



TESIS DOCTORAL

Biomarcadores urinarios para la identificación de las secuelas subclínicas del daño renal agudo y de su recuperación

Memoria presentada por Cristina Cuesta Apausa
para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Mención “Doctor Internacional”

Cristina Cuesta Apausa

Salamanca a 27 de septiembre de 2018

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 graduada en Farmacia Dña. Cristina Cuesta Apausa para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, con el título: **“Biomarcadores urinarios para la identificación de las secuelas subclínicas del daño renal agudo y de su recuperación”** ha sido realizado bajo de la dirección de Prof. Dr. Carlos Martínez Salgado; de la Prof. Dra. Isabel Fuentes Calvo y del Prof. Dr. Francisco J. López Hernández, en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expido y certifico el siguiente certificado, en Salamanca a 24 de julio de 2018.

EL **DR. CARLOS MARTÍNEZ SALGADO**, INVESTIGADOR DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE SALAMANCA (IBSAL) Y PROFESOR DE FISIOLÓGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA; LA **DRA. ISABEL FUENTES CALVO**, PROFESORA DE FISIOLÓGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA; Y EL **DR. FRANCISCO J. LÓPEZ HERNÁNDEZ**, INVESTIGADOR DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE SALAMANCA (IBSAL) Y PROFESOR DE FISIOLÓGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo, titulado **“Biomarcadores urinarios para la identificación de las secuelas subclínicas de DRA y de su recuperación”** presentado por la Graduada en Farmacia Dña. Cristina Cuesta Apausa, ha sido realizado bajo su dirección en el Área de Fisiología del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca, consideran que cumple con las condiciones necesarias y autorizan su presentación con el fin de que pueda ser defendido ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expide y firma el presente certificado, en Salamanca a 24 de julio de 2018.

Fdo. Dr. Carlos Martínez Salgado

Fdo. Dra Isabel Fuentes Calvo

Fdo. Dr. Francisco J. López Hernández

Esta Tesis Doctoral ha sido financiada por los siguientes organismos:

- Instituto de Salud Carlos III, expediente PI12/00959, cofinanciado con cargo a Fondos *FEDER*.
- Instituto de Salud Carlos III, expediente PI15/01055, cofinanciado con cargo a Fondos *FEDER*.
- Red de Investigación Renal (RedinRen), expediente RD012/0021/0032, cofinanciado con cargo a Fondos *FEDER*.
- Red de Investigación Renal (RedinRen), expediente RD016/0009/0025, cofinanciado con cargo a Fondos *FEDER*.
- Junta de Castilla y León, Consejería de Sanidad, expediente BIO/SA87/13.
- Fundación Mutua Madrileña, IX Convocatoria de Becas y Ayudas a la Investigación Médica.
- Universidad de Salamanca, financiación para grupos de investigación reconocidos (GIR)

La doctoranda ha sido financiada por un Contrato de Personal Investigador de Reciente Titulación Universitaria (PIRTU) de la Junta de Castilla y León (orden EDU/1083/2013, de 27 de diciembre) y por una ayuda de la Organización Europea de Biología Molecular (EMBO short-term fellowship) durante su estancia en Amberes (Bélgica).

A mi familia

ÍNDICES

ÍNDICES	III
ABREVIATURAS	XII
INTRODUCCIÓN	1
1. EL SISTEMA RENAL	5
1.1 Estructura del riñón	5
1.2 Descripción anatómica	6
1.3 Procesos renales.....	7
2. EL DAÑO RENAL AGUDO	8
2.1 Repercusión clínica y socioeconómica	9
2.2 El diagnóstico del DRA.....	10
2.2.1 Criterios diagnósticos	10
- Criterio RIFLE	10
- Criterio AKIN	11
- Criterio KDIGO	11
2.2.2 Problemas en el diagnóstico	12
- Limitaciones de la CrP.....	12
- Limitaciones de la TFG	13
2.3 Tipos de DRA.....	14
2.3.1 El DRA pre-renal	14
2.3.2 El DRA post-renal.....	14
2.3.3 El DRA renal o intrínseco	15
2.4 El DRA inducido por cisplatino	16
2.5 La necrosis tubular aguda	17
2.5.1 Fases de la NTA	18

3.	LA RECUPERACIÓN DEL DRA	20
3.1	La reparación renal	20
3.1.1	El proceso de reparación renal	21
3.1.2	Mecanismos de mala reparación	25
-	Parada del ciclo celular	25
-	Activación de miofibroblastos	25
-	Inflamación persistente	26
4.	LA ENFERMEDAD RENAL AGUDA	28
4.1	Definición y estadios.....	28
4.2	La ERA subclínica	29
5.	HERRAMIENTAS DIAGNÓSTICAS DE RECUPERACIÓN DE UN DRA	31
	OBJETIVOS.....	35
	MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
1.	MATERIALES	43
2.	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	43
2.1	Mantenimiento y manipulación de los animales.....	43
2.2	Modelos experimentales	44
2.2.1	Modelo experimental 1: Daño renal agudo (DRA).....	44
-	Diseño experimental	44
2.2.2	Modelo animal experimental 2: Evaluación del riesgo funcional.....	47
-	Diseño experimental.....	48
3.	TÉCNICAS EXPERIMENTALES IN VIVO	52
3.1	Recogida de orina de 24 horas: jaulas metabólicas	52
3.2	Extracción de sangre y obtención del plasma	53

3.3	Perfusión y recogida de órganos.....	53
4.	DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS	54
4.1	Medida de creatinina en plasma y orina. Cálculo del aclaramiento de creatinina.....	54
4.2	Medida de la concentración de proteínas en orina	56
4.3	Medida de Na ⁺ en orina y plasma.....	57
4.4	Determinación de la fracción excretada de glucosa	58
	- Medida de la glucosa en plasma	58
	- Medida de la glucosa en orina.....	59
5.	IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE LA TÉCNICA <i>WESTERN BLOT</i>	59
5.1	Preparación de las muestras, electroforesis y transferencia	60
5.2	Bloqueo e incubación con los anticuerpos	61
5.3	Revelado	61
5.4	Normalización de datos.....	62
6.	ELISA	63
7.	ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA: PCR A TIEMPO REAL	66
7.1	Extracción de ARN del tejido renal	66
7.2	Obtención de ADNc.....	67
7.3	Diseño de los cebadores	68
7.4	PCR a tiempo real.....	69
8.	ANÁLISIS HISTOLÓGICO	70
8.1	Tinción hematoxilina-eosina.....	70
8.2	Tinción con ácido peryódico y reactivo de Schiff (PAS)	72
8.3	Tinción inmunohistoquímica de Ki67	73
9.	TRATAMIENTO DE LOS DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	74

10. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS.....	75
10.1 Tabla 11: Relación de reactivos y productos utilizados	75
10.2 Tabla 12: Relación de equipos y aparatos utilizados	77
10.3 Tabla 13: Programas informáticos utilizados	78
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	81
1. CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN RENAL	83
1.1 Determinación de los niveles de creatinina plasmática	83
1.2 Determinación del aclaramiento de creatinina y de la proteinuria	85
2. ESTUDIO DE LAS SECUELAS ESTRUCTURALES SUBCLÍNICAS	87
2.1 Evaluación de la estructura renal mediante la tinción con hematoxilina-eosina	87
2.2 Evaluación del borde en cepillo y la membrana basal mediante la	
tinción con PAS.....	90
2.3 Evaluación de la proliferación celular mediante tinción inmunohistoquímica	
de Ki67	94
3. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN TUBULAR.....	97
3.1 Evaluación de la excreción fraccional de sodio y glucosa	97
4. EVALUACIÓN DEL RIESGO FUNCIONAL	99
DISCUSIÓN FINAL.....	109
CONCLUSIONES.....	111
BIBLIOGRAFÍA.....	113
SUMMARY.....	127

MATERIAL SUPLEMENTARIO.....141

Parte del contenido no está aún disponible para su lectura debido a que se encuentra en trámites de solicitud de patente.

Será publicado una vez obtenida la autorización pertinente

ÍNDICE DE FIGURAS

Parte del contenido no está aún disponible para su lectura debido a que se encuentra en trámites de solicitud de patente.

Será publicado una vez obtenida la autorización pertinente

ÍNDICE DE TABLAS

El resto del contenido no está aún disponible para su lectura debido a que se encuentra en trámites de solicitud de patente.

Será publicado una vez obtenida la autorización pertinente

ABREVIATURAS

4PL	Del inglés <i>Four parametric logistic</i>
ADQI	Iniciativa para la Calidad de la Diálisis Aguda (del inglés <i>acute dialysis quality initiative</i>)
ADNc	ADN complementario
AKIN	Red de lesión renal aguda (del inglés <i>Acute Kidney Injury Network</i>)
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
B	Basal
BSA	Albúmina de suero bovino (del inglés <i>bovine serum albumin</i>)
BUN	Nitrógeno ureico plasmático (del inglés <i>blood urea nitrogen</i>)
Cispl	Cisplatino
ClCr	Aclaramiento de creatinina
ConcP	Concentración plasmática
CrP	Creatinina plasmática
CrU	Creatinina urinaria
CT	Control
c.s.p	Cantidad suficiente para
D4	Día de máximo daño renal
DAMPS	Patrones moleculares asociados a daño (del inglés <i>damage associated molecular patterns</i>)
DRA	Daño renal agudo
DO	Densidad óptica
EEM	Error estándar de la media
EFGl_c	Excreción fraccional de glucosa
EFNa	Excreción fraccional de sodio
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción enzimática (del inglés <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)
ERA	Enfermedad renal aguda (en inglés <i>acute kidney disease</i> , AKD)
ERC	Enfermedad renal crónica
ESRD	Fallo irreversible de la función renal (del inglés <i>end-stage renal disease</i>)

FRA	Fallo renal agudo
FU	Flujo urinario
GlcP	Glucosa plasmática
GlcU	Glucosa urinaria
HRP	Peroxidasa de rábano picante (del inglés <i>horseradish peroxidase</i>)
kDa	Kilodalton
i.p	Intraperitoneal
KDIGO	Del inglés <i>Kidney disease: improving global outcomes</i>
MDRD	Del inglés <i>modification of diet in renal disease</i>
MEC	Matriz extracelular
NaCl	Cloruro sódico
NaOH	Hidróxido sódico
NaP	Sodio plasmático
NaU	Sodio urinario
NTA	Necrosis tubular aguda
PAS	Ácido peryódico de Schiff (del inglés <i>periodic acid–Schiff</i>)
pb	Pares de bases
PBS	Salino con tampón fosfato (del inglés <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>polimerase chain reaction</i>)
PPRs	Receptores de reconocimiento de patrones (del inglés <i>Pattern Recognition Receptor</i>)
PVDF	Difluoruro de polivinilideno (del inglés <i>polyvinylidene fluoridide</i>)
q-PCR	PCR cuantitativa
R0	Día en que los animales recuperan la función renal
R1	1 semana después de que los animales recuperen la función renal
R2	2 semanas después de que los animales recuperen la función renal

R3	3 semanas después de que los animales recuperen la función renal
R4	4 semanas después de que los animales recuperen la función renal
RFR	Reserva funcional renal
RPC	Células progenitoras renales (del inglés <i>renal progenitor cells</i>)
r.p.m	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
SDS	Dodecil sulfato sódico (del inglés <i>sodium dodecyl sulphate</i>)
SDS-PAGE	Del inglés <i>Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEA	Servicio de experimentación animal
STCs	Células tubulares diseminadas (del inglés <i>scattered tubular cells</i>)
TCA	Ácido trifluoroacético (del inglés <i>trifluoroacetic acid</i>)
TFG	Tasa de filtración glomerular
TLR	Receptor tipo Toll (del inglés <i>toll-like receptor</i>)
TRS	Terapia renal sustitutiva
UCI	Unidad de cuidados intensivos
UU.AA	Unidades arbitrarias

*“Después de todo, ¿qué es un científico entonces?
Es un Hombre curioso que mira a través del ojo de una cerradura,
la cerradura de la naturaleza, tratando de saber qué es lo que sucede.”*

Jacques Yves Cousteau

INTRODUCCIÓN

El daño renal agudo (DRA) es un síndrome de gravedad clínica en el que se produce un deterioro brusco de la función excretora renal. Supone un problema de salud pública dada su alta incidencia, las elevadas tasas de morbi-mortalidad asociadas y el coste que supone para los sistemas de salud. Se estima que el DRA es responsable de 1,7 millones de muertes anuales en todo el mundo (Zuk y Bonventre, 2016). Además, su incidencia, lejos de reducirse, se ha incrementado en la última década. El aumento de la incidencia se puede atribuir a distintos factores, algunos asociados a las características de la población, como el aumento en la esperanza de vida, o el aumento de la prevalencia de comorbilidades como la hipertensión o la diabetes (Negi y cols., 2018). El DRA fue considerado durante muchos años como un episodio aislado, un evento completamente reversible en los pacientes que se recuperaban funcionalmente, dada la gran capacidad de los túbulos para regenerarse (Lombardi y cols., 2016). Actualmente este concepto ha quedado descartado y el DRA es considerado un factor de riesgo para el desarrollo de eventos adversos en el futuro, como riesgo de desarrollar enfermedad renal crónica (ERC), enfermedad renal terminal, mortalidad prematura, y eventos adversos no renales, como enfermedades cardiovasculares (Rangaswamy y Sud, 2018).

Los riñones, al contrario que otros órganos como el corazón o el cerebro, tienen la capacidad de regenerarse por completo tras un daño (Bonventre, 2003). La regeneración renal implica una serie de procesos, tanto a nivel celular como molecular, resultando un mecanismo complejo. Las células epiteliales supervivientes se desdiferencian, migran a las áreas desnudas de la membrana basal, proliferan y se rediferencian, restaurando el epitelio y la función renal (Kramann y cols., 2015). Cuando los mecanismos de reparación se alteran y no se regulan correctamente, dan lugar a una reparación incompleta y defectuosa que se asocia al desarrollo de eventos renales adversos.

Los criterios RIFLE, AKIN y KDIGO han establecido una definición consensuada y unificada de DRA, sin embargo, no existe una definición estandarizada de recuperación, a pesar de que se conoce la importancia de evaluar el período posterior a un DRA (Gaião y Paiva, 2017). En el año 2004, la Iniciativa para la Calidad de la Diálisis Aguda (conocida como ADQI, de sus siglas en inglés *Acute Dialysis Quality Initiative*) propuso una definición de recuperación basada en los niveles de creatinina plasmática (CrP) (Bellomo

y cols., 2004). Sin embargo, el hecho de que el DRA se haya asociado al desarrollo de eventos adversos a largo plazo en pacientes en los que se habían normalizado los valores de CrP, pone de manifiesto sus limitaciones para el diagnóstico de la recuperación. En este punto es en el que se centra este trabajo de investigación. Planteamos que una vez la CrP ha vuelto a valores basales tras un DRA, existen aún en el riñón alteraciones estructurales que suponen un riesgo para el desarrollo de nuevos eventos renales y que podemos identificar biomarcadores que sean capaces de diagnosticar de una manera más sensible y específica que la creatinina las alteraciones renales subclínicas asociadas al período posterior a un DRA. Poder conocer en qué pacientes la regeneración renal ha sido completa y en cuáles queda un daño renal remanente es fundamental para que los clínicos puedan llevar a cabo un seguimiento adecuado de los pacientes tanto recuperados como no recuperados.

1. EL SISTEMA RENAL

El sistema renal o aparato excretor está constituido por los riñones, los uréteres, la vejiga y la uretra. Sus principales funciones son (Guyton y Hall, 2011; Jones, 2013):

- Función excretora: los riñones son los responsables del filtrado de agua y de los solutos que son transportados en sangre, lo que permite retirar del organismo sustancias de desecho, ya sean metabolitos o productos extraños como fármacos o tóxicos. Las sustancias de desecho son excretadas en orina, mientras que aquellas que se han filtrado y son necesarias para el organismo vuelven a la sangre.
- Función reguladora: el sistema renal regula los equilibrios hídrico, electrolítico, y ácido-base. Los riñones son fundamentales en el mantenimiento de la homeostasis. Esta función se logra mediante el control de la eliminación de agua y electrolitos en función de las necesidades del organismo, y mediante la eliminación de ácidos (como el ácido sulfúrico o el ácido fosfórico, procedentes del metabolismo de las proteínas y que solo se eliminan vía renal). Además, los riñones juegan un papel primordial en la regulación de la presión arterial a largo plazo mediante la regulación de los niveles de agua y sodio.
- Función endocrina y metabólica: los riñones participan en la síntesis de renina (que participa en la regulación a corto plazo de la presión arterial), eritropoyetina, prostaglandinas, vitamina D3 y glucosa, entre otros.

1.1 Estructura del riñón

La nefrona es la unidad funcional del riñón. En el ser humano cada riñón está formado por un millón de nefronas, aproximadamente. Cada nefrona consta de dos partes principales (Guyton y Hall, 2011; Robledo-Villegas y Builes, 2006):

- Corpúsculo renal: Es la estructura donde se produce el proceso de filtración. Está compuesto por el glomérulo capilar y la cápsula de Bowman que lo recubre. El glomérulo es una red enrollada y compacta de capilares sanguíneos que derivan de una arteriola aferente y confluyen en una arteriola eferente. La pared de estos

capilares presenta poros, lo cual los hace muy permeables al paso de diversas moléculas. La cápsula de Bowman es una estructura de doble pared que rodea al glomérulo, a partir de la cual nacen los túbulos renales.

- Sistema tubular: está formado por el túbulo proximal, el asa de Henle, el túbulo contorneado distal y el túbulo colector. La pared de los túbulos está constituida por una sola capa de células epiteliales que descansan sobre una membrana basal. En el túbulo proximal, las células epiteliales tienen forma cúbica y numerosas microvellosidades que en conjunto forman el borde en cepillo. La estructura y función de las células epiteliales tubulares varía mucho de un segmento a otro del túbulo ya que este epitelio es el encargado de reabsorber y secretar de forma selectiva los distintos compuestos.

1.2 Descripción anatómica

En un corte longitudinal a través del riñón se distinguen las siguientes estructuras (Guyton y Hall, 2011; Robledo-Villegas y Builes, 2006):

- Cápsula renal: Membrana fibrosa de color blanquecino que recubre el riñón.
- Corteza renal: Es la región más externa del riñón, de textura lisa y color rojizo. En la corteza renal se localizan los corpúsculos renales, los túbulos contorneados distales, los túbulos contorneados proximales (porción S1 y porción S2) y parte de los segmentos gruesos del asa de Henle.
- Médula renal: Es la porción interna del riñón y está constituida por 8-10 pirámides renales o de Malpighi. La base de cada pirámide se origina en el borde entre la corteza y la médula y termina en la papila, que se proyecta en el espacio de la pelvis renal, una continuación en forma de abanico de la porción superior del uréter. El borde externo de la pelvis se divide en los cálices mayores que se extienden hacia abajo y se subdividen en los cálices menores, que recogen la orina de los túbulos de cada papila. En la médula no hay corpúsculos, solamente túbulos, principalmente el asa de Henle y los túbulos colectores.

1.3 Procesos renales

Los procesos renales que regulan la función excretora renal son la filtración, la reabsorción y la secreción.

La filtración glomerular

La filtración glomerular es el primer proceso en la formación de la orina y se produce en el corpúsculo. La mayoría de las sustancias del plasma, excepto las proteínas y los elementos celulares, se filtran libremente, de tal modo que sus concentraciones en el filtrado glomerular de la cápsula de Bowman son casi las mismas que en el plasma. La composición del filtrado se irá modificando a medida que pasa por los túbulos renales.

La reabsorción tubular

Mediante este proceso, una gran parte de las sustancias filtradas que están en el túbulo vuelven a sangre. Implica el transporte de las moléculas a través de la membrana luminal de las células tubulares, para después atravesar la membrana de la cara basal de las células y llegar hasta el líquido intersticial renal, desde donde son transportadas a través de las membranas de los capilares peritubulares hasta la sangre.

La secreción tubular

Es el proceso inverso a la reabsorción, de manera que las sustancias pasan de los capilares tubulares al lumen tubular.

La cantidad que se excreta en orina de las diferentes sustancias representa la suma de estos tres procesos renales (Guyton y Hall, 2011; Avendaño, 2009) (figura 1).

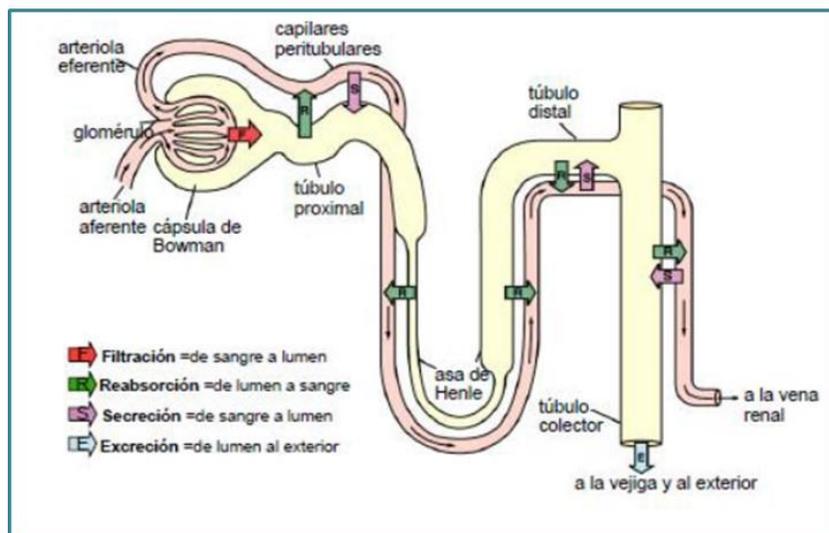


Figura 1: Procesos básicos de la función renal (Adaptado de Guyton y Hall, 2011).

2. EL DAÑO RENAL AGUDO

El daño renal agudo (DRA) es la pérdida repentina de la capacidad excretora renal, de manera que los riñones son incapaces de mantener un balance hidro-electrolítico adecuado y de depurar la sangre de fármacos, tóxicos y productos de desecho procedentes del metabolismo. Como consecuencia, se produce una retención de los fluidos (oliguria o anuria), una acumulación en la sangre de productos normalmente encontrados en la orina (uremia), como la creatinina, la urea y otros productos nitrogenados (azotemia) y trastornos en el metabolismo, como acidosis metabólica e hiperpotasemia. Finalmente, se afectan otros órganos y sistemas poniendo en riesgo la vida del paciente (Lameire, 2005; Kellum y cols., 2008). Para un funcionamiento renal adecuado se necesita una perfusión renal apropiada, un parénquima renal íntegro y una correcta permeabilidad de las vías excretoras. La alteración súbita de cualquiera de estas características puede ocasionar un deterioro de la función renal (Avenidaño, 2009).

La función renal puede normalizarse tras un DRA, si se descubre la causa subyacente del problema y se trata satisfactoriamente. El pronóstico depende fundamentalmente de la intensidad y del tipo de la lesión. En general, una lesión tisular leve o una disfunción moderada desaparecen con la retirada del agente causante, mientras que la destrucción extensa de uno o varios compartimentos renales puede requerir tratamiento con

terapia renal sustitutiva (TRS), originar una reparación deficiente e incluso un deterioro progresivo y crónico de la función renal (Rivero-Sánchez y cols., 2000).

2.1 Repercusión clínica y socioeconómica

El DRA es un problema sanitario y económico muy grave ya que es causa de una elevada morbilidad y mortalidad. La incidencia del DRA es de 20-200 casos por millón de habitantes. Se calcula que aproximadamente un 8-16 % de los pacientes que ingresan en los hospitales presentan un DRA (Sawhney y Fraser, 2017) y un 7-18 % de los pacientes ya hospitalizados lo desarrollan, cifra que se eleva hasta el 78 % en pacientes críticos. La incidencia del DRA está aumentando probablemente debido al incremento de sus factores de riesgo, como la edad, la presencia de comorbilidades (diabetes mellitus, hipertensión arterial) o al aumento de las intervenciones terapéuticas (cirugías, quimioterapia) (Chawla y cols., 2014, 2017; Negi y cols., 2018). En conjunto, la mortalidad asociada al DRA se estima en un 23,8 % en adultos y 33,7 % en niños (Susantitaphong y cols., 2013). En los pacientes ingresados en las unidades de cuidados intensivos (UCI), el DRA alcanza una tasa de mortalidad del 70 % (Negi y cols., 2018).

Además, el DRA tiene importantes consecuencias para la salud. A corto plazo, entre el 4 y el 6 % de los pacientes necesitan diálisis durante un DRA (Dennen y cols., 2010), un número que aumenta hasta el 13 % entre los pacientes de la UCI (Brochard y cols., 2010). De ellos, hasta el 7,5 % necesitará diálisis de por vida (González y cols., 2008). Además, en algunos pacientes que sufren DRA (hasta un 10 %) la función renal queda alterada de forma crónica (Schiffli, 2006). A largo plazo, el DRA está considerado un factor de riesgo para una pérdida progresiva de la función renal, con un riesgo incrementado de sufrir complicaciones renales y cardiovasculares meses o años después del episodio de DRA.

Se estima que los gastos directamente asociados al DRA son el 1 % del presupuesto sanitario total y el 5 % de los presupuestos hospitalarios totales (Chertow y cols., 2005; Vandijck y cols., 2007).

2.2 El diagnóstico del DRA

El concepto de DRA ha ido evolucionando a lo largo de los años y continúa en constante revisión. El término DRA se remonta al año 1951 cuando se denominó fallo renal agudo (FRA), sin embargo, hasta hace relativamente poco tiempo no existía consenso en los criterios diagnósticos ni en la definición clínica del DRA, coexistiendo diferentes definiciones. Actualmente existe un consenso internacional para la definición de DRA y es la que se utiliza de manera rutinaria para el diagnóstico de la enfermedad en la práctica clínica (Kellum y cols., 2012). Hoy en día se prefiere el término DRA a FRA, e implica la presencia de daño o lesión en los riñones durante un periodo de tiempo de horas o días (agudo) pero no la presencia obligatoria de disfunción renal, desplazando definitivamente la idea de que una alteración renal es solo clínicamente relevante cuando hay disminución de la función de filtración. A pesar de que el término DRA no implica necesariamente disfunción renal, su diagnóstico se basa en los cambios en la CrP y en el flujo urinario, los cuales derivan de alteraciones en la filtración glomerular e identifican por tanto más una disfunción que un daño. Recientemente se ha demostrado que el daño tubular sin disfunción glomerular está asociado con eventos adversos renales y no renales. Esta situación se conoce como DRA subclínico y pone de manifiesto la necesidad de mejorar las técnicas diagnósticas empleadas en el diagnóstico del DRA, por ejemplo, a través del uso de biomarcadores cuya aparición en sangre u orina preceda a la pérdida de la función renal (Ronco y cols., 2012).

2.2.1 Criterios diagnósticos

En el ámbito del diagnóstico, se dispone en la actualidad de varios sistemas de clasificación que permiten evaluar la función renal para diagnosticar el DRA. Son los criterios RIFLE, AKIN y KDIGO. Los tres criterios se basan en los mismos tres parámetros: cambios en los niveles plasmáticos de creatinina o en la tasa de filtración glomerular (TFG) y cambios en el flujo urinario en un período dado de tiempo.

Criterio RIFLE

En el 2004, la ADQI publicó una definición consensuada de DRA, conocida como criterio RIFLE, que divide al DRA en las siguientes categorías: riesgo (R, del inglés *risk*), daño (I,

del inglés *injury*), fallo (F, del inglés *failure*), pérdida (L, del inglés *loss*) y enfermedad renal terminal (E, del inglés *end-stage renal disease*). Esta definición establece la presencia o ausencia de DRA clínico y describe su gravedad, pero no predice la mortalidad ni los eventos adversos (tabla 1). La clasificación de los dos últimos estadios se hace en base a la duración de la pérdida de la función renal. Si está presente durante más de 4 semanas se considera L, y si está presente durante más de tres meses, E (Bellomo y cols., 2004; Ricci y cols., 2011).

Criterio AKIN

En el año 2007 el criterio RIFLE fue modificado por el grupo de expertos de daño renal agudo (AKIN, de sus siglas en inglés *acute kidney injury network*) para tratar de solventar algunos de los inconvenientes de la clasificación RIFLE (Mehta y cols., 2007). En esta clasificación se reemplazan las categorías Risk, Injury y Failure por los estadios 1, 2 y 3 respectivamente y se eliminan las categorías Loss y End-stage renal disease (tabla 1).

Criterio KDIGO

La guía KDIGO trata sobre el manejo de la enfermedad renal y fue desarrollada por el consorcio que lleva su mismo nombre (del inglés *Kidney Disease: Improving Global Outcomes*). Esta guía resume los dos criterios anteriores y define el DRA como cualquiera de las situaciones recogidas en la tabla 1 (Kellum y cols., 2012; Antón-Gamero y Fernández-Escribano, 2014).

