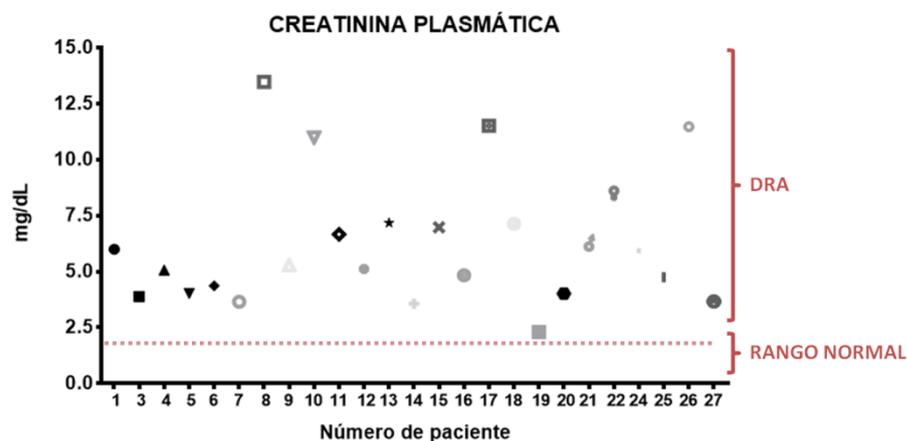
Nº paciente	Sexo	Edad	Diagnóstico DRA	Crp	Na ⁺ orina (mmol/L)	EFNa (%)	Osmolalidad urinaria (mOsm/Kg)	Cru/Crp	Uu/Upl
1	Mujer	75	Pre-renal	5,99	21	1,2	252	12,7	3,0
3	Mujer	53	NTA	3,88	46	1,71	339	19,3	7,3
4	Mujer	72	Pre-renal	5,07	50	1,75	366	21,3	2,9
5	Mujer	76	Pre-renal	4,02	48	-	276	11,2	5,5
6	Hombre	72	Pre-renal	4,36	15	0,41	-	30,0	6,7
7	Mujer	75	Pre-renal	3,65	48	0,66	428	56,7	6,3
8	Hombre	68	Pre-renal	13,46	68	-	343	9,1	2,3
9	Mujer	86	Pre-renal	5,28	15	-	309	31,4	-
10	Hombre	78	Pre-renal	10,99	20	0,52	258	46,3	-
11	Hombre	84	Pre-renal	6,66	61	-	-	16,4	-
12	Hombre	78	Renal	5,11	115	14,24	-	5,7	3,5
13	Mujer	83	Pre-renal	7,17	25	0,48	368	38,6	4,5
14	Hombre	87	Pre-renal	3,56	54	1,28	-	30,9	8,5
15	Mujer	53	Pre-renal	6,97	20	-	406	44,9	-
16	Mujer	87	Pre-renal	4,83	75	4,11	230	13,0	4,1
17	Mujer	87	Renal/pre-renal	11,51	61	-	441	-	2,6
18	Mujer	82	Pre-renal	7,13	63	3,5	360	10,9	2,5
19	Hombre	27	Pre-renal	2,3	47	0,78	356	42,6	16,1
20	Mujer	68	Pre-renal	4,01	29	-	330	19,7	5,7
21	Hombre	83	Pre-renal	6,27	57	-	-	11,0	4,6
22	Mujer	41	Renal	8,45	93	-	327	6,4	4,5
24	Hombre	41	Renal/pre-renal	6,04	23	0,54	-	30,8	-
25	Hombre	64	Pre-renal	4,74	17	0,97	432	13,3	8,3
26	Hombre	67	Pre-renal	11,47	92	13,9	388	4,8	2,8
27	Mujer	83	Pre-renal	3,66	22	0,56	357	29,2	1,8

Tabla 24. Principales características de los pacientes incluidos en el estudio, diagnóstico principal establecido por el Servicio de Nefrología y principales parámetros utilizados para diferenciar el DRA. Crpl: creatinina plasmática; EFNa: excreción fraccional de Na⁺; Cru: creatinina urinaria; Uu: urea urinaria; Upl: urea plasmática.

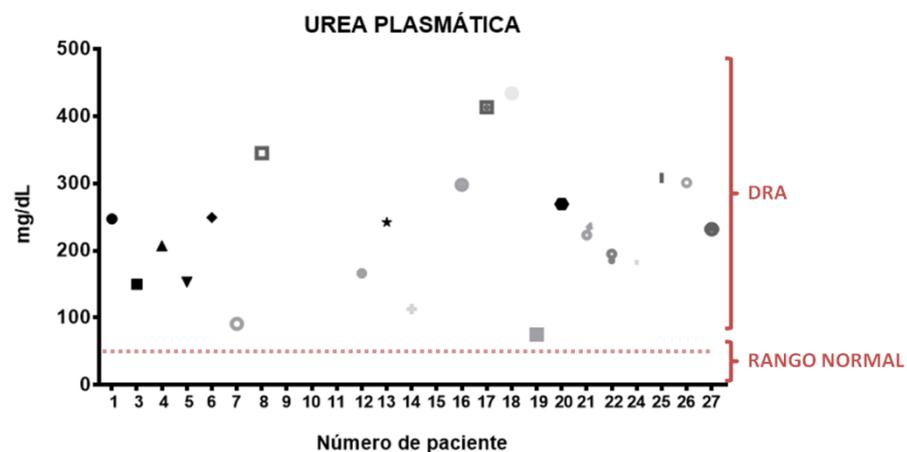
En la Introducción de este trabajo se explicaron los parámetros teóricos establecidos para diferenciar en clínica un DRA pre-renal del DRA intrínseco. La EFNa inferior al 1 %, la concentración de Na⁺ en la orina por debajo de 20 mEq/L, la osmolalidad urinaria superior a 200 mmOsm/kg son valores utilizados para diferenciar el DRA de tipo pre-renal, así como el índice Cru/Crp>200 o Uu/Up>10. Como se puede apreciar, el diagnóstico establecido para cada uno de los pacientes no se basa en estos parámetros teóricos, lo que indica que no son unas variables utilizadas en la práctica clínica y no se consideran fiables para asegurar el diagnóstico exacto por parte del equipo médico.

Todos los pacientes llegan al Servicio de Nefrología con un claro DRA, caracterizado por una concentración elevada de creatinina y urea plasmática debido a una TFG estimada muy reducida. La figura 67 representa el estado de estos parámetros en cada uno de los pacientes a su llegada al hospital, antes de que sufran ninguna intervención ni tratamiento para el síndrome en estudio. La creatinina plasmática varía enormemente de unos individuos a otros, ya que se encuentran valores patológicos de creatinina en plasma que abarcan un amplio rango, desde 2 hasta 13 mg/dL. La urea plasmática se encuentra alrededor de 200-300 mg/dL en todos ellos salvo excepciones, mientras que la TFG estimada no supera los 20 mL/min en la mayoría de los casos.

A)



B)



C)

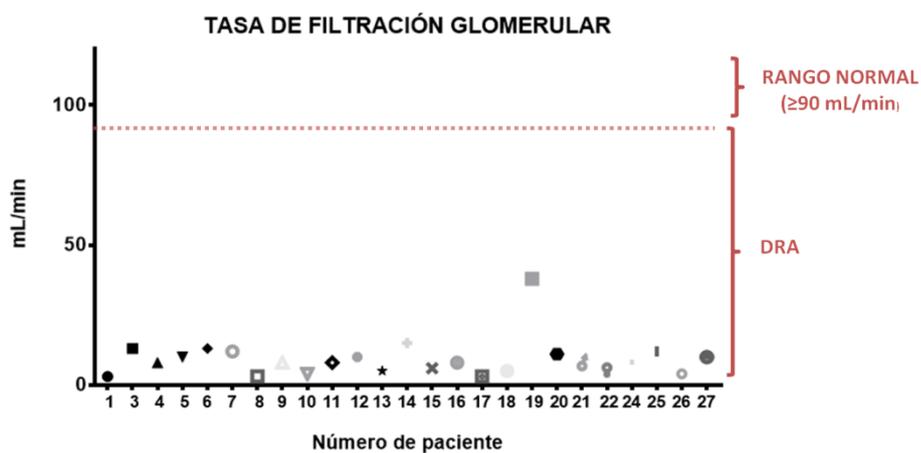


Figura 67. Caracterización de la función renal alterada de los pacientes procedentes del Servicio de Nefrología del Hospital Universitario de Salamanca. Se representa el análisis de la creatinina plasmática (A), la urea plasmática (B) y la estimación de la TFG (C). Los pacientes presentan un claro DRA caracterizado por una Crp y una Urp elevadas así como una TFG gravemente disminuida.

8.2. Estudio del patrón de aparición de los biomarcadores urinarios asociados al DRA

Se analizaron 8 de los potenciales biomarcadores urinarios relacionados con el DRA intrínseco en la orina de los pacientes a su llegada al centro de estudio. La figura 68 presenta los resultados obtenidos en el análisis de los mismos de forma individual. En el caso de las proteínas biomarcador 1, biomarcador 2, biomarcador 3, biomarcador 4, biomarcador 5, biomarcador 6 y biomarcador 7 los datos se presentan en porcentaje respecto a la presencia de cada proteína en un control positivo humano de DRA. En el caso del estudio del biomarcador 8, los resultados presentan la concentración en u.a/L presente en la orina de cada individuo analizado.

La presencia o ausencia de los marcadores en cada individuo es variable, ya que no se distingue un patrón similar en todos ellos. Estos resultados sugieren que los marcadores podrían indicar el estado estructural y fisiopatológico del riñón de cada individuo, información muy útil y valiosa en su conjunto. Éstos podrían delinear diferentes grados dentro de un mismo tipo de DRA, lo que añadiría información acerca de las áreas o de las estructuras más afectadas. En este contexto, numerosos estudios tratan de correlacionar cada uno de estos biomarcadores urinarios con una etiología del daño renal. Conocer la causa que provoca el daño renal en cada una de sus partes facilitaría su terapia y su pronóstico. Sin embargo, el estudio de la etiología del DRA de tipo renal se escapa de los límites de este trabajo de Investigación.

Figura no publicada por proceso de patente

Figura 68. Cuantificación de la presencia de los diferentes marcadores urinarios relacionados con el DRA en las orinas de 25 pacientes procedentes del Servicio de Nefrología del HUSA. Los resultados obtenidos para el biomarcador 1, biomarcador 2, biomarcador 3, biomarcador 4, biomarcador 5, biomarcador 6 y biomarcador 8 se obtuvieron mediante la técnica del Western blot. La gráfica presenta el % de proteína presente en la orina de cada uno de los pacientes respecto a un control positivo de DRA. El biomarcador 9 se evaluó mediante una técnica colorimétrica y los resultados se presentan concentración del biomarcador 9 en la orina de cada individuo (u.a/L).

8.3. Estudio de los biomarcadores urinarios identificados en el modelo experimental animal Triple whammy

Se analizó la presencia de las proteínas identificadas y validadas en el modelo animal de DRA de tipo pre-renal. La figura 69 muestra la cuantificación de la presencia de cada una de ellas en la orina de los pacientes incluidos en este estudio. Los datos presentan el porcentaje de cada proteína respecto al valor obtenido para la misma proteína en un control positivo de DRA. En su conjunto, los valores obtenidos muestran, como en el caso anterior, una gran variabilidad entre individuos, lo que no nos permite evaluar un único perfil proteico que pueda diferenciar el DRA pre-renal, sino un perfil individual, que podría determinar el estado fisiopatológico del organismo.

Figura no publicada por proceso de patente

Figura 69. Cuantificación de los resultados obtenidos al analizar la presencia de las proteínas identificadas en la orina del modelo experimental animal puesto a punto en este trabajo de investigación. Las gráficas representan el % del biomarcador 13, biomarcador 14 y biomarcador 15 en la orina de cada paciente respecto a un control positivo de DRA.

8.4. Huella proteica de los pacientes con un DRA

Se ha representado un resumen de la presencia de cada proteína en la orina de cada paciente con el fin de delinear una huella proteica individual. Los datos de cada proteína, expresados en porcentaje respecto al control positivo, se representan mediante un código de colores. El valor 0 se marca de color blanco y el valor 100 se marca de color negro. El resto de porcentajes comprendidos entre estos valores se etiquetan en diferentes colores grises.

Figura no publicada por proceso de patente

Figura 70. Resumen de la huella peptídica obtenida tras el análisis de 12 potenciales marcadores DRA en la orina de pacientes con DRA procedentes del Servicio de Nefrología del HUSA.

Los resultados obtenidos muestran una amplia variabilidad en la presencia de las proteínas analizadas, sin seguir un patrón completamente similar al obtenido para el DRA de tipo renal o pre-renal en los modelos animales. Por ejemplo, los pacientes 1, 11 o 12 presentan un alto porcentaje de varias de las proteínas analizadas, de forma que su huella proteica se aproxima a los tonos oscuros y negros, lo que nos podría indicar un diagnóstico cercano al DRA de tipo renal, en el que existen alteraciones de las estructuras renales. Los pacientes 3,4 o 21 presentan una ausencia total o presencia débil de las proteínas relacionadas con el DRA de tipo renal y son positivas para algunas de las proteínas relacionadas con el DRA de tipo pre-renal, lo que nos podría indicar un diagnóstico más cercano al DRA de tipo pre-renal causado por alteraciones hemodinámicas. Entre ambos límites, podemos situar los resultados obtenidos en el resto de pacientes, que presentan porcentajes variables de las proteínas analizadas, lo que sugiere que su diagnóstico es una fase intermedia entre ambos tipos de daño. Los límites establecidos en el diagnóstico diferencial del DRA son, en muchos casos, difíciles de establecer, ya que como podemos observar en los resultados, los casos clínicos no son modelos absolutos de daño. Los pacientes presentan comorbilidades asociadas, exposición a fármacos y toxinas, estados de deshidratación, etc, que provocan, en muchos casos, que la aparición del síndrome sea multifactorial. Estos factores pueden provocar un daño en las estructuras del riñón y alteraciones en su función en mayor o menor medida, que en su conjunto y dependiendo de los factores que converjan en un mismo individuo al mismo tiempo, darán lugar a un tipo de DRA u otro. Sin embargo, la clasificación de DRA debería ampliar sus límites o eliminarlos, con el fin de comprender que en la práctica clínica, entre un DRA de tipo renal teórico y un pre-renal teórico existe un amplio rango de subclasificaciones o estados fisiopatológicos de dicho síndrome. Nuestros resultados sugieren que en la mayoría de los casos en la práctica clínica el diagnóstico establecido para el DRA es erróneo, lo que puede conllevar a un tratamiento equivocado o incompleto. El DRA de tipo pre-renal es el DRA más común ya que alcanza el 60 % de todos los casos. En el área clínica, este tipo de DRA producido por una alteración hemodinámica se solventa con sueroterapia, con el fin de establecer la volemia y restaurar el FSR. Una vez que los valores de la creatinina y de la urea plasmática se restablecen, el evento se considera cerrado y el síndrome renal recuperado. El problema que se plantea es, que en muchas ocasiones, el DRA no es estricta y únicamente pre-renal, ya que otros factores pueden haber estado involucrados en el desarrollo de la enfermedad. Si

estos factores han producido un daño parcial en las estructuras renales, el daño puede pasar desapercibido en el riñón como un DRA subclínico y dar lugar a problemas posteriores. Los biomarcadores analizados podrían ser la clave para conocer el estado global del riñón tanto en su estructura, como en su fisiología y crear un abanico de posibilidades en las que el componente renal y el componente pre-renal se complementen y no se excluyan. En este punto, el desafío se encuentra en evaluar cada uno de esos estados fisiopatológicos y estudiar la etiología de la presencia de cada uno de los biomarcadores hoy conocidos, y de los que se continúen identificando.