Creatinina plasmática/Aclaramiento de creatinina				Diuresis
Estadio	RIFLE (2004)	AKIN (2007)	KDIGO (2012)	RIFLE/AKIN/KDIGO
1 (R)	CrP x 1,5 veces el basal o disminución ClCr > 25 %.	CrP x 1,5-2 veces el basal o incremento de CrP > 0,3 mg/dL.	CrP x 1,5-1,9 veces el basal o incremento de CrP > 0,3 mg/dL en 48 horas	Diuresis < 0,5 mL/kg/hora x 6-12 horas
2 (I)	CrP x 2 veces el basal o disminución ClCr > 50 %.	CrP ≥ 2-3 veces el basal	CrP ≥ 2-2,9 veces el basal	Diuresis < 0,5 mL/kg/hora x 12 horas
3 (F)	CrP x 3 veces el basal o CrP > 4 mg/dL o incremento > 0,5 mg/dL o disminución ClCr > 75 %.	CrP > 3 veces el valor basal o CrP ≥ 4 mg/dL con un incremento de al menos 0,5 mg/dL o necesidad de diálisis	CrP > 3 veces el valor basal o CrP ≥ 4 mg/dL o necesidad de diálisis	Diuresis < 0,3 mL/kg/hora x 24 horas o anuria x 12 horas

Tabla 1: Criterios RIFLE, AKIN y KDIGO para el diagnóstico del DRA. (CrP: creatinina plasmática; ClCr: aclaramiento de creatinina) (Adaptado de Antón Gamero y Fernández Escribano, 2014).

2.2.2 Problemas en el diagnóstico

El diagnóstico del DRA se basa, principalmente, en la medida de la CrP y la TFG, cuya principal limitación es que no pueden detectar el DRA en su etapa temprana. Las elevadas tasas de morbi-mortalidad asociadas al DRA, ponen de manifiesto que su diagnóstico no se está llevando a cabo de la manera adecuada.

Limitaciones de la CrP

Es el marcador más utilizado para evaluar la función renal. La creatinina es un compuesto derivado principalmente del metabolismo del músculo esquelético y la ingesta de carne. Se libera al plasma a un ritmo relativamente constante, tras lo cual, se filtra en el glomérulo y no es reabsorbida ni metabolizada por el riñón. Por estas razones, el valor de creatinina en plasma se utiliza, aplicando ecuaciones matemáticas, como estimador de la TFG asumiendo en general una relación inversa entre ambos

parámetros, de manera que un aumento en el valor de CrP se asocia con un descenso en la TFG y viceversa.

Sin embargo, la creatinina tiene importantes limitaciones a la hora de evaluar la función renal: sus concentraciones plasmáticas se modifican en varias situaciones fisiológicas y fisiopatológicas (como la cetoacidosis o las alteraciones neuromusculares) y puede estar influida por varios factores como la edad, la raza, el género, el estado nutricional, o el peso corporal. Además, sus niveles no aumentan durante las fases tempranas del DRA, ya que se requiere que al menos se haya perdido el 50% de las nefronas para que haya cambios en la TFG, y por tanto en los niveles de CrP. Otro inconveniente es que un porcentaje de la creatinina se secreta, lo que puede dar lugar a una sobreestimación de la TFG (Hart, 2005; Rossaint y Zarbock, 2016).

Limitaciones de la TFG

La TFG es la cantidad de plasma filtrada en el glomérulo en un período dado de tiempo, es un indicador por tanto de la función renal (Molitoris y Reilly, 2016). En la práctica clínica las técnicas para calcular la TFG son invasivas y suponen un gran consumo de tiempo, por lo que se lleva a cabo una estimación aplicando, fundamentalmente, dos ecuaciones:

- La ecuación de Cockcroft y Gault que estima la TFG en base a la CrP (Cockcroft y Gault, 1976).
- La ecuación de Levey o fórmula MDRD (*Modification of Diet in Renal Disease*) que estima la TFG en base también a la CrP, y que tiene además en cuenta el sexo y la raza (Levey y cols., 1999).

Sin embargo, estas ecuaciones pueden aplicarse únicamente en pacientes con una función renal alterada de manera estable o crónica. En el DRA, por su parte, el descenso en la TFG se produce de forma brusca pero como ya se ha mencionado, se necesita un intervalo de tiempo mayor para que la CrP comience a acumularse en plasma (Urbschat y cols., 2011).

2.3 Tipos de DRA

En función del mecanismo que desencadene el DRA, éste se clasifica en pre-renal, renal o post-renal (figura 2). Es frecuente observar que la etiología del DRA es multifactorial y que un mismo agente nocivo produzca simultáneamente efectos pre-renales y renales (Esteller y Cordero, 1998; Singri y cols., 2003).

2.3.1 El DRA pre-renal

Se considera DRA pre-renal o azotemia pre-renal a una disfunción renal transitoria producida por una reducción de la perfusión renal o una alteración de la autorregulación renal que conduce a una disminución de la TFG, sin daño en las estructuras renales (Lameire, 2005). Es la forma más frecuente de DRA, suponiendo entre el 55 y 60 % de los casos.

Entre las causas de DRA pre-renal están: disminución del volumen extracelular (deshidratación, hemorragias, vómitos, diarreas ...), disminución del gasto cardíaco (shock cardiogénico, infarto agudo de miocardio, valvulopatías, arritmia...), vasodilatación periférica (shock anafiláctico, sepsis, fármacos vasodilatadores), vasoconstricción renal (sepsis, hipercalcemia, síndrome hepatorenal...) y tratamientos farmacológicos (antiinflamatorios no esteroideos o los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina) (Singri y cols., 2003; Guyton y Hall, 2011; Arias-Rodríguez y cols., 2013).

2.3.2 El DRA post-renal

Esta forma de DRA es consecuencia de la obstrucción del flujo de orina y es la responsable al menos del 5 % de los casos. La causa puede ser un aumento del tamaño de la próstata, la formación de cálculos renales, tumores o traumatismos de la vejiga y de las vías urinarias. Dado que un solo riñón posee la capacidad de depuración suficiente para excretar los productos de desecho, para que se produzca este tipo de DRA es necesario que exista una obstrucción en la uretra, en ambos uréteres o una obstrucción unilateral en un paciente monorreno.

El mecanismo principal que conduce al DRA post-renal es la hipertensión retrógrada, de modo que, por causa de la obstrucción, aumenta la presión en las vías urinarias, la cual es transmitida hacia las zonas más proximales del riñón donde se produce un aumento de la presión hidrostática en el espacio de Bowman, que disminuye el gradiente de presión de filtración y, con ello, la tasa de filtración glomerular (Esteller y Cordero, 1998; Rivero-Sánchez y cols., 2000).

2.3.3 El DRA renal o intrínseco

Se produce por una lesión de cualquiera de las estructuras renales: glomérulos, túbulos, intersticio o vasos. Supone el 25 % de todos los casos de DRA (Avendaño, 2009).

El DRA intrínseco puede dividirse en función de la parte de la estructura renal afectada: (i) cuadros que lesionan los capilares glomerulares u otros pequeños vasos renales; (ii) procesos que lesionan los glomérulos, (iii) procesos que lesionan el epitelio tubular renal y (iv) procesos que producen lesiones del intersticio renal. Esta clasificación se refiere a la localización primaria de la lesión, pero debido a que la vascularización renal y el sistema tubular son funcionalmente interdependientes, la lesión de los vasos sanguíneos puede llegar a producir una lesión tubular y la lesión primaria de los túbulos puede a su vez producir una lesión de los vasos sanguíneos (Guyton y Hall, 2011).

El DRA intrínseco más común es la necrosis tubular aguda (NTA), donde la lesión primaria se produce en el epitelio tubular. La NTA se caracteriza por la destrucción de las células tubulares que conlleva la pérdida de la función excretora renal. La afección tubular asociada a la NTA resulta con frecuencia reversible y su causa puede ser un proceso isquémico renal o la exposición a tóxicos, como el cisplatino (Hanif y Ramphul, 2018).

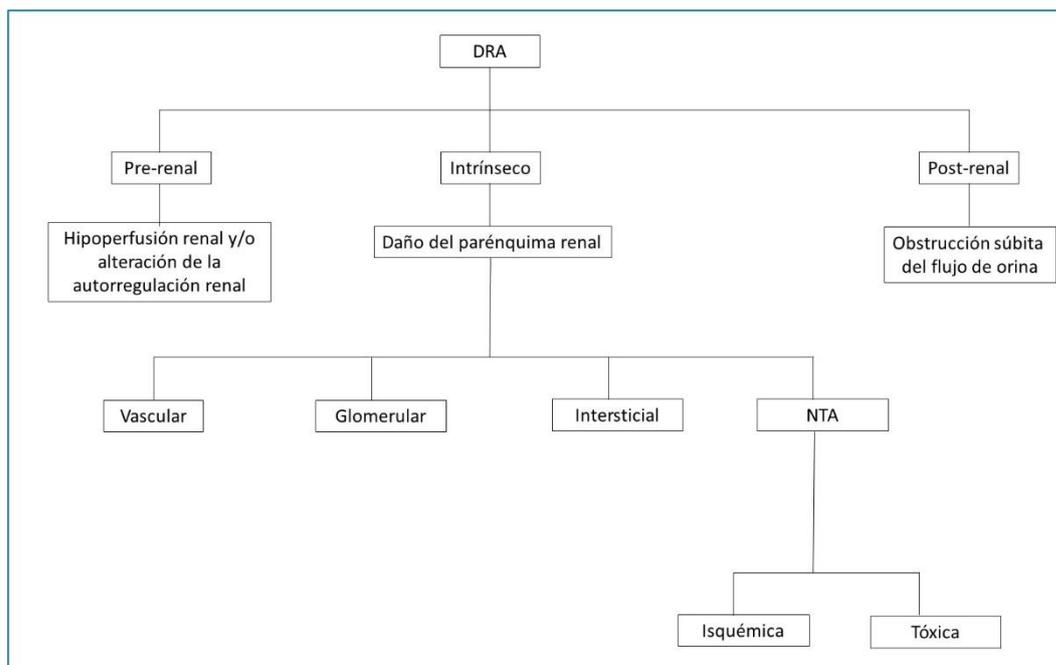


Figura 2: Tipos de daño renal agudo (DRA) y su causa. (NTA: necrosis tubular aguda). (Adaptado de Tenorio y cols., 2010).

Uno de los estímulos que puede desencadenar un DRA intrínseco es la exposición a nefrotóxicos. En este trabajo se ha utilizado un modelo de DRA que cursa con NTA inducido por cisplatino, un fármaco antineoplásico cuya nefrotoxicidad supone un efecto limitante (Miller y cols., 2010).

2.4 El DRA inducido por cisplatino

El cisplatino es un fármaco antineoplásico utilizado en el tratamiento de tumores sólidos. Su principal limitación es su nefrotoxicidad, ya que induce DRA en el 20-30 % de los pacientes tratados con una única dosis de cisplatino de 50-100 mg/m². Muestra una toxicidad dosis dependiente, y además tiene un efecto acumulativo (Madias y Harrington, 1978). A pesar de su elevada toxicidad renal, en la actualidad el cisplatino sigue siendo uno de los fármacos antineoplásicos más ampliamente utilizado por su potente eficacia antitumoral.

El inicio del DRA inducido por cisplatino ocurre días después de su administración y se caracteriza por incrementos en las concentraciones plasmáticas de creatinina y de nitrógeno ureico y una disminución de la TFG. El flujo urinario se mantiene, y se trata por tanto de un DRA no oligúrico. La recuperación de la función renal suele ocurrir entre

2 y 4 semanas después (Miller y cols., 2010), aunque en algunos pacientes la función renal queda alterada de forma crónica, especialmente tras tratamientos prolongados (Sánchez-González y cols., 2011).

El cisplatino se elimina por vía renal, por filtración glomerular y por secreción (Yao y cols., 2007). Se acumula en las células renales, principalmente del segmento S3 del túbulo proximal, a las que entra por difusión facilitada o por transporte activo a través de los transportadores: Ctr1 (transportador de cobre 1) y OCT2 (transportador de cationes orgánicos 2) (Miller y cols., 2010). Ejerce sus efectos tóxicos principalmente en dicho segmento, en la región medular externa. No obstante, en algunos casos se evidencian daños distales, e incluso lesiones en los túbulos colectores como consecuencia de un daño tubulointersticial por tratamientos prolongados con dicho fármaco (Uchida y cols., 2017).

La nefrotoxicidad asociada al cisplatino es un proceso complejo y multifactorial, induciendo daño en distintos niveles de la nefrona principalmente a nivel tubular donde induce una NTA. Además, también puede producir daño en las células del endotelio vascular, dañando principalmente pequeñas y medianas arterias; en el glomérulo, aunque a este nivel las lesiones son menos frecuentes; y en el intersticio renal, especialmente tras tratamientos prolongados (Sánchez-González y cols., 2011).

2.5 La necrosis tubular aguda

Los aspectos moleculares y celulares de la NTA se han estudiado principalmente en modelos animales. En humanos el diagnóstico de la NTA se basa en evidencias clínicas que permitan un diagnóstico diferencial (cambios en la concentración urinaria de Na^+ , su excreción fraccional, proteinuria, osmolaridad urinaria...) y no histológicas, ya que las biopsias por lo general no se practican (Lameire, 2005; Lameire y cols., 2005). Los modelos animales de NTA, cursan con muerte celular por necrosis. Sin embargo, en las biopsias de riñón humano con DRA intrínseco, rara vez se encuentra necrosis. Estas diferencias podrían explicarse porque a nivel experimental se utilizan modelos de daño de gran intensidad, como la administración de dosis elevadas de un nefrotóxico, o bien en que los datos procedentes de biopsias humanas son escasos y se pueden cometer fallos al tomar la muestra renal (Heyman y cols., 2011; Basile y cols., 2012).

Además de la necrosis, puesta de manifiesto principalmente en modelos animales, las principales alteraciones tubulares que se producen durante una NTA son:

- Desprendimiento de las células tubulares de la membrana basal, pasando al lumen tubular, pudiendo producir una obstrucción tubular. Como consecuencia, la membrana basal queda como la única barrera entre el filtrado y el intersticio peritubular. Todo ello conduce a un incremento de la presión intratubular y a un retroceso del filtrado (Lameire, 2005).
- Pérdida del borde en cepillo de las células del túbulo proximal.
- Alteraciones en la polaridad celular: Hay una redistribución de las moléculas de adhesión, como las integrinas y de las proteínas de membrana, como la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$. Estos cambios de polaridad celular explican las alteraciones de reabsorción de Na^+ , agua y otros solutos que ocurren en la NTA (Woroniecki y cols., 2003).

La NTA afecta principalmente a las células del túbulo proximal, al ser las estructuras renales más susceptibles al daño por efectuar principalmente la reabsorción isoosmótica y la secreción, y siendo por tanto el lugar donde se acumulan principalmente los tóxicos; aunque también pueden verse afectadas las células de la parte gruesa ascendente del asa de Henle. Sin embargo, las células que revisten los túbulos del conducto colector no suelen verse afectados (Sharfuddin y Molitoris, 2011).

Pero la NTA no produce daño únicamente a nivel tubular. En función de su intensidad, también se han descrito alteraciones en los glomérulos, los vasos y el intersticio, Así, durante una NTA también es frecuente observar edema intersticial, acumulación de leucocitos en el intersticio o congestión de los capilares tubulares (principalmente de la médula externa) que a su vez potencia el daño tubular (Basile y cols., 2012).

2.5.1 Fases de la NTA

La NTA se divide en las siguientes fases (figura 3) (Tenorio y cols., 2010; Basile y cols., 2012; Hanif y Ramphul, 2018):

- *Fase de iniciación*: Se caracteriza por una brusca disminución de la TFG e incremento de los niveles plasmáticos de creatinina y urea. Durante este periodo, hay

daño celular (pérdida del borde en cepillo, desprendimiento de las células al lumen tubular).

- *Fase de extensión:* Durante este período hay una respuesta inflamatoria, con liberación de citocinas y quimiocinas, y una hipoxia continuada como consecuencia de la reducción del flujo renal. Ambos eventos son más pronunciados en la unión cortico-medular y en la médula externa, donde puede haber también necrosis y apoptosis. Durante esta fase la TFG continúa disminuyendo. Las células tubulares de la corteza externa empiezan a regenerarse.

- *Fase de mantenimiento:* En esta fase se establece la reparación celular, hay apoptosis, migración y proliferación celular para recuperar la integridad tisular y funcional. La función celular mejora lentamente a medida que las células se reparan y reorganizan. Durante esta fase la TFG se estabiliza en un nivel determinado en función de la intensidad del daño inicial.

- *Fase de recuperación:* Es la continuación de la fase de mantenimiento, con diferenciación celular y restablecimiento de la polaridad celular, con una recuperación de la función renal.

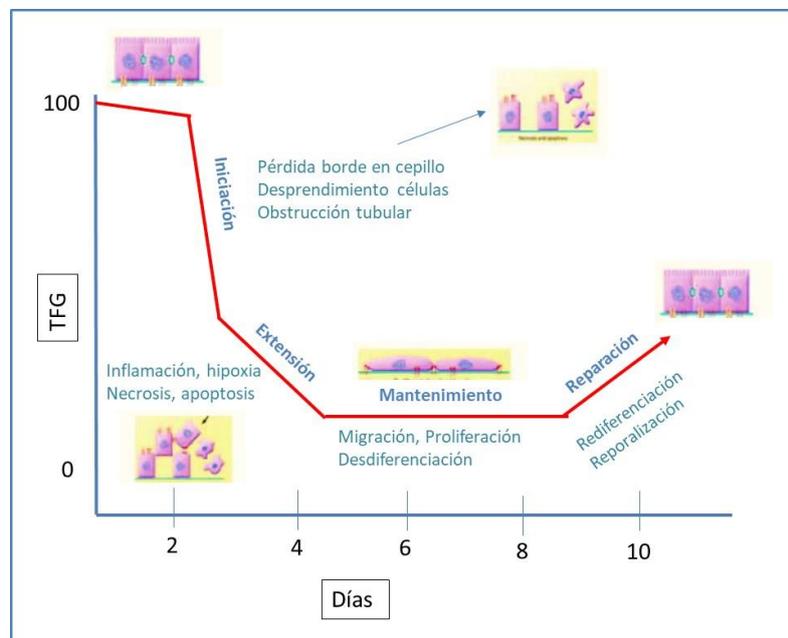


Figura 3: Fases de la NTA. (Adaptado de Tenorio y cols., 2010)

3. LA RECUPERACIÓN DEL DRA

La recuperación renal se define como la restauración de la estructura y función renal tras un episodio de DRA. Una recuperación renal completa implica la restauración de la perfusión renal, de la TFG y de la función tubular. No existe una definición consensuada ni estandarizada de recuperación, pero una definición ideal debe cuantificar cuánta masa y/o función renal se ha perdido, indicar cuándo la recuperación es completa y cuándo los mecanismos de daño se han detenido, proveer una medida de la reserva renal y proporcionar información pronóstica (Chawla y cols., 2017).

Numerosos estudios han evaluado la recuperación tras un DRA, incluidas las formas más severas, y sitúan que la recuperación completa ocurre en el 33-90 % de los casos. El uso de diferentes definiciones de DRA y de recuperación, la variabilidad de los pacientes incluidos en los estudios y las diferencias en los tiempos de evaluación de la recuperación explican esta variabilidad en las tasas de recuperación y dificultan la interpretación de los resultados. La mayoría de los estudios donde se evalúa recuperación se han llevado a cabo en pacientes con DRA grave que han requerido TRS y definen recuperación como la independencia de diálisis en el momento del alta, sin tener en cuenta la función renal en ese momento. Existen pocos estudios en los que se haya evaluado la recuperación tras casos de DRA más leves, y la mayoría se han llevado a cabo antes de que existieran los criterios RIFLE y AKIN, por lo que han definido recuperación en base a diferentes criterios (Schiffli, 2006; Macedo y cols., 2008; Forni y cols., 2017).

3.1 La reparación renal

Los riñones tienen una gran capacidad intrínseca de regeneración tras la exposición a un daño agudo, como aquellos inducidos por nefrotóxicos o procesos isquémicos y que cursan con muerte celular (Forni y cols., 2017). Al contrario que el corazón o el cerebro, el riñón tiene la capacidad de recuperarse por completo funcionalmente, especialmente tras casos leves o moderados de daño (Bonventre, 2003; Lombardi y cols., 2016).

Aunque tradicionalmente se ha considerado el DRA como un evento agudo, transitorio y reversible, con una regeneración completa de la estructura y función renal, estudios epidemiológicos realizados en los últimos años muestran una relación entre el DRA y una pérdida persistente y progresiva de la función renal con potencial para progresar a ERC y enfermedad renal terminal. Este hecho confirma que el proceso de regeneración renal no siempre es completo ni adecuado. En algunas ocasiones, los mecanismos que regulan la reparación se pueden alterar, dando lugar a alteraciones celulares y tisulares, especialmente cuando el daño es severo o prolongado, lo que supone un factor de riesgo para la progresión a ERC (figura 4) (Lombardi y cols., 2016; Zuk y Bonventre, 2016; Forni y cols., 2017).

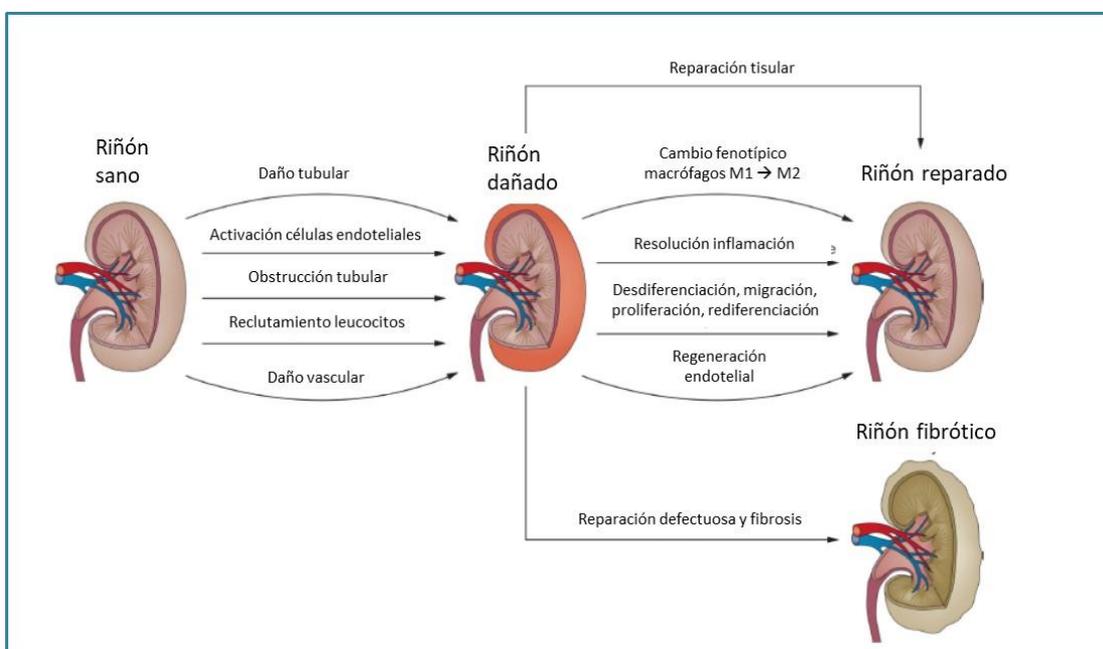


Figura 4: Resumen de los mecanismos implicados en el daño renal asociado a DRA, así como de los mecanismos de reparación. Un proceso de reparación defectuoso e incompleto conduce al desarrollo de fibrosis y finalmente a ERC (Adaptado de Ferenbach y Bonventre, 2015).

3.1.1 El proceso de reparación renal

Los procesos de reparación renal después de un episodio de DRA se han estudiado principalmente en modelos animales. Durante años, existió un extenso debate sobre el origen de las células responsables de la regeneración renal. Se ha sugerido la participación de células epiteliales tubulares supervivientes, células madre renales o células madre derivadas de la médula ósea.

Se ha descartado que las células madre derivadas de la médula ósea contribuyan de manera significativa en el proceso de regeneración. Estas células modularían dicho proceso mediante mecanismos paracrinos a través de la liberación de varios factores, ya que, aunque migran al riñón tras un daño agudo, no se diferencian en células tubulares (Duffield y cols., 2005).

Actualmente está aceptado que son las células intrarrenales las que regeneran el epitelio dañado. La regeneración renal implica la migración de las células supervivientes a áreas desnudas de la membrana basal, la proliferación para reemplazar las células perdidas y regenerar la monocapa de células epiteliales que forman los túbulos y, por último, la diferenciación celular para restaurar el fenotipo tubular epitelial normal y recuperar la funcionalidad (Nony y Schnellmann, 2003).

Sin embargo, la identidad de las células responsables de este proceso genera controversia. Por un lado, se han postulado las células epiteliales tubulares supervivientes y por otro, que existe en el riñón una población de células progenitoras intratubulares en estado quiescente, que ante un daño entrarían en el ciclo celular con el objetivo de reponer las células perdidas durante el DRA.

La teoría mayoritariamente aceptada por la comunidad científica es que la regeneración se lleva cabo a partir de las células epiteliales supervivientes. Se basa en el hecho de que las células del túbulo proximal tienen una tasa de división baja y por tanto no se requeriría una población de células madre renales. Además, las células del epitelio tubular están detenidas en fase G1 del ciclo celular, como si estuvieran preparadas para entrar en división tras un daño (Vogetseder y cols., 2008; Lombardi y cols., 2016). Durante un DRA las células epiteliales del túbulo proximal se dañan, lo que se manifiesta con alteraciones en la polaridad celular, depleción de ATP, alteraciones en el citoesqueleto, pérdida del borde en cepillo o disfunción mitocondrial. Si el daño es muy intenso, estas alteraciones llevan a la muerte celular o al desprendimiento de las células al lumen tubular. Las células epiteliales que no mueren ni se desprenden regeneran el epitelio dañado. Estas células tienen que desdiferenciarse, proceso fundamental para la posterior migración y proliferación. Finalmente, se rediferencian, recuperando el fenotipo epitelial (figura 5) (Nony y Schnellmann, 2003).

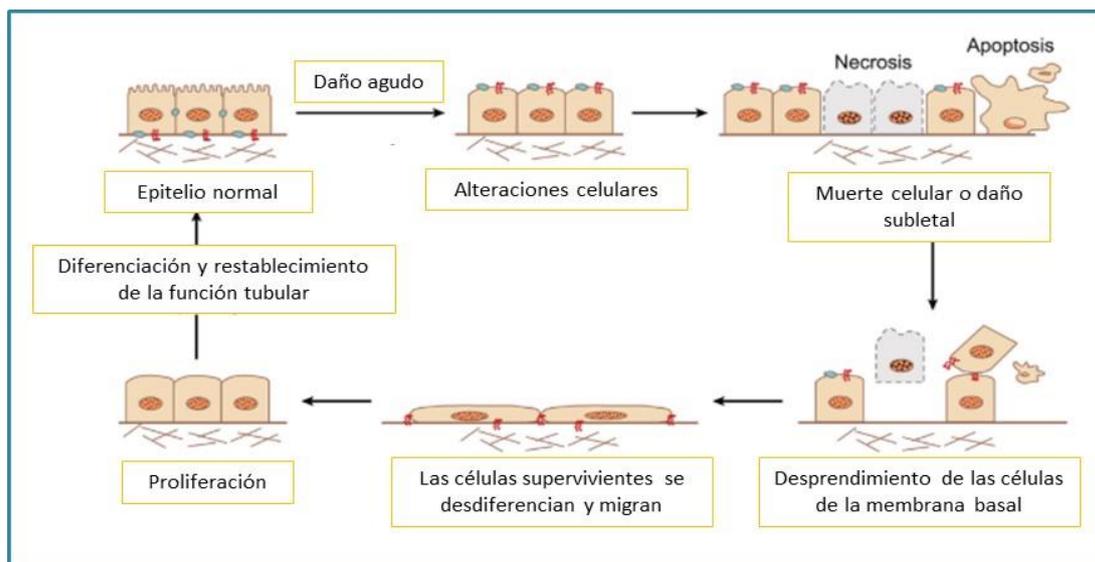


Figura 5: Representación esquemática de los procesos de daño y reparación de un DRA, donde las células tubulares epiteliales supervivientes son las responsables del proceso de regeneración (Adaptado de Ferguson, Vaidya y Bonventre, 2008).

Por otro lado, hay autores que proponen la existencia de una subpoblación de células progenitoras renales, con gran capacidad de regeneración y resistencia a la apoptosis, que serían las responsables del proceso de reparación renal. Esta teoría se basa en que en el riñón humano se han identificado células progenitoras renales (RPC, de sus siglas en inglés *renal progenitor cells*) en la cápsula de Bowman que se caracterizan por coexpresar CD133 y CD24, marcadores típicos de células madre. También se han identificado células CD133⁺ y CD24⁺ localizadas de manera dispersa a lo largo del túbulo proximal que expresan bajos niveles de marcadores epiteliales (Sagrinati y cols., 2006; Ronconi y cols., 2009).