En su conjunto, los resultados analizados en este bloque nos permiten alcanzar las siguientes conclusiones parciales:

- No se identificaron marcadores de riesgo de desarrollar un DRA en este modelo animal *Triple Whammy*. Sin embargo, las proteínas biomarcador 13, biomarcador 14 y biomarcador 15 aparecen en la orina de los animales tratados con el antiinflamatorio desde el comienzo del tratamiento hasta el día 6. Se necesitan estudios posteriores para determinar la causa de esta presencia y su posible relación con las alteraciones producidas por el fármaco.
- La información aportada por estas proteínas, unida a la evaluada anteriormente, nos ha permitido delinear una huella proteica capaz de diferenciar el DRA pre-renal del renal y de los individuos sanos.
- La aplicación de esta huella proteica en el análisis del diagnóstico de pacientes con un DRA sugiere que los parámetros utilizados en clínica para realizar el diagnóstico de este síndrome son insuficientes.

9. DISCUSIÓN GENERAL

La reproducción de un DRA de tipo pre-renal producido en un modelo experimental de rata tras la administración de tres fármacos que interfieren con los mecanismos de regulación de la homeostasis sistémica y renal nos ha permitido investigar las alteraciones producidas por cada uno de los fármacos y los mecanismos fisiopatológicos que desembocan en un DRA tras la administración conjunta de la triple terapia. Además, se ha identificado un patrón de biomarcadores urinarios en cada grupo experimental que puede reflejar el estado fisiológico o fisiopatológico de cada uno de ellos. A continuación, se resume el estado fisiológico en cada grupo experimental así como los biomarcadores que pudieran identificar dicho estatus.

9.1. Terapias individuales: AINEs, inhibidores de Ang II o diuréticos en monoterapia

La administración individual de ninguno de estos fármacos produce alteraciones capaces de disminuir la TFG. Los diuréticos producen una disminución de la volemia que activa los mecanismos de regulación de la PA para mantenerla. Por su parte, los inhibidores de la COX y de la angiotensina II producen un bloqueo de los mecanismos de regulación en los que estas moléculas se encuentran involucrados. Nuestros resultados demuestran que los animales tratados con estos fármacos de manera individual mantienen una correcta función renal, sin alteraciones observadas mediante los parámetros analizados. Estos resultados sugieren que los mecanismos de regulación inhibidos por estos fármacos no son necesarios para mantener la filtración glomerular en los individuos sanos en los que no haya alteraciones hemodinámicas. A continuación se representa un resumen de las principales vías hemodinámicas alteradas por estos tratamientos y los puntos claves afectados por su acción individual.

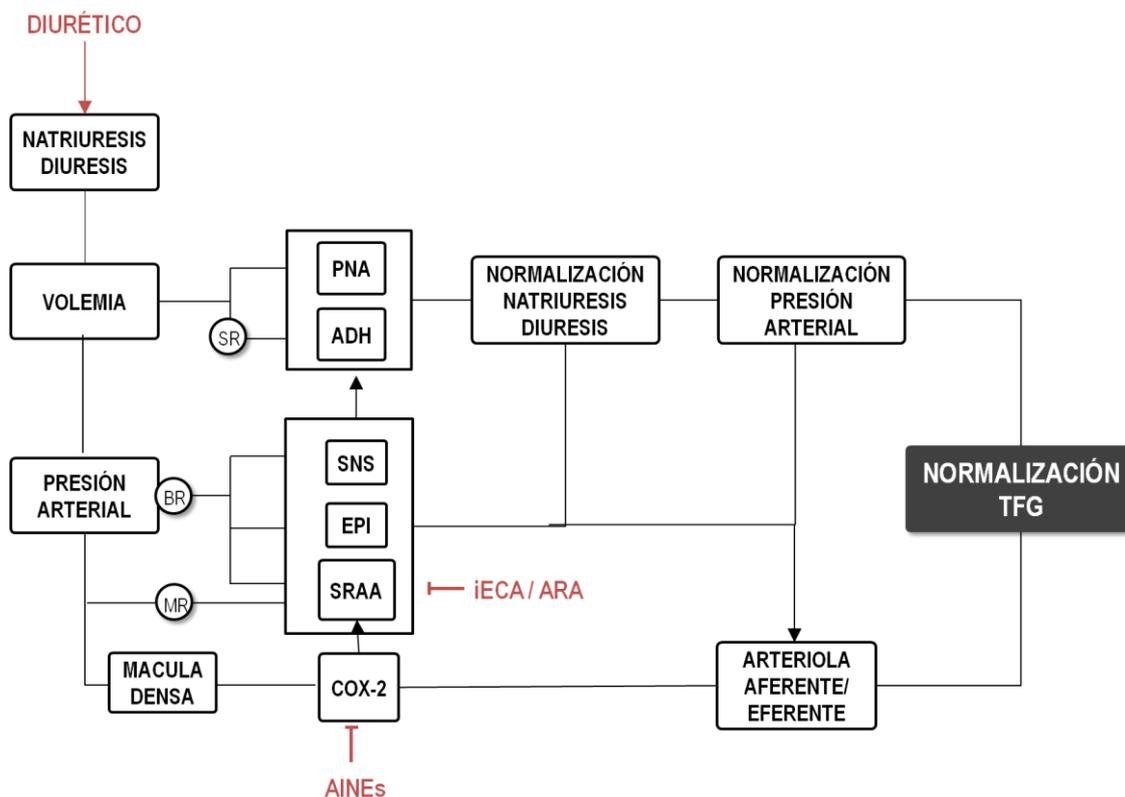


Figura 71. Resumen de las principales vías alteradas por los fármacos administrados y los puntos clave donde producen su acción. ADH: hormona antidiurética; PNA: péptido natriurético atrial; BR: barorreceptores; COX: ciclooxigenasa; EPI: epinefrina; MR: mecanorreceptores; SRAA: sistema renina-angiotensina-aldosterona; SNS: sistema nervioso simpático; SR: receptores *stretch*.

En el estudio de los biomarcadores urinarios analizados, se detectaron tres proteínas en la orina del grupo ibuprofeno: biomarcador 13, biomarcador 14 y biomarcador 15, identificadas también en aquellos grupos de terapia doble con una posible alteración renal y en el grupo de la triple terapia, claro control positivo de un DRA de tipo pre-renal. En este contexto, la hipótesis que se plantea es que dichos marcadores aparezcan en la orina como el resultado de las alteraciones producidas en la hemodinámica renal por la inhibición de la enzima COX. En el apartado 1.5.2 de la Introducción se ha explicado la importancia de las enzimas COX-1 y COX-2 en la homeostasis renal, entre las que podemos destacar el control de la TFG y del FSR ante diferentes alteraciones. Estudios de perfusión realizados en riñones *in vitro* con una PPR normal demuestran que el flujo renal es similar en riñones pre-tratados con ibuprofeno que en los del grupo control. Sin embargo, el ibuprofeno potencia la vasoconstricción mediada por la angiotensina II (Tang y cols., 2000), resultados que indican claramente la importancia de las PGs como vasodilatadores en situaciones en

las que el SRAA se encuentra activo. Tras el análisis de nuestros resultados, se plantea la posibilidad de que la síntesis de ciertas proteínas, tales como el biomarcador 13, 14 o 15, se estimule tras la inhibición parcial de los mecanismos de regulación renal en los que estas moléculas se encuentran involucradas. De ser así, estos marcadores renales solamente indicarían el estado fisiológico del individuo en un momento específico, lo que permitiría poder actuar de forma preventiva en el área clínica. En este punto, el desafío es, por un lado, poder correlacionar estos marcadores fisiológicos con tales alteraciones de las vías regulatorias antes mencionadas, y por otro lado, verificar que la utilidad de estos marcadores se amplía más allá de la administración farmacológica de inhibidores de la COX. De ser así, estas proteínas podrían ser consideradas como biomarcadores fisiológicos, concepto propuesto por el Grupo de Iniciativa para la Calidad de la Diálisis Aguda (ADQUI de inglés *Acute Dialysis Quality Initiative*) en 2013. Okusa y cols., (Okusa y cols., 2013) presentan el concepto de biomarcador fisiológico como aquella variable que refleja los cambios fisiológicos que ocurren en las etapas previas a que se produzca la enfermedad renal. En el caso de nuestra investigación, una de las fases previas al establecimiento del DRA pre-renal podría ser la alteración de los mecanismos de regulación de la hemodinámica renal, que podría detectarse por la aparición de estas proteínas en la orina.

Desde el punto de vista práctico, estos marcadores fisiológicos podrían aplicarse, por ejemplo, para el seguimiento y monitorización de las alteraciones hemodinámicas producidas por los tratamientos antiinflamatorios prolongados de enfermedades crónicas, como las artritis y artrosis, y la monitorización del riesgo de daño renal. No obstante, estas conclusiones son meramente teóricas y numerosos estudios deben continuar esta línea de investigación con el fin de descubrir la causa y el mecanismo de la presencia de estas proteínas en la orina como consecuencia del tratamiento con el antiinflamatorio.

9.2. Terapias dobles: mecanismos de regulación al límite

Las terapias dobles reflejan el límite de los mecanismos de regulación de la hemodinámica sistémica y renal, desafiados por el diurético en la triple terapia. A continuación, se propone un esquema de las principales vías fisiológicas involucradas y la repercusión de su alteración o bloqueo en la función renal, según los resultados obtenidos.

9.2.1. AINE+inhibidor de la angiotensina II (ibuprofeno+trandolapril)

En este grupo los mecanismos de regulación de la PA y de la autorregulación renal están inhibidos, estado que provoca ciertas alteraciones en la homeostasis sistémica y renal que no desembocan en un DRA, según establecen las definiciones internacionales vigentes en la actualidad. El siguiente esquema fisiológico (figura 72) resume el estado hemodinámico de este grupo y su repercusión en la función renal.

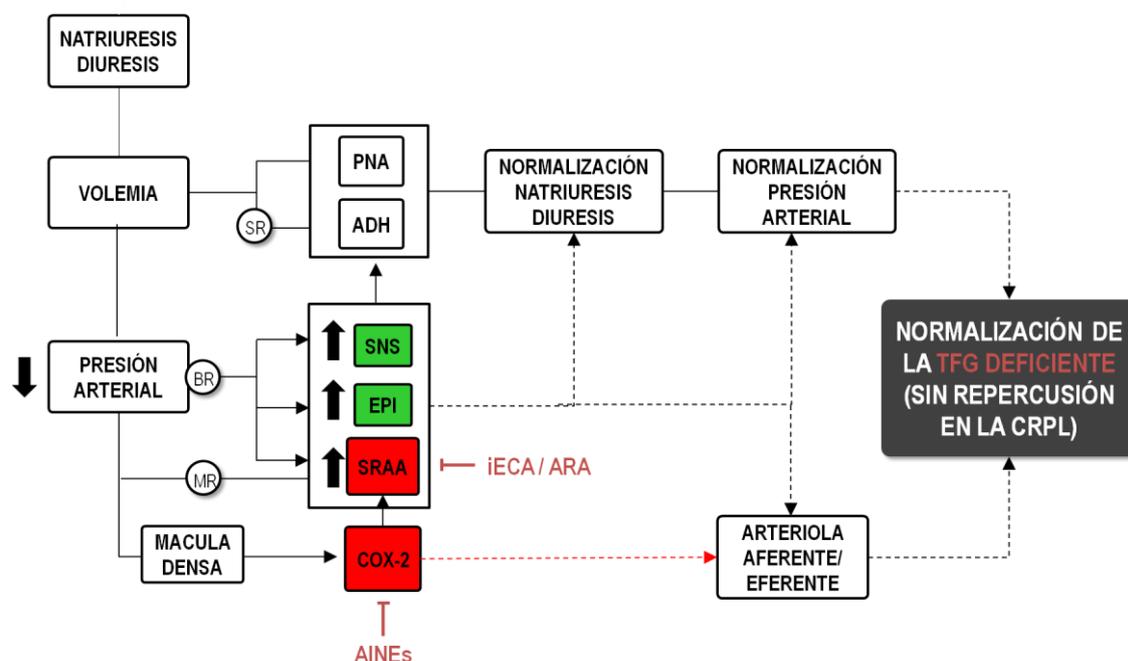


Figura 72. Esquema representativo del estado fisiológico de los animales tratados con ibuprofeno y trandolapril de forma combinada durante 10 días. Las cajas rojas representan los mecanismos bloqueados, las cajas verdes los mecanismos activados y el grosor de las flechas indica el grado de activación de la vía marcada: alta activación (flecha gruesa); media activación (grosor medio), débil activación (flecha fina), sin activación (líneas punteadas). ADH: hormona antidiurética; PNA: péptido natriurético atrial; BR: baroreceptores; COX: ciclooxigenasa; EPI: epinefrina; MR: mecanoreceptores; SRAA: sistema renina-angiotensina-aldosterona; SNS: sistema nervioso simpático; SR: receptores stretch; Crpl: creatinina plasmática.

La PA de los animales tratados con ambos fármacos sufre una pequeña disminución de aproximadamente 10 mmHg. Esto implicaría que ambas moléculas se encuentran involucradas en el mantenimiento de la PA en un individuo sano sin alteraciones, pero no tienen un papel fundamental ya que la PA no desciende gravemente tras su inhibición. Sin embargo, ante la bajada de PA se activan los mecanismos de regulación, en los que el SRAA es el gran protagonista, observado en el análisis de expresión de renina y de su actividad. Debido a la inhibición de la

angiotensina II, molécula fundamental del sistema, no se puede restablecer la PA hasta los niveles basales, por lo que la PA débilmente disminuida se mantiene hasta el fin de tratamiento. Por otra parte, esa disminución de la PA produciría una pequeña activación de la autorregulación renal con el fin de mantener el FSR y la TFG sin cambios. Sin embargo, los resultados obtenidos demuestran una bajada de ambos parámetros, lo que sugiere una pérdida de la autorregulación renal, de forma que la pequeña disminución de la PA se convierte en una bajada de la TFG y del FSR, debido a la falta o reducción de algunos mecanismos compensatorios. La TFG disminuye un 40 %, por lo que no da lugar a un aumento de la creatinina en plasma. Estos resultados sugieren la existencia de un DRA de tipo subclínico, no detectado por las variables hoy estandarizadas para detectar el DRA. Este planteamiento cuestiona que estos fármacos no alteren la función renal en individuos normales, sin alteraciones en la perfusión renal, como se afirmaba hasta ahora (Sturrock y Struthers, 1993)

Por otra parte, el estudio de los biomarcadores urinarios denota la presencia de las proteínas anteriormente descritas en el grupo de ibuprofeno, por lo que se refuerza la hipótesis de que puedan reflejar el estado bloqueado de las vías hemodinámicas mediadas por la COX-2.

9.2.2. AINE+diurético (ibuprofeno+furosemida)

La administración del diurético produce una reducción de volumen que da lugar a una disminución de la PA, por lo que se activan los mecanismos necesarios para restablecer dicha variable. Nuestros resultados demuestran que la administración conjunta de estos fármacos no produce una caída de la PA, ya que el SRAA se encuentra activo. Otros estudios verifican este mantenimiento de la PA sin variaciones tras la administración de ambos fármacos (Passmore y cols., 1990; Wilson y cols., 1993; Birk y cols., 2000). Tanto la expresión de la renina como la ARP aumenta respecto al control en nuestro estudio, posiblemente dependiente de la COX-2 que también aumenta respecto al control. Como ya se ha comentado en la Introducción diversos estudios indican que la liberación de la renina tras la administración de la furosemida es parcialmente dependiente de la COX-2 (Kammerl y cols., 2001; Matzdorf y cols., 2007; Stritchtenoth y cols., 2005; Steinhäuslin y cols., 1993; Turull y cols., 2001; Passmore y cols., 1990). Al no existir una variación de la PA, los mecanismos de regulación renal no serían necesarios para mantener la TFG y el FSR. Sin embargo, este grupo presenta una disminución de la TFG del 50 % y del

FSR, datos que sugieren una cierta alteración en la autorregulación renal debido a la inhibición de las PGs. La angiotensina II sintetizada de forma sistémica para mantener la PA promueve la síntesis de las PGs para equilibrar la vasoconstricción en la arteriola aferente (Cheng y cols., 1999; Harris y cols., 2004) El exceso de vasoconstricción no contrarrestada debido a la inhibición de las PGs podría ser responsable de la bajada de la TFG y del FSR, lo que sitúa al riñón en un estado de DRA subclínico, en el que la bajada de la TFG no repercute en un aumento de la Crpl. Este efecto en la TFG ya fue observado en otros estudios (Turull y cols., 2001), aunque como en nuestro caso, no se detectaron cambios en los niveles de la Crp respecto al control o a los tratamientos por separado (Kose y cols., 2010).

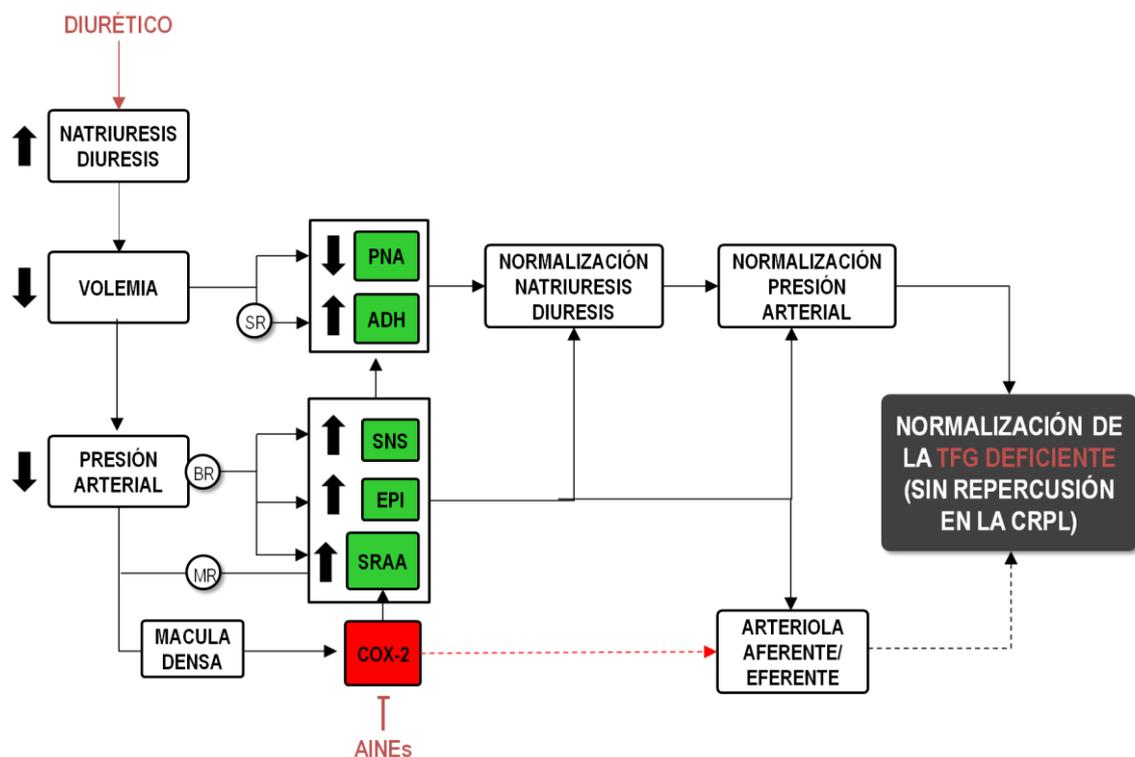


Figura 73. Resumen de las vías fisiológicas activadas y alteradas tras la administración de un diurético y un AINE de forma conjunta. Las cajas rojas representan los mecanismos bloqueados, las cajas verdes los mecanismos activados y el grosor de las flechas indica el grado de activación de la vía marcada: alta activación (flecha gruesa); media activación (grosor medio), débil activación (flecha fina), sin activación (líneas punteadas). ADH: hormona antidiurética; PNA: peptido natriurético atrial; BR: barorreceptores; COX: ciclooxigenasa; EPI: epinefrina; MR: mecanorreceptores; SRAA: sistema renina-angiotensina-aldosterona; SNS: sistema nervioso simpático; SR: receptores stretch; Crpl: creatinina plasmática.

Sin embargo, los resultados obtenidos en el estudio de biomarcadores urinarios abre nuevos interrogantes. Los biomarcadores 13, 14 y 15 aparecen de forma

intermitente según los estudios de excreción urinaria y de composición relativa de la orina. Estos resultados restan fuerza a la hipótesis establecida de que estas proteínas marquen las alteraciones producidas por la inhibición de los mecanismos de autorregulación renal por parte de la COX-2. Futuros estudios son necesarios para determinar la etiología de estas proteínas en la orina ya que esta información nos podría hacer comprender por qué estas moléculas aparecen en determinados grupos de estudio y en otros no. Quizás estas proteínas marquen el estado de las vías fisiológicas en un momento específico o también es posible que la acción del diurético altere su excreción. Este trabajo deja abiertos nuevos interrogantes que necesitan ser estudiados y aclarados, con el fin de sumar información que pueda ser de gran ayuda en el diagnóstico precoz y preventivo de esta enfermedad, incluso cuando la misma no se ha establecido en el riñón, pero los primeros signos de alerta pudieran ser detectados.

9.2.3. Diurético+inhibidor de la angiotensina II (furosemida+trandolapril)

El escenario cambia completamente cuando el diurético se combina con un inhibidor de la angiotensina II. La furosemida activa los mecanismos de regulación de la volemia y de la PA, pero la inhibición de la angiotensina II hace que dichos mecanismos no sean eficientes para mantener este parámetro sin variaciones. De acuerdo a los resultados obtenidos, la PA de los animales de este grupo disminuye hasta 90 mmHg, una hipotensión también detectada en otros estudios tras la administración de ambas familias de fármacos (Lane y cols., 1998; Sechi y cols., 1990; Esnault y cols., 2008; Good y cols., 1994). En los riñones, esta bajada de PA activará los mecanismos de la autorregulación con el fin de mantener la TFG. Nuestros animales presentan una TFG sin alteraciones, lo que denota que los sistemas de autorregulación renal pueden trabajar perfectamente. Los altos niveles de expresión de renina detectados en los riñones y en la ARP sugieren una clara activación del SRAA tras la administración de estos fármacos, datos apoyados por otros estudios de investigación que han obtenido resultados similares (Castrop y cols., 2003). Esta activación del SRAA parece ser dependiente en mayor o menor medida de la enzima COX-2, ya que su expresión se incrementa enormemente a lo largo de toda la corteza renal. En la arteriola aferente, las PGs sintetizadas en la macula densa gracias a la RTG y la contracción miogénica atenuada provocan un efecto vasodilatador. Sin embargo, en la arteriola eferente la angiotensina II parece ser el factor más importante en el control de la resistencia vascular (Ito y Abe,

1997). El mantenimiento de la TFG sugiere que en estas condiciones, este parámetro se mantiene gracias al efecto vasodilatador de las PGs y al efecto miogénico, mientras que la falta de contracción en la arteriola eferente por parte de la angiotensina II tiene débiles repercusiones en la TFG. Sin embargo, el FSR detectado en este grupo de estudio aparece disminuido respecto al control, lo que denota la inhibición parcial de la autorregulación renal. La inhibición de la angiotensina II provoca que las RVP no puedan tamponar los cambios en la PPR, de forma que estos dos parámetros disminuyen, lo que desemboca en una bajada del FSR. Sin embargo, estas variaciones en el FSR no se traducen en cambios en la presión intraglomerular, gracias posiblemente a la acción vasodilatadora descrita anteriormente.

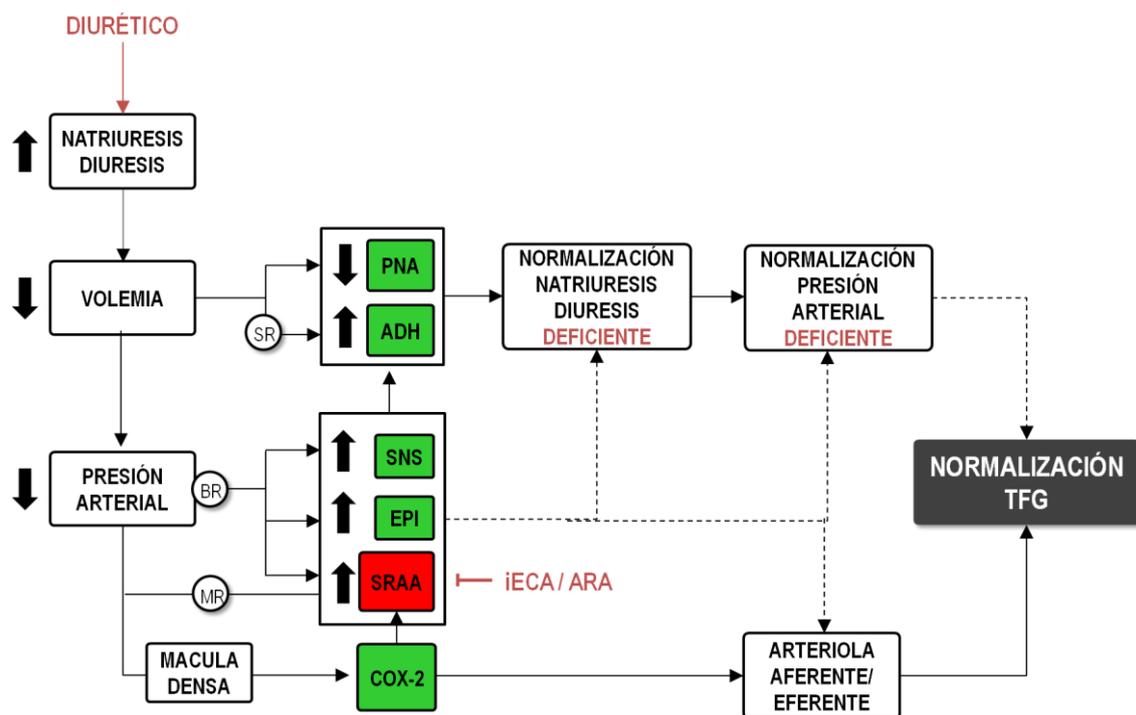


Figura 74. Principales mecanismos de regulación de la PA y de la TFG activados tras la administración de un diurético y un inhibidor de la angiotensina II. Las cajas rojas representan los mecanismos bloqueados, las cajas verdes los mecanismos activados y el grosor de las flechas indica el grado de activación de la vía marcada: alta activación (flecha gruesa); media activación (grosor medio), débil activación (flecha fina), sin activación (líneas punteadas). ADH: hormona antidiurética; PNA: péptido natriurético atrial; BR: baroreceptores; COX: ciclooxigenasa; EPI: epinefrina; MR: mecanorreceptores; SRAA: sistema renina-angiotensina-aldosterona; SNS: sistema nervioso simpático; SR: receptores stretch.