En el año 2011 se identificó una nueva subpoblación de células tubulares, denominadas células tubulares diseminadas (STCs, de sus siglas en inglés *scattered tubular cells*), que presentaban una morfología distinta a las células epiteliales renales y estaban diseminadas de forma individual entre las células epiteliales a lo largo del túbulo proximal (figura 6). Pueden aparecer individualmente o formando dobletes o tripletes (Lindgren y cols., 2011; Berger y Moeller, 2014).

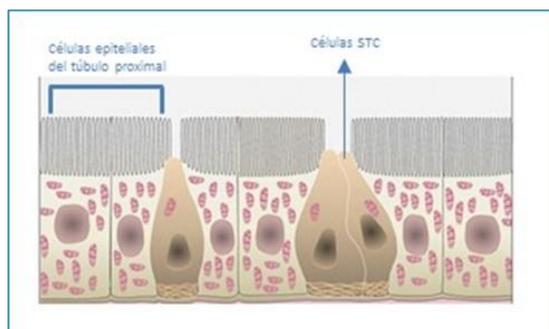


Figura 6: Ilustración de las STCs y las células epiteliales del túbulo proximal. Las STCs son más pequeñas, no tienen borde en cepillo y tienen pocas mitocondrias. Las células epiteliales son más grandes, con abundantes mitocondrias y borde en cepillo desarrollado (Adaptado de Hansson y cols., 2014).

Cuando se descubrieron se propusieron como las células responsables de la regeneración renal, apoyando la teoría de la existencia de una subpoblación de células progenitoras en el riñón. Las características que hacen que estas células sean las candidatas para reparar los túbulos después de un DRA son fundamentalmente: (i) su expresión aumenta tras un DRA, (ii) expresan antígenos similares a las células madre hematopoyéticas (CD24, CD133, vimentina), (iii) tienen mayor capacidad proliferativa. A pesar de ello, hay autores que afirman que en realidad las STCs son un fenotipo celular transitorio del proceso de reparación que aparece como respuesta a un daño, ya que este tipo celular está virtualmente ausente en riñones sanos de animales de experimentación. Además, algunos marcadores de las STCs como KIM-1 y anexina-3, son marcadores de desdiferenciación (Kramann y cols., 2015).

Ante esta controversia, algunos grupos de investigación (Humphreys y cols., 2008; Vogetseder y cols., 2008; Berger y cols., 2014; Kusaba y cols., 2014) han llevado a cabo en los últimos años estudios en animales de experimentación para determinar si las STCs son una subpoblación de células progenitoras o son un estado transitorio de desdiferenciación. Estos estudios, llevados a cabo de manera independiente, demostrarían que las STCs representan un fenotipo desdiferenciado de células epiteliales tubulares y no una subpoblación de células progenitoras pre-existente. Gracias a estos estudios, se tiende a alcanzar consenso en que son las células epiteliales supervivientes las que regeneran el epitelio dañado, para lo que se tienen que desdiferenciar, adquiriendo el fenotipo STC.

3.1.2 Mecanismos de mala reparación

Tras un DRA se pone en marcha una respuesta para regenerar el tejido dañado; sin embargo y especialmente cuando el daño es severo o prolongado, esta respuesta puede ser defectuosa dando lugar a alteraciones celulares y tisulares (Zuk y Bonventre, 2016). Una reparación defectuosa puede ocurrir a nivel tubular, vascular o intersticial y su principal consecuencia es el desarrollo de fibrosis, lo que finalmente puede conducir a la ERC. Los mecanismos implicados son, principalmente, parada del ciclo celular en la fase G2/M, activación de miofibroblastos intersticiales e inflamación persistente (Yang y cols., 2011; Ferenbach y Bonventre, 2015).

Parada del ciclo celular

Cuando las células epiteliales resultan dañadas se produce una parada del ciclo celular como mecanismo de defensa. Sin embargo, una parada del ciclo celular que se prolonga en el tiempo hace que las células adquieran un fenotipo patogénico relacionado con el desarrollo de fibrosis. En concreto, la parada del ciclo celular de las células tubulares en la fase G2/M activa la vía de señalización JNK, implicada en la producción de citoquinas profibróticas y proinflamatorias como TGF- β 1, CTGF y PDGF-B. (Bonventre, 2003; Srisawat y cols., 2014; Ferenbach y Bonventre, 2015; Zuk y Bonventre, 2016).

Activación de miofibroblastos

La aparición de un número elevado de miofibroblastos en el riñón durante el daño contribuye al depósito de colágeno y otros componentes de la matriz extracelular (MEC). Tras un daño, la principal fuente de miofibroblastos en el riñón son los pericitos renales, los cuales jugarían un papel central en el desarrollo de ERC tras un DRA. Las alteraciones epiteliales tubulares que ocurren durante un DRA, como por ejemplo las modificaciones en las uniones pericito-endotelio, pueden promover la activación y proliferación de pericitos a miofibroblastos. Las células epiteliales renales dañadas no contribuyen a la generación de miofibroblastos, pero sí participan en el proceso de fibrosis mediante la liberación de citoquinas profibrogénicas (Lelongt y Ronco, 2003; Yang y cols., 2011; Ferenbach y Bonventre, 2015; Zuk y Bonventre, 2016).

Inflamación persistente

La respuesta inflamatoria es un importante mecanismo de defensa y juega un papel crucial en la regeneración de los tejidos dañados. Una fase inflamatoria aguda y autolimitada es necesaria en la promoción de la regeneración tisular. Por el contrario, un grado de inflamación insuficiente puede suponer la destrucción del tejido por agentes dañinos, mientras que una inflamación crónica puede desencadenar fibrosis y cáncer (Rock y cols., 2010; Karin y Clevers, 2016).

Las células de la respuesta inflamatoria (principalmente macrófagos, neutrófilos, monocitos, eosinófilos, basófilos y linfocitos) participan en el proceso de reparación renal tras un DRA, sin embargo, también pueden potenciar el daño renal mediante la liberación de citocinas, quimiocinas o especies reactivas de oxígeno (figura 7). Cuando la respuesta inflamatoria es persistente y se altera su regulación, la balanza se inclina a favor de un microambiente inflamatorio perjudicial.

El papel de los macrófagos es esencial en este proceso, ya que pueden exhibir un fenotipo proinflamatorio (macrófagos M1) o reparativo (macrófagos M2). Durante el curso de un DRA existen en el riñón diferentes subpoblaciones de macrófagos, el conocimiento de los mecanismos que llevan a que prevalezca una sobre otra en los distintos momentos de la regeneración renal es fundamental para el desarrollo de terapias farmacológicas que promuevan la regeneración y reduzcan la fibrosis y la inflamación asociadas a DRA.

Otras células implicadas en este proceso son las que expresan receptores de reconocimiento de patrones (PPRs), principalmente el receptor tipo toll (TLR). Este receptor se expresa en células epiteliales renales y en células del sistema inmune. Los PPRs reconocen moléculas liberadas por las células dañadas (DAMPs, del inglés *damage-associated molecular patterns*). Los TLRs contribuyen al proceso de regeneración, pero cuando los mecanismos de regulación no son adecuados, promueven el daño y la fibrosis. Uno de los receptores más estudiados ha sido TLR4, que participa en la regeneración renal a través de la liberación de la IL-22 desde macrófagos y células dendríticas. Sin embargo, los TLRs también participan en el desarrollo de fibrosis, a través de la fosforilación de SMAD-2.

Las células dendríticas juegan también un papel importante en la respuesta inflamatoria asociada a un DRA. Por un lado, activan células T nativas, las cuales participan en el proceso de reparación renal. Por otro lado, las células dendríticas contribuyen a aumentar el daño tisular mediante la liberación de factores solubles que potencian la respuesta inflamatoria (Yang y cols., 2011; Humphreys y cols., 2016; Zuk y Bonventre, 2016; Coelho y cols., 2018).

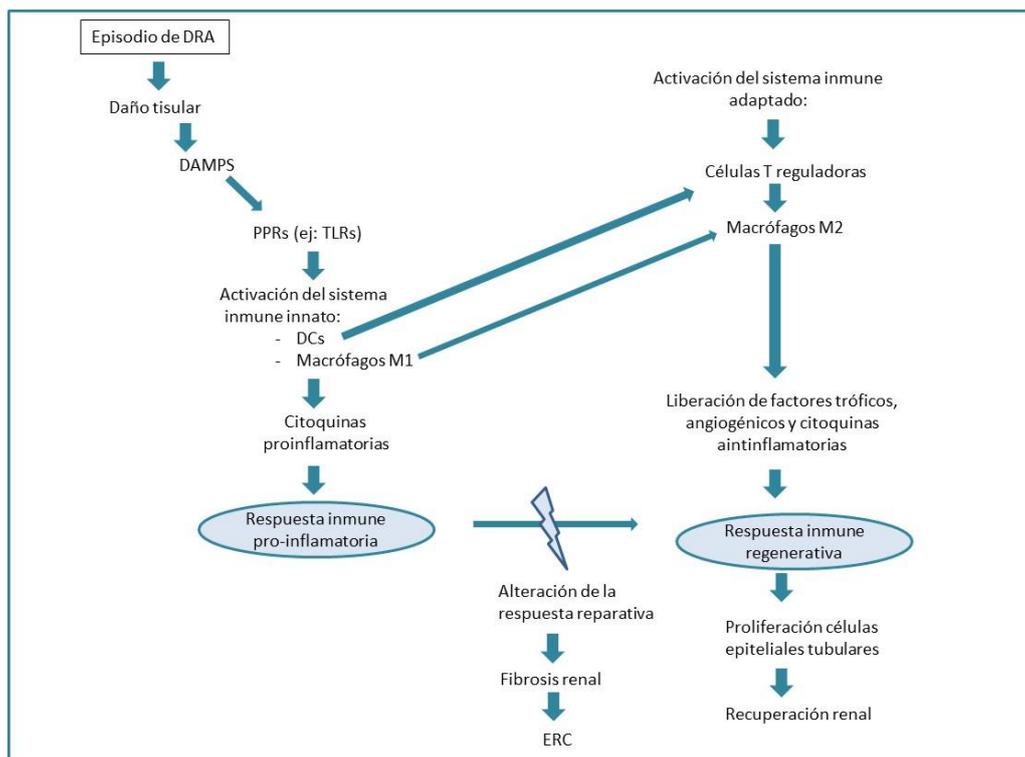


Figura 7: Esquema del papel del sistema inmune en la regeneración renal. Tras un DRA los tejidos dañados liberan DAMPs que activan la respuesta inmune innata e inician una respuesta inflamatoria. La respuesta inflamatoria tiene un mecanismo de retroalimentación positivo que genera más daño. Las moléculas que activan la respuesta inmune innata inician también la activación de la respuesta inmune adaptada y en consecuencia una respuesta que favorece la regeneración. Cuando los mecanismos de regeneración se alteran, la respuesta inflamatoria conduce al desarrollo de fibrosis y a la progresión a ERC (DRA: daño renal agudo; DAMPs: patrones moleculares asociados a daño; PPRs: receptores de reconocimiento de patrones; TLRs; receptores tipo toll; DCs: células dendríticas; ERC: enfermedad renal crónica) (Adaptado Coelho y cols., 2018).

4. LA ENFERMEDAD RENAL AGUDA

Dado que el DRA es un factor de riesgo para el desarrollo de ERC y de enfermedades cardiovasculares y está asociado a un incremento de la mortalidad, resulta fundamental definir criterios para llevar a cabo un seguimiento adecuado de los pacientes en el período posterior a un DRA. Entre el DRA y la ERC existe un vacío diagnóstico que impide conocer qué pacientes están en riesgo de sufrir eventos adversos en el futuro. Ante esta situación, en el año 2012 se propuso un nuevo término, la enfermedad renal aguda (ERA). Este término define el curso de la enfermedad tras un DRA en pacientes en los que aún existen alteraciones fisiopatológicas renales. El objetivo de este nuevo término es proporcionar una aproximación clínica integrada a los pacientes con alteraciones agudas de la función y la estructura renal (Kellum y cols., 2012; Chawla y cols., 2017).

4.1 Definición y estadios

La ERA se define como daño renal clínico o subclínico y/o pérdida de la función renal que tiene una duración de entre 7 días y 3 meses desde la exposición a la causa que indujo un DRA. Este periodo se considera crítico para llevar a cabo intervenciones que modifiquen el curso natural de la enfermedad. Si estas alteraciones siguen presentes durante más de tres meses se considera ERC (figura 8) (Chawla y cols., 2017).

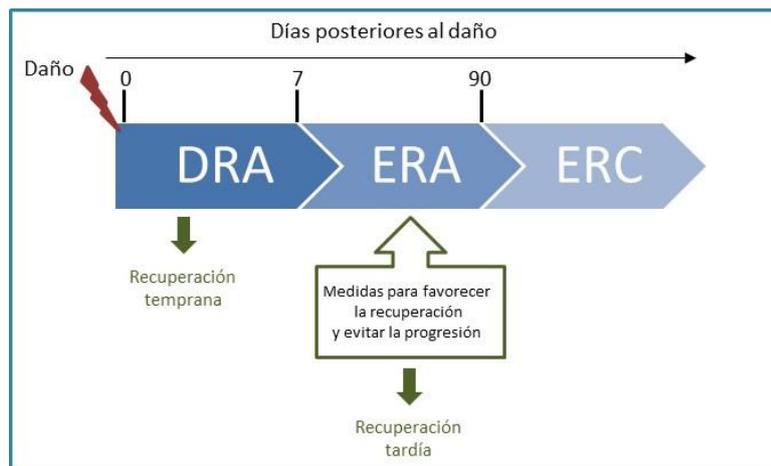


Figura 8: Representación esquemática de la progresión DRA-ERA-ERC. El período de ERA resulta crítico para tomar las medidas terapéuticas oportunas que modifiquen el curso natural de la enfermedad y favorezcan la recuperación. La progresión de la ERA puede ser recuperación o progresión a ERC (DRA: daño renal agudo; ERA: enfermedad renal aguda; ERC: enfermedad renal crónica) (Adaptado de Chawla y cols., 2017).

Se han definido varios estadios de ERA (tabla 2). La primera definición de ERA incluía solo los estadios 1, 2 y 3, y por tanto implicaba que la CrP se mantuviera elevada. Posteriormente se amplió la definición y se incluyó un nuevo estadio (0) que se corresponde con la ERA subclínica, para subrayar el hecho de que pacientes que recuperan la función renal tras un DRA también tienen riesgo de sufrir eventos adversos en el futuro (Chawla y cols., 2017; Rangaswamy y Sud, 2018).

ESTADIO	DEFINICIÓN
0	<p>A: Ausencia de criterios para B o para C.</p> <p>B: Evidencias de daño renal, o de procesos regeneración/reparación en curso o pérdida de la reserva tubular o glomerular.</p> <p>C: Niveles de creatinina plasmática < 1,5 veces el valor basal, pero sin llegar a recuperar los valores basales y evidencias de daño, regeneración o reparación en curso</p>
1	Niveles de creatinina plasmática entre 1,5-1,9 veces por encima del basal
2	Niveles de creatinina plasmática entre 2-2,9 veces por encima del basal
3	Niveles de creatinina plasmática más de 3 veces por encima del basal o incrementos de creatinina plasmática $\geq 353,6 \mu\text{mol/L}$ ($\geq 4,0 \text{ mg/dL}$) o necesidad de terapia renal sustitutiva

Tabla 2: Recomendaciones de la ADQI para la clasificación en estadios de la ERA. Se debe tener en cuenta que estos criterios deben estar presentes entre 7 días y 3 meses para ser considerado ERA. (Adaptado de Chawla y cols., 2017).

La ERA es un término reciente, que aún no se utiliza en clínica, ya que se requieren más estudios para definir entre otros, su epidemiología, el curso clínico de la enfermedad (progresión a ERC o recuperación), los cambios estructurales y biológicos que se producen en el riñón durante la ERA, o los factores de riesgo para desarrollarla, así como determinar los métodos diagnósticos que proporcionen información sobre los procesos de daño y/o reparación que están teniendo lugar en el riñón durante la enfermedad.

4.2 La ERA subclínica

Como se ha reflejado en la tabla 2, la ERA (estadio 0) puede existir en ausencia de evidencias clínicas. El estadio 0B resulta de especial interés para este trabajo, ya que incluye a pacientes cuyos niveles plasmáticos de creatinina han vuelto a valores basales

tras el DRA, pero en los que aún quedan alteraciones renales, ya sea porque están en marcha procesos de daño, de reparación o por una pérdida de la reserva funcional renal.

En estos pacientes el diagnóstico de dichas alteraciones subclínicas se podría lograr mediante el uso de biomarcadores o estudios de imagen. También, mediante la medida de la reserva funcional que se puede llevar a cabo con tests de estrés tubulares o glomerulares. Sin embargo, ninguna de estas alternativas a la CrP se aplica en la práctica clínica. Identificar qué pacientes tienen ERA resulta fundamental, ya que se considera un período de transición después del DRA, resultando un momento crítico para llevar a cabo las intervenciones terapéuticas oportunas para reducir el riesgo de eventos adversos, como nuevos episodios de DRA o la progresión a ERC, y promover la recuperación. Una de las intervenciones que se proponen en pacientes con ERA es monitorizar minuciosamente la función renal y evitar la administración de fármacos nefrotóxicos, o cuando no existan alternativas, ajustar su dosis o monitorizar sus concentraciones en sangre. Sin embargo, los pacientes con ERA subclínico pasan inadvertidos a las técnicas diagnósticas hoy en día disponibles y por lo tanto no se beneficiarán de estas medidas, lo que supone un importante riesgo para su salud.

La recuperación de la ERA resulta también complicada de valorar y aún no existe una definición estandarizada. Si el diagnóstico de la recuperación se basa en CrP, los pacientes con ERA subclínica serán considerados como recuperados.

De lo anteriormente expuesto se desprende la idea de que es necesario la aplicación de medidas alternativas o complementarias a la CrP para mejorar el seguimiento del período posterior a un DRA, como métodos que valoren la reserva funcional glomerular o tubular, técnicas de imagen o el estudio de nuevos biomarcadores que reflejen la presencia de alteraciones estructurales renales (Chawla y cols., 2017; Rangaswamy y Sud, 2018).

5. **HERRAMIENTAS DIAGNÓSTICAS DE RECUPERACIÓN DE UN DRA**

El resto del contenido no está aún disponible para su lectura debido a que se encuentra en trámites de solicitud de patente.

Será publicado una vez obtenida la autorización pertinente

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos proponemos la siguiente **hipótesis** de trabajo:

Tras un DRA, existen en el riñón alteraciones estructurales y funcionales subclínicas que no pueden ser diagnosticadas por la CrP. Proponemos la existencia de biomarcadores más sensibles que la creatinina que permitan identificar la presencia de alteraciones renales, tanto estructurales como funcionales, en el período posterior a un DRA. Estos biomarcadores permitirán la monitorización del proceso de recuperación renal, determinando cuándo la recuperación es completa y cuándo persisten alteraciones subclínicas.

“La ciencia es un viaje, nunca una llegada”

Karl Raiumd Popper

OBJETIVOS

Después de un DRA, pueden quedar en el riñón secuelas subclínicas que cursan de manera ciega a la tecnología hoy en día disponible (basada fundamentalmente en la cuantificación de la creatinina plasmática). Estas secuelas pueden suponer un riesgo para el desarrollo de eventos adversos tanto a corto (predisposición a nuevos episodios de DRA) como a largo plazo (progresión a ERC). Por ello, este trabajo de investigación analiza el período posterior a un DRA, planteándose como objetivos:

1. Determinar si una vez normalizada la función renal tras un DRA existen en el riñón alteraciones estructurales y funcionales subclínicas que suponen un riesgo oculto para el desarrollo de nuevos eventos adversos renales.
2. Identificar biomarcadores urinarios que puedan diagnosticar y monitorizar las secuelas estructurales y funcionales identificadas en el objetivo 1.

*“Duda siempre de ti mismo,
hasta que los datos no dejen lugar a dudas”*

Louis Pasteur

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

Todos los reactivos y productos, anticuerpos, equipos y aparatos, y programas y softwares utilizados para la realización de este trabajo, así como las casas comerciales y correspondientes referencias, están recogidos en las tablas 11, 12 y 13 que se encuentran al final de la sección de Métodos.

2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

2.1 Mantenimiento y manipulación de los animales

Para la realización de este trabajo de investigación se han utilizado ratas Wistar macho de 240-260 g de peso corporal procedentes del Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Salamanca. Durante todo el experimento, los animales se mantuvieron en régimen de confinamiento controlado en el animalario del SEA que cuenta con condiciones ambientales constantes de temperatura (20 °C), humedad ambiental (60 %), ciclos de luz-oscuridad cada 12 horas y sistemas de renovación y filtrado de aire. De igual modo, los animales se alimentaron con una dieta estándar con la siguiente composición: proteína bruta (17,62 % del total), materias grasas brutas (2,50 %), celulosa bruta (4,05 %), cenizas brutas (4,38 %), almidón (43,30 %), calcio (0,66 %), fósforo (0,49 %), sodio (0,14 %), 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). Todo esto facilita 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 2010/63/UE del Parlamento y del Consejo de la Unión Europea, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos; la Ley 32/2007 del Estado Español, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio; y los Reales Decretos RD 1201/2005 y RD

53/2013 sobre la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

El sacrificio de los animales se llevó a cabo siguiendo las guías para la eutanasia de los animales de experimentación detalladas en el Anexo III del RD 53/2013, basadas en el reglamento Nº 1099/2009 del Consejo de la Unión Europea, relativo a la protección de los animales en el momento de la matanza.

Los animales se monitorizaron todos los días durante los distintos experimentos. Se observó su estado de salud general, movilidad, color del pelo y peso corporal entre otros parámetros.

2.2 Modelos experimentales

2.2.1 Modelo experimental 1: Daño renal agudo (DRA)

Para la caracterización de las secuelas subclínicas asociadas al período posterior a un DRA e identificación de biomarcadores urinarios para su diagnóstico, en este trabajo de investigación se ha utilizado un modelo de DRA tóxico inducido por cisplatino. El cisplatino es un fármaco antineoplásico potencialmente nefrotóxico pero ampliamente utilizado en el tratamiento de tumores sólidos. El cisplatino ejerce sus efectos tóxicos predominantemente en el segmento S3 de los túbulos proximales (Dasari y Tchounwou, 2014).

Diseño experimental (Figura 12)

Para inducir el DRA se administró una dosis única de cisplatino vía intraperitoneal (i.p). Para la preparación de la disolución de cisplatino, éste se diluyó en suero salino 0,9 % atemperado (37º), manteniéndose en agitación hasta su completa disolución. Al administrarse en dosis única, el mínimo excedente que pudiera quedar tras la inyección se eliminó según dictan los protocolos de seguridad del grupo de investigación.

Se midieron los niveles de creatinina plasmática (CrP) para el diagnóstico del DRA (CrP \geq 1,5 mg/dl), así como para determinar el momento en que se producía la recuperación del daño (CrP en valores basales).

En base a estudios realizados previamente en nuestro grupo de investigación, para inducir el DRA se administró cisplatino en dosis única de 5 mg/kg por vía i.p. El cuarto día post-administración se corresponde con el momento de máximo daño renal. Se determinó la presencia de DRA si la concentración plasmática de creatinina era superior a 1,5 mg/dl.

Con el objetivo de determinar en qué momento se producía la recuperación de la función renal se midieron los niveles plasmáticos de creatinina diariamente desde el 7º día post-administración hasta que los valores de CrP volvieron a valores basales (0,4-0,7 mg/dl), momento en que se consideró que el animal se había recuperado del DRA. Además, se monitorizó la recuperación 1, 2, 3 y 4 semanas después de que la función renal se normalizara. En la tabla 4 se muestran los distintos puntos de estudio establecidos en este trabajo de acuerdo con el objetivo propuesto.

PUNTO DE ESTUDIO	NOMENCLATURA
Basal, antes de la administración de cisplatino	B
Día de máximo daño renal (CrP \geq 1,5 mg/kg)	D4
Día en que se recupera la función renal (CrP en valores basales)	R0
1 semana después de R0	R1
2 semanas después de R0	R2
3 semanas después de R0	R3
4 semanas después de R0	R4

Tabla 4: Puntos de estudio en el modelo animal de DRA

En base a estos puntos de estudio, se diseñaron los siguientes grupos experimentales:

- **Grupo Cispl** (n=33): Ratas a las que se administró una dosis única de cisplatino a 5 mg/kg vía i.p. A su vez este grupo se dividió en los siguientes subgrupos en función del punto de estudio en que se sacrifica al animal para llevar a cabo la perfusión renal y extraer los riñones:
 - **Cispl D4** (n=5): Se sacrifica al animal en el punto D4.
 - **Cispl R0** (n=6): Se sacrifica al animal en el punto R0.
 - **Cispl R1** (n=6): Se sacrifica al animal en el punto R1.
 - **Cispl R2** (n=6): Se sacrifica al animal en el punto R2.
 - **Cispl R3** (n=5): Se sacrifica al animal en el punto R3.

- **Cispl R4** (n=5): Se sacrifica al animal en el punto R4.
- **Grupo CT o grupo control** (n=18): Ratas a las que se administró una dosis única de NaCl 0,9 % vía i.p., por ser el vehículo en que va disuelto el cisplatino. A su vez este grupo se dividió en los mismos subgrupos que el grupo Cispl:
 - CT D4 (n=3): Se sacrifica al animal en el punto D4.
 - CT R0 (n=3): Se sacrifica al animal en el punto R0.
 - CT R1 (n=3): Se sacrifica al animal en el punto R1.
 - CT R2 (n=3): Se sacrifica al animal en el punto R2.
 - CT R3 (n=3): Se sacrifica al animal en el punto R3.
 - CT R4 (n=3): Se sacrifica al animal en el punto R4.

Se recogieron muestras de orina y plasma de todos los grupos en los siguientes puntos de estudio: B, D4 y R0, así como el día de sacrificio. Se sacrificaron los animales en cada uno de los puntos de estudio indicados para llevar a cabo la perfusión renal para la obtención de muestras de tejido renal con el fin de realizar estudios histológicos, de inmunohistoquímica o qPCR.

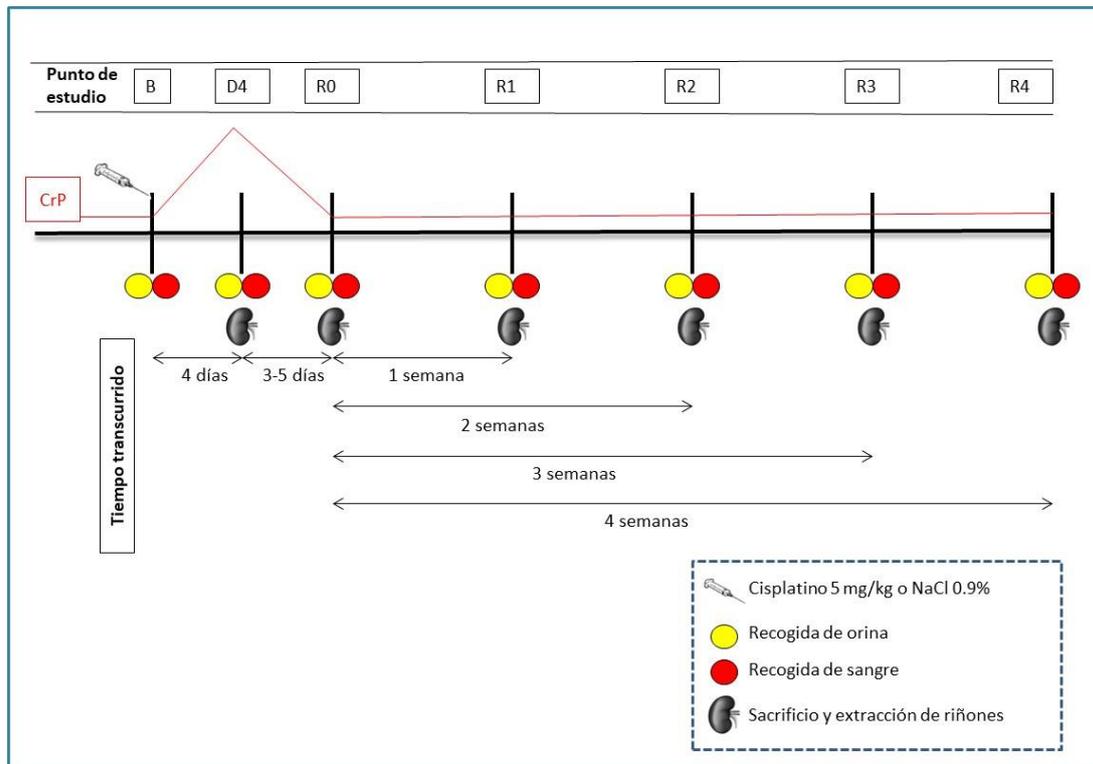


Figura 12: Representación esquemática del modelo experimental animal 1. Se indican los puntos de estudio, así como los momentos en que se recogen las muestras de sangre y orina o se lleva a cabo el sacrificio para la extracción de los riñones.