Este grupo no presenta un DRA subclínico como en el caso de las otras dos terapias dobles, ya que su TFG se mantiene intacta. Sin embargo, esta TFG es constante a costa de la autorregulación renal parcialmente activa, en la que las PGs

son fundamentales. Por tanto, su correcta función renal se encuentra al límite y cualquier estímulo que interfiera con este mecanismo responsable del mantenimiento de la TFG provocará un colapso de la función renal. En este contexto, este grupo de estudio es un claro ejemplo de un estado de riesgo de desarrollar un DRA de tipo pre-renal.

Lógicamente, el estudio de los biomarcadores refleja la ausencia tanto de los relacionados con un DRA renal, como aquellos identificados en este trabajo, resultantes del efecto del ibuprofeno.

9.3. La triple terapia, el talón de Aquiles de la hemodinámica

Tras llegar a las conclusiones anteriormente planteadas es fácil de entender que la suma de un inhibidor de las PGs al escenario propuesto por la administración conjunta de diuréticos y de inhibidores de la angiotensina II tenga repercusiones desastrosas para el organismo. Los resultados de PA sugieren que el pre-tratamiento producido con I+T provoca una pequeña disminución de la PA, lo que denota la inhibición de los mecanismos regulatorios. Sin embargo, la administración de la furosemida desafía el estado hemodinámico sistémico y renal. Su agregación a la terapia provoca la caída brusca de la PA, ya que el SRAA se encuentra inhibido. Además, la TFG cae drásticamente tras dos dosis del diurético ya que la autorregulación renal, totalmente dependiente de las PGs en momentos de inhibición de la angiotensina II, se encuentra completamente bloqueada por los antiinflamatorios. El estado de hipoperfusión renal se hace evidente tras los resultados obtenidos a día 6 de tratamiento del FSR y el flujo sanguíneo cortical. Sin embargo, los estudios de correlación realizados entre el aumento de la Crp y la disminución de la PA sugieren que la pérdida de la autorregulación se produce desde las primeras dosis de la furosemida, de forma que posteriormente tanto la PA como la TFG disminuyen bruscamente debido a la falta de todo mecanismo de regulación y al colapso hemodinámico producido. EL SRAA y la enzima COX-2 son los grandes protagonistas de este escenario, ya que su expresión se incrementa exageradamente con la triple terapia y la inhibición de sus efectores provoca un daño renal.

La ausencia de marcadores de DRA de tipo renal, junto con la presencia de nuevas proteínas identificadas en la orina de estos animales y las alteraciones producidas en todos los parámetros fisiológicos descritos puede crear una huella molecular capaz de describir este estado fisiológico y diferenciar este escenario

fisiopatológico de otros muchos, punto clave para la mejora del tratamiento terapéutico y del pronóstico posterior.

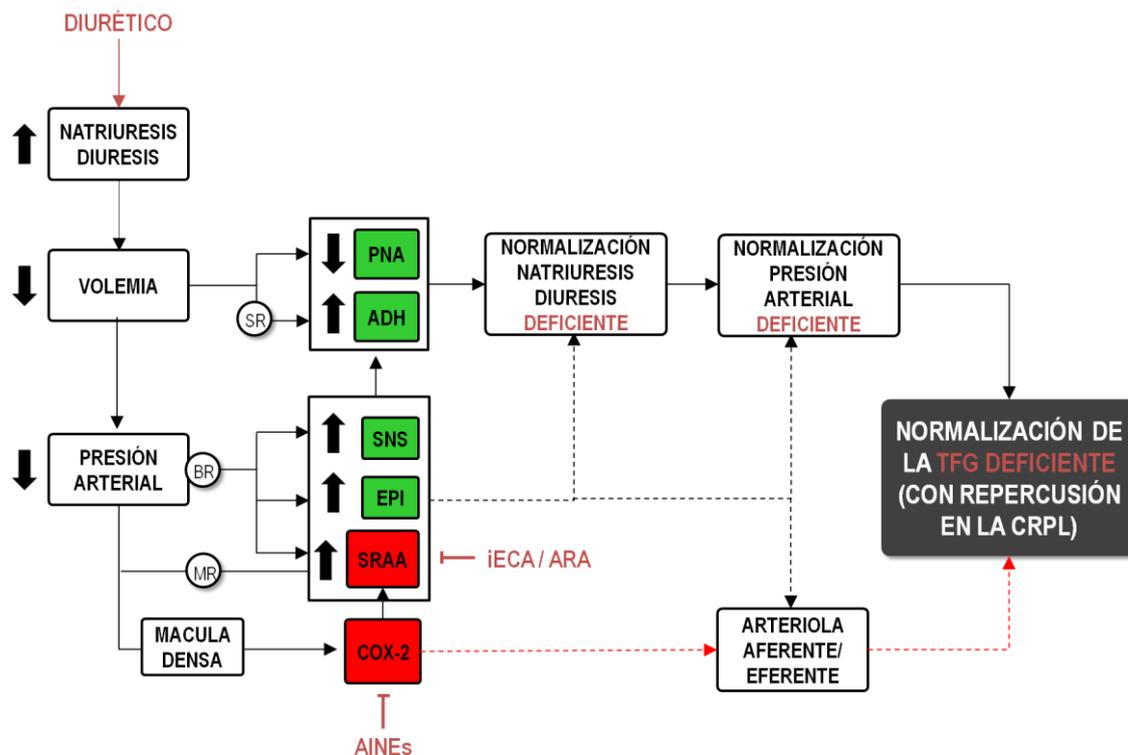


Figura 75. Resumen del estado fisiopatológico y de las principales vías involucradas en el desarrollo del modelo experimental animal "Triple Whammy". Las cajas rojas representan los mecanismos bloqueados, las cajas verdes los mecanismos activados y el grosor de las flechas indica el grado de activación de la vía marcada: alta activación (flecha gruesa); media activación (grosor medio), débil activación (flecha fina), sin activación (líneas punteadas). ADH: hormona antidiurética; PNA: péptido natriurético atrial; BR: barorreceptores; COX: ciclooxigenasa; EPI: epinefrina; MR: mecanorreceptores; SRAA: sistema renina-angiotensina-aldosterona; SNS: sistema nervioso simpático; SR: receptores stretch; Crpl: creatinina plasmática.

En este punto, el desafío clave es encontrar marcadores fisiológicos que puedan correlacionarse con los efectos biológicos concretos, como la disminución del FSR, la disminución de la autorregulación, etc, independientemente del fármaco o condición que los produzca.

10. PERSPECTIVAS

El análisis minucioso de cada grupo experimental nos ha permitido establecer un mapa fisiológico para cada uno, que pueden reflejar multitud de casos prácticos encontrados diariamente en el área clínica. Nuestros resultados han podido reforzar la idea de que un único biomarcador sea incapaz de evaluar el estado fisiológico o fisiopatológico de un individuo. Por ello, la idea final de este trabajo de investigación plantea analizar y agrupar todos los parámetros fisiológicos, moleculares y bioquímicos estudiados mediante modelos matemáticos, capaces de crear un *perfil hemodinámico* para cada grupo gracias al cual se pueda determinar el estado fisiológico del individuo y poder actuar en consecuencia, lo que prevendría la aparición de dicho síndrome y facilitaría su manejo una vez que la enfermedad se encuentre establecida en el riñón. En la actualidad, nuestro grupo de investigación ha creado una base de datos que incluye datos fisiológicos (peso, estado hídrico, función renal, PA, FSR), datos hidro-electrolíticos (sodio urinario, potasio urinario, osmolalidad urinaria, EFNa...), datos moleculares (renina, COX-2, ARP) y datos de los biomarcadores urinarios analizados de 100 ratas, con el fin de obtener un modelo matemático capaz de discernir el perfil de un nuevo individuo y localizar el grupo de riesgo o daño al que pertenece.

Por otra parte, el modelo experimental de DRA llevado a cabo en este trabajo de investigación sugiere que tres factores de riesgo o alteraciones deben converger en un mismo individuo al mismo tiempo para desarrollar este tipo de dolencia. Sin embargo, este modelo de DRA podría recrear solamente una de las muchas posibilidades que se pueden encontrar en la clínica. De acuerdo con nuestra hipótesis, el DRA de tipo pre-renal se desarrollaría en cualquier situación de hipoperfusión en la que los mecanismos de regulación de la PA y de la autorregulación renal no trabajasen correctamente. Estos tres vértices propuestos podrían dibujar un triángulo de equilibrio en el que podríamos incluir multitud de situaciones clínicas (figura 76).

Las situaciones de hipoperfusión son relativamente comunes, como por ejemplo en estados de deshidratación, envejecimiento, estenosis arterial o enfermedades previas que puedan comprometer el FSR y la PPR. En estas situaciones la administración de fármacos que alteran los mecanismos de regulación de la hemodinámica puede tener consecuencias desastrosas para el mantenimiento de la filtración glomerular. En este contexto, el DRA de tipo pre-renal podría ser la

consecuencia de una combinación de múltiples factores de riesgo, tales como enfermedades, administración de fármacos, y cambios funcionales o estructurales debidos al envejecimiento, que puedan alterar cada uno de los vértices anteriormente propuestos. Esta idea explicaría la presencia de un DRA en algunas dobles terapias, como se expone en la Introducción de este trabajo, siempre en presencia de enfermedades asociadas, situaciones de hipoperfusión renal o avanzada edad (Camin y cols., 2015; Sturrock y Struthers, 1993; Bridoux y cols., 1992; Braden y cols. 2004).

La siguiente figura resume el modelo propuesto para el desarrollo de un DRA de tipo pre-renal en un sentido amplio. En la primera parte de la figura (figura 76.A) se esquematiza las alteraciones producidas por las combinaciones de fármacos utilizadas en el modelo experimental animal. En la figura 76.B se propone un modelo de DRA pre-renal esquematizado en un triángulo, en cuyos vértices se sitúan las alteraciones determinadas en este trabajo como necesarias para el desarrollo de este síndrome renal. En este punto, el desafío que se presenta es esclarecer los puntos clave para cada situación clínica de riesgo, situados en los lados del triángulo, con el fin de poder delinear un mapa fisiológico para cada uno de ellos, lo que permitiría concluir qué combinaciones de factores de riesgo pueden desembocar en un colapso renal.

Y, finalmente, el reto implica el desarrollo de nuevos sistemas de diagnóstico basados en los niveles de parámetros fisiopatológicos y biomarcadores capaces de delimitar el perfil hemodinámico de un individuo. Este modelo permitiría detectar situaciones de riesgo que puedan alterar los mecanismos regulatorios antes de que el DRA aparezca, herramienta clave en la medicina preventiva y personalizada.

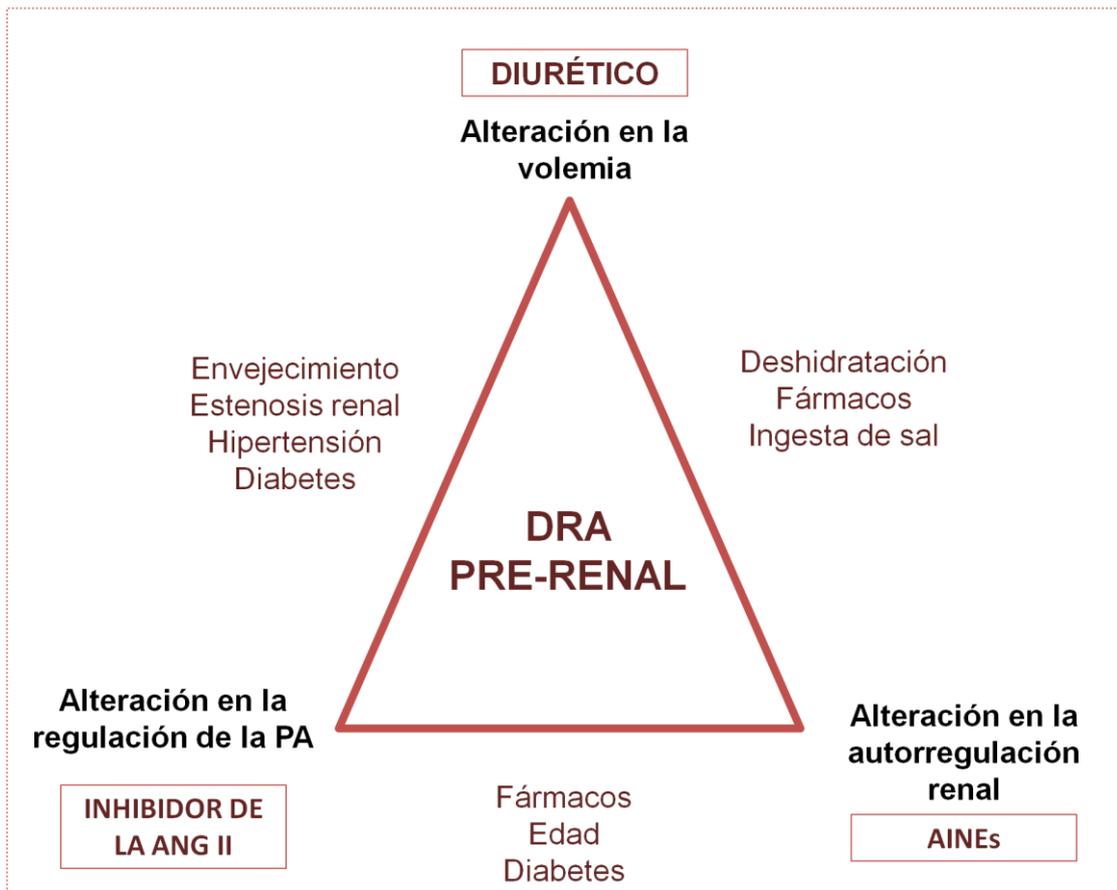


Figura 76. Esquema propuesto de los cambios necesarios en el organismo en un DRA de este tipo y los factores de riesgo que pueden producir dichas modificaciones.

CONCLUSIONES

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

1. La administración conjunta de furosemida, trandolapril e ibuprofeno produce un claro DRA en los animales de experimentación, caracterizado por un aumento de la creatinina y de la urea plasmática sin un daño aparente en las estructuras renales. La evaluación de diferentes parámetros renales sugiere que este modelo experimental animal reproduce un DRA de tipo pre-renal.
2. La administración conjunta de ibuprofeno y trandolapril, o ibuprofeno y furosemida, podría producir un DRA subclínico, caracterizado por una disminución de la TFG sin repercusión en un aumento de la creatinina plasmática.
3. En la orina de los animales tratados con la triple terapia no se detectan los potenciales biomarcadores relacionados con un DRA, datos que nos permitirían perfilar una huella proteica para este tipo de daño, útil para llevar a cabo un diagnóstico diferencial.
4. Los mecanismos de regulación de la hemodinámica sistémica y renal se encuentran implicados en la fisiopatología de este síndrome renal. En la triple terapia existiría una inhibición simultánea de los mecanismos de regulación de la PA y de la autorregulación renal, lo que desembocaría en un colapso renal.
5. El biomarcador 13, el biomarcador 14 y el biomarcador 15 aparecen en la orina de los animales tratados con la triple terapia y están ausentes en la orina de los animales controles. Su presencia, en combinación con la información aportada por otros parámetros, podría ser útil para caracterizar el DRA pre-renal, avance para la mejora de su diagnóstico diferencial.

BIBLIOGRAFÍA

- Adhiyaman, V., M. Asghar, A. Oke, A. D. White & I. U. Shah: Nephrotoxicity in the elderly due to co-prescription of angiotensin converting enzyme inhibitors and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J R Soc Med* 2001, **94**, 512-4.
- Adiyanti, S. S. & T. Loho: Acute Kidney Injury (AKI) biomarker. *Acta Med Indones* 2012, **44**, 246-55.
- Agaba, E. I., M. Rohrscheib & A. H. Tzamaloukas: The renal concentrating mechanism and the clinical consequences of its loss. *Niger Med J* 2012, **53**, 109-15.
- Alge, J. L. & J. M. Arthur: Biomarkers of AKI: a review of mechanistic relevance and potential therapeutic implications. *Clin J Am Soc Nephrol* 2015, **10**, 147-55.
- Anderson, S., B. Eldadah, J. B. Halter, W. R. Hazzard, J. Himmelfarb, F. M. Horne, P. L. Kimmel, B. A. Molitoris, M. Murthy, A. M. O'Hare, K. E. Schmader & K. P. High: Acute kidney injury in older adults. *J Am Soc Nephrol* 2011, **22**, 28-38.
- Aragoncillo Ballesteros, P.: Anatomía del corazón. Libro de Salud Cardiovascular. *Editorial Nerea S.A* 2009.
- Arrizurieta, E.: Marcadores del filtrado glomerular: cistatina C. *Revista Argentina de nefrologia* 2006, **4**.
- Avenidaño, L. H.: Nefrología Clínica. *Panamericana* 2009, 1086.
- Awodele, O., A. O. Fadipe, M. Adekoya & O. O. Adeyemi: Prescribing Pattern of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs at the Outpatient Pharmacy Department of a University Teaching Hospital in Nigeria. *Ghana Med J* 2015, **49**, 25-9.
- Bagga, A., A. Bakkaloglu, P. Devarajan, R. L. Mehta, J. A. Kellum, S. V. Shah, B. A. Molitoris, C. Ronco, D. G. Warnock, M. Joannidis & A. Levin: Improving outcomes from acute kidney injury: report of an initiative. *Pediatr Nephrol* 2007, **22**, 1655-8.
- Barajas, L.: Anatomy of the juxtaglomerular apparatus. *Am J Physiol* 1979, **237**, F333-43.
- Barrera-Chimal, J. & N. A. Bobadilla: Are recently reported biomarkers helpful for early and accurate diagnosis of acute kidney injury? *Biomarkers* 2012, **17**, 385-93.
- Batlouni, M.: [Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cardiovascular, cerebrovascular and renal effects]. *Arq Bras Cardiol* 2010, **94**, 556-63.
- Birck, R., S. Krzossok, T. Knoll, C. Braun, F. J. van Der Woude & P. Rohmeiss: Preferential COX-2 inhibitor, meloxicam, compromises renal perfusion in euvoletic and hypovolemic rats. *Exp Nephrol* 2000, **8**, 173-80.
- Blantz, R. C.: Pathophysiology of pre-renal azotemia. *Kidney Int* 1998, **53**, 512-23.
- Block, C. A. & A. C. Schoolwerth: The epidemiology and outcome of acute renal failure and the impact on chronic kidney disease. *Semin Dial* 2006, **19**, 450-4.

BIBLIOGRAFÍA

- Bolisetty, S. & A. Agarwal: Urine albumin as a biomarker in acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2017, **300**, F626-7.
- Boshra, V., G. A. El Wakeel & M. A. Nader: Effect of celecoxib on the antihypertensive effect of losartan in a rat model of renovascular hypertension. *Can J Physiol Pharmacol* 2011, **89**, 103-7.
- Braden, G. L., M. H. O'Shea, J. G. Mulhern & M. J. Germain: Acute renal failure and hyperkalaemia associated with cyclooxygenase-2 inhibitors. *Nephrol Dial Transplant* 2004, **19**, 1149-53.
- Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976, **72**, 248-54.
- Brater, D. C.: Anti-inflammatory agents and renal function. *Semin Arthritis Rheum* 2002, **32**, 33-42.
- Brenner, B. M. & H. D. Humes: Mechanics of glomerular ultrafiltration. *N Engl J Med* 1977, **297**, 148-54.
- Breyer, M. D. & R. M. Breyer: G protein-coupled prostanoid receptors and the kidney. *Annu Rev Physiol* 2001, **63**, 579-605.
- Bridoux, F., M. Hazzan, J. L. Pallot, D. Fleury, V. Lemaitre, D. Kleinknecht & P. Vanhille: Acute renal failure after the use of angiotensin-converting-enzyme inhibitors in patients without renal artery stenosis. *Nephrol Dial Transplant* 1992, **7**, 100-4.
- Brilla, E., K. Schosinsky, M. Esqunel & M. Chavarria: Cuantificación de la glucosa por el método de la O-Toluidina. *Act. Méd. Costo* 1977, **6**.
- Brivet, F., P. Loirat, D. Kleinknecht & P. Landais: Biocompatible dialysis membrane in acute renal failure: the best choice. French Study Group on Acute Renal Failure. *Intensive Care Med* 1996, **22**, 833-4.
- Brix, A. E.: Renal papillary necrosis. *Toxicol Pathol* 2002, **30**, 672-4.
- Brodehl, J., B. S. Oemar & P. F. Hoyer: Renal glucosuria. *Pediatr Nephrol* 1987, **1**, 502-8.
- Brown, N. J. & D. E. Vaughan: Angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Circulation* 1998, **97**, 1411-20.
- Bulger, R. E. & D. C. Dobyan: Recent advances in renal morphology. *Annu Rev Physiol* 1982, **44**, 147-79.
- Calderón-Ospina, C., G. Guzmán-Ramírez, J. Sarmiento-Monroy, D. Gómez-Angulo, A. Joya-Higuera, L. Ríos-Barajas, J. Romero-Soler, K. Rosado-Sierra & J. Soler-Barrera: Nefrotoxicidad inducida por medicamentos. *MED.UIS*. 2010, **1**, 24.

- Camici, M.: Urinary detection of podocyte injury. *Biomed Pharmacother* 2007, **61**, 245-9.
- Camin, R. M., M. Cols, J. L. Chevarria, R. G. Osuna, M. Carreras, J. M. Lisbona & J. Coderch: Acute kidney injury secondary to a combination of renin-angiotensin system inhibitors, diuretics and NSAIDs: "The Triple Whammy". *Nefrologia* 2015, **35**, 197-206.
- Capuano, F., M. Goracci, R. Luciani, G. Gentile, A. Roscitano, U. Benedetto & R. Sinatra: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels after use of mini-cardiopulmonary bypass system. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2009, **9**, 797-801.
- Carey, R. M.: AT2 Receptors: Potential Therapeutic Targets for Hypertension. *Am J Hypertens* 2017, **30**, 339-347.
- Carey, R. M., Z. Q. Wang & H. M. Siragy: Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. *Hypertension* 2000, **35**, 155-63.
- Carlstrom, M., C. S. Wilcox & W. J. Arendshorst: Renal autoregulation in health and disease. *Physiol Rev* 2015, **95**, 405-511.
- Castellano Cabrera, J., J. Pérez Mendoza, M. Plasencia Núñez, N. Bañón Morón, E. Montes Gómez & F. de la Nuez Viera: Triple Whammy. *infarma* 2015, **7**, 2.
- Castrop, H., J. Klar, C. Wagner, K. Hoehler & A. Kurtz: General inhibition of renocortical cyclooxygenase-2 expression by the renin-angiotensin system. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003, **284**, F518-24.
- Catalá Bauset, M., A. Gilsanz Peral, F. Tortosa Henzi, A. Zugasi Murillo, B. Moreno Esteban, I. Halperin Ravinovich, T. Lucas Morante, G. Obiols Alfonso, C. Páramo Fernández, A. Picó Alfonso, C. Del Pozo Picó, E. Torres Vela, C. Varela da Costa, S. Webb Youdale & C. Villabona Artero: Clinical practice guideline for the diagnosis and treatment of neuropituitary disorders. *Endocrinol Nutr* 2007, **1**, 10.
- Cheng, H. F. & R. C. Harris: Cyclooxygenases, the kidney, and hypertension. *Hypertension* 2004, **43**, 525-30.
- Cheng, H. F., J. L. Wang, M. Z. Zhang, Y. Miyazaki, I. Ichikawa, J. A. McKanna & R. C. Harris: Angiotensin II attenuates renal cortical cyclooxygenase-2 expression. *J Clin Invest* 1999, **103**, 953-61.
- Chertow, G. M., J. Lee, G. J. Kuperman, E. Burdick, J. Horsky, D. L. Seger, R. Lee, A. Mekala, J. Song, A. L. Komaroff & D. W. Bates: Guided medication dosing for inpatients with renal insufficiency. *Jama* 2001, **286**, 2839-44.
- Coca, S. G., A. X. Garg, M. Swaminathan, S. Garwood, K. Hong, H. Thiessen-Philbrook, C. Passik, J. L. Koyner & C. R. Parikh: Preoperative angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blocker use and acute kidney injury in patients undergoing cardiac surgery. *Nephrol Dial Transplant* 2013, **28**, 2787-99.

Cowley, A. W., Jr.: Long-term control of arterial blood pressure. *Physiol Rev* 1992, **72**, 231-300.

Crowley, S. D., S. B. Gurley, M. J. Herrera, P. Ruiz, R. Griffiths, A. P. Kumar, H. S. Kim, O. Smithies, T. H. Le & T. M. Coffman: Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**, 17985-90.

Cupples, W. A. & B. Braam: Assessment of renal autoregulation. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007, **292**, F1105-23.

Dampney, R. A., M. J. Coleman, M. A. Fontes, Y. Hirooka, J. Horiuchi, Y. W. Li, J. W. Polson, P. D. Potts & T. Tagawa: Central mechanisms underlying short- and long-term regulation of the cardiovascular system. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002, **29**, 261-8.

de Mendonca, A., J. L. Vincent, P. M. Suter, R. Moreno, N. M. Dearden, M. Antonelli, J. Takala, C. Sprung & F. Cantraine: Acute renal failure in the ICU: risk factors and outcome evaluated by the SOFA score. *Intensive Care Med* 2000, **26**, 915-21.

Deen, W. M., C. R. Robertson & B. M. Brenner: Glomerular ultrafiltration. *Fed Proc* 1974, **33**, 14-20.

Delanghe, J. R. & M. R. Langlois: Hemopexin: a review of biological aspects and the role in laboratory medicine. *Clin Chim Acta* 2001, **312**, 13-23.

Delanghe, J. R. & M. M. Speeckaert: Creatinine determination according to Jaffe-what does it stand for? *NDT Plus* 2011, **4**, 83-6.

D'Elia, J. A., G. Bayliss, R. E. Gleason & L. A. Weinrauch: Cardiovascular-renal complications and the possible role of plasminogen activator inhibitor: a review. *Clin Kidney J* 2016, **9**, 705-12.

Delmas, P. D.: Non-steroidal anti-inflammatory drugs and renal function. *Br J Rheumatol* 1995, **34 Suppl 1**, 25-8.

Devarajan, P.: Proteomics for biomarker discovery in acute kidney injury. *Semin Nephrol* 2007, **27**, 637-51.

Devarajan, P.: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): a new marker of kidney disease. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 2008, **241**, 89-94.

Devarajan, P.: Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. *Curr Opin Pediatr* 2011, **23**, 194-200.

Devarajan, P. & P. Murray: Biomarkers in acute kidney injury: are we ready for prime time? *Nephron Clin Pract* 2014, **127**, 176-9.

- Díaz-Casasola, L.: Gastric mucosa: Protective mechanisms and harmful effects of acetylsalicylic acid. Physiological and biochemical approaches. *Medicina e Investigación* 2015, **1**, 3.
- DiBona, G. F.: The sympathetic nervous system and hypertension: recent developments. *Hypertension* 2004, **43**, 147-50.
- Dunn, M. J. & E. J. Zambraski: Renal effects of drugs that inhibit prostaglandin synthesis. *Kidney Int* 1980, **18**, 609-22.
- Eaton, D. & J. Pooler: Vander's Renal Physiology. *McGraw-Hill Interamericana* 2009.
- Eckberg, D. L.: Adaptation of the human carotid baroreceptor-cardiac reflex. *J Physiol* 1977, **269**, 579-89.
- Edwards, J. K.: Biomarkers. How precise is NephroCheck(R)? *Nat Rev Nephrol* 2015, **11**, 127.
- Ejaz, A. A. & R. Mohandas: Are diuretics harmful in the management of acute kidney injury? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2014, **23**, 155-60.
- Erdo, E. G.: Angiotensin I converting enzyme and the changes in our concepts through the years. Lewis K. Dahl memorial lecture. *Hypertension* 1990, **16**, 363-70.
- Escalante, B.: Biological importance of AT2 for angiotensin II. *Archivos de Cardiología de México* 2004.
- Escobar Cervantes, C. & V. Barrios Alonso: Combinaciones en el tratamiento de la hipertensión arterial. *www.jano.es* 2010.
- Esnault, V. L., E. A. Brown, E. Apetrei, J. Bagon, C. Calvo, R. DeChatel, H. Holdaas, S. Krcmery & Z. Kopalava: The effects of amlodipine and enalapril on renal function in adults with hypertension and nondiabetic nephropathies: a 3-year, randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled study. *Clin Ther* 2008, **30**, 482-98.
- Estañol, B., M. Porras-Betancourt, G. Sánchez-Torres, R. Martínez-Memije, O. Infante & H. Senties-Madrid: Control neural de la circulación periférica y de la presión arterial *Arch Cardiol Mex* 2009, **79**, 8.
- Esteller, A. & M. Cordero: Fundamentos de Fisiopatología. *McGraw-Hill. Interamericana* . 1ra Edición. 1998.
- Facemire, C. S., M. Nguyen, L. Jania, W. H. Beierwaltes, H. S. Kim, B. H. Koller & T. M. Coffman: A major role for the EP4 receptor in regulation of renin. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011, **301**, F1035-41.
- Ferguson, M. A., V. S. Vaidya, S. S. Waikar, F. B. Collings, K. E. Sunderland, C. J. Gioules & J. V. Bonventre: Urinary liver-type fatty acid-binding protein predicts adverse outcomes in acute kidney injury. *Kidney Int* 2010, **77**, 708-14.