2.2.2 Modelo animal experimental 2: evaluación del riesgo funcional tras un DRA

En este trabajo se ha planteado como hipótesis que tras un DRA existen alteraciones renales subclínicas estructurales y/o funcionales que podrían predisponer al desarrollo de nuevos episodios de DRA. Para comprobar esta hipótesis se indujo DRA en un grupo de animales mediante administración de dosis única de cisplatino (como en modelo experimental 1). Una vez los animales recuperaron la función renal se administró gentamicina a dosis subtóxicas en los distintos puntos de recuperación establecidos en el modelo experimental 1. La gentamicina es un antibiótico aminoglucósido ampliamente utilizado en la práctica clínica que induce nefrotoxicidad en el 10-20 % de los pacientes tratados (Biro y cols., 2016).

Diseño experimental (Figura 13)

Para inducir el DRA se administró una dosis única de cisplatino 5 mg/kg vía i.p. El día en que ocurre la recuperación, una o dos semanas después se administró a todos los animales gentamicina a una dosis de 50 mg/kg/día durante 6 días. De acuerdo con resultados previos de nuestro grupo de investigación, esta dosis de gentamicina es subtóxica ya que no induce cambios en los parámetros renales de los animales control (Quiros y cols., 2010).

Para la preparación de las disoluciones de gentamicina se utilizó como disolvente NaCl 0,9 % atemperado (37 °C) y se mantuvo en agitación hasta la total disolución. La disolución se almacenó a 4 °C y protegida de la luz, atemperándola previamente a la inyección i.p.

En función del momento en que se empieza a administrar la gentamicina se dividió a los animales en tres grupos experimentales.

- **Grupo gentamicina R0:** A su vez queda dividido en dos subgrupos en función de si los animales se tratan o no con cisplatino previamente a la administración de gentamicina:
 - **Grupo Cispl+G R0 (n=6):** El día 0 del estudio se administró a los animales cisplatino 5 mg/kg para inducir el DRA. El día en que los animales recuperan la función renal (punto R0) se administró gentamicina 50 mg/kg/día durante 6 días vía i.p.
 - **Grupo CT+G R0 (n=6):** El día 0 del estudio se administró a los animales NaCl 0,9 %, por ser el vehículo en que va disuelto el cisplatino. En el punto R0 se administró gentamicina 50 mg/kg/día durante 6 días vía i.p.

PUNTO DE ESTUDIO	NOMENCLATURA
Basal, antes de la administración de cisplatino	B
Día de máximo daño renal (CrP \geq 1,5 mg/kg)	D4
Día en que se recupera la función renal (CrP en valores basales), se empieza administrar gentamicina	R0
Fin tratamiento gentamicina. Perfusión y sacrificio	R0+G6

Tabla 5: Puntos de estudio del grupo gentamicina R0

- **Grupo gentamicina R1:** Al igual que el grupo anterior se dividió en dos subgrupos:
 - **Grupo Cispl+G R1 (n=6):** El día 0 del estudio se administró a los animales cisplatino 5 mg/kg para inducir el DRA. Una semana después de que los animales recuperen la función renal (punto R1) se administró gentamicina 50 mg/kg/día durante 6 días vía i.p.
 - **Grupo CT+G R1 (n=6):** El día 0 del estudio se administró a los animales NaCl 0,9 %. En el punto R1 se administró gentamicina 50 mg/kg/día durante 6 días vía i.p.

PUNTO DE ESTUDIO	NOMENCLATURA
Basal, antes de la administración de cisplatino	B
Día de máximo daño renal (CrP \geq 1,5 mg/kg)	D4
Día en que se recupera la función renal (CrP en valores basales)	R0
1 semana después de R0, se empieza administrar gentamicina	R1
Fin tratamiento gentamicina. Perfusión y sacrificio	R1+G6

○

Tabla 6: Puntos de estudio del grupo gentamicina R1.

- **Grupo gentamicina R2:** Al igual que los grupos anteriores se dividió en dos subgrupos:
 - **Grupo Cispl+G R2 (n=8):** El día 0 del estudio se administró a los animales cisplatino 5 mg/kg para inducir el DRA. Dos semanas después de que los animales recuperen la función renal (punto R2) se administró gentamicina 50 mg/kg/día durante 6 días vía i.p.

- **Grupo CT+G R2 (n=8):** El día 0 del estudio se administró a los animales NaCl 0,9 %. En el punto R2 se administró gentamicina 50 mg/kg/día durante 6 días vía i.p.

PUNTO DE ESTUDIO	NOMENCLATURA
Basal, antes de la administración de cisplatino	B
Día de máximo daño renal (CrP \geq 1,5 mg/kg)	D4
Día en que se recupera la función renal (CrP en valores basales)	R0
2 semanas después de R0, se empieza administrar gentamicina	R2
Fin tratamiento gentamicina. Perfusión y sacrificio	R2+G6

Tabla 7: Puntos de estudio del grupo gentamicina R2.

En los tres grupos, el subgrupo CT+G es el grupo control del experimento (sin DRA previo), necesario para determinar que la gentamicina se está usando en dosis subtóxicas.

En todos los puntos de estudio indicados en cada uno de los tres grupos se recogieron muestras de sangre y orina. Además, se sacrificó a los animales al día siguiente de finalizar el tratamiento con gentamicina para perfundir los riñones y obtener tejido renal para los estudios histológicos.

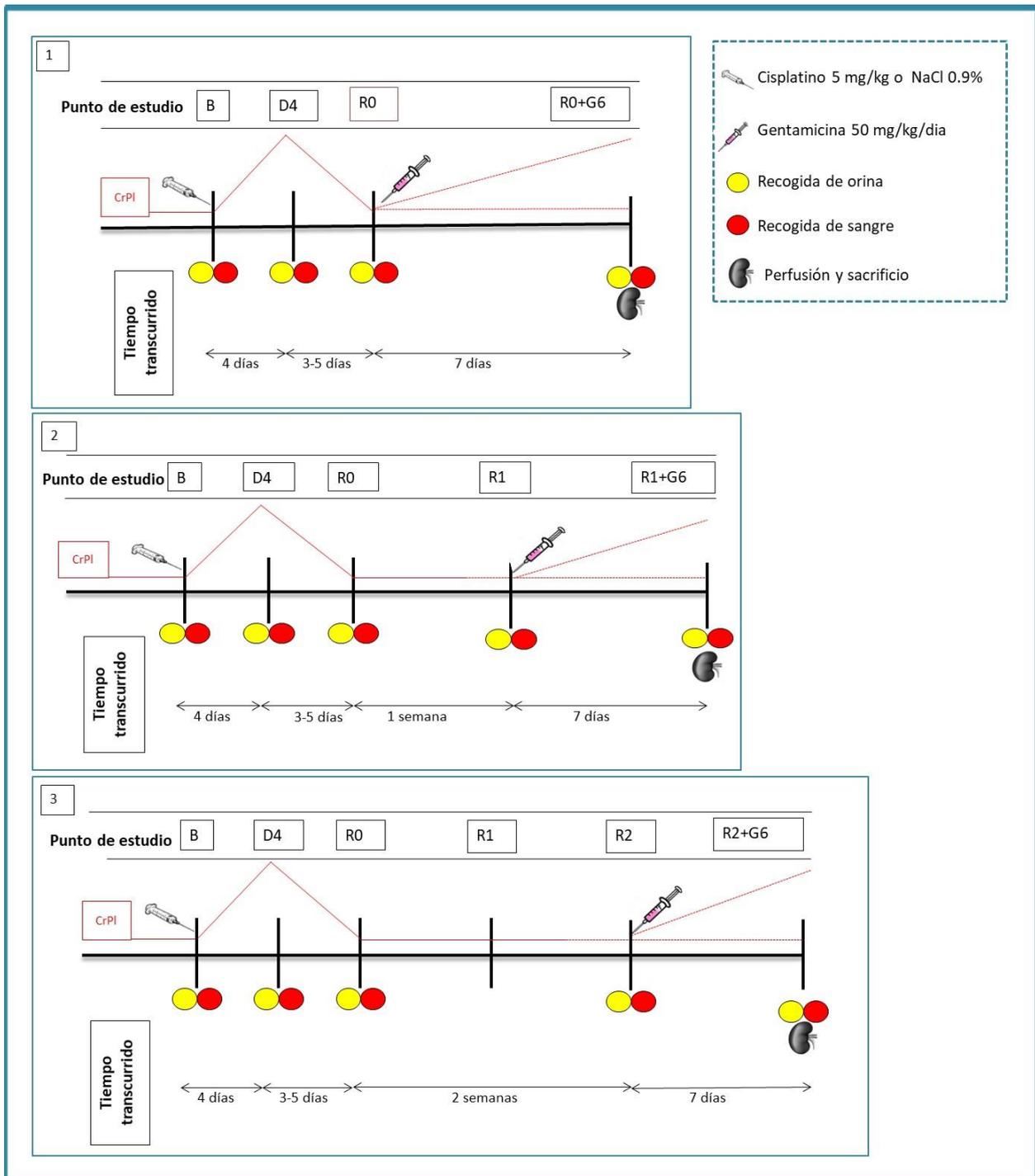


Figura 13: Diseño experimental del modelo animal 2. Se indican los puntos de recogida de muestras de sangre y orina, de sacrificio y de administración de cisplatino y gentamicina (1: grupo gentamicina R0; 2: grupo gentamicina R1; 3: grupo gentamicina R2).

2.2.3 Modelo animal experimental 3

Parte del contenido no está aún disponible para su lectura debido a que se encuentra en trámites de solicitud de patente.

Será publicado una vez obtenida la autorización pertinente

3. TÉCNICAS EXPERIMENTALES IN VIVO

3.1 Recogida de orina de 24 horas: jaulas metabólicas

Se usaron jaulas metabólicas individuales que permiten la recogida de orina. Estas jaulas están diseñadas para separar de forma efectiva la orina de las heces del animal en tubos externos a la jaula (Kurien y cols., 1977). 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. Antes de la recogida de la orina se debe añadir 1 mL de aceite mineral al correspondiente colector para evitar la evaporación de la orina y 100 µL de azida sódica al 0,1 % para evitar la contaminación bacteriana de la muestra.

Este método 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 para que el animal pueda familiarizarse con el habitáculo. Aun así, las jaulas metabólicas se deben utilizar el menor tiempo posible, para evitar el estrés en los animales y la posible alteración en los resultados.



Figura 14: Jaula metabólica individual

Una vez recogida la orina se procesó mediante centrifugación a 2.000 x g durante 8 minutos a temperatura ambiente para eliminar el aceite mineral y otros elementos (resto de comida, pelos del animal, etc.) con los que se haya podido contaminar la muestra. Posteriormente, se midió el volumen de orina usando un tubo tipo falcon graduado y se determinó el flujo urinario, expresado como mL de orina recogidos en 24 horas. Por último, se almacenó en alícuotas a -20 °C o -80 °C en función del análisis que se vaya a realizar.

3.2 Extracción de sangre y obtención del plasma

Se obtuvieron muestras de sangre de los animales mediante la canulación de la vena caudal. Se anestesió a los animales con anestesia inhalatoria isofluorano al 5 % para inducir y al 3 % para mantener a los animales anestesiados, con el fin de evitar dolor al animal y facilitar la manipulación al investigador. Para canular la vena caudal se utilizó un catéter de 25 G y se recogió la sangre directamente del catéter con la ayuda de capilares heparinizados. Su contenido fue depositado en tubos tipo *eppendorf* colocados en hielo y posteriormente se centrifugaron a 7.000 x g, 4 °C durante 4 minutos para la separación del plasma y de los restos celulares. El plasma se conservó a -80 °C para su posterior análisis.

3.3 Perfusión y recogida de órganos

En los puntos de sacrificio anteriormente indicados (tabla 4) se perfundió a los animales con suero salino 0,9 % heparinizado 5 UI/mL para recoger los riñones.

La perfusión con suero salino heparinizado sustituye la sangre en los órganos del animal con el fin de limpiar los tejidos para facilitar su posterior análisis. Para llevar a cabo esta técnica se utilizó una bomba de infusión que permite perfundir los órganos del animal a la velocidad de perfusión fisiológica con el fin de evitar posibles alteraciones en el tejido por el método experimental. Se utilizó una velocidad de perfusión de 3 ml/min. Los animales se anestesiaron con pentobarbital 50 mg/kg vía i.p. y se colocaron en posición decúbito supino. Se realizó una laparatomía media, se retiró el paquete intestinal hacia un lado y se localizó la arteria aorta y su bifurcación. Se introdujo un catéter, conectado a la bomba de perfusión, en la ramificación femoral de la arteria aorta. Inmediatamente después se interrumpió el flujo sanguíneo anudando mediante ligadura la aorta y la vena supra-renal, de esta manera se realiza la perfusión únicamente de los riñones para evitar consumir suero salino heparinizado innecesario.

Una vez perfundidos, los riñones se descapsularon y recogieron rápidamente para evitar la degradación de proteínas o del ácido ribonucleico (ARN). Uno de los riñones se incluyó en formaldehído al 3,7 %, pH 7, para futuros estudios histológicos, y el otro riñón se ultracongeló en nitrógeno líquido y se conservó a -80 °C para su posterior análisis por diferentes técnicas.

4. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

4.1 Medida de creatinina en plasma y orina. Cálculo del aclaramiento de creatinina

La creatinina es una proteína procedente del metabolismo muscular. Se elimina vía renal por filtración glomerular, de forma que se acumula en la sangre cuando disminuye la filtración glomerular. Además, 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. El aclaramiento de creatinina es un valor utilizado para estimar la TFG, debido a que esta molécula no se reabsorbe ni se secreta en grandes cantidades, 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 determinar la concentración de la creatinina en el plasma y en la orina se utilizó un kit comercial (*Quantichrom creatinine assay kit, BioAssay System*), siguiendo las

recomendaciones del fabricante. Esta técnica se fundamenta en el método colorimétrico-cinético conocido como reacción de Jaffé (Husdan y Rapoport, 1968), según la cual la creatinina es capaz de unirse al ácido pícrico en medio alcalino y dar lugar a un complejo coloreado (complejo de Janvosky), cuya intensidad es proporcional a la concentración de la creatinina.

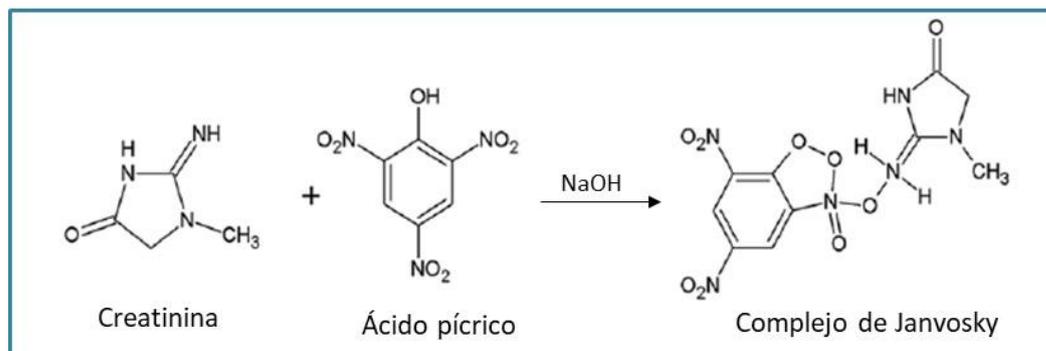


Figura 15: Reacción de Jaffé

En el caso de las muestras de plasma, se añaden 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) a cada pocillo y se midió la absorbancia en un lector de placas a 490 nm en el momento justo posterior de añadir los reactivos (OD0) y 5 minutos después (OD5).

En el caso de las muestras de orina, se añaden 5 μL de cada una de las muestras previamente diluidas 1:10 y de los patrones 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) a cada pocillo y se midió la absorbancia siguiendo los pasos explicados anteriormente.

En ambos casos, se determinó la concentración de creatinina siguiendo los siguientes pasos: i) se calculó la diferencia entre OD5-OD0 de las muestras y de los calibradores de la recta estándar; ii) se creó 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.

El aclaramiento de la creatinina es un fiable estimador de la tasa de filtración glomerular.

Se puede calcular según la siguiente fórmula:

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

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

4.2 Medida de la concentración de proteínas en orina

Una elevada concentración urinaria de proteínas es un indicador de una alteración renal funcional (glomerular, tubular o ambas). Para determinar la concentración de proteínas en las muestras se usó un kit comercial (*Quantichrom Protein Assay, BioAssay System*) cuya técnica de análisis se basa en el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976). El colorante utilizado, azul de Coomassie G-250, se une a los aminoácidos básicos de las proteínas en una solución ácida lo que produce un cambio en la longitud de onda de absorción máxima del colorante, pasando de 465 nm a 595 nm. La intensidad de la absorbancia medida a 595 nm es proporcional a la concentración de proteínas en las muestras.

Según el protocolo comercial, se colocaron 10 µL de las muestras de orina previamente diluidas 1:10 si correspondían al punto D4 o sin diluir si correspondían al resto de puntos, y de los calibradores de una recta patrón estándar de albúmina de suero bovino (BSA) (rango 0 a 1 mg/mL de BSA) en una placa de 96 pocillos. Se añadieron 200 µL del reactivo comercial previamente diluido 1:5. Se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de placas. Tras obtener las absorbancias correspondientes a cada calibrador, se creó la recta estándar y se extrapó la concentración de proteínas de cada una de las muestras analizadas, teniendo en cuenta, si lo hay, el factor de dilución.

La concentración de proteínas en las muestras de orina de los animales no nos reporta información relevante sobre su función renal, ya que es necesario tener en cuenta el volumen de orina en el que se han excretado dichas proteínas, es decir, la excreción de proteínas. Por tanto, se determinó la excreción de proteínas totales por día, con el fin de valorar si éstos presentaban o no proteinuria (niveles de proteínas en la orina superiores a lo normal). Se calculó la excreción total de proteínas por día según la siguiente fórmula:

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

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

4.3 Medida de Na⁺ en orina y plasma

Se evaluó mediante la utilización de un medidor de Na⁺ compacto (*LAQUATWin B-722, Horiba Scientific*). El principio de medición se basa en el método de electrodo selectivo de iones (ISE, por sus siglas en inglés *Ion-selective-electrode*), que sigue la ecuación de Nerst. Permite determinar la concentración de un determinado ion en una muestra.

El medidor consta de un electrodo ion selectivo que posee una membrana ion selectiva, que sólo responde al contacto con un determinado ion disuelto en la solución; y de un electrodo de referencia. Para determinar la concentración de un determinado ion, el sistema mide la diferencia de potencial causada por el contacto del electrodo con el ion en cuestión, respecto de la diferencia de potencial en el electrodo de referencia.

Para analizar las muestras, se colocaron 300 µL de la muestra en el soporte donde se encuentra situada la membrana y el aparato determinó la concentración de Na⁺ de cada muestra.

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:

$$FENa (\%) = \frac{NaU \text{ (mg/L)} \times CrP \text{ (mg/dL)}}{NaP \text{ (mg/L)} \times CrU \text{ (mg/dL)}} \times 100$$

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

4.4 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:

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

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

Medida de la glucosa en plasma

Para el análisis de la concentración de glucosa en el plasma de los animales se utilizó el dispositivo Contour[®]XT (Ascensia) y las tiras reactivas correspondientes. Es necesario colocar una gota de plasma en un extremo de la tira reactiva previamente introducida en el glucómetro. El fluido biológico asciende por capilaridad por la tira reactiva, donde la glucosa se oxida por acción enzimática y como consecuencia se liberan electrones. Estos electrones son medidos por varios electrodos de la tira y generan una pequeña corriente eléctrica que es enviada al medidor. La corriente eléctrica generada es directamente proporcional a la concentración de glucosa contenida en la muestra

analizada. El medidor es capaz de relacionar cada corriente eléctrica medida con un valor de glucosa gracias a un algoritmo implementado en el software del aparato.

Medida de la glucosa en orina

Para determinar la concentración de glucosa en la orina se usó el método de la o-toloudina cuyo fundamento analítico es 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 llevar a cabo el ensayo, se colocaron 25 μL de la muestra de orina a analizar y de la recta patrón de concentraciones conocidas de glucosa (rango 0-4 mg/ml) en tubos tipo *ependorf*. A cada *ependorf* se añadieron 125 μL de ácido tricloroacético (TCA, del inglés *trichloroacetic acid*) al 3 % y 1.350 μL de la amina aromática o-toloudina al 6 % disuelta en ácido acético glacial. Esta mezcla se calentó a 80 °C en un baño húmedo durante 20 minutos y tras enfriarse, se colocaron 250 μL de cada uno de los *ependorf* en una placa de 96 pocillos. Se midió la absorbancia a 630 nm de longitud de onda y se extrapoló la concentración de glucosa de las muestras de orina en mg/mL.

Únicamente se diluyeron en proporción 1:2 las muestras de orina correspondientes al punto D4 del grupo cispl.

5. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE LA TÉCNICA WESTERN BLOT

La técnica de *Western Blot* permite la identificación de proteínas específicas en diferentes tipos de muestras biológicas como orina, sangre o tejido. En esta técnica las proteínas presentes en una muestra se separan en base a su peso molecular en un gel de poliacrilamida. A continuación, las proteínas se transfieren a una membrana donde pueden ser reconocidas por un anticuerpo específico (primario). Este anticuerpo primario reacciona con un anticuerpo secundario conjugado con la enzima HRP (enzima peroxidasa de rábano picante, del inglés *horseradish peroxidase*) la cual reacciona con un sustrato específico (por ejemplo el luminol, al que oxida en presencia de peróxido de hidrógeno), produciendo una reacción fácilmente detectable y relativamente

proporcional a la cantidad de la proteína de la muestra (figura 16) (Towbin y cols., 1979; Gallagher y cols., 2008).

En este trabajo de investigación se ha usado la técnica de *Western Blot* para detectar proteínas en muestras de orina.

5.1 Preparación de las muestras, electroforesis y transferencia

Para la preparación de las muestras, primero se determinó la cantidad de orina a cargar en cada pocillo del *Western Blot* en función del flujo urinario diario correspondiente a cada animal. De manera que la cantidad de orina que se cargó fue proporcional al FU en relación 1:1000, es decir, si el flujo urinario fue de 12 mL la cantidad a cargar son 12 μ L. El volumen de orina determinado se completó con H₂O destilada hasta 21 μ L.

A continuación, se prepararon las muestras en condiciones desnaturalizantes y reductoras con el fin de deshacer la estructura tridimensional de las proteínas. 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) en proporción 1:3 con la muestra de orina 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*). Se utilizaron geles comerciales con un porcentaje de acrilamida 4-20 % (*Bio-Rad*). En uno de los pocillos del gel se cargó el marcador de proteínas de pesos moleculares conocidos (*Termo Fischer Scientific*).

La electroforesis se realizó en cubetas Mini-PROTEAN®III (*Bio-Rad*) donde el gel estaba sumergido en un tampón de electroforesis (Tris 25 mM, Glicina 192 Mm, pH 8,3, SDS al 0,1 %). 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 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 semiseca, para lo que se montó un “sándwich” poniendo en contacto el gel con la membrana y colocando dos papeles de filtro, uno sobre el gel y

otro sobre la membrana. Se humedeció el “sándwich” con tampón de transferencia (*Transblot Turbo Transfer Buffer, Bio-Rad*) y se llevó a cabo la transferencia usando un equipo comercial (*Transblot Turbo, Bio-Rad*) que permite el paso de una corriente eléctrica a través del gel, haciendo que las proteínas migren del polo negativo, donde se encuentra el gel, hacia el polo positivo, donde se encuentra la membrana, quedando atrapadas en ésta.

5.2 Bloqueo e incubación con los anticuerpos

Una vez finalizada la transferencia, para evitar uniones inespecíficas durante la inmunodetección se procedió al bloqueo de los lugares de la membrana no ocupados por proteínas. Para ello se incubó la membrana durante 2 horas en agitación con solución de bloqueo, que es tampón de lavado (100 mL PBS 10X, 1 mL de Tween-20 y c.s.p. 1 L de H₂O destilada) con BSA al 3 %.

A continuación, se incubó la membrana toda la noche a 4 °C en agitación con el anticuerpo primario diluido en solución de lavado con BSA al 1 %. Seguidamente, se realizaron 3 lavados de 7 minutos con tampón de lavado y se incubó con el anticuerpo secundario, diluido en solución de lavado con BSA al 3%, durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 7 minutos con tampón de lavado.

Las tablas 8 y 9 muestran los anticuerpos primarios y secundarios utilizados, su dilución y condiciones.

Las tablas de los anticuerpos utilizados no están aún disponibles para su lectura debido a que se encuentra en trámites de solicitud de patente.

Será publicado una vez obtenida la autorización pertinente

5.3 Revelado

Para detectar la señal emitida por el anticuerpo secundario, se utilizó un sistema basado en la oxidación del luminol potenciada con fosfo-yodofenol. Las membranas se incubaron durante 1 minuto en una solución de ECL (Tris-HCl 1 M, pH 9,35; luminol 2,2

mM, p-iodofenol 2,2 mM) suplementada con H₂O₂ al 0,03-0,06 %. La enzima HRP unida al anticuerpo secundario cataliza la descomposición del H₂O₂ y libera O₂ que oxida el luminol. El luminol oxidado emite una señal de luminiscencia, que será mayor cuanto más proteína haya, puesto que unirá mayor cantidad de anticuerpo y habrá más catálisis enzimática en ese punto.

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

5.4 Normalización de datos

En todos los *Western Blot* se ha utilizado un control positivo (C+), la orina de una rata con DRA inducido por gentamicina 150 mg/Kg, la cual expresaba todos los biomarcadores analizados.

Tras el revelado, la normalización se efectuó de la siguiente manera:

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

Donde UU.AA. son unidades arbitrarias

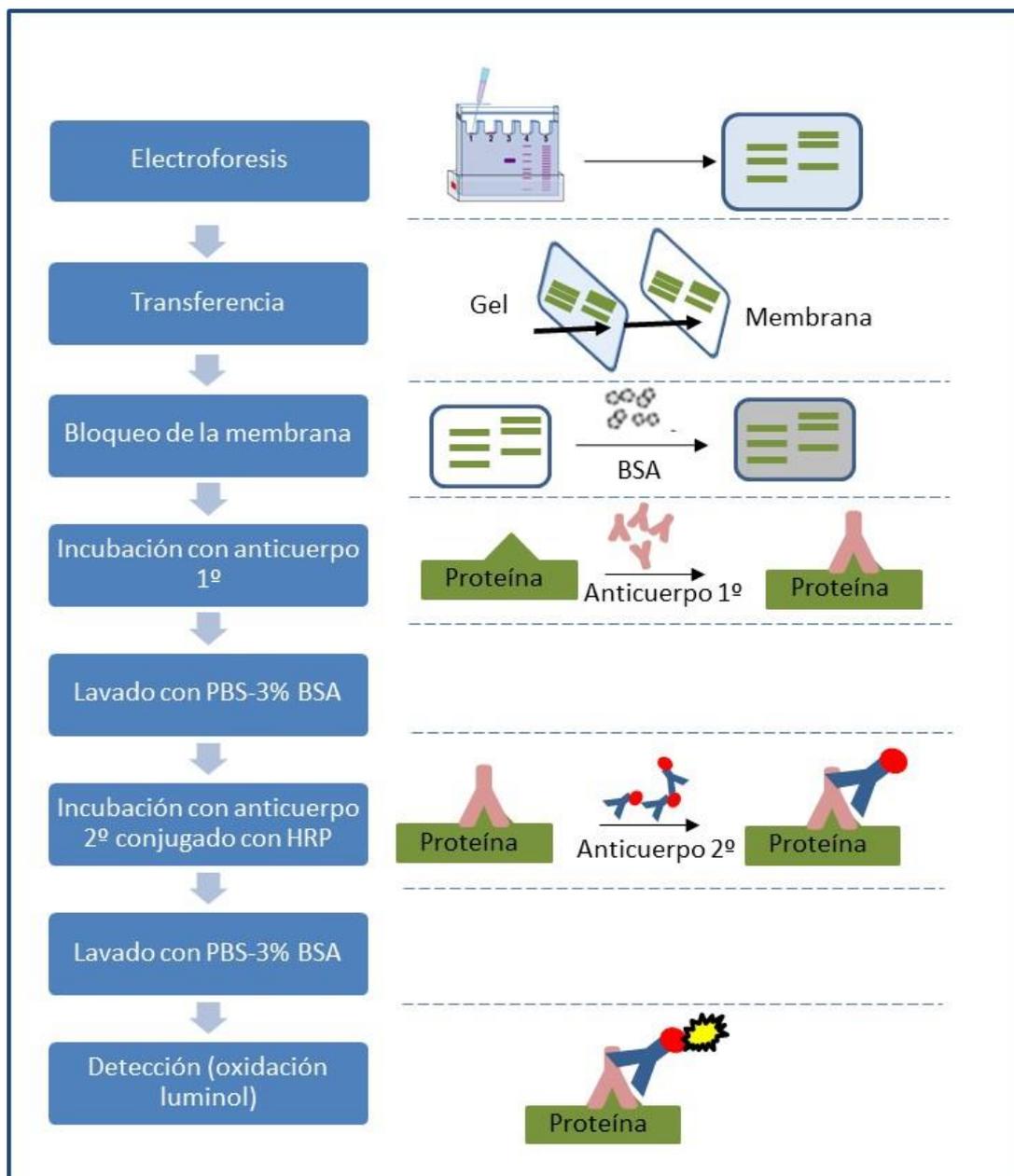


Figura 16: Representación esquemática del Western Blot. Se muestran las principales etapas. (Adaptado de Veiga, 2013).