BIBLIOGRAFÍA

Fernández García, M., E. Coll, S. Ventura Pedret, C. Bermudo Guitartea, M. C. Cárdenas Fernández, M. Cortés Rius, M. García Montes, C. Martínez-Brúa, D. Pérez Surribas, T. Rodríguez González, C. Valldecabres Ortiz, J. A. Viedma Contreras & E. Zapico Muniz: Cistatina C en la evaluación de la función renal. *Rev Lab Clin* 2011, 4, 12.

Ferreira, L., Y. Quiros, S. M. Sancho-Martinez, O. Garcia-Sanchez, C. Raposo, J. M. Lopez-Novoa, J. M. Gonzalez-Buitrago & F. J. Lopez-Hernandez: Urinary levels of regenerating islet-derived protein III beta and gelsolin differentiate gentamicin from cisplatin-induced acute kidney injury in rats. *Kidney Int* 2010, 79, 518-28.

Fontanilla, J. & W. K. Han: Kidney injury molecule-1 as an early detection tool for acute kidney injury and other kidney diseases. *Expert Opin Med Diagn* 2011, 5, 161-73.

Fournier, J. P., M. Lapeyre-Mestre, A. Sommet, J. Dupouy, J. C. Poutrain & J. L. Montastruc: Laboratory monitoring of patients treated with antihypertensive drugs and newly exposed to non steroidal anti-inflammatory drugs: a cohort study. *PLoS One* 2012, 7, e34187.

Frank, J.: Managing hypertension using combination therapy. *Am Fam Physician* 2008, 77, 1279-86.

Fushimi, F., K. Taguchi, H. Izumi, K. Kohno, M. Kuwano, M. Ono, Y. Nakashima, T. Takesue, S. Naito & Y. Oda: Peroxiredoxins, thioredoxin, and Y-box-binding protein-1 are involved in the pathogenesis and progression of dialysis-associated renal cell carcinoma. *Virchows Arch* 2013, 463, 553-62.

Gambaro, G. & M. A. Perazella: Adverse renal effects of anti-inflammatory agents: evaluation of selective and nonselective cyclooxygenase inhibitors. *J Intern Med* 2003, 253, 643-52.

Garcia Acuna, J. M., E. Gonzalez-Babarro, L. Grigorian Shamagian, C. Pena-Gil, R. Vidal Perez, A. M. Lopez-Lago, M. Gutierrez Feijoo & J. R. Gonzalez-Juanatey: Cystatin C provides more information than other renal function parameters for stratifying risk in patients with acute coronary syndrome. *Rev Esp Cardiol* 2009, 62, 510-9.

Gaspari, F., P. Cravedi, M. Mandala, N. Perico, F. R. de Leon, N. Stucchi, S. Ferrari, R. Labianca, G. Remuzzi & P. Ruggenenti: Predicting cisplatin-induced acute kidney injury by urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin excretion: a pilot prospective case-control study. *Nephron Clin Pract* 2010, 115, c154-60.

Gazapo, E., R. M. Gazapo & A. Caturla: [Clinical usefulness of beta-2-microglobulin measurement]. *Med Clin (Barc)* 1996, 106, 751-5.

Ghai, C.: A Text Book of Practical Physiology

Jaypee Brothers medical Publishers 2013.

- Giasson, J., G. H. Li & Y. Chen: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a new biomarker for non--acute kidney injury (AKI) diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2011, **10**, 272-82.
- Gocze, I., M. Koch, P. Renner, F. Zeman, B. M. Graf, M. H. Dahlke, M. Nerlich, H. J. Schlitt, J. A. Kellum & T. Bein: Urinary biomarkers TIMP-2 and IGFBP7 early predict acute kidney injury after major surgery. *PLoS One* 2015, **10**, e0120863.
- Golan, D. E., A. H. Tashjian & E. J. Armstrong: Principles of Pharmacology: The pathophysiologic basis of drug therapy. 2011.
- Goldenberg, I. & S. Matetzky: Nephropathy induced by contrast media: pathogenesis, risk factors and preventive strategies. *Cmaj* 2005, **172**, 1461-71.
- González-Toledo, R. & M. Franco: Is salt sensitive hypertension an inflammatory disease? Role of lymphocytes and macrophages. *Arch Cardiol Mex* 2012, **82**, 9.
- Good, J. M., A. J. Brady, F. H. Noormohamed, C. M. Oakley & J. G. Cleland: Effect of intense angiotensin II suppression on the diuretic response to furosemide during chronic ACE inhibition. *Circulation* 1994, **90**, 220-4.
- Green, T., A. A. Gonzalez, K. D. Mitchell & L. G. Navar: The complex interplay between cyclooxygenase-2 and angiotensin II in regulating kidney function. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2012, **21**, 7-14.
- Haase, M., R. Bellomo, P. Devarajan, P. Schlattmann & A. Haase-Fielitz: Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis* 2009, **54**, 1012-24.
- Habib, R., S. Begum, G. Alam, A. Ali, I. Khan, M. Waseem, N. Kabir & A. Salim: Transcription profile of genes affected in response to pathological changes in drug-induced rat model of acute kidney injury. *Ren Fail* 2015, **37**, 1225-31.
- Hall, J. E.: Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica. *Elsevier Health Sciences* 2011.
- Hao, C. M. & M. D. Breyer: Physiological regulation of prostaglandins in the kidney. *Annu Rev Physiol* 2008, **70**, 357-77.
- Harding, P., W. F. Glass, 2nd & S. D. Scherer: COX-2 inhibition potentiates the antiproteinuric effect of enalapril in uninephrectomized SHR. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003, **68**, 17-25.
- Harris, R. C.: Interactions between COX-2 and the renin-angiotensin system in the kidney. *Acta Physiol Scand* 2003, **177**, 423-7.
- Harris, R. C.: Physiologic and pathophysiologic roles of cyclooxygenase-2 in the kidney. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2013, **124**, 139-51.

BIBLIOGRAFÍA

- Harris, R. C. & M. D. Breyer: Physiological regulation of cyclooxygenase-2 in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001, **281**, F1-11.
- Harris, R. C., J. A. McKanna, Y. Akai, H. R. Jacobson, R. N. Dubois & M. D. Breyer: Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest* 1994, **94**, 2504-10.
- Harris, R. C., M. Z. Zhang & H. F. Cheng: Cyclooxygenase-2 and the renal renin-angiotensin system. *Acta Physiol Scand* 2004, **181**, 543-7.
- Harrison, C. & K. R. Acharya: ACE for all - a molecular perspective. *J Cell Commun Signal* 2014, **8**, 195-210.
- Hertzberg, D., L. Ryden, J. W. Pickering, U. Sartipy & M. J. Holzman: Acute kidney injury-an overview of diagnostic methods and clinical management. *Clin Kidney J* 2017, **10**, 323-331.
- Hörl, W. H.: Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and the Kidney. *Pharmaceuticals* 2010, **3**, 2291-2321.
- Hricik, D. E. & M. J. Dunn: Angiotensin-converting enzyme inhibitor-induced renal failure: causes, consequences, and diagnostic uses. *J Am Soc Nephrol* 1990, **1**, 845-58.
- Husdan, H. & A. Rapoport: Estimation of creatinine by the Jaffe reaction. A comparison of three methods. *Clin Chem* 1968, **14**, 222-38.
- Ichikawa, D., A. Kamijo-Ikemori, T. Sugaya, K. Ohata, M. Hisamichi, S. Hoshino, K. Kimura & Y. Shibagaki: Utility of urinary tubular markers for monitoring chronic tubulointerstitial injury after ischemia-reperfusion. *Nephrology (Carlton)* 2017.
- Ichimura, T., J. V. Bonventre, V. Bailly, H. Wei, C. A. Hession, R. L. Cate & M. Sanicola: Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J Biol Chem* 1998, **273**, 4135-42.
- Ichimura, T. & S. Mou: Kidney injury molecule-1 in acute kidney injury and renal repair: a review. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao* 2008, **6**, 533-8.
- Ito, S. & K. Abe: Contractile properties of afferent and efferent arterioles. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1997, **24**, 532-5.
- Johns, E. J.: Autonomic regulation of kidney function. *Handb Clin Neurol* 2013, **117**, 203-14.
- Jolobe, O. M.: Nephrotoxicity in the elderly due to co-prescription of ACE inhibitors and NSAIDs. *J R Soc Med* 2001, **94**, 657-8.
- Jung, D., H. Biggs, J. Erikson & P. U. Ledyard: New Colorimetric reaction for end-point, continuous-flow, and kinetic measurement of urea. *Clin Chem* 1975, **21**, 1136-40.

- Just, A.: Mechanisms of renal blood flow autoregulation: dynamics and contributions. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007, **292**, R1-17.
- Kammerl, M. C., R. M. Nusing, W. Richthammer, B. K. Kramer & A. Kurtz: Inhibition of COX-2 counteracts the effects of diuretics in rats. *Kidney Int* 2001, **60**, 1684-91.
- Kammerl, M. C., R. M. Nusing, H. W. Seyberth, G. A. Riegger, A. Kurtz & B. K. Kramer: Inhibition of cyclooxygenase-2 attenuates urinary prostanoid excretion without affecting renal renin expression. *Pflugers Arch* 2001, **442**, 842-7.
- Kamran, A., S. Sadeghieh Ahari, M. Biria, A. Malepour & H. Heydari: Determinants of Patient's Adherence to Hypertension Medications: Application of Health Belief Model Among Rural Patients. *Ann Med Health Sci Res* 2014, **4**, 922-7.
- Karajala, V., W. Mansour & J. A. Kellum: Diuretics in acute kidney injury. *Minerva Anesthesiol* 2009, **75**, 251-7.
- Kaucsar, T., M. Godo, C. Revesz, M. Kovacs, A. Mocsai, N. Kiss, M. Albert, T. Krenacs, G. Szenasi & P. Hamar: Urine/Plasma Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin Ratio Is a Sensitive and Specific Marker of Subclinical Acute Kidney Injury in Mice. *PLoS One* 2016, **11**, e0148043.
- Kaufman, J., M. Dhakal, B. Patel & R. Hamburger: Community-acquired acute renal failure. *Am J Kidney Dis* 1991, **17**, 191-8.
- Kerr, M., M. Bedford, B. Matthews & D. O'Donoghue: The economic impact of acute kidney injury in England. *Nephrol Dial Transplant* 2014, **29**, 1362-8.
- Kim, G. H.: Renal effects of prostaglandins and cyclooxygenase-2 inhibitors. *Electrolyte Blood Press* 2008, **6**, 35-41.
- Klabunde, R.: Cardiovascular Physiology Concepts Second Edition. *Lippincott Williams & Wilkins* 2011.
- Kleinstreuer, N., T. David, M. J. Plank & Z. Endre: Dynamic myogenic autoregulation in the rat kidney: a whole-organ model. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008, **294**, F1453-64.
- Kose, F., A. Besen, S. Paydas, M. Balal, G. Gonlusen, T. Inal, A. Dogan & M. Kibar: Effects of selective Cox-2 inhibitor, rofecoxib, alone or combination with furosemide on renal functions and renal Cox-2 expression in rats. *Clin Exp Nephrol* 2010, **14**, 22-7.
- Kumar, N., D. A. Calhoun & T. Dudenbostel: Management of patients with resistant hypertension: current treatment options. *Integr Blood Press Control* 2013, **6**, 139-51.
- Kumar, V., J. C. Aster, N. Fausto & A. K. Abbas: Robbins y Cotran. Patología Estructural y Funcional. *Elsevier* 2010.
- Kurien, B., N. Everds & R. Hal Scofield: Recolección experimental de orina en animales: Revisión. *Laboratory Animals* 2004, **38**.

Kutz, S. M., J. Hordines, P. J. McKeown-Longo & P. J. Higgins: TGF-beta1-induced PAI-1 gene expression requires MEK activity and cell-to-substrate adhesion. *J Cell Sci* 2001, **114**, 3905-14.

Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, **227**, 680-5.

Lane, P. H., L. D. Tyler & P. G. Schmitz: Chronic administration of furosemide augments renal weight and glomerular capillary pressure in normal rats. *Am J Physiol* 1998, **275**, F230-4.

Lapi, F., L. Azoulay, H. Yin, S. J. Nessim & S. Suissa: Concurrent use of diuretics, angiotensin converting enzyme inhibitors, and angiotensin receptor blockers with non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of acute kidney injury: nested case-control study. *Bmj* 2013, **346**, e8525.

Lavecchia, L., G. Cereza García, M. Sabaté Gallego, X. Vidal Guitart, N. Ramos Terrades, J. de la Torre, A. Segarra Medrano & A. Agustí Escasany: Insuficiencia renal aguda relacionada con medicamentos en pacientes hospitalizados. *Revista de la Sociedad Española de Nefrología* 2015, **6**.

Layton, A. T.: Recent advances in renal hemodynamics: insights from bench experiments and computer simulations. *Am J Physiol Renal Physiol* 2015, **308**, F951-5.

Li, P. K., E. A. Burdmann & R. L. Mehta: Acute kidney injury: global health alert. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2013, **22**, 253-8.

Liangos, O., R. Wald, J. W. O'Bell, L. Price, B. J. Pereira & B. L. Jaber: Epidemiology and outcomes of acute renal failure in hospitalized patients: a national survey. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006, **1**, 43-51.

Linkermann, A., G. Chen, G. Dong, U. Kunzendorf, S. Krautwald & Z. Dong: Regulated cell death in AKI. *J Am Soc Nephrol* 2014, **25**, 2689-701.

Lisowska-Myjak, B.: Serum and urinary biomarkers of acute kidney injury. *Blood Purif* 2010, **29**, 357-65.

Liu, M., J. Liu, X. Liu & G. Wei: Peroxiredoxin I protein, a potential biomarker of hydronephrosis in fetal mice exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J Pediatr Urol* 2014, **10**, 474-81.

Loboz, K. K. & G. M. Shenfield: Drug combinations and impaired renal function -- the 'triple whammy'. *Br J Clin Pharmacol* 2005, **59**, 239-43.

Lohmeier, T. E., D. A. Hildebrandt, S. Warren, P. J. May & J. T. Cunningham: Recent insights into the interactions between the baroreflex and the kidneys in hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005, **288**, R828-36.

Lopez-Hernandez, F. J. & J. M. Lopez-Novoa: The lord of the ring: mandatory role of the kidney in drug therapy of hypertension. *Pharmacol Ther* 2006, **111**, 53-80.

Lopez-Novoa, J. M., Y. Quiros, L. Vicente, A. I. Morales & F. J. Lopez-Hernandez: New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view. *Kidney Int* 2011, **79**, 33-45.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr & R. J. Randall: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951, **193**, 265-75.

Loza, E.: AINEs en la práctica clínica: lo que hay que saber. *Inf Ter Sist Nac Salud* 2011, **35**, 8.

Luo, Q. H., M. L. Chen, F. J. Sun, Z. L. Chen, M. Y. Li, W. Zeng, L. Gong, A. C. Cheng, X. Peng, J. Fang, L. Tang & Y. Geng: KIM-1 and NGAL as biomarkers of nephrotoxicity induced by gentamicin in rats. *Mol Cell Biochem* 2014, **397**, 53-60.

Macedo, E. & R. Mehta: Prerenal azotemia in congestive heart failure. *Contrib Nephrol* 2010, **164**, 79-87.

Madsen, K. M. & C. C. Tisher: Structural-functional relationships along the distal nephron. *Am J Physiol* 1986, **250**, F1-15.

Mann, B., A. Hartner, B. L. Jensen, M. Kammerl, B. K. Kramer & A. Kurtz: Furosemide stimulates macula densa cyclooxygenase-2 expression in rats. *Kidney Int* 2001, **59**, 62-8.

Marín, R., R. Álvarez-Navascués & F. Fernández-Vega: Blockade of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Arterial Hypertension, Diabetes and Nephropathy. *Rev Esp Cardiol* 2008.

Matzdorf, C., A. Kurtz & K. Hoehlerl: COX-2 activity determines the level of renin expression but is dispensable for acute upregulation of renin expression in rat kidneys. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007, **292**, F1782-90.

McCaffrey, J., B. Coupes, C. Chaloner, N. J. Webb, R. Barber & R. Lennon: Towards a biomarker panel for the assessment of AKI in children receiving intensive care. *Pediatr Nephrol* 2015, **30**, 1861-71.

Meersch, M., C. Schmidt, H. Van Aken, S. Martens, J. Rossaint, K. Singbartl, D. Gorlich, J. A. Kellum & A. Zarbock: Urinary TIMP-2 and IGFBP7 as early biomarkers of acute kidney injury and renal recovery following cardiac surgery. *PLoS One* 2014, **9**, e93460.

Mehta, N. U. & S. T. Reddy: Role of hemoglobin/heme scavenger protein hemopexin in atherosclerosis and inflammatory diseases. *Curr Opin Lipidol* 2015, **26**, 384-7.

Mei, W., Z. Peng, M. Lu, C. Liu, Z. Deng, Y. Xiao, J. Liu, Y. He, Q. Yuan, X. Yuan, D. Tang, H. Yang & L. Tao: Peroxiredoxin 1 inhibits the oxidative stress induced apoptosis in renal tubulointerstitial fibrosis. *Nephrology (Carlton)* 2015, **20**, 832-42.

- Melnikov, V. Y. & B. A. Molitoris: Improvements in the diagnosis of acute kidney injury. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2008, **19**, 537-44.
- Meola, M., F. Nalesso, I. Petrucci, S. Samoni & C. Ronco: Pathophysiology and Clinical Work-Up of Acute Kidney Injury. *Contrib Nephrol* 2016, **188**, 1-10.
- Mishra, J., Q. Ma, A. Prada, M. Mitsnefes, K. Zahedi, J. Yang, J. Barasch & P. Devarajan: Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol* 2003, **14**, 2534-43.
- Morales Olivas, F. & L. Estañ Yago: Aliskiren: el primer inhibidor directo de la renina introducido en terapéutica. *Rev Esp Cardiol* 2009, **9**, 8.
- Murray, P. T., R. L. Mehta, A. Shaw, C. Ronco, Z. Endre, J. A. Kellum, L. S. Chawla, D. Cruz, C. Ince & M. D. Okusa: Potential use of biomarkers in acute kidney injury: report and summary of recommendations from the 10th Acute Dialysis Quality Initiative consensus conference. *Kidney Int* 2014, **85**, 513-21.
- Nasrallah, R., J. Clark & R. L. Hebert: Prostaglandins in the kidney: developments since Y2K. *Clin Sci (Lond)* 2007, **113**, 297-311.
- Nicholl, S. M., E. Roztocil & M. G. Davies: Plasminogen activator system and vascular disease. *Curr Vasc Pharmacol* 2006, **4**, 101-16.
- Nicolussi, A., S. D'Inzeo, C. Capalbo, G. Giannini & A. Coppa: The role of peroxiredoxins in cancer. *Mol Clin Oncol* 2017, **6**, 139-153.
- Nielsen, S. E., K. J. Schjoedt, A. S. Astrup, L. Tarnow, M. Lajer, P. R. Hansen, H. H. Parving & P. Rossing: Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) and Kidney Injury Molecule 1 (KIM1) in patients with diabetic nephropathy: a cross-sectional study and the effects of lisinopril. *Diabet Med* 2010, **27**, 1144-50.
- Obermuller, N., S. Kunchaparty, D. H. Ellison & S. Bachmann: Expression of the Na-K-2Cl cotransporter by macula densa and thick ascending limb cells of rat and rabbit nephron. *J Clin Invest* 1996, **98**, 635-40.
- Okusa, M. D., B. L. Jaber, P. Doran, J. Duranteau, L. Yang, P. T. Murray, R. L. Mehta & C. Ince: Physiological biomarkers of acute kidney injury: a conceptual approach to improving outcomes. *Contrib Nephrol* 2013, **182**, 65-81.
- Onopiuk, A., A. Tokarzewicz & E. Gorodkiewicz: Cystatin C: a kidney function biomarker. *Adv Clin Chem* 2014, **68**, 57-69.
- Onuigbo, M. A.: The nephrotoxic "triple whammy" of combining diuretics, ACE inhibitors, and NSAIDs [corrected]. *Bmj* 2013, **346**, f678.
- Onuigbo, M. A. & N. Agbasi: "Quadruple whammy"- a preventable newly described syndrome of post-operative AKI in CKD II and CKD III patients on combination "Triple

whammy" medications: a Mayo Clinic Health System, Eau Claire, Wisconsin experience. *Niger J Clin Pract* 2014, **17**, 649-54.

Osswald, H., B. Muhlbauer & V. Vallon: Adenosine and tubuloglomerular feedback. *Blood Purif* 1997, **15**, 243-52.

Padhi, S., I. Bullock, L. Li & M. Stroud: Intravenous fluid therapy for adults in hospital: summary of NICE guidance. *Bmj* 2013, **347**, f7073.

Palm, C. A., G. Segev, L. D. Cowgill, B. E. LeRoy, K. L. Kowalkowski, K. Kanakubo & J. L. Westropp: Urinary Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin as a Marker for Identification of Acute Kidney Injury and Recovery in Dogs with Gentamicin-induced Nephrotoxicity. *J Vet Intern Med* 2016, **30**, 200-5.

Paragas, N., A. Qiu, M. Hollmen, T. L. Nickolas, P. Devarajan & J. Barasch: NGAL-Siderocalin in kidney disease. *Biochim Biophys Acta* 2012, **1823**, 1451-8.

Parikh, C. R., I. Butrymowicz, A. Yu, V. M. Chinchilli, M. Park, C. Y. Hsu, W. B. Reeves, P. Devarajan, P. L. Kimmel, E. D. Siew & K. D. Liu: Urine stability studies for novel biomarkers of acute kidney injury. *Am J Kidney Dis* 2014, **63**, 567-72.

Passmore, A. P., S. Copeland & G. D. Johnston: The effects of ibuprofen and indomethacin on renal function in the presence and absence of frusemide in healthy volunteers on a restricted sodium diet. *Br J Clin Pharmacol* 1990, **29**, 311-9.

Patzer, L.: Nephrotoxicity as a cause of acute kidney injury in children. *Pediatr Nephrol* 2008, **23**, 2159-73.

Persson, A. E., A. Ollerstam, R. Liu & R. Brown: Mechanisms for macula densa cell release of renin. *Acta Physiol Scand* 2004, **181**, 471-4.

Pfaller, W. & G. Gstraunthaler: Nephrotoxicity testing in vitro--what we know and what we need to know. *Environ Health Perspect* 1998, **106 Suppl 2**, 559-69.

Pfeffer, J. M., M. A. Pfeffer & E. D. Frohlich: Validity of an indirect tail-cuff method for determining systolic arterial pressure in unanesthetized normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Lab Clin Med* 1971, **78**, 957-62.

Pianta, T. J., L. Succar, T. Davidson, N. A. Buckley & Z. H. Endre: Monitoring treatment of acute kidney injury with damage biomarkers. *Toxicol Lett* 2017, **268**, 63-70.

Piazzon, N., F. Bernet, L. Guihard, W. N. Leonhard, S. Urfer, D. Firsov, H. Chehade, B. Vogt, S. Piergiovanni, D. J. Peters, O. Bonny & D. B. Constam: Urine Fetuin-A is a biomarker of autosomal dominant polycystic kidney disease progression. *J Transl Med* 2015, **13**, 103.

Pontillo, C., L. Jacobs, J. A. Staessen, J. P. Schanstra, P. Rossing, H. J. Heerspink, J. Siwy, W. Mullen, A. Vlahou, H. Mischak, R. Vanholder, P. Zurbig & J. Jankowski: A

urinary proteome-based classifier for the early detection of decline in glomerular filtration. *Nephrol Dial Transplant* 2016.

Prieto-Garcia, L., M. Pericacho, S. M. Sancho-Martinez, A. Sanchez, C. Martinez-Salgado, J. M. Lopez-Novoa & F. J. Lopez-Hernandez: Mechanisms of triple whammy acute kidney injury. *Pharmacol Ther* 2016, **167**, 132-145.

Pritchard, G., D. Lyons, J. Webster, J. C. Petrie & T. M. MacDonald: Do trandolapril and indomethacin influence renal function and renal functional reserve in hypertensive patients? *Br J Clin Pharmacol* 1997, **44**, 145-9.

Prowle, J. R., C. J. Kirwan & R. Bellomo: Fluid management for the prevention and attenuation of acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol* 2014, **10**, 37-47.

Quiros, Y., L. Ferreira, S. M. Sancho-Martinez, J. M. Gonzalez-Buitrago, J. M. Lopez-Novoa & F. J. Lopez-Hernandez: Sub-nephrotoxic doses of gentamicin predispose animals to developing acute kidney injury and to excrete ganglioside M2 activator protein. *Kidney Int* 2010, **78**, 1006-15.

Raebel, M. A.: Hyperkalemia associated with use of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers. *Cardiovasc Ther* 2012, **30**, e156-66.

Raoufinia, R., A. Mota, N. Keyhanvar, F. Safari, S. Shamekhi & J. Abdolalizadeh: Overview of Albumin and Its Purification Methods. *Adv Pharm Bull* 2016, **6**, 495-507.

Ren, Y., J. L. Garvin, R. Liu & O. A. Carretero: Role of macula densa adenosine triphosphate (ATP) in tubuloglomerular feedback. *Kidney Int* 2004, **66**, 1479-85.

Rhee, S. G.: Overview on Peroxiredoxin. *Mol Cells* 2016, **39**, 1-5.

Rhoades, R. & D. Bell: Medical Physiology: Principles for Clinical Medicine. *Lippincott Williams & Wilkins* 2009, 816.

Rhoades, R. & G. Tanner: Medical Physiology. *Lippincott Williams & Wilkins* 2003.

Rollason, V. & N. Vogt: Reduction of polypharmacy in the elderly: a systematic review of the role of the pharmacist. *Drugs Aging* 2003, **20**, 817-32.

Rosner, M. H.: The pathogenesis of susceptibility to acute kidney injury in the elderly. *Curr Aging Sci* 2009, **2**, 158-64.

Ross, M. H. & W. Pawlina: Histology: A text and Atlas with correlated cell and molecular biology. *Editorial Médica Panamericana* 2006.

Roush, G. C., R. Kaur & M. E. Ernst: Diuretics: a review and update. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2014, **19**, 5-13.

Salvadó-Usach, M., S. Martínez-González, T. Álvaro-Naranjo, M. Barberá -Marro, R. Risa-Royo, A. Suñé-Martín, B. Tomás-Arasa & R. Bosch-Príncipe: Técnicas de desenmascaramiento antigénico en inmunohistoquímica. Estudio dirigido a anticuerpos

con especiales dificultades de inmunodetección. *Revista española de patología* 2001, **34**, 6.

Sancho-Martínez SM, P. L., Blanco-Gozalo V, Fontecha-Barriuso M, Vicente-Vicente L, Casanova AG, Prieto M, Pescador M, Morales AI, López-Novoa JM, Martínez-Salgado C, López-Hernández FJ: An old term in search for a new meaning within the evolving concept of acute kidney injury. *New Horiz Transl Med* 2015, **2**, 110-117.

Santos, C., P. Marcelino, T. Carvalho, J. Coelho, M. Bispo, L. Mourao, R. Perdigoto & E. Barroso: The value of tubular enzymes for early detection of acute kidney injury after liver transplantation: an observational study. *Transplant Proc* 2010, **42**, 3639-43.