6. ELISA

La técnica ELISA, acrónimo del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, es un ensayo de inmunoabsorción enzimática basado en la detección de un antígeno presente en una muestra mediante anticuerpos que, directa o indirectamente, producen una reacción cuantificable espectrofotométricamente (Engvall y Perlmann, 1971; Voller, 1976).

El tipo de ELISA empleado en este estudio fue el tipo “sándwich”. Se denomina así porque el antígeno o proteína a detectar queda atrapado entre dos capas de anticuerpos, el de captura y el de detección. En este tipo de ELISA, la proteína a determinar queda inmovilizada en una superficie sólida mediante la unión al anticuerpo de captura previamente adherido a dicha superficie (el fondo de los pocillos de una placa de ELISA). Una vez inmovilizada la proteína de interés, se añade un segundo anticuerpo primario conjugado con biotina, denominado anticuerpo de detección, que también se une a la proteína de interés, pero en un epítopo distinto al que lo hace el anticuerpo de captura.

Tras un periodo de incubación que suele variar entre 1 y 2 horas, se añade la proteína estreptavidina asociada a la enzima HRP. La estreptavidina tiene gran afinidad por la biotina del anticuerpo de detección, de manera que si hay proteína en las muestras de estudio se forma el siguiente complejo de unión: anticuerpo de captura-proteína-anticuerpo de detección-HRP estreptavidina. Finalmente, la adición de un sustrato coloreado (generalmente TMB, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina) susceptible de ser modificado por esta última enzima permite obtener una señal visible por espectrofotometría (figura 17).

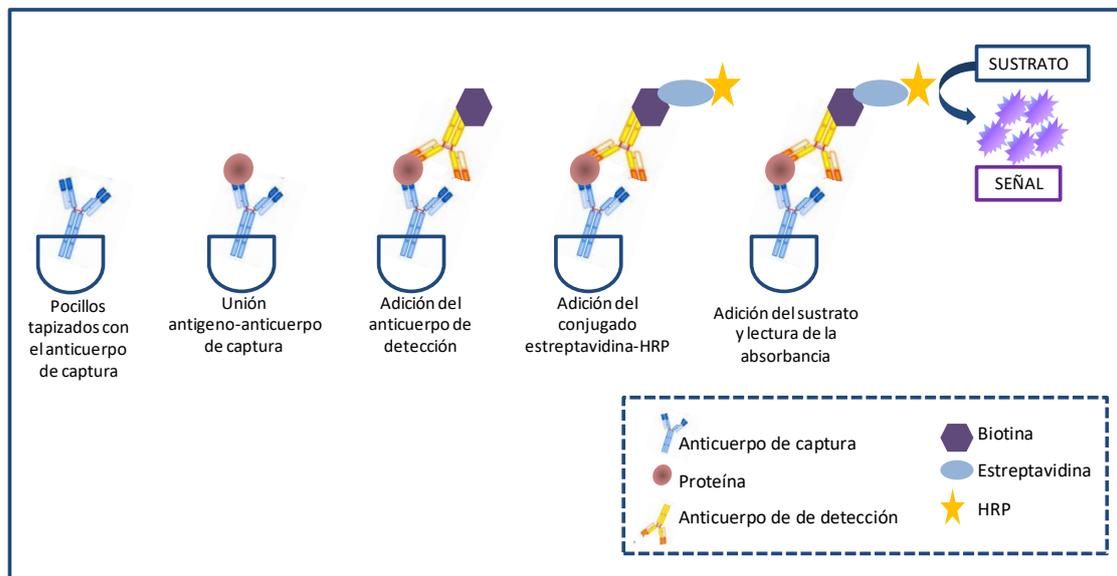


Figura 17: Representación esquemática del ELISA.

Se usó la técnica ELISA para determinar cuantitativamente la presencia de biomarcadores en la orina de los animales utilizados en este estudio. En la tabla 10 se muestran los ELISAS utilizados y las diluciones empleadas en cada uno de ellos. Se siguieron las instrucciones indicadas por el fabricante para llevar a cabo cada uno de ellos.

La tabla donde se indican los ELISAS utilizados no está aún disponible para su lectura debido a que se encuentra en trámites de solicitud de patente.

Será publicado una vez obtenida la autorización pertinente

Para todos los ELISAS empleados, se midió la densidad óptica a 450 nm. La intensidad de color producido es directamente proporcional a la cantidad de proteína contenida en las muestras de estudio. Con la absorbancia determinada de cada uno de los calibradores de la recta estándar, se creó la curva de concentraciones de biomarcador conocidas mediante la realización de un análisis de tipo *four parametric logistic* (4PL), un modelo de regresión no lineal de uso común en ensayos biológicos. La ecuación que define este modelo es la siguiente:

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

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

7. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA: PCR A TIEMPO REAL

Se estudió la expresión de ARNm en el tejido renal de los biomarcadores identificados en orina mediante la técnica de PCR a tiempo real, también conocida como qPCR (del inglés *real time quantitative polymerase chain reaction*). Este método permite la amplificación de una determinada región de ADN gracias a la utilización de cebadores específicos que anillan a ambos lados de dicha región y a la capacidad de la enzima ADN polimerasa para sintetizar ADN nuevo mediante la copia de la secuencia de dicha región gracias a la elongación de los cebadores (Bessman y cols., 1958).

Consta de 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 (Mullis y cols., 1986). 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. Se requiere un software acoplado al termociclador para registrar la emisión de fluorescencia de cada muestra y generar una curva de amplificación sigmoidea.

7.1 Extracción de ARN del tejido renal

Para la obtención del ARN de las muestras de tejido renal extraídas y ultracongeladas se utilizó el kit comercial *RNeasy Mini Kit (Qiagen)*. 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 la membrana de sílica de las columnas, mientras que las proteínas, los metabolitos y otros contaminantes no se unen y, por lo tanto, son eliminados de la muestra durante los pasos de lavado.

En primer lugar, se pulverizó el tejido, se pesaron 10-12 mg y se lisó en el tampón RLT del kit que inactiva ARNasas, suplementado con β -mercaptoetanol al 1 %. El lisado se diluyó con etanol 70 %, que proporciona unas condiciones de unión adecuadas entre el ARN y las membranas de sílice, y se filtró por unas columnas específicas a las que queda unido el ARN, mientras que los contaminantes se eliminan en los sucesivos lavados.

Se incubaron las membranas con ADNasa recombinante para eliminar el ADN que pudiera permanecer en ellas. Se hicieron 3 lavados con tampones de lavado para eliminar sales, metabolitos y componentes macromoleculares y finalmente el ARN se eluyó con H₂O libre de ARNasas permitiendo devolver la capa hidratante de agua alrededor de estos ácidos nucleicos y liberarlos así de la membrana en la que estaban retenidos (figura 18). El ARN obtenido se cuantificó en un espectrofotómetro de tipo Nanodrop ND-1000 y se almacenó a -80 °C.

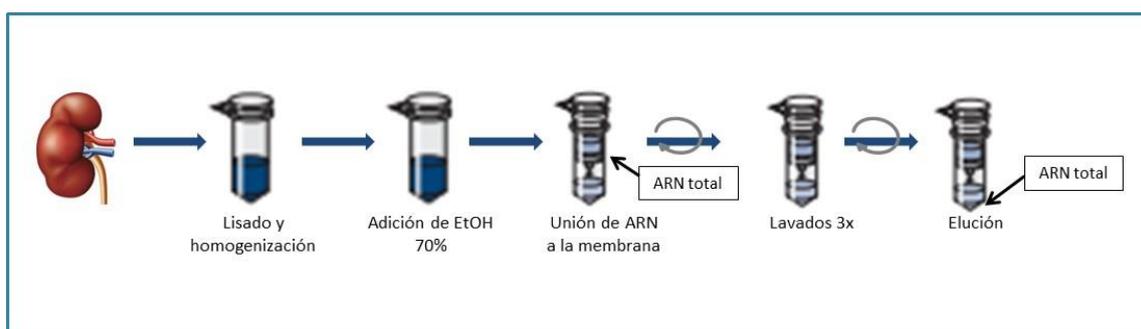


Figura 18: Esquema del proceso de extracción de ARN usando columnas de sílice (kit comercial).

7.2 Obtención de ADNc

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

Para sintetizar ADNc, se diluyeron 400 ng de ARN de cada muestra con agua bidestilada libre de ARNasas hasta un volumen final de 16 μ L. Se añadieron 4 μ L de la iScript RT Supermix 5X, que contiene transcriptasa reversa, dNTP, oligo(dT), random primers,

inhibidor de ARNasas, estabilizadores de $MgCl_2$ y el tampón de reacción. Los 20 μL totales se incubaron en un termociclador MyCycler a 25 °C durante 5 minutos, seguidos de 30 minutos a 42 °C y 5 minutos finales a 85 °C. El ADNc obtenido se almacenó a -20 °C.

7.3 Diseño de los cebadores

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

Se llevaron a cabo dos pruebas para verificar en cada caso el funcionamiento de la pareja de cebadores. En primer lugar, un gradiente de temperaturas consistente en una qPCR que utiliza diferentes temperaturas de anillamiento. Esta prueba nos permitió, por una parte, elegir la temperatura de anillamiento a la que mejor funcionasen los cebadores. Por otro lado, el análisis de la curva de disociación del producto de PCR nos permitió saber si se había amplificado un solo producto o había habido amplificaciones inespecíficas que por tanto invalidasen el uso de estos cebadores. Debido a la posibilidad de que dos productos de PCR de diferente longitud tuviesen una curva de disociación similar por su composición en pares de bases, llevamos a cabo una electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos en la anterior prueba. De este modo, pudimos comprobar que nuestra pareja de cebadores sólo ofrecía un producto de PCR. Posteriormente, comprobamos la eficiencia de amplificación de nuestra pareja de cebadores, amplificando diluciones seriadas 1:3 de una muestra, y comprobando que el producto de PCR obtenido en cada muestra conservaba la proporción con respecto a la muestra sin diluir. Así, se elaboró una recta que enfrentaba el Ct (ciclo umbral) con la dilución de la muestra. Se consideraron válidas rectas con un valor de R^2 superior a 0,99. Además, la eficiencia, es decir, la proporción de ADN que rendía la reacción de PCR en cada muestra, o pendiente de la recta, debía estar entre el 90 y el 110 %. Un resultado positivo en ambas pruebas validaba los cebadores para su uso.

Como *house keeping* se ha usado la proteína ribosómica L7 (RPL7, de sus siglas en inglés *ribosomal protein L7*)

Las parejas de cebadores utilizadas en este trabajo se detallan en la tabla 11.

La tabla en que se muestran los primers utilizados no está aún disponible para su lectura debido a que se encuentra en trámites de solicitud de patente.

Será publicado una vez obtenida la autorización pertinente

7.4 PCR a tiempo real

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

Se utilizó un termociclador iQTM 5 (*Bio-Rad*) empleando el siguiente protocolo para llevar a cabo las diferentes etapas de la reacción: 5 minutos a 95 °C, 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C (desnaturalización, etapa en la que se abre la doble hélice de ADN), 30 segundos a la temperatura de anillamiento específica (unión de los cebadores a las hebras de ADN), 30 segundos a 72 °C (elongación). El termociclador detecta la señal fluorescente emitida, siendo ésta mayor cuanto mayor es el producto de PCR.

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

8. ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Los riñones destinados a los estudios histológicos se fijaron con formaldehído tamponado al 3,7 % durante 24 horas para evitar la degradación del tejido. Después se deshidrataron en una concentración creciente de etanol desde 50 % hasta 100 % para permitir que la parafina pueda penetrar posteriormente en el tejido ya que no es miscible con el agua. Tras la deshidratación se sumergió el tejido en xileno, para sustituir el etanol y por tanto favorecer la penetración de la parafina en el siguiente paso. Finalmente, el tejido se incluyó en parafina en una estufa a 60 °C durante 24 horas y se obtuvieron bloques, que se cortaron con un microtomo (*HM-310, Micron*) en secciones transversales de 5 µm de grosor. Por último, los cortes se depositaron en un portaobjetos y se dejaron secar en la estufa durante 24 horas. Antes de realizar las diferentes tinciones, se desparafinan los cortes de tejido con xileno y se rehidratan haciéndolos pasar por una serie de graduaciones decrecientes de etanol (desde el 100 hasta el 76 %) hasta finalizar con una solución 100 % de agua destilada.

8.1 Tinción hematoxilina-eosina

Esta tinción permite el estudio de la morfología de las células que conforman el tejido y de las estructuras tisulares en conjunto debido a los dos colorantes utilizados. La hematoxilina tiene afinidad por los ácidos, por lo que se une a los ácidos nucleicos y tiñe de azul los núcleos celulares. La eosina, debido a su afinidad por los compuestos básicos tiñe de color rosado el citoplasma de la célula.

Para ello se introdujo el tejido desparafinado e hidratado en hematoxilina durante 10 minutos y en eosina durante 30 segundos. Posteriormente, se deshidrató de nuevo el tejido con alcohol siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente. Tras la deshidratación, se añadió medio de montaje DPX a los portaobjetos y se colocó un cubreobjetos para proteger los cortes teñidos. Una vez secos, se codificaron los portaobjetos para hacer un estudio ciego y se aplicó la técnica microscópica DotSlide que permite hacer una digitalización de toda la preparación histológica gracias a un escáner y un microscopio robotizado (*Olympus BX51*). A continuación, se analizaron las imágenes con el Software Olyvia (*Olympus Life Science*).

Se realizó una valoración semicuantitativa del grado de daño renal en la médula externa, por ser la estructura renal principalmente afectada por el tratamiento con cisplatino, mediante la determinación de un índice de daño histológico. Para ello, se utilizaron 3 cortes renales teñidos con hematoxilina-eosina provenientes de animales controles y 4 cortes renales con la misma tinción provenientes de ratas tratadas con cisplatino en cada punto de estudio. De cada corte se tomaron 10 fotos de la médula externa de manera aleatoria y representativa.

Cada foto se dividió en 6 secciones. En cada sección se valoraron las siguientes alteraciones morfológicas: necrosis, dilatación/atrofia tubular, depósitos de material hialino y desorganización epitelial. Para cada uno de estos parámetros se otorgó un valor de 0 a 3 en cada sección de acuerdo con el siguiente criterio:

- Valor 0: Histología normal
- Valor 1: Presencia de la alteración a valorar en un tercio de la sección
- Valor 2: Presencia de la alteración a valorar entre uno y dos tercios de la sección
- Valor 3: Presencia de la alteración a valorar en más de dos tercios de la sección

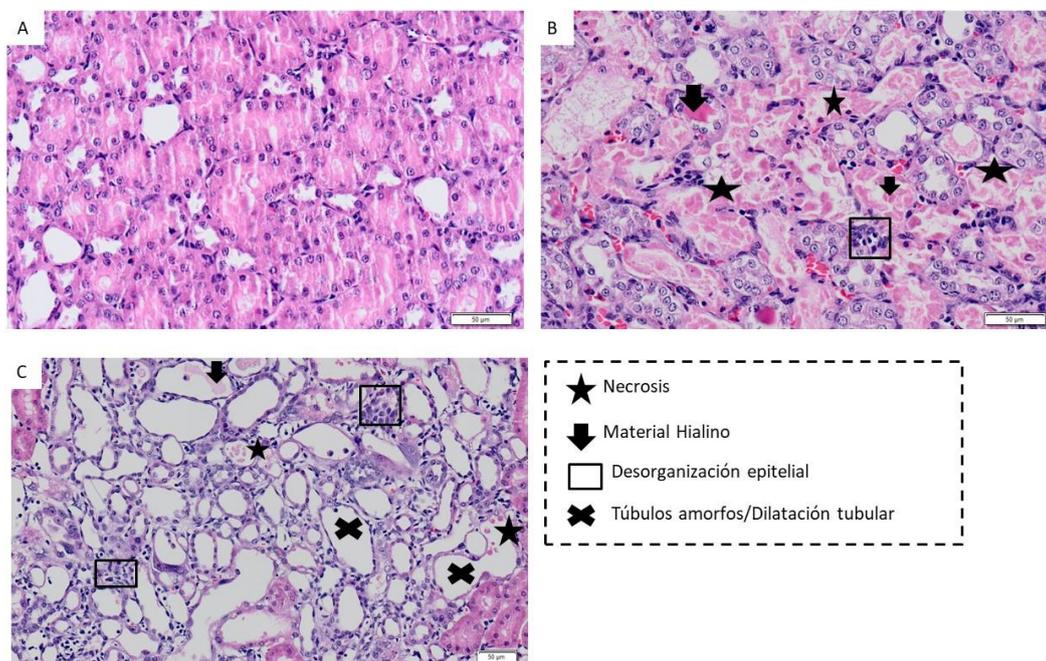


Figura 19: Imágenes representativas (200X) de la médula externa renal. Se indican los distintos parámetros estructurales a evaluar para la cuantificación del daño. (A: rata control; B: rata con DRA; C: rata recuperada de un DRA)

Para cada parámetro de alteración morfológica, se sumaron y se promediaron los valores primero en cada una de las 6 secciones por foto y después en el conjunto de las 10 fotos de un mismo riñón, obteniéndose el índice de daño para cada parámetro en cada riñón. El índice de daño total de cada parámetro se calculó sumando los índices de daño de todos los riñones del mismo grupo experimental (figura 20).

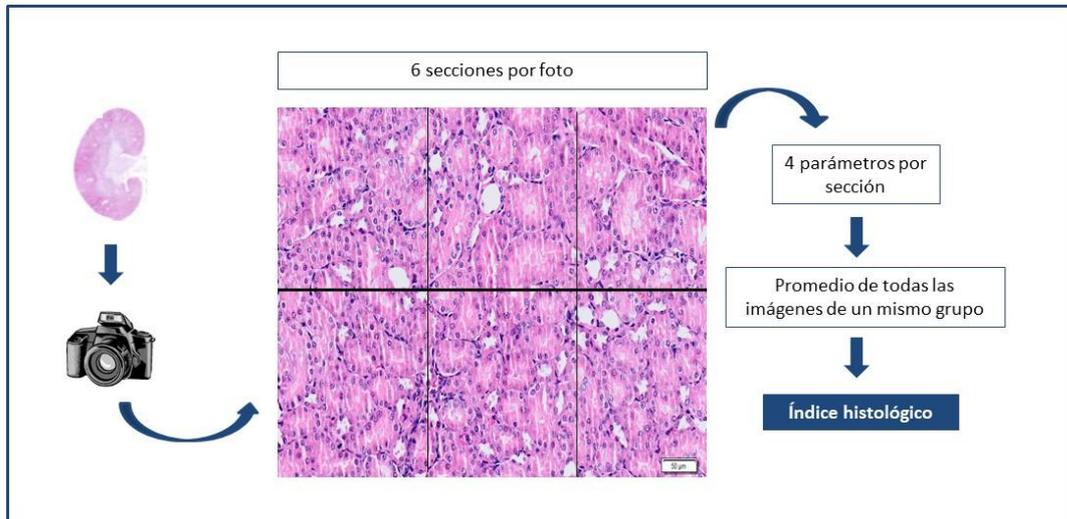


Figura 20: Esquema descriptivo de la semicuantificación de las alteraciones morfológicas

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

Esta técnica histológica permite la detección de polisacáridos, mucopolisacáridos y mucoproteínas en tejidos. La tinción se basa en una modificación química del tejido que consiste en la oxidación mediante el ácido peryódico de los enlaces carbono-carbono de los carbohidratos donde hay hidroxilos adyacentes y NH_2 primarios o grupos amino secundarios. Esto provoca la formación de grupos aldehído que serán reconocidos por el reactivo de Schiff, el cual se combinará con ellos para dar un color magenta. Esta técnica se ha utilizado para valorar las estructuras PAS+ de los túbulos, como son las membranas basales y el borde en cepillo en la membrana apical de los túbulos proximales.

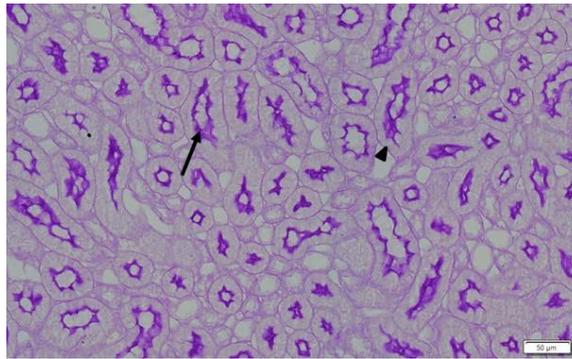


Figura 21: Imagen representativa de un riñón (200X) teñido con PAS. Se diferencia el borde en cepillo (flecha) y la membrana basal (triángulo)

Para llevar a cabo la tinción se sumergió el riñón desparafinado e hidratado en ácido peryódico durante 5 minutos, se lavó con agua y se sumergió en ácido de Schiff durante 15 minutos. Tras tres lavados de 10 minutos con agua se sumergió en hematoxilina de Mayer durante 1 minuto y se lavaron los restos de colorante con agua. Por último, se deshidrató nuevamente el tejido con etanol en distintas concentraciones siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Después de las deshidrataciones, se añadió el medio de montaje DPX a los portaobjetos y se colocó un cubreobjetos para proteger los cortes teñidos. Se codificaron los portaobjetos para hacer un estudio histológico y se aplicó la técnica microscópica DotSlide que permite hacer una digitalización de toda la preparación histológica gracias a un escáner y un microscopio robotizado. A continuación, se analizaron las imágenes con el Software Olyvia (*Olympus Life Science*).

8.3 Tinción inmunohistoquímica de Ki67

Esta técnica se basa en la localización específica de proteínas en cortes de tejidos. Consiste en la conjugación de un anticuerpo primario con la proteína a identificar y en su posterior detección mediante anticuerpos secundarios ligados a moléculas que permiten la visualización microscópica tras la adición de un cromógeno.

Realizamos una tinción inmunohistoquímica de Ki67, que es un marcador de proliferación celular. Es una proteína implicada en la regulación del ciclo celular, ausente en las células en estado quiescente o sin replicación, y que alcanza niveles máximos de expresión durante la mitosis. Se analizó en todos los puntos de estudio para evaluar el proceso de regeneración renal, ya que durante dicho proceso hay proliferación celular.

Tras la hidratación del tejido renal anteriormente descrita se llevó a cabo el desenmascaramiento del antígeno hirviendo las muestras en un tampón citrato a pH 6 durante 4 minutos a 130 °C en olla a presión y se dejó reposar 20 minutos. Después se incubó con peróxido de hidrógeno al 1,6 % durante 10 minutos y se bloqueó el tejido renal con BSA al 5 % en PBS-Tween 20 al 0,1 % durante 1 hora a temperatura ambiente para saturar los posibles sitios de unión inespecífica de los anticuerpos y se incubó con el anticuerpo primario anti-Ki67 en dilución 1:50 en la solución de bloqueo durante 44 minutos.

Después se realizó otro lavado con PBS-Tween, se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con la enzima HRP en la solución de bloqueo durante 30 minutos y se lavó de nuevo con PBS-Tween.

Por último, se deshidrataron, se montaron las preparaciones y se digitalizaron mediante la técnica DotSlide. Se evaluó y cuantificó la expresión y localización de Ki67 y se obtuvieron imágenes representativas mediante el software Olympia.

Para evaluar el nivel de expresión de Ki67, se seleccionaron 6 fotos de cada riñón (n=3 para cada punto) y se dividió cada foto en 6 secciones. En cada sección se cuantificó el número total de núcleos, teñidos en color azul por la hematoxilina y el número de núcleos Ki67+. Para evaluar la proliferación celular se calculó el porcentaje de núcleos Ki67+, a través de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Núcleos Ki67}^+ = \frac{\text{Número de núcleos Ki67}^+}{\text{Número total de núcleos}} \times 100$$

9. TRATAMIENTO DE LOS DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media (EEM). Se utilizaron entre 3 y 10 animales por cada grupo experimental.

Se aplicó el test de Kolmogorov-Smirnov a los diferentes conjuntos de datos para comprobar si su distribución era normal (se ajustaba a una campana de Gauss). En caso afirmativo, se aplicaron test estadísticos paramétricos.

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

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

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

10. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

10.1 Tabla 12: Relación de reactivos y productos utilizados

Reactivo/Producto	Referencia	Casa comercial
Aceite mineral	141003.1211	Panreac
Ácido acético	71251	Sigma-Aldrich
Ácido acético glacial	90062	Merck
Ácido trifluoroacético (TCA)	T62200	Sigma-Aldrich
ADN Polimerasa	10.003	Biotools
ADNasa	D5025	Sigma-Aldrich
Agujas 23G	4657667	Braun
Azida sódica	6688	Merck
Azul de bromofenol	8026	Sigma-Aldrich
Albúmina sérica bovina (BSA)	A7906	Sigma-Aldrich
Capilares heparinizados	7301	Deltalab
Cebadores comerciales qPCR	-	Isogen Life Science
Cisplatino	P4394	Sigma-Aldrich
Cubreobjetos	200x200	Termo Fischer Scientific

Diaminobenzidina	D4293	Sigma-Aldrich
Dieta estandarizada	AØ4	Panlab
sNTPs	11277049001	Roche
Dolethal (Pentobarbital)	424126	Vetoquinol
Eosina surgipath	353501601	Casa Álvarez
Etanol	100983	Merck
Formaldehído	344198	Calbiochem
Geles Criterion TGX 4-20%	5678094	Bio-Rad
Gentamicina	G3632	Sigma-Aldrich
Glicerol	D4751	Sigma-Aldrich
Glucosa	141341	Panreac
H₂O₂	H-6520	Sigma-Aldrich
Hematoxilina de Harris	10-2332	Casa Álvarez
Hematoxilina de Mayer	MHS16	Sigma-Aldrich
Heparina 5%	6547533	Hospira
Isoflurano (Vetflurane)	305845	Virbac
Jeringuillas 1 mL	9161406V	Braun
Jeringuillas 2 mL	4606027V	Braun
Luminol	A8511	Sigma-Aldrich
Marcador 1kb	107-87-018	Termo Fischer Scientific
Marcador pesos moleculares PageRuler™	26616	Termo Fischer Scientific
Material quirúrgico	-	Fine Scientific Tools (F.S.T)
Medidor de glucosa	84190994	Ascensia
Medidor de Na⁺	B-722 Na ⁺	Horiba
Medio de montaje DPX	10-8500	Casa Álvarez
Membranas de PVDF	66543	Pall Corporation
Metanol	34885	Sigma-Aldrich
NaCl	S3014	Sigma-Aldrich
NaOH	28245.29	Prolabo
o-toluidina	28688298	Prolabo
Parafina	-	Casa Álvarez
Kit de tinción de PAS	1016460001	Merck
PBS	1610780	Bio-rad
Películas Fuji Medical X-Ray Film Super RX	47410	Fuji Medical
p-yodofenol	l10201	Sigma-Aldrich
Pipetas de plástico de 5,10 y 25mL	-	Corning
Portaobjetos	76x26	Termo Fischer Scientific
Puntas micropipeta con filtro	-	Neptune
Puntas micropipeta sin filtro	200/80/16	Detalab
Quantichrom™ Creatinine assay kit	DICT-500	BioAssay Systems

Quantichrom™ Protein assay kit	QPCR-500	BioAssay Systems
RNeasy Mini Kit	74104	Qiagen
Dodecil Sulfato Sódico (SDS)	152002C	Bio-Rad
Tiras reactivas medidor glucosa	84191370	Ascensia
Tiourea	141743	Panreac
Tampón de transferencia Trans-blot turbo™	10026929	Bio-Rad
Tris base	443566G	Merck
Tris-glicina 10X	1610771	Bio-Rad
Tris-HCl	RES3098	Sigma-Aldrich
Tubos de plástico de 10, 15 y 20mL	-	Corning
Tubos de plástico de 2 mL	4092.7N	Deltalab
Tween-20	P7949	Sigma-Aldrich
Xileno	141769	Panreac
β-mercaptoetanol	M6250	Sigma-Aldrich

10.2 Tabla 13: Relación de equipos y aparatos utilizados

Equipo/aparato	Casa comercial
Agitador	Grant BOEKEL
Baño húmedo	Indelan
Baño seco	Termolyne, modelo 17600
Bomba de infusión	Dinko Instruments
Cassette de revelado	Amersham
Centrífugas	Eppendorf
DotSlide	Olympus BX51
Equipo electroforesis western blot	Bio-Rad
Equipo transferencia semiseca western blot	Bio-Rad
Escáner	Canon
Incubador	Termo Fischer Scientific
Jaulas metabólicas	Panlab
Lector de placa ELISA E1x800	BioTek
Máquina para anestesia inhalatoria	MSS Isoflurane
Máquina de revelado Medical X Ray Processor	Kodak
Nanodrop (ND-1000)	Termo Fischer Scientific
Termociclador Iqtm 5	Bio-Rad
Termociclador MyCycler™	Bio-Rad
Ultracentrífuga	Beckman
Ultracongelador	Termo Fischer Scientific

10.3 Tabla 14: Programas informáticos utilizado

Programa/software informático	Casa comercial
Adobe Photoshop 7.0	Adobe
Fiji (Image J)	Fiji
GraphPad Prism 7	Graphpad
Gen 5.0	Bio-Tek
Image Pro Plus	Media Cybernetics
Mendeley Desktop	Mendeley
Microsoft Excel 2016	Microsoft
Microsoft Word 2016	Microsoft
Olyvia	Olympus
Primer Blast	NCBI (National Center for Biotechnology Information)
Scion Image	Scion Corporation

*“Es mejor saber después de haber pensado y
discutido que aceptar los saberes
que nadie discute para no tener que pensar”*

Fernando Savater

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

BLOQUE I: MODELO EXPERIMENTAL DE DRA CON RECUPERACIÓN DE LA FUNCIÓN RENAL

Para la caracterización de las secuelas renales subclínicas durante el período posterior a un DRA, se ha utilizado un modelo animal de nefrotoxicidad aguda con recuperación.