Sarafidis, P. A., M. E. Alexandrou & L. M. Ruilope: A review of chemical therapies for treating diabetic hypertension. *Expert Opin Pharmacother* 2017, **18**, 909-923.

Schiessl, I. M. & H. Castrop: Angiotensin II AT2 receptor activation attenuates AT1 receptor-induced increases in the glomerular filtration of albumin: a multiphoton microscopy study. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013, **305**, F1189-200.

Schiffel, H. & R. Fischer: Five-year outcomes of severe acute kidney injury requiring renal replacement therapy. *Nephrol Dial Transplant* 2008, **23**, 2235-41.

Schindler, C., P. Bramlage, W. Kirch & C. M. Ferrario: Role of the vasodilator peptide angiotensin-(1-7) in cardiovascular drug therapy. *Vasc Health Risk Manag* 2007, **3**, 125-37.

Schlieper, G., R. Westenfeld, V. Brandenburg & M. Ketteler: Inhibitors of calcification in blood and urine. *Semin Dial* 2007, **20**, 113-21.

Schnermann, J.: Cyclooxygenase-2 and macula densa control of renin secretion. *Nephrol Dial Transplant* 2001, **16**, 1735-8.

Schoolwerth, A. C., D. A. Sica, B. J. Ballermann & C. S. Wilcox: Renal considerations in angiotensin converting enzyme inhibitor therapy: a statement for healthcare professionals from the Council on the Kidney in Cardiovascular Disease and the Council for High Blood Pressure Research of the American Heart Association. *Circulation* 2001, **104**, 1985-91.

Schorr, K.: Role of prostaglandins in the cardiovascular effects of bradykinin and angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992, **20 Suppl 9**, S68-73.

Schweda, F., U. Friis, C. Wagner, O. Skott & A. Kurtz: Renin release. *Physiology (Bethesda)* 2007, **22**, 310-9.

Sechi, L. A., R. Tedde & A. Melis: Effects of furosemide on blood pressure in anephric rats. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1990, **66**, 693-700.

Segarra, E.: Fisiología de los aparatos y sistemas. 2006.

Shin, J., G. Kim, J. W. Lee, J. E. Lee, Y. S. Kim, J. H. Yu, S. T. Lee, S. H. Ahn, H. Kim & C. Lee: Identification of ganglioside GM2 activator playing a role in cancer cell migration through proteomic analysis of breast cancer secretomes. *Cancer Sci* 2016, **107**, 828-35.

Shinke, H., S. Masuda, Y. Togashi, Y. Ikemi, A. Ozawa, T. Sato, Y. H. Kim, M. Mishima, T. Ichimura, J. V. Bonventre & K. Matsubara: Urinary kidney injury molecule-1 and monocyte chemotactic protein-1 are noninvasive biomarkers of cisplatin-induced nephrotoxicity in lung cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 2015, **76**, 989-96.

Silacci, P., L. Mazzolai, C. Gauci, N. Stergiopoulos, H. L. Yin & D. Hayoz: Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions. *Cell Mol Life Sci* 2004, **61**, 2614-23.

Singer, E., L. Marko, N. Paragas, J. Barasch, D. Dragun, D. N. Muller, K. Budde & K. M. Schmidt-Ott: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: pathophysiology and clinical applications. *Acta Physiol (Oxf)* 2013, **207**, 663-72.

Singri, N., S. N. Ahya & M. L. Levin: Acute renal failure. *Jama* 2003, **289**, 747-51.

Sinha, V., L. M. Vence & A. K. Salahudeen: Urinary tubular protein-based biomarkers in the rodent model of cisplatin nephrotoxicity: a comparative analysis of serum creatinine, renal histology, and urinary KIM-1, NGAL, and NAG in the initiation, maintenance, and recovery phases of acute kidney injury. *J Investig Med* 2013, **61**, 564-8.

Soni, S. S., C. Ronco, N. Katz & D. N. Cruz: Early diagnosis of acute kidney injury: the promise of novel biomarkers. *Blood Purif* 2009, **28**, 165-74.

Steckelings, U. M., F. Rompe, E. Kaschina & T. Unger: The evolving story of the RAAS in hypertension, diabetes and CV disease: moving from macrovascular to microvascular targets. *Fundam Clin Pharmacol* 2009, **23**, 693-703.

Steinhauslin, F., A. Munafo, T. Buclin, A. Macciocchi & J. Biollaz: Renal effects of nimesulide in furosemide-treated subjects. *Drugs* 1993, **46 Suppl 1**, 257-62.

Stichtenoth, D. O., V. Marhauer, D. Tsikas, F. M. Gutzki & J. C. Frolich: Effects of specific COX-2-inhibition on renin release and renal and systemic prostanoid synthesis in healthy volunteers. *Kidney Int* 2005, **68**, 2197-207.

Stosic, Z., V. Sedlak, D. Felle, S. Curic, M. Ubavic & S. Vodopivec: [Anti-proteinuria effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in patients with nephrotic syndrome: an illusion or a read improvement?]. *Med Pregl* 1995, **48**, 155-8.

Sturrock, N. D. & A. D. Struthers: Non-steroidal anti-inflammatory drugs and angiotensin converting enzyme inhibitors: a commonly prescribed combination with variable effects on renal function. *Br J Clin Pharmacol* 1993, **35**, 343-8.

Sutherland, S. M., J. J. Byrnes, M. Kothari, C. A. Longhurst, S. Dutta, P. Garcia & S. L. Goldstein: AKI in hospitalized children: comparing the pRIFLE, AKIN, and KDIGO definitions. *Clin J Am Soc Nephrol* 2015, **10**, 554-61.

Taber, S. S. & B. A. Mueller: Drug-associated renal dysfunction. *Crit Care Clin* 2006, **22**, 357-74, viii.

Tamargo, J., R. Caballero, R. Gómez, L. Núñez, M. Vaquero & E. Delpón: Pharmacological Properties of Angiotensin-II Receptor Antagonists. Do They All Belong to the Same Class of Drugs? *Rev Esp Cardiol* 2006.

Tang, L., K. Loutzenhiser & R. Loutzenhiser: Biphasic actions of prostaglandin E(2) on the renal afferent arteriole : role of EP(3) and EP(4) receptors. *Circ Res* 2000, **86**, 663-70.

Te Riet, L., J. H. van Esch, A. J. Roks, A. H. van den Meiracker & A. H. Danser: Hypertension: renin-angiotensin-aldosterone system alterations. *Circ Res* 2015, **116**, 960-75.

Thomas, M. C.: Diuretics, ACE inhibitors and NSAIDs--the triple whammy. *Med J Aust* 2000, **172**, 184-5.

Thomas, M. E., C. Blaine, A. Dawnay, M. A. Devonald, S. Ftouh, C. Laing, S. Latchem, A. Lewington, D. V. Milford & M. Ostermann: The definition of acute kidney injury and its use in practice. *Kidney Int* 2015, **87**, 62-73.

Tisher, C. C.: Anatomy of the Kidney. *Brenner BM. Rector FC. The Kidney Philadelphia Saunders*. 1981.

Torregrosa, I., C. Montoliu, A. Urios, M. J. Andres-Costa, C. Gimenez-Garzo, I. Juan, M. J. Puchades, M. L. Blasco, A. Carratala, R. Sanjuan & A. Miguel: Urinary KIM-1, NGAL and L-FABP for the diagnosis of AKI in patients with acute coronary syndrome or heart failure undergoing coronary angiography. *Heart Vessels* 2015, **30**, 703-11.

Towbin, H., T. Staehelin & J. Gordon: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979, **76**, 4350-4.

Townsend, N., L. Wilson, P. Bhatnagar, K. Wickramasinghe, M. Rayner & M. Nichols: Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. *Eur Heart J* 2016, **37**, 3232-3245.

Tresguerres, J. A. F.: Fisiología Humana. *McGraw-Hill Interamericana de España S.L.* 2010.

Tsujimura, T., M. Idei, M. Yoshikawa, O. Takase & K. Hishikawa: Roles and regulation of bone morphogenetic protein-7 in kidney development and diseases. *World J Stem Cells* 2016, **8**, 288-96.

- Turull, A., C. Piera & J. Queralt: Acute effects of the anti-inflammatory cyclooxygenase-2 selective inhibitor, flosulide, on renal plasma flow and glomerular filtration rate in rats. *Inflammation* 2001, **25**, 119-28.
- Vaidya, V. S., M. A. Ferguson & J. V. Bonventre: Biomarkers of acute kidney injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2008, **48**, 463-93.
- Vaidya, V. S., V. Ramirez, T. Ichimura, N. A. Bobadilla & J. V. Bonventre: Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006, **290**, F517-29.
- Vallon, V.: Tubuloglomerular feedback and the control of glomerular filtration rate. *News Physiol Sci* 2003, **18**, 169-74.
- Vander, A.: Fisiología Renal. *Interamericana-McGraw-Hill, cuarta edición* 1993.
- Vandijck, D. M., S. Oeyen, J. M. Decruyenaere, L. Annemans & E. A. Hoste: Acute kidney injury, length of stay, and costs in patients hospitalized in the intensive care unit. *Acta Clin Belg* 2007, **62 Suppl 2**, 341-5.
- Vanmassenhove, J., R. Vanholder, E. Nagler & W. Van Biesen: Urinary and serum biomarkers for the diagnosis of acute kidney injury: an in-depth review of the literature. *Nephrol Dial Transplant* 2013, **28**, 254-73.
- Vicente-Vicente, L., L. Ferreira, J. M. Gonzalez-Buitrago, F. J. Lopez-Hernandez, J. M. Lopez-Novoa & A. I. Morales: Increased urinary excretion of albumin, hemopexin, transferrin and VDBP correlates with chronic sensitization to gentamicin nephrotoxicity in rats. *Toxicology* 2013, **304**, 83-91.
- Vicente-Vicente, L., F. Sanchez-Juanes, O. Garcia-Sanchez, V. Blanco-Goza, M. Pescador, M. A. Sevilla, J. M. Gonzalez-Buitrago, F. J. Lopez-Hernandez, J. M. Lopez-Novoa & A. I. Morales: Sub-nephrotoxic cisplatin sensitizes rats to acute renal failure and increases urinary excretion of fumarylacetoacetase. *Toxicol Lett* 2015, **234**, 99-109.
- Vio, C. P., M. Quiroz-Munoz, C. A. Cuevas, C. Cespedes & N. R. Ferreri: Prostaglandin E2 EP3 receptor regulates cyclooxygenase-2 expression in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012, **303**, F449-57.
- Vnukov, V. V., R. V. Sidorov, N. P. Milutina, A. A. Ananyan, D. Y. Gvaldin, A. B. Sagakyants, I. F. Shlyk & E. P. Talalaev: [Concentration of proinflammatory cytokines, peroxiredoxin-1 and glutathione peroxidase activity in the blood plasma of patients with coronary artery disease undergoing coronary artery bypass grafting]. *Adv Gerontol* 2017, **30**, 269-275.
- Vogt, L., G. D. Laverman & G. Navis: Time for a comeback of NSAIDs in proteinuric chronic kidney disease? *Neth J Med* 2010, **68**, 400-7.

Wald, D. S., M. Law, J. K. Morris, J. P. Bestwick & N. J. Wald: Combination therapy versus monotherapy in reducing blood pressure: meta-analysis on 11,000 participants from 42 trials. *Am J Med* 2009, **122**, 290-300.

Weir, M. R.: Effects of renin-angiotensin system inhibition on end-organ protection: can we do better? *Clin Ther* 2007, **29**, 1803-24.

Wendeler, M., N. Werth, T. Maier, G. Schwarzmann, T. Kolter, M. Schoeniger, D. Hoffmann, T. Lemm, W. Saenger & K. Sandhoff: The enzyme-binding region of human GM2-activator protein. *Febs J* 2006, **273**, 982-91.

Westenfeld, R., W. Jahnen-Dechent & M. Ketteler: Vascular calcification and fetuin-A deficiency in chronic kidney disease. *Trends Cardiovasc Med* 2007, **17**, 124-8.

Westenfelder, C.: Earlier diagnosis of acute kidney injury awaits effective therapy. *Kidney Int* 2011, **79**, 1159-61.

Whelton, A. & C. W. Hamilton: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: effects on kidney function. *J Clin Pharmacol* 1991, **31**, 588-98.

Wilson, T. W., A. H. Badahman & R. D. Kaushal: Thromboxane synthase inhibition enhances furosemide-induced renal vasodilation. *Clin Invest Med* 1993, **16**, 372-8.

Wolf, G.: Renal injury due to renin-angiotensin-aldosterone system activation of the transforming growth factor-beta pathway. *Kidney Int* 2006, **70**, 1914-9.

Woodson, B. W., L. Wang, S. Mandava & B. R. Lee: Urinary cystatin C and NGAL as early biomarkers for assessment of renal ischemia-reperfusion injury: a serum marker to replace creatinine? *J Endourol* 2013, **27**, 1510-5.

Woreta, T. A. & S. A. Alqahtani: Evaluation of abnormal liver tests. *Med Clin North Am* 2014, **98**, 1-16.

Wu, X., W. Zhang, H. Ren, X. Chen, J. Xie & N. Chen: Diuretics associated acute kidney injury: clinical and pathological analysis. *Ren Fail* 2014, **36**, 1051-5.

Yanai, H., H. Yoshida, Y. Tomono, N. Tada & H. Chiba: The possible contribution of a general glycosphingolipid transporter, GM2 activator protein, to atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2006, **13**, 281-5.

Yang, T.: Crosstalk between (Pro)renin receptor and COX-2 in the renal medulla during angiotensin II-induced hypertension. *Curr Opin Pharmacol* 2015, **21**, 89-94.

Zadrazil, J.: [Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the kidney]. *Vnitr Lek* 2006, **52**, 686-90.

Zager, R. A., A. C. Johnson & K. Becker: Renal cortical hemopexin accumulation in response to acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012, **303**, F1460-72.

BIBLIOGRAFÍA

Zhang, M. Z., B. Yao, H. F. Cheng, S. W. Wang, T. Inagami & R. C. Harris: Renal cortical cyclooxygenase 2 expression is differentially regulated by angiotensin II AT(1) and AT(2) receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**, 16045-50.