El cisplatino es un fármaco antineoplásico ampliamente utilizado en el tratamiento de tumores sólidos, sin embargo, su uso se ve frecuentemente limitado por su nefrotoxicidad. El efecto nefrotóxico de cisplatino es acumulativo y dosis dependiente y se caracteriza por inducir daño en el túbulo proximal, con NTA y apoptosis, inflamación, estrés oxidativo y afectación del árbol vascular renal. Se estima que un tercio de los pacientes tratados con una dosis única de cisplatino superior a 50 mg/m² desarrollan nefrotoxicidad (Ozkok y Edelstein, 2014; George y cols., 2017).

En el modelo experimental usado en este trabajo, se ha inducido el DRA mediante la administración de cisplatino en dosis única de 5 mg/kg vía intraperitoneal (i.p) en ratas Wistar macho. Se ha seleccionado esta dosis ya que el cisplatino ejerce una toxicidad dosis-dependiente (Ozkok y Edelstein, 2014). Resultados previos de nuestro grupo de investigación muestran que la dosis de 5 mg/kg es suficiente para inducir DRA, mientras que dosis más elevadas (7,5 y 10 mg/kg) producen un daño más grave (Ferreira y cols., 2011; Ozkok y Edelstein, 2014; Tesis Dr. Victor Blanco Gozalo, 2017). La gravedad del daño es un factor de riesgo de no recuperación y de mortalidad (Chawla y cols., 2014; Forni y cols., 2017). Como el objetivo de este proyecto ha sido evaluar las secuelas asociadas a un DRA tras la normalización de la función renal, se ha seleccionado una dosis que induzca DRA pero que permita que ocurra una posterior recuperación.

1. CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN RENAL

1.1 Determinación de los niveles de creatinina plasmática

Los criterios RIFLE, AKIN y KDIGO se basan en los valores de la CrP para establecer el diagnóstico del DRA, por ello, en este trabajo de investigación, para valorar el desarrollo del DRA se ha utilizado dicho parámetro (George y cols., 2017).

El criterio AKIN para la clasificación del DRA en pacientes establece el estadio 1 cuando los niveles de CrP son 1,5 - 2 veces superiores al basal (Ricci y cols., 2011). Teniendo en cuenta que una rata de laboratorio tiene unos valores de CrP basales entre 0,4 - 0,7 mg/dL (Bolant-Hernández y cols., 1990), en nuestro modelo animal se ha establecido que los animales desarrollan DRA si el aumento de CrP es superior a 1,5 mg/mL. Nuestros resultados muestran que cuatro días después de la administración de cisplatino los niveles de CrP alcanzan el punto más elevado. Este punto se corresponde con el día de máximo daño renal, denominado D4 (figura 22).

Aunque no existe una definición consensuada de recuperación, todas las definiciones actualmente disponibles implican la normalización de la CrP (Kashani y Kellum, 2015; Chawla y cols., 2017; Forni y cols., 2017). En nuestro modelo experimental se ha establecido que la recuperación de la función renal tras el episodio de DRA se produce cuando los niveles de CrP vuelven a valores basales (0,4 - 0,7 mg/dl), a este punto se le ha denominado R0 y ocurre entre 7 y 9 días después de la administración de cisplatino (figura 22).

Se ha evaluado la función renal semanalmente hasta 4 semanas después de la recuperación, y los niveles de CrP se mantienen en valores basales durante todo este periodo. Por tanto, y de acuerdo con los criterios internacionales para el diagnóstico del DRA, nuestro modelo animal es un modelo idóneo de DRA para estudiar la recuperación. En el grupo control, los niveles de CrP no se alteran a lo largo del experimento.

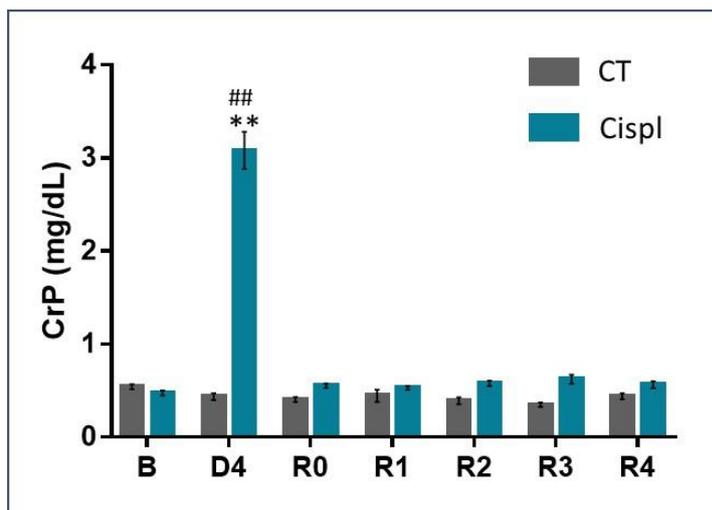


Figura 22: Evolución de los valores de creatinina plasmática. Se muestran los valores de los animales tratados con cisplatino 5 mg/kg (Cispl) y los animales control (CT) en los diferentes puntos de estudio (B: basal; D4: día de máximo daño renal; R0: día de la recuperación; R1, R2, R3 y R4: 1, 2, 3 y 4 semanas después de R0, respectivamente). Cada barra representa la media \pm EEM de 5-30 animales. ^{##} $p < 0,01$ vs basal (B) Cispl; ^{**} $p < 0,01$ vs CT en ese punto.

1.2 Determinación del aclaramiento de creatinina y de la proteinuria

Para completar la evaluación de la función renal, se han medido también los valores de proteinuria y se ha determinado el aclaramiento de creatinina (ClCr). El ClCr es una estimación más fiable de la TFG que la CrP, ha demostrado un diagnóstico más temprano que la CrP de la disfunción renal y un mejor seguimiento de los tratamientos (Den Bakker y cols., 2018). Nuestros resultados muestran que la disminución del ClCr coincide con el aumento de la CrP 4 días después de la administración de cisplatino, y que el día en que se recupera la función renal (R0), el ClCr también alcanza los valores basales (figura 23). Por tanto, en nuestro modelo experimental, el ClCr no ofrece ninguna mejora en el diagnóstico de la recuperación respecto a CrP.

La proteinuria es también un índice de daño renal. Puede deberse tanto a un daño tubular que altere los mecanismos de reabsorción de las proteínas, como a una alteración en la barrera de filtración glomerular, que tenga como consecuencia un aumento de la permeabilidad, o también a una combinación de ambos mecanismos (Emeigh-Hart, 2005). El rango normal de excreción urinaria de proteínas en una rata Wistar se encuentra alrededor de los 5-10 mg/día (Bolant-Hernández y cols., 1990). Nuestros resultados muestran un incremento significativo de la proteinuria el día de

máximo daño renal (D4), volviendo a valores basales el día en que se establece la recuperación (R0) (figura 23).

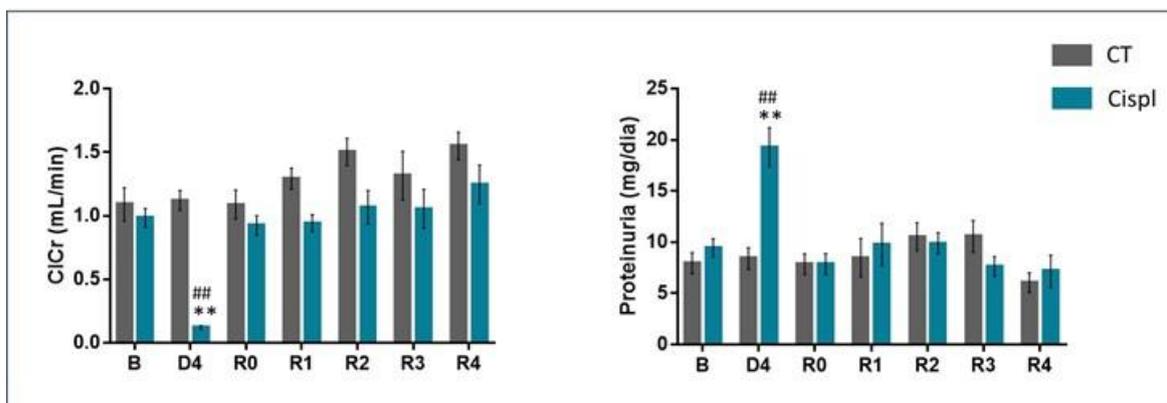


Figura 23: Evolución del aclaramiento de creatinina (ClCr) y de la proteinuria. Se muestran los valores de los animales tratados con cisplatino 5 mg/kg (Cispl) y de los animales control (CT) en los diferentes puntos de estudio (B: basal; D4: día de máximo daño renal; R0: día de la recuperación; R1, R2, R3 y R4: 1, 2, 3 y 4 semanas después de R0, respectivamente). Cada diagrama representa la media \pm EEM de 5-30 animales. ### $p < 0,01$ vs basal (B) Cispl; ** $p < 0,01$ vs CT en ese punto.

Todos estos resultados muestran que el modelo animal establecido reproduce experimentalmente un DRA nefrotóxico, definido por cambios en más de un parámetro de diagnóstico, como son aumento en la CrP y la proteinuria y la reducción del ClCr, lo que representa una reducción de la TFG. Tras el DRA se recupera la función renal, determinada por la vuelta a valores basales de los parámetros analizados de función renal.

Después de un DRA se ponen en marcha mecanismos de reparación renal que inducen cambios estructurales y anatómicos en el riñón. La CrP refleja cambios en la TFG, la cual puede permanecer en valores normales aunque se haya perdido un 50 % de la masa renal. Por tanto, que la CrP vuelva a valores basales tras un DRA puede no ser sinónimo de que la integridad tisular se haya restaurado por completo (Goldstein y cols., 2014; Kashani y Kellum 2015; George y cols., 2017).

2. ESTUDIO DE LAS SECUELAS ESTRUCTURALES SUBCLÍNICAS

Para determinar si en el periodo posterior a un DRA existen en el riñón alteraciones estructurales, aunque los parámetros de función renal estén recuperados, realizamos un análisis histológico en los riñones obtenidos de ratas tratadas con cisplatino en los diferentes puntos de estudio de este trabajo, mediante tinciones con hematoxilina-eosina y con ácido peryódico de Schiff (PAS). Dado que el cisplatino induce la mayor parte del daño en la médula externa, concretamente en el segmento S3 del túbulo proximal (McDuffie y cols., 2013), ésta es la parte que se ha evaluado de manera más profunda, aunque se ha analizado y comprobado la ausencia de daño en otras zonas del riñón.

2.1 Evaluación de la estructura renal mediante la tinción con hematoxilina-eosina

La tinción con hematoxilina-eosina nos permite determinar visualmente si existen alteraciones histológicas de la estructura de un órgano.

Nuestros resultados muestran que el cisplatino produce en el punto D4 una necrosis tubular masiva, con una pérdida de la integridad tisular y acumulación de restos celulares en el lumen tubular con formación de cilindros de material hialino que obstruyen los túbulos (figura 24). El principal mecanismo nefrotóxico del cisplatino es el daño en las células del túbulo proximal, donde induce NTA (Miller y cols., 2010). La necrosis de las células tubulares, el desprendimiento de las células al lumen tubular, la obstrucción tubular y la pérdida del borde en cepillo son hallazgos típicos de la NTA (Lameire, 2005). Los animales control tienen una histología normal a lo largo de todo el experimento, similar a la del estado basal (figura S1, material suplementario).

El día en que tiene lugar la recuperación de la función renal (punto R0) se sigue observando una estructura renal alterada. Por un lado, continúa habiendo alteraciones asociadas a la NTA, como necrosis celular o depósitos de material hialino, aunque en un grado mucho menor que en el punto D4. Por otro lado, se observan alteraciones estructurales asociadas a la regeneración epitelial, como desorganización epitelial y dilatación tubular (figura 24). A medida que avanza el período de reparación, las alteraciones estructurales se van reduciendo y el tejido renal recupera progresivamente

la normalidad. Una y dos semanas después de la recuperación (R1 y R2) aún se observa una estructura renal alterada, predominando la desorganización epitelial, la dilatación tubular y habiendo aún muerte celular, aunque en menor grado que en el punto R0. En el punto R3, la principal alteración que se observa es la desorganización epitelial. Cuatro semanas después de que se recupere la función renal (R4), la estructura renal está casi normalizada, aunque se siguen observando algunos focos de desorganización epitelial (figura 24).

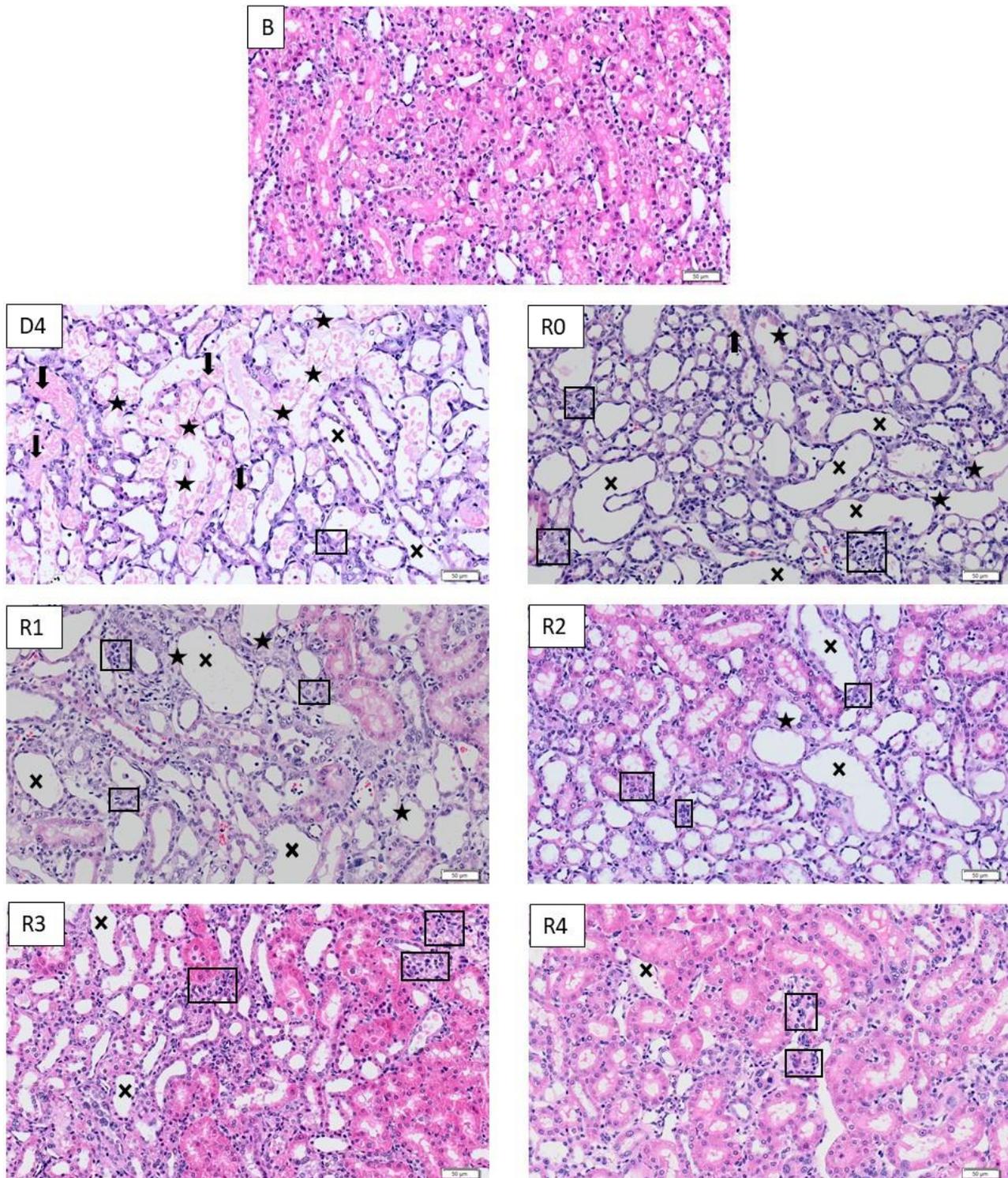


Figura 24: Evaluación de las alteraciones histológicas renales tras un DRA. Imágenes representativas (200X) de cortes histológicos de la médula externa renal teñidos con hematoxilina-eosina. Las imágenes corresponden a animales tratados con cisplatino en los diferentes puntos de estudio (B: basal; D4: día de máximo daño renal; R0: día de la recuperación; R1, R2, R3 y R4: 1, 2, 3 y 4 semanas después de R0, respectivamente). Se indica la escala (50 µm). Las X simbolizan túbulos amorfos, los rectángulos desorganización epitelial, las estrellas necrosis y las flechas depósitos de material hialino o depósitos celulares.

En la figura 25, se muestra la cuantificación de las alteraciones estructurales valoradas a través de la tinción con hematoxilina-eosina, con una escala de 0-3 para cada parámetro con los criterios que se indican en la sección de “Materiales y Métodos”.

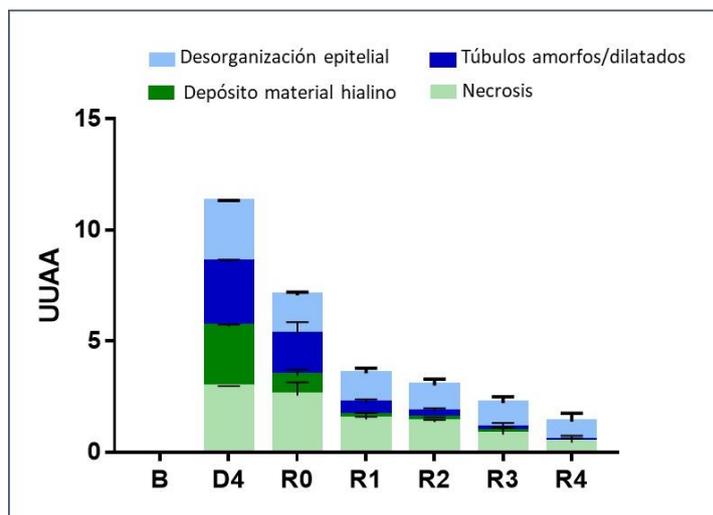


Figura 25: Cuantificación del daño renal en la zona medular externa. Se ha realizado en cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina de animales tratados con cisplatino (5 mg/kg) obtenidos en los diferentes puntos de estudio (B: basal; D4: día de máximo daño renal; R0: día de la recuperación; R1, R2, R3 y R4: 1, 2, 3 y 4 semanas después de R0, respectivamente). La puntuación máxima de daño es de 12 puntos (3 puntos por cada parámetro evaluado).

2.2 Evaluación del borde en cepillo y la membrana basal mediante la tinción con PAS

La tinción PAS tiñe el borde en cepillo y la membrana basal, permitiendo evaluar si existen alteraciones en esas estructuras.

Nuestros resultados muestran que en D4 hay una pérdida del borde en cepillo de las células del túbulo proximal (figura 26). En la NTA las células epiteliales pueden sufrir dos tipos de daño: letal, lo que conduce a la muerte celular por necrosis, o subletal que implica, entre otros, la pérdida del borde en cepillo (Basile y cols., 2012). El día en que tiene lugar la recuperación de la función renal (R0), se observa un epitelio tubular aplanado y ausencia de borde en cepillo. El borde en cepillo se va regenerando lentamente a lo largo de período post-DRA analizado, de modo que en R1 aún existen numerosas células tubulares proximales en las que no se ha regenerado el borde en

cepillo. Finalmente, cuatro semanas después de la recuperación (R4) el borde en cepillo parece casi regenerado por completo (figura 26). En los animales control, se observa un borde cepillo y una membrana basal normal a lo largo de todo el período de estudio (figura S2, material suplementario).

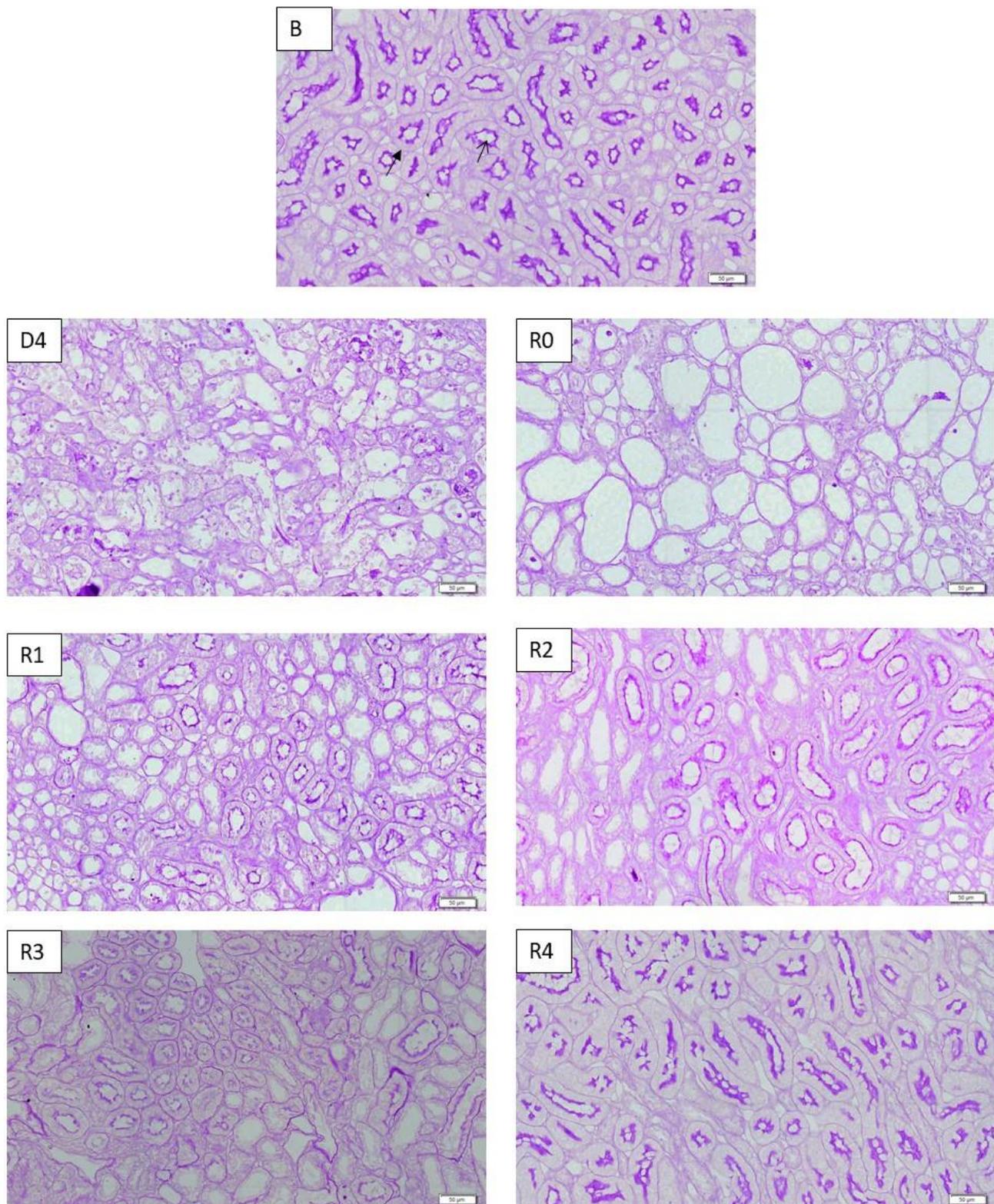


Figura 26: Evaluación del borde en cepillo y de la membrana basal. Imágenes representativas (200X) de cortes histológicos de la zona de la médula externa teñidos con ácido peryódico de Schiff. Las imágenes corresponden a animales tratados con cisplatino (5 mg/kg) en los diferentes puntos de estudio (B: basal; D4: día de máximo daño renal; R0: día de la recuperación; R1, R2, R3 y R4: 1, 2, 3 y 4 semanas después de R0, respectivamente). Las flechas con punta triangular señalan la membrana basal y las flechas con punta abierta representan el borde en cepillo.

Tanto el análisis histológico realizado mediante la tinción con hematoxilina-eosina como con PAS muestran dos tipos de alteraciones en el proceso de reparación renal. Por un lado, aquellas que están asociadas a las características de la NTA, como la necrosis celular y los depósitos de material hialino, que son especialmente notables en el punto D4, se mantienen en las primeras fases del proceso de reparación, aunque en mucho menor grado, y desaparecen casi totalmente en el punto R4. Tras un DRA que cursa con necrosis y daño celular, dichos eventos pueden continuar durante el proceso de regeneración (Toback, 1992). Por otro lado, las características que parecen estar más relacionadas con el proceso de regeneración renal como la desorganización epitelial, presencia de túbulos anormales o dilatados, ausencia de borde en cepillo y un epitelio tubular aplanado.

La dilatación tubular puede ocurrir tras la exposición a xenobióticos, como el cisplatino y puede ser consecuencia de un daño tóxico directo en el epitelio tubular, lo que interferirá con los mecanismos de absorción y secreción tubular (Seely y Brix, 2014). Este tipo de alteración la observamos en el momento de máximo daño (D4). Pero la dilatación tubular también está asociada a la fase de regeneración de un DRA. Varios estudios demuestran que, tras una NTA, aparece dilatación tubular en la fase de regeneración (Biro y cols., 2016; Glastras y cols., 2016) que podría ser debida a la obstrucción tubular observada durante el episodio de DRA. Sin embargo, otros estudios muestran que no existe relación entre la dilatación tubular y la obstrucción de los túbulos y que ésta alcanza su máximo nivel en las fases tempranas de la regeneración y está asociada a la presencia de las células epiteliales aplanadas en regeneración y a alteraciones en la membrana basal. Tras una necrosis tubular, se ha observado un epitelio aplanado en los túbulos dañados (Venkatachalam y cols., 1981; Shimizu y cols., 1994). Estos datos concuerdan con nuestros resultados, donde observamos un menor número de túbulos amorfos según avanza temporalmente la recuperación (figura 24).

La ausencia del borde en cepillo durante el proceso de reparación puede estar asociada a los fenómenos celulares implicados en este proceso. Durante el período posterior a un DRA se ponen en marcha mecanismos de reparación que implican la desdiferenciación de las células epiteliales supervivientes, la migración, la proliferación y finalmente la rediferenciación para recuperar el fenotipo de célula epitelial tubular, restaurando la

integridad tisular de la nefrona (Bonventre, 2003; Nony y Schnellmann, 2003). Las células epiteliales desdiferenciadas tienen un fenotipo caracterizado por una pérdida del borde en cepillo, son más pequeñas y estrechas que las células diferenciadas y tienen niveles bajos de mitocondrias (Smeets y cols., 2013; Hansson y cols., 2014). Durante la fase de regeneración de un DRA, este fenotipo celular es predominante. Se ha debatido si este fenotipo celular, denominado STC son en realidad células progenitoras renales o células epiteliales desdiferenciadas. Los últimos estudios llevados a cabo demostrarían que las STCs son un fenotipo transitorio de desdiferenciación y no una subpoblación de células progenitoras (Berger y Moeller, 2014; Kusaba y cols., 2014; Kramann y cols., 2015). De manera que la ausencia de borde en cepillo y la presencia de células más estrechas, observadas tras un DRA, podría deberse a la presencia de células desdiferenciadas (fenotipo STC) que están llevando a cabo el proceso de reparación renal y que aún no han llegado a la última fase de este proceso, la rediferenciación.

A lo largo de período post-DRA analizado, la dilatación tubular va desapareciendo, a medida que se recupera también un epitelio tubular de grosor normal y se va regenerando el borde en cepillo. Una dilatación tubular transitoria en el proceso de reparación ha sido descrita en un modelo de DRA por isquemia/reperfusión, donde la regeneración de los túbulos normales coincide con el desarrollo del borde en cepillo en las células y con la desaparición de un epitelio tubular aplanado (Shimizu y cols., 1994). La regeneración del borde en cepillo va aumentando a medida que avanza la recuperación, siendo casi total en R4, hecho que coincidiría con que las células desdiferenciadas proliferan y se rediferencian, adquiriendo de nuevo el fenotipo epitelial tubular y regenerando, por tanto, una estructura renal normal.

2.3 Evaluación de la proliferación celular mediante tinción inmunohistoquímica de Ki67

Una de las etapas de la regeneración renal es la proliferación de las células tubulares remanentes. Para evaluar la proliferación celular durante la recuperación del DRA se cuantificó la expresión de la proteína Ki67 mediante tinción inmunohistoquímica. Ki67

es un marcador del ciclo celular que se expresa desde la fase G1 hasta la fase mitótica (Lombardi y cols., 2016).

Nuestros resultados muestran que el día en que se recupera la función renal (R0), aumenta el número de células en proliferación en comparación con el punto basal y que se mantiene elevado hasta dos semanas después de que se normalice la función renal (R2) (figuras 27 y 28). A partir de la tercera semana tras la recuperación, el número de células positivas para Ki67 es casi nulo por lo que parece que la actividad proliferativa vuelve a valores basales. En condiciones normales, las células epiteliales tubulares tienen una tasa de división baja (Nadasdy y cols., 1994). Después de un DRA en el que se produce muerte celular, tiene lugar una respuesta proliferativa rápida y extensiva (Bonventre, 2003). Nuestros resultados concuerdan con estos datos, ya que en la fase más temprana de la regeneración (R0) es cuando hay una mayor actividad proliferativa (figura 27). En los animales control la tasa de proliferación es similar al basal en todos los puntos de estudio analizados (figura S3, material suplementario).

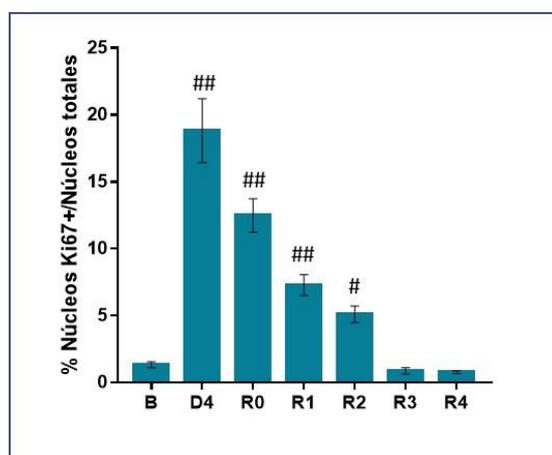


Figura 27: Cuantificación de núcleos Ki67⁺. Se muestran los resultados de la cuantificación de núcleos Ki67⁺ de los animales tratados con cisplatino en los diferentes puntos de estudio (B: basal; D4: día de máximo daño renal; R0: día de la recuperación; R1, R2, R3 y R4: 1, 2, 3 y 4 semanas después de R0, respectivamente). Cada diagrama representa la media \pm EEM de 3 animales. ## $p < 0,01$ vs basal (B) Cispl.

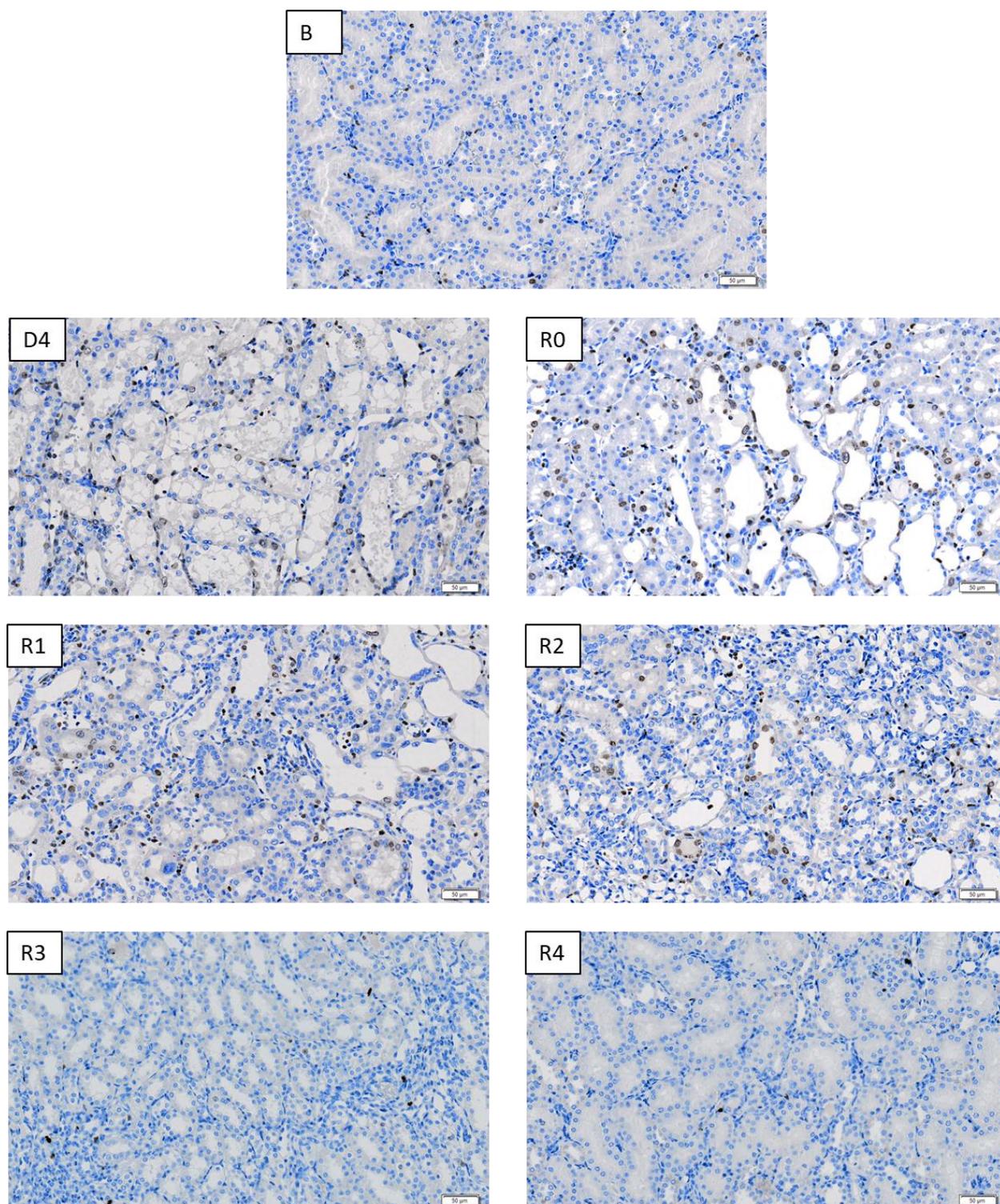


Figura 28: Evaluación de la proliferación celular después de un DRA. Imágenes representativas (200X) de cortes histológicos de la médula externa renal teñidos con inmunohistoquímica de Ki67. Las imágenes corresponden a animales tratados con cisplatino en los diferentes puntos de estudio (B: basal; D4: día de máximo daño renal; R0: día de la recuperación; R1, R2, R3 y R4: 1, 2, 3 y 4 semanas después de R0, respectivamente). Se indica la escala (50 µm).

La mayor tasa de proliferación celular durante la fase de regeneración renal coincide con la mayor presencia de alteraciones estructurales asociadas a este proceso, como la ausencia de borde en cepillo, un epitelio tubular aplanado o la presencia de túbulos con una morfología anormal; mientras que la normalización de la estructura renal y la regeneración del borde en cepillo tiene lugar cuando la tasa de proliferación ha vuelto a valores basales (puntos R3 y R4), lo que indicaría que el proceso de reparación se ha completado.

En resumen, nuestros resultados muestran que en el punto R0, donde la CrP, la proteinuria y el ClCr están normalizados, sigue existiendo daño estructural y la regeneración está iniciada pero no completada por lo que estos parámetros no son buenos indicadores para monitorizar la recuperación tras un DRA. Además, nuestros resultados muestran que hasta R2, y en menor medida en R3 y R4, siguen existiendo en el riñón alteraciones estructurales importantes, que podrían inducir alteraciones en los mecanismos de función renal o incluso ser causantes de un aumento de la susceptibilidad ante nuevos daños.

3. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN TUBULAR

El resto del contenido no está aún disponible para su lectura debido a que se encuentra en trámites de solicitud de patente.

Será publicado una vez obtenida la autorización pertinente

3.1 Evaluación de la excreción fraccional de sodio y glucosa

Una de las principales funciones del sistema renal es mantener la homeostasia de electrolitos y minerales, por lo que la determinación de la fracción de excreción de estos se utiliza como medida de función tubular. Cuando hay disfunción tubular, se producen cambios en la fracción de excreción de algunos electrolitos, que podrá disminuir o

aumentar en función de la dirección del transporte del electrolito en el riñón (reabsorción o secreción) (Emeigh-Hart, 2005). Futrakul y cols. (1999) observaron que la excreción fraccional de sodio (EFNa) es un parámetro útil para valorar la integridad tubular y refleja disfunción tubular o defectos en el transporte tubular de solutos, ambos parámetros asociados al DRA.

En individuos sanos la EFNa es inferior al 1 %, 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 vinculada entre sí, en un complejo proceso de interacciones (Rossaint y Zarbock, 2016). Sin embargo, este valor aumenta por encima del 1 % en individuos con un DRA de tipo intrínseco, debido a que las células tubulares dañadas son incapaces de reabsorber correctamente dicho electrolito. En las ratas, el valor normal de EFNa se sitúa en torno al 0,5 % (Quiros y cols., 2010).

La excreción fraccional de glucosa (EFGlc) permite evaluar el funcionamiento del transporte tubular de la nefrona. La glucosa es una molécula 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 proximal de la nefrona. La presencia de glucosa en la orina implica que los mecanismos de transporte de las células tubulares se encuentran dañados, como ocurre en el DRA, o que la concentración de glucosa en el filtrado sobrepasa el umbral renal de los transportadores de glucosa y el sistema tubular no es capaz de reabsorber su exceso, como ocurre en la diabetes (Brodehl y cols., 1987; Alsahli y Gerich, 2017).

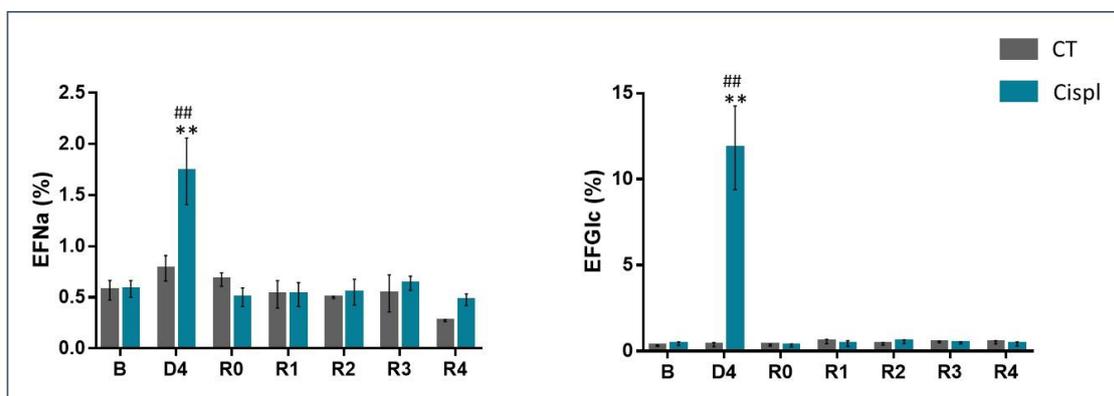


Figura 29: Evaluación de la excreción fraccional de Na⁺ (EFNa) y de glucosa (EFGlc). Se muestran los valores de los animales tratados con cisplatino 5 mg/kg (Cispl) y los animales control (CT) en los diferentes puntos de estudio (B: basal; D4: día de máximo daño renal; R0: día de la recuperación; R1, R2, R3 y R4: 1, 2, 3 y 4 semanas después de R0, respectivamente). Cada

diagrama representa la media \pm EEM de 5 animales. $^{##}p<0,01$ vs basal (B) CDDP; $^{**}p<0,01$ vs CT en ese punto.

Parte del contenido no está aún disponible para su lectura debido a que se encuentra en trámites de solicitud de patente.

Será publicado una vez obtenida la autorización pertinente

4. EVALUACIÓN DEL RIESGO FUNCIONAL

Para evaluar la predisposición a sufrir nuevos episodios de DRA, se llevó a cabo un test de riesgo funcional mediante la administración de gentamicina en dosis subtóxicas (50 mg/kg/día, 6 días) en los puntos de recuperación definidos en el modelo anterior (R0, R1, R2, R3 y R4) tanto en animales que habían desarrollado DRA en el punto D4 como en animales controles, es decir, sin DRA previo.

La gentamicina es un antibiótico aminoglucósido que produce nefrotoxicidad en el 10-20 % de los pacientes. La lesión típica de la gentamicina es una NTA en los túbulos proximales (Biro y cols., 2016). Estudios previos en nuestro grupo de investigación, han establecido que la dosis de 50 mg/kg/día de gentamicina durante 6 días en ratas Wistar macho es subtóxica, ya que no induce la aparición de síntomas de enfermedad renal, ni a nivel funcional ni estructural (Quiros y cols., 2010).

Nuestros resultados muestran que la administración de gentamicina subtóxica a animales que sufrieron un DRA previo desde el día en que se recupera la función renal (R0) (figura 31) o desde una semana después (R1) (figura 32), induce el desarrollo de un nuevo episodio de DRA, caracterizado por incrementos en la CrP y la proteinuria, una disminución del ClCr y alteraciones estructurales renales severas al día siguiente de haber finalizado el tratamiento con gentamicina (figura 34). Sin embargo, cuando la gentamicina se administró a partir de la segunda semana post-recuperación (R2) (figura 33) no se observaron alteraciones en los parámetros de función renal ni tampoco en la estructura renal (figura 34) y por tanto el riesgo funcional ha desaparecido. Al desaparecer la susceptibilidad a desarrollar nuevos episodios de DRA dos semanas

después de la recuperación, el test de riesgo funcional no se realizó en los puntos de recuperación R3 ni R4.

Los animales control (sin DRA previo) que reciben la misma dosis de gentamicina no desarrollan DRA, ni tampoco se observan lesiones a nivel estructural, lo que confirma que la gentamicina se está usando a dosis subtóxicas.

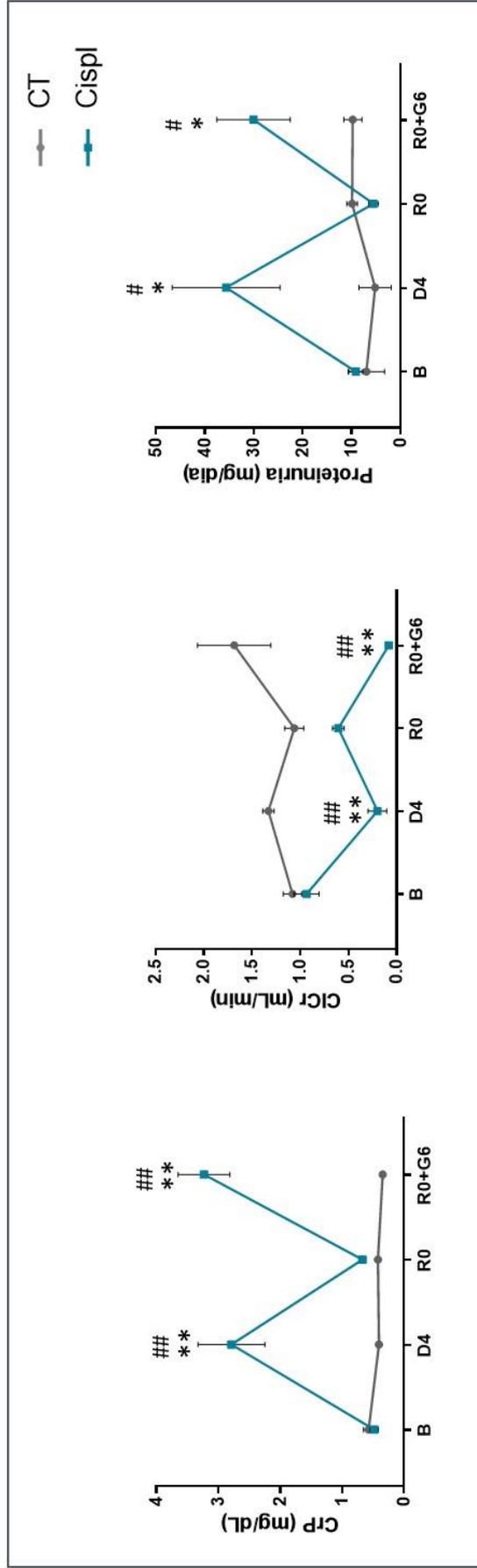


Figura 31: Evaluación del riesgo funcional el día en que se recupera la función renal tras un DRA (R0). Se muestran los valores de creatinina plasmática, aclaramiento de creatinina y proteinuria. Al grupo Cispl se le administró una dosis de cisplatino 5 mg/kg en el día basal (B), a los animales del grupo CT se les administró solución salina. El día en que los animales del grupo Cispl se recuperan del DRA (R0) se administró la gentamicina en dosis subtóxica (50 mg/kg/día, 6 días), al igual que a los animales del grupo CT. Al final del tratamiento con la gentamicina, se evaluó el desarrollo de un nuevo episodio de DRA (R0+G6). Cada punto representa la media ± EEM de 6 animales. ^{##}p<0,01 vs basal (B) CDDP; [#]p<0,05 vs basal (B) CDDP; ^{**}p<0,01 vs CT en ese punto; ^{*}p<0,05 vs CT en ese punto

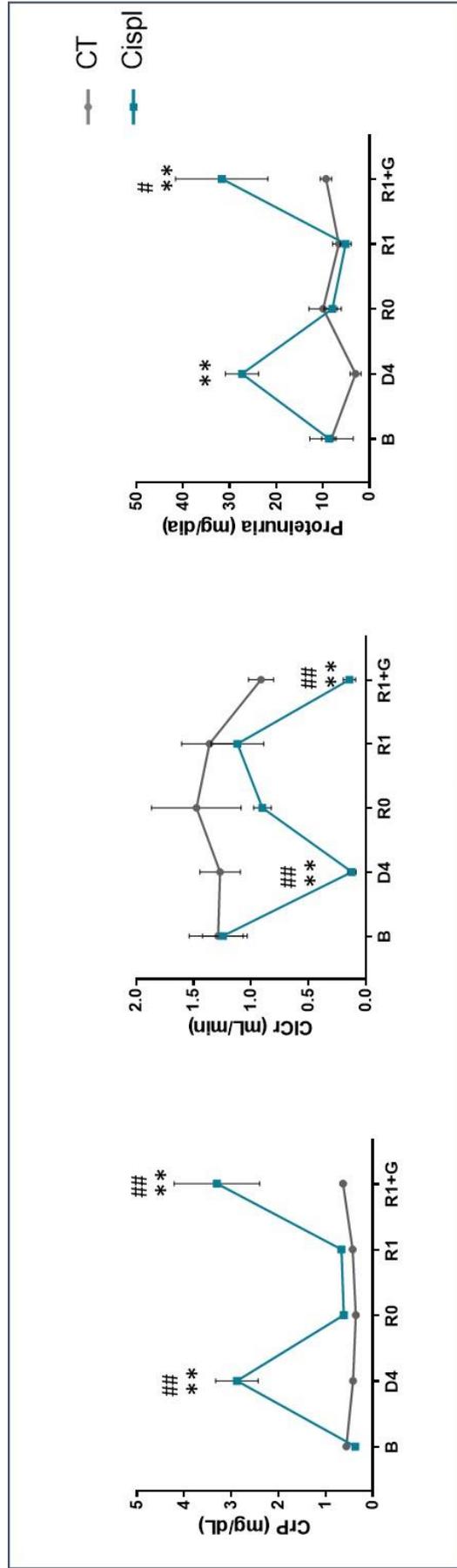


Figura 32: Evaluación del riesgo funcional una semana después de la recuperación de la función renal tras un DRA (R1). Se muestran los valores de creatinina plasmática, aclaramiento de creatinina y proteinuria. Al grupo Cisp se le administró una dosis de cisplatino 5 mg/kg en el día basal (B), a los animales del grupo CT se les administró solución salina. Una semana después de que los animales del grupo Cisp se recuperan del DRA (R1) se administró la gentamicina en dosis subtóxicas (50 mg/kg/día, 6 días), al igual que a los animales del grupo CT. Al final del tratamiento con la gentamicina, se evaluó el desarrollo de un nuevo episodio de DRA (R1+G). Cada punto representa la media ± EEM de 6 animales. ^{##} $p < 0,01$ vs basal (B) CDDP; ^{**} $p < 0,05$ vs basal (B) CDDP; [#] $p < 0,01$ vs CT en ese punto.

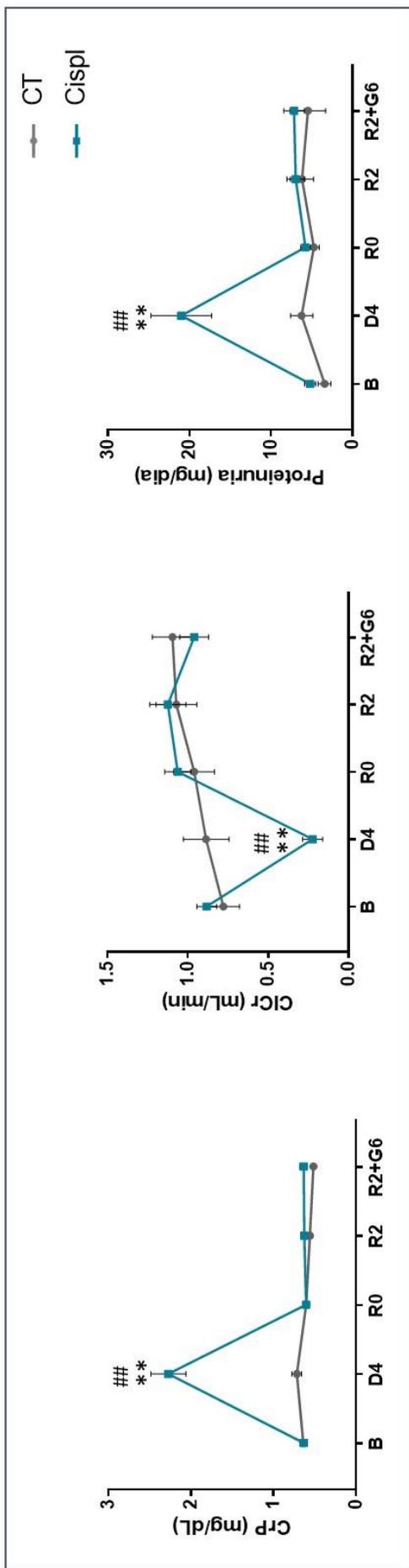


Figura 33: Evaluación del riesgo funcional dos semanas después de la recuperación de la función renal tras un DRA (R2). Se muestran los valores de creatinina plasmática, aclaramiento de creatinina y proteinuria. Al grupo Cispl se le administró una dosis de cisplatino 5 mg/kg en el día basal (B), a los animales del grupo CT se les administró solución salina. Dos semanas después de que los animales del grupo Cispl se recuperan del DRA (R2) se administró la gentamicina en dosis subtóxicas (50 mg/kg/día, 6 días), al igual que a los animales del grupo CT. Al final del tratamiento con la gentamicina, se evaluó el desarrollo de un nuevo episodio de DRA (R2+G6). Cada punto representa la media ± EEM de 8 animales. ##*p*<0,01 vs basal (B) CDDP; ***p*<0,01 vs CT en ese punto

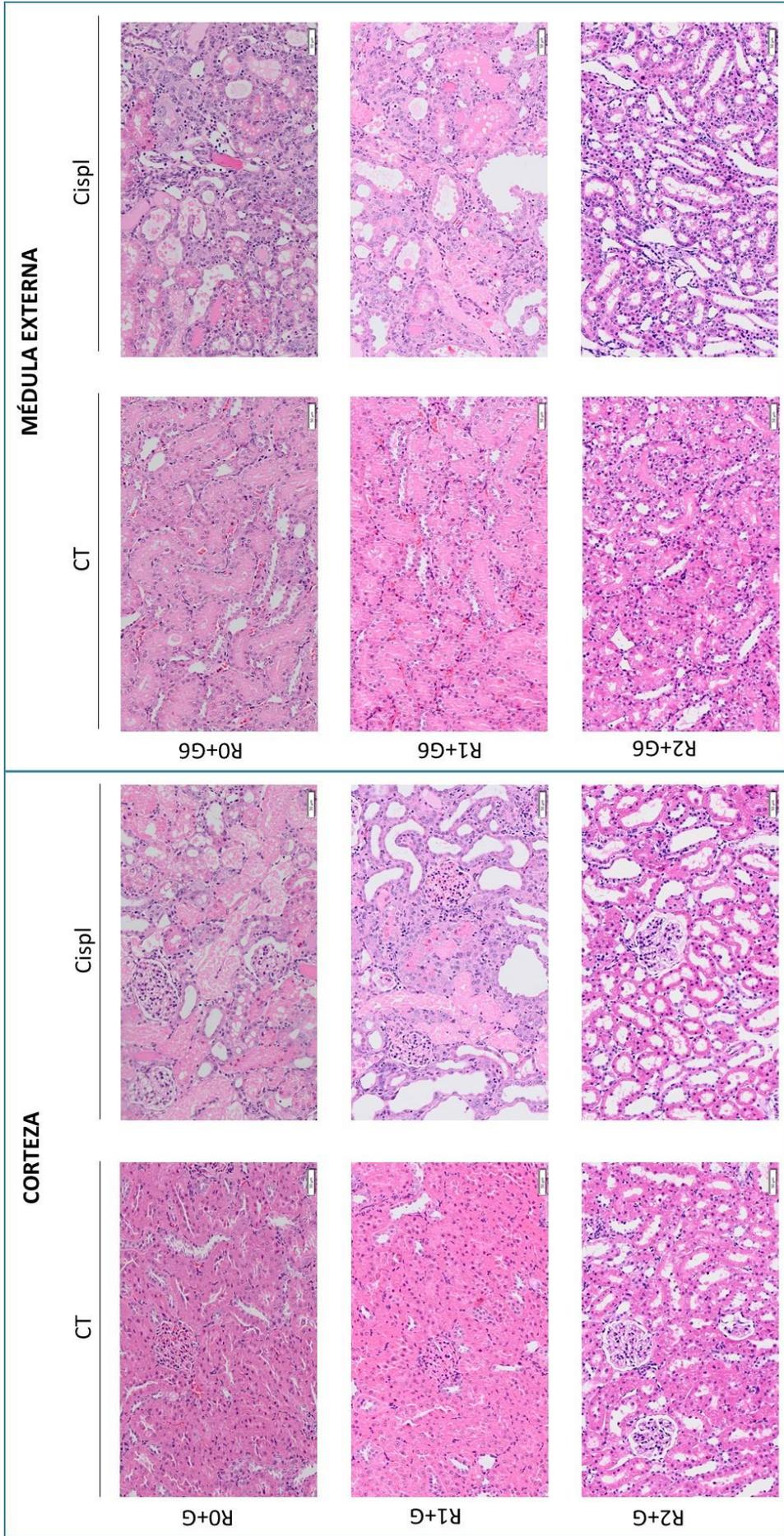


Figura 34: Análisis histológico de los riñones de ratas tratadas con dosis subtóxicas de gentamicina. Imágenes representativas (200X) de cortes histológicos de la corteza y de la médula externa renal teñidos con hematoxilina-eosina de animales tratados con cisplatino (5 mg/kg) y posteriormente con gentamicina (50 mg/kg/día, 6 días) el día de la recuperación (R0+G) o 2 semanas después (R1+G); y de los animales control (CT) a los que se administró suero salino en lugar de cisplatino 5 mg/kg) y posteriormente gentamicina (50 mg/kg/día, 6 días) en los días ya indicados. Las imágenes corresponden al día siguiente de finalizar el tratamiento con la gentamicina.

El resto del contenido no está aún disponible para su lectura debido a que se encuentra en trámites de solicitud de patente.

Será publicado una vez obtenida la autorización pertinente

BLOQUE II: BIOMARCADORES URINARIOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL DAÑO RENAL SUBCLÍNICO ASOCIADO AL PERÍODO POSTERIOR A UN DRA

El resto del contenido no está aún disponible para su lectura debido a que se encuentra en trámites de solicitud de patente.

Será publicado una vez obtenida la autorización pertinente

“Nada en este mundo debe ser temido, solo entendido.

*Ahora es el momento de comprender más,
para que podamos temer menos”*

Marie Curie

DISCUSIÓN FINAL

El resto del contenido no está aún disponible para su lectura debido a que se encuentra en trámites de solicitud de patente.

Será publicado una vez obtenida la autorización pertinente

CONCLUSIONES

El resto del contenido no está aún disponible para su lectura debido a que se encuentra en trámites de solicitud de patente.

Será publicado una vez obtenida la autorización pertinente

BIBLIOGRAFÍA

Alsahli, M. y Gerich, J. E. (2017). Renal glucose metabolism in normal physiological conditions and in diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 133, 1-9.

Antón Gamero, M. y Fernández Escribano, A. (2014). DAÑO RENAL AGUDO. *Revista de la Sociedad Española de Pediatría*, 1, 355-71. Disponible en: http://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/22_dano_renal_agudo.pdf (Accedido: 12 de julio de 2018).

Arias Rodríguez, M., Aljama, P. y Hernando Avendaño, L. (2013). Nefrología clínica. *Revista Médica Panamericana*. Disponible en: <https://www.medicapanamericana.com/Libros/Libro/4877/Hernando-Nefrologia-Clinica.html>.

Avendaño, L. . (2009). Nefrología Clínica. *Panamericana*. Disponible en: <http://booksmedicos.org/nefrologia-clinica-avendano/> (Accedido: 30 de junio de 2018).

Den Bakker, E., Gemke, R., van Wijk, J. A. E., Hubeek, I., Stoffel-Wagner, B. y Bökenkamp, A. (2018). Combining GFR estimates from cystatin C and creatinine—what is the optimal mix?. *Pediatric Nephrology*, 33(9), 1553-1563.

Basile, D., Anderson, M. y Sutton, T. (2012). Pathophysiology of Acute Kidney Injury. *Comprehensive Physiology*, 2(2), 1303-1353.

Bellomo, R., Ronco, C., Kellum, J. A., Mehta, R. L., Palevsky, P. y ADQI workgroup (2004). Acute renal failure – definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group». *Critical Care August*, 8(4), 204-212.

Bellomo, R., Ronco, C., Mehta, R. L., Asfar, P., Boisramé-Helms, J., Darmon, M., Diehl, J. L., Duranteau, J., Hoste, E. A. J., Olivier, J. B., Legrand, M., Lerolle, N., Malbrain, M., Mårtensson, J., Oudemans-van S., Parienti, J. J., Payen, D., Perinel, S., Peters, E., Pickkers, P., Rondeau E., Schetz, M., Vinsonneau, C., Wendon, J., Zhang, L. y Laterre, P, F. (2017). Acute kidney injury in the ICU: from injury to recovery: reports from the 5th Paris International Conference. *Annals of intensive care*, 7-49.

Berger, K., Bangen, J. M., Hammerich, L., Liedtke, C., Floege, J., Smeets, B. y Moeller, M. J. (2014). Origin of regenerating tubular cells after acute kidney injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(4), 1533-1538.

Berger, K. y Moeller, M. J. (2014). Mechanisms of epithelial repair and regeneration after acute kidney injury. *Seminars in Nephrology*, 34(4), 394-403.

Bessman, M. J, Lehman, I. R., Adler, J., Zimmerman, S. B., Simms, E. S. y Kornberg, A. (1958) . Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. iii. the incorporation of pyrimidine and purine analogues into deoxyribonucleic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 44(7), 633-640.

Biro, A., Vaknine, H., Cohen-Armon, M., Matas, Z., Fux, A., Schreiber, L., Berger, E., Dan, M., Boaz, M., Gregoriev, O. y Katzir, Z. (2016). The effect of poly (ADP-ribose) polymerase inhibition on aminoglycoside-induced acute tubular necrosis in rats, *Clinical Nephrology*, 85 (04),226-234.

Bolant-Hernández, B., Calvo-Bermúdez, M. A., Cejalvo-Lapeña, D., Gimeno-Forner, O., Gimeno-Forner, L. y Lloris Carsí, J. M. (1990). Hematología y Bioquímica Clínica de la Rata. *Research in Surgery*, 4, 12-19.

Bonventre, J. V. (2003). Dedifferentiation and Proliferation of Surviving Epithelial Cells in Acute Renal Failure. *Journal of the American Society of Nephrology*, 14, S55-S61.

Bosch, J. P., Saccaggi, A., Lauer, A., Ronco, C., Belledonne, M. y Glabman, S. (1983). Renal functional reserve in humans. Effect of protein intake on glomerular filtration rate. *The American journal of medicine*, 75(6), 943-50.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. Academic Press, 72(1-2), 248-254.

Brilla, E., Schosinsky, K., Esquivel, M. y Chavarría, M. (1977). Cuantificación de la glucosa por el método de la O-Toluidina». *Act. Med. Cost*, 20, 18-23

Brochard, L., Abroug, F., Brenner, M., Broccard, A, F., Danner, R, L., Ferrer, M., Laghi, F., Magder, S., Papazian, M., Pelosi, P. y Polderman, K, H. (2010). An Official ATS/ERS/ESICM/SCCM/SRLF Statement: Prevention and Management of Acute Renal Failure in the ICU Patient. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 181(10), 1128-1155.

Brodehl, J., Oemar, B. S. y Hoyer, P. F. (1987). Renal glucosuria. *Pediatric nephrology*, 1(3), 502-508.

Chawla, L. S., Amdur, M, L., Shaw, A, D., Faselis, C., Palant, E. y Kimmel, P. L. (2014). Article Association between AKI and Long-Term Renal and Cardiovascular Outcomes in United States

Veterans. *Clin J Am Soc Nephrol*, 9, 448-456.

Chawla, L. S., Bellomo, R., Bihorac, A., Goldstein, S. L., Siew, E. D., Bagshaw, S. M., Bittleman, D., Cruz, D., Endre, Z., Fitzgerald, R. L., Forni, L., Kane-Gil, S. L., Hoste, E., Koyner, J., Liu, K. D., MacEdo, E., Mehta, R., Murray, P., Nadim, M., Ostermann, M., Palevsky, P. M., Pannu, R., Rosner, M., Wald, R., Zarbock, A., Ronco C. y Kellum, J. A. (2017). Acute kidney disease and renal recovery: Consensus report of the Acute Disease Quality Initiative (ADQI) 16 Workgroup», *Nature Reviews Nephrology*. Nature Publishing Group, 13(4), 241-257.

Chertow, G. M., Burdick, E., Honour, M., Bonventre, J. V. y Bates, D. W. (2005). Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.*, 16(11), 3365-70.

Choudhury, D. y Ahmed, Z. (2006). Drug-associated renal dysfunction and injury». *Nature Clinical Practice Nephrology*, 2(2), pp. 80-91. doi: 10.1038/ncpneph0076.

Cockcroft, D. W. y Gault, H. (1976). Prediction of Creatinine Clearance from Serum Creatinine. *Nephron*, 16(1), 1-41.

Coelho, S., Cabral, G., Lopes, J. A., Jacinto, A. (2018). Renal regeneration after Acute Kidney Injury, *Nephrology*, 23(9), 805-814.

Dasari, S. y Tchounwou, P. B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action.», *European journal of pharmacology*, 740, 364-378.

Delanghe, J. R. y Speeckaert, M. M. (2011). Creatinine determination according to Jaffe--what does it stand for?. *Clinical Kidney Journal*, 4(2), 83-86.

Dennen, P., Douglas, I. S. y Anderson, R. (2010). Acute kidney injury in the intensive care unit: An update and primer for the intensivist. *Critical Care Medicine*, 38(1), 261-275.

Doig, G. S., Simpson, F., Bellomo, R., Heighes, P. T., Sweetman, E. A., Chesher, D., Pollock, C., Davies, A., Botha, J., Harrigan, P. y Reade, M. C. (2015). Intravenous amino acid therapy for kidney function in critically ill patients: a randomized controlled trial. *Intensive Care Medicine*, 41(7), 1197-1208.

Duffield, J. S., Park, K. M., Hsiao, L. L., Kelley, V. R., Scadden, D. T., Ichimura, T. y Bonventre, J. V. (2005). Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells. *Journal of Clinical Investigation*, 115(7), 1743-1755.

- Emeigh-Hart, S. G. (2005). Assessment of renal injury in vivo. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 52, 30-45.
- Engvall, E. y Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), 871-874.
- Esteller, A. y Cordero, M. (1998). Fundamentos de Fisiopatología. 1º Edición. *McGraw-Hill Interamericana*.
- Ferenbach, D. A. y Bonventre, J. V (2015). Mechanisms of maladaptive repair after AKI leading to accelerated kidney ageing and CKD. *Nature reviews. Nephrology*, 11(5), 264-76.
- Ferguson, M. A., Vaidya, V. S. y Bonventre, J. V (2008). Biomarkers of nephrotoxic acute kidney injury. *Toxicology*. 245(3), 182-193.
- Forni, L. G., Darnos, M., Ostermann, M., Oudemans-van Straaten, H. M., Pettilä, V., Prowle, J. R., Schetz, M. y Joannidis, M. (2017). Renal recovery after acute kidney injury. *Intensive Care Medicine*, 43(6), 855-866.
- Gaião, S. M. y Paiva, J. A. O. de C. (2017). Biomarkers of renal recovery after acute kidney injury, *Revista Brasileira de terapia intensiva.*, 29(3), 373-381.
- Gallagher, S., Winston, S. E., Fuller, S. A. y Hurrell, J. G. (2008). Immunoblotting and Immunodetection. *Current Protocols in Molecular Biology*, 83(1), 1-28.
- George, B., Wen, X., Mercke, N., Gomez, M., O'Bryant, C., Hu, Y., Hogan, S. L., Joy, M. S. y Aleksunes, L. M. (2017). Profiling of Kidney Injury Biomarkers in Patients Receiving Cisplatin: Time-dependent Changes in the Absence of Clinical Nephrotoxicity. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 101(4), 510-518.
- Glastras, S. J., Chen, H., Teh, R., McGrath, R. T., Chen, J., Pollock, C. A., Wong, M. G. y Saad, S. (2016). Mouse models of diabetes, obesity and related kidney disease. *PLoS ONE*, 11(8), 1-15.
- Göcze, I., Wiesner, C., Schlitt, H. J. y Bergler, T. (2017). Renal recovery. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, 31(3), 403-414.
- Goldstein, S. L., Chawla, L., Ronco, C. y Kellum, J. A. (2014). Renal recovery. *Critical care*, 18(1), 301-308.
- González, E., Gutierrez, E., Galeano, C., Chevia, C., de Sequera, P., Bernis, C., Parra, E. G., Delgado, R., Sanz, M., Ortiz, M., Goicoechea, M., Quereda, C., Olea, T., Bouarich, H., Hernández,

- Y., Segovia, B. y Praga, M., (2008). Early steroid treatment improves the recovery of renal function in patients with drug-induced acute interstitial nephritis. *Kidney International*, 73(8), 940-946.
- Graf, H., Stummvoll, H, K., Luger, A. y Prager, R. (1983). Effect of Amino Acid Infusion on Glomerular Filtration Rate. *New England Journal of Medicine*, 308(3), 159-160.
- Guyton, A. C. y Hall, J. E. (2011). Tratado de Fisiología Médica. *McGraw-Hill Interamericana*
- Hanif, M. O. y Ramphul, K. (2018). Renal Tubular Necrosis, Acute. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29939592> (Accedido: 3 de julio de 2018).
- Hansson, J., Hultenby, K., Cramnert, C., Pontén, F., Jansson, H., Lindgren, D., Axelson, H., y Johansson, M, E. (2014). Evidence for a morphologically distinct and functionally robust cell type in the proximal tubules of human kidney. *Human Pathology*, 45(2), 382-393.
- Heyman, S. N., Rosenberger, C. y Rosen, S. (2011). Acute Kidney Injury: Lessons from Experimental Models. *Experimental Models for Renal Diseases*, 169, 286-296.
- Humphreys, B. D., Valerius, M, T., Kobayashi, A., Mugford, J, W., Soeung, S., Duffield, J, S., McMahon, A. y Bonventre, J, V. (2008). Intrinsic Epithelial Cells Repair the Kidney after Injury. *Cell Stem Cell*, 2(3), 284-291.
- Humphreys, B. D., Cantaluppi, V., Portilla, D., Singbartl, K., Yang, L., Rosner, M. H., Kellum, J. A., Ronco, C., *et al.* (2016). Targeting Endogenous Repair Pathways after AKI. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 27(4), 990-998.
- Husdan, H. y Rapoport, A. (1968). Estimation of creatinine by the Jaffe reaction. A comparison of three methods. *Clinical chemistry*, 14(3), 222-38.
- Jones, T. L. (2013). Lo esencial en Sistema renal y urinario. *Elsevier España*. Disponible en: https://books.google.es/books?id=8y_xwjQCARGC&printsec=frontcover&dq=el+sistema+renal&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwi1iOWTtJncAhWUXsAKHSv1BqoQ6AEILDAB#v=onepage&q=el+sistema+renal&f=false (Accedido: 12 de julio de 2018).
- Karin, M. y Clevers, H. (2016). Reparative inflammation takes charge of tissue regeneration. *Nature*, 529(7586), 307-315.
- Kashani, K. y Kellum, J. A. (2015). Novel biomarkers indicating repair or progression after acute kidney injury. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 24(1), 21-27.

Kellum, J. A., Leblanc, M. y Venkataraman, R. (2008). Acute renal failure. *BMJ clinical evidence*, 9, 2001.

Kellum, J., Lameire, N., Aspelin, P., Barsoum, R, S., Burdmann, E., Goldstein, S, L., Herzog, C., Joannidis, M., Kribben, A., Levey, A, S, MacLeod, A, M., Mehta, R, L., Murray, P, T., Naicker, S., Opal, S, M., Schaefer, F., Schetz, M. y Uchino, S. (2012). KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney international supplements*, 2(1), 1-138.

Kramann, R., Kusaba, T. y Humphreys, B. D. (2015). Who regenerates the kidney tubule?. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 30(6), 903-910.

Kurien, B., Everds, N. y Scofield, R. H. (1977). Recolección experimental de orina en animales. *Laboratory Animals*, 38, 333-361.

Kusaba, T., Lalli, M., Kramman, M., Kobayashi, A. y Humphreys, B. D. (2014). Differentiated kidney epithelial cells repair injured proximal tubule. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(4), 1527-1532.

Lameire, N. (2005). The Pathophysiology of Acute Renal Failure. *Critical Care Clinics*, 21(2), 197-210.

Lameire, N., Van Biesen, W. y Vanholder, R. (2005). Acute Renal Failure. *The lancet*, 365(9457), 417-430.

Lelongt, B. y Ronco, P. (2003). Role of extracellular matrix in kidney development and repair. *Pediatric Nephrology*, 18(8), 731-742.

Levey, A. S., Greene, T., Beck, G. J., Caggiula, A. W., Kusek, J. W., Hunsicker, L. G., y Klahr, S. (1999). Dietary protein restriction and the progression of chronic renal disease: what have all of the results of the MDRD study shown? Modification of Diet in Renal Disease Study group. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 10(11), 2426-39.

Lindgren, D., Boström, A. K., Nilsson, K., Hansson, J., Sjölund, J., Möller, C., Jirström, K., Nilsson, E., Landberg, G., Axelson, H. y Johansson, M. E. (2011). Isolation and characterization of progenitor-like cells from human renal proximal tubules. *The American journal of pathology*, 178(2), 828-37.

Lombardi, D., Becherucci, F. y Romagnani, P. (2016). How much can the tubule regenerate and who does it? An open question. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 31(8), 1243-1250.

- Macedo, E., Bouchard, J. y Mehta, R. L. (2008). Renal recovery following acute kidney injury. *Current Opinion in Critical Care*, 14(6), 660-665.
- Madias, N. E. y Harrington, J. T. (1978). Platinum nephrotoxicity. *The American journal of medicine*, 65(2), 307-14.
- McDuffie, J. E., Ma, J. Y., Sablad, M., Sonee, M., Varacallo, L., Loudon, C., Guy, A., Vegas, J., Liu, X., La, D. y Snook, S. (2013). Time Course of Renal Proximal Tubule Injury, Reversal, and Related Biomarker Changes in Rats Following Cisplatin Administration. *International Journal of Toxicology*, 32(4), 251-260.
- Mehta, R. L., Kellum, J. A., Shah, S., Molitoris, B. V., Ronco, C., Warnock, D. G. y Levin, A. (2007). Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Critical Care*, 11(2), R31.
- Miller, R. P., Tadagavadi, R. K., Ramesh, G. y Reeves, B. W. (2010). Mechanisms of Cisplatin nephrotoxicity. *Toxins*, 2(11), 2490-2518.
- Molitoris, B. A. y Reilly, E. (2016). Quantifying Glomerular Filtration Rates in Acute Kidney Injury: A Requirement for Translational Success. *Seminars in Nephrology*, 36(1), 31-41.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. y Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 51(1), 263-73.
- Nadasdy, T., Laszik, Z., Blick, K. E., Johnson, L. D., Silva, F. G. (1994). Proliferative activity of intrinsic cell populations in the normal human kidney. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 4(12), 2032-2039.
- Negi, S., Koreeda, D., Kobayashi, S., Yano, T., Tatsuta, K., Mima, T., Shigematsu, T. y Ohya, M. (2018). Acute kidney injury: Epidemiology, outcomes, complications, and therapeutic strategies. *Seminars in Dialysis*, 1-9.
- Nony, P. a y Schnellmann, R. G. (2003). Mechanisms of renal cell repair and regeneration after acute renal failure. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 304, 905-912.
- Ozkok, A. y Edelstein, C. L. (2014). Pathophysiology of cisplatin-induced acute kidney injury. *BioMed research international*, 2014, 967826.
- Pazhayattil, G. S. y Shirali, A. C. (2014). Drug-induced impairment of renal function. *International*

journal of nephrology and renovascular disease. 7, 457-68.

Prowle, J. R., Kolic, I., Purdell-Lewis, J., Taylor, R., Pearse, R. M. y Kirwan, C. J. (2014). Serum Creatinine Changes Associated with Critical Illness and Detection of Persistent Renal Dysfunction after AKI», *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 9(6), 015-1023.

Quiros, Y., Ferreira, L., Sancho-Martínez, S. M., González-Buitrago, J. M., López-Novoa, J. M., López-Hernández, F. J. (2010). Sub-nephrotoxic doses of gentamicin predispose animals to developing acute kidney injury and to excrete ganglioside M2 activator protein. *Kidney International*, 78(10), 1006-1015.

Rangaswamy, D. y Sud, K. (2018). Acute kidney injury and disease: long-term consequences and management. *Nephrology*. doi: 10.1111/nep.13408.

Ricci, Z., Cruz, D. N. y Ronco, C. (2011). Classification and staging of acute kidney injury: Beyond the RIFLE and AKIN criteria. *Nature Reviews Nephrology*, 7(4), 201-208.

Rivero Sánchez, M., Rubio-Quiñones, J., Cózar-Caraasco, J. y García-Gil, D. (2000). Insuficiencia renal aguda. *Principios de Urgencias, Emergencias y Cuidados Críticos*, capítulo 7. Disponible en: <https://www.uninet.edu/tratado/c0701i.html> (Accedido: 1 de julio de 2018).

Rivosecchi, R. M., Kellum, J. A., Dasta, J. F., Armahizer, M, J., Bolesta, S., Buckley, M. S., Dzierba, A. L., Frazee, E. N., Johnson, H. J., Kim, C., Murugan, R., Smithburger, P. L., Wong, A. y Kane-Gill, S. L. (2016). Drug Class Combination–Associated Acute Kidney Injury. *Annals of Pharmacotherapy*, 50(11), 953-972.

Rock, K. L., Latz, E., Ontiveros, F. y Kono, H. (2010). The Sterile Inflammatory Response. *Annual Review of Immunology*, 28(1), 321-342.

Ronco, C., Kellum, J. A. y Haase, M. (2012). Subclinical AKI is still AKI. *Critical Care*, 16(3), 2010-2013.

Ronco, C. y Rosner, M. H. (2012). Acute kidney injury and residual renal function. *Critical care*, 16(4), 144.

Ronconi, E., Sagrinati, C., Angelotti, M. L., Lazzeri, E., Mazzinghi, B., Ballerini, L., Parenti, E., Becherucci, F., Gacci, M., Carini, M., Maggi, E., Vannelli, G. B., Lasagni, L., Romagnani, S. y Romagnani, P. (2009). Regeneration of Glomerular Podocytes by Human Renal Progenitors. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(2), 322-332.

- Rossaint, J. y Zarbock, A. (2016). Acute kidney injury: definition, diagnosis and epidemiology. *Minerva Urologica e Nefrologica*, 68(1), 49-57.
- Sagrinati, C., Netti, G. S., Mazzinghi, B., Lazzeri, E., Liotta, F., Frosali, F., Ronconi, E., Meini, C., Gacci, M., Squecco, R., Carini, M., Gesulado, L., Francini, F., Maggi, E., Annunziato, F., Lasagni, L., Serio, M., Romagnani, S. y Romagnani, P. (2006). Isolation and Characterization of Multipotent Progenitor Cells from the Bowman's Capsule of Adult Human Kidneys. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17(9), 2443-2456.
- Sánchez-González, P. D., López-Hernández, F. J., López-Novoa, J. M. y Morales, A. I. (2011). An integrative view of the pathophysiological events leading to cisplatin nephrotoxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, 41(10), 803-821.
- Sawhney, S. y Fraser, S. D. (2017). Epidemiology of AKI: Utilizing Large Databases to Determine the Burden of AKI. *Advances in Chronic Kidney Disease*, 24(4), 194-204.
- Schiffli, H. (2006). Renal recovery from acute tubular necrosis requiring renal replacement therapy: a prospective study in critically ill patients. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 21(5), 1248-1252.
- Seely, J. C. y Brix, A. (2014). Kidney, Renal Tubule – Dilation. *National Toxicology Program*, 1-2. Disponible en: <http://ntp.niehs.nih.gov/nnl/urinary/kidney/rtdilat/kidney-tubule-dilation-508.pdf> (Accedido 18 de junio de 2018).
- Sharfuddin, A. A. y Molitoris, B. A. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nature Reviews Nephrology*. 7(4), 189-200.
- Sharma, A., Mucino, M. J. y Ronco, C. (2014). Renal functional reserve and renal recovery after acute kidney injury». *Nephron - Clinical Practice*, 127(1-4), 94-100.
- Shimizu, A., Masuda, Y., Ishizaki, M., Sugisaki, Y. y Yamanaka, N. (1994). Tubular dilatation in the repair process of ischaemic tubular necrosis. *Virchows Archiv*, 425(3), 281-290.
- Singri, N., Ahya, S. N. y Levin, M. L. (2003). Acute Renal Failure. *JAMA*. American Medical Association, 289(6), 747-751.
- Sinha, V., Vence, L. M. y Salahudeen, A. K. (2013). Urinary Tubular Protein-Based Biomarkers in the Rodent Model of Cisplatin Nephrotoxicity. *Journal of Investigative Medicine*, 61(3), 564-568.
- Smeets, B., Boor, P., Dijkman, H., Sharma, S. V., Jirak, P., Mooren, F., Berger, K., Bornemann, J.,

- Gelman, I. H., Floege, J., van der Vlag, J., Wetzels, J. y Moeller, M. J. (2013). Proximal tubular cells contain a phenotypically distinct, scattered cell population involved in tubular regeneration. *The Journal of Pathology*, 229(5), 645-659.
- Srisawat, N., Murugan, R. y Kellum, J. A. (2014). Repair or Progression after AKI: A Role for Biomarkers?. *Nephron Clinical Practice*, 127(1-4), 185-189.
- Susantitaphong, P., Cruz, D. N., Cerda, J., Abulfaraj, M., Alqahtani, F., Koulouridis, I. y Jaber, B. L., (2013). World incidence of AKI: a meta-analysis. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 8(9), 1482-1493.
- Taber, S. S. y Mueller, B. A. (2006). Drug-associated renal dysfunction. *Critical care clinics*, 22(2), 357-74
- Tenorio, M. T., Galeno, C., Rodríguez, N. y Liaño, F. (2010). Diagnóstico diferencial de la insuficiencia renal aguda. *Sociedad Española de Nefrología*, 3(2), 16-32.
- Toback, F. G. (1992). Regeneration after acute tubular necrosis. *Kidney International*, 41, 226-246.
- Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), 4350-4.
- Uchida, M., Miyoshi, T. y Miyamoto, Y. (2017). Pharmacological effects of a vitamin K1 2,3-epoxide reductase (VKOR) inhibitor, 3-acetyl-5-methyltetronic acid, on cisplatin-induced fibrosis in rats. *The Journal of veterinary medical science*. Japanese Society of Veterinary Science, 79(9), 1507-1515.
- Urbschat, A., Obermüller, N. y Haferkamp, A. (2011) «Biomarkers of kidney injury», *Biomarkers*, 16(sup1), pp. S22-S30. doi: 10.3109/1354750X.2011.587129.
- Vandijck, D. M., Oeyen, S., Decruyenaere, J. M., Annemans, L. y Hoste, E. A. (2007). Acute kidney injury, length of stay, and costs in patients hospitalized in the intensive care unit. *Acta clinica*, 62(2), 341-345.
- Veiga, A. (2013). Western Blot Introducción y Optimizació. *Manual de Abcam*. Disponible en: <http://docs.abcam.com/pdf/events/spanish-wb-webinar.pdf> (Accedido: 16 de julio de 2018).
- Venkatachalam, M. A., Jones, D. B., Rennke, H. G., Sandstrom, D. y Patel, Y. (1981). Mechanism

of proximal tubule brush border loss and regeneration following mild renal ischemia. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 45(4), 355-65.

Vogetseder, A., Picard, N., Gaspert, A., Walch, M., Kaissling, B. y Le Hir, M. (2008). Proliferation capacity of the renal proximal tubule involves the bulk of differentiated epithelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 294(1), C22-C28.

Voller, A. (1976). The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Bulletin of the World Health Organization*, 54(2), 129-139.

Woroniecki, R., Ferdinand, J. R., Morrow, J. S. y Devarajan, P. (2003). Dissociation of spectrin-ankyrin complex as a basis for loss of Na-K-ATPase polarity after ischemia. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 284(2), F358-F364.

Yang, L., Humphreys, B. D. y Bonventre, J. V (2011). Pathophysiology of acute kidney injury to chronic kidney disease: maladaptive repair. *Contributions to nephrology*, 174, 149-155.

Yao, X., Panichpisal, K., Kurtzman, N., Nugent, K. (2007). Cisplatin Nephrotoxicity: A Review. *The American Journal of the Medical Sciences*, 334(2), 115-124.

Zuk, A. y Bonventre, J. V. (2016). Acute Kidney Injury», *Annual Review of Medicine*, 67(1), 293-307.

SUMMARY

INTRODUCTION

Acute kidney injury (AKI) is characterized by the loss of excretory renal function in hours or few days and, consequently, toxic products are accumulated in the blood which causes serious injury in several organs and even death if an adequate treatment is not carried out. AKI has significant clinical and economic consequences, as it has a high morbidity and mortality, which involves 1% of total health expenditure and 5% of hospital expenditure¹. AKI is annually responsible for approximately 2 million deaths worldwide, and it has a mortality of 23,9% in adults and 13,8% in children^{2,3}(Susantitaphong *et al.*, 2013b; Chawla *et al.*, 2014).

Traditionally, AKI was considered as fully reversible, especially after mild tubular injury episodes, in which kidney structure and function would return to a normal condition because of the high regenerative capacity of the tubules. However, apparent functional recovery may occur despite persistence of significant injury and relevant nephron loss^{4,5}. Recent epidemiological studies in various clinical settings have shown that AKI is associated with an increased risk of adverse kidney events, like worsened renal function with progression to chronic kidney disease (CKD) and end-stage renal disease (ESKD). Survivors of AKI also have an increased risk of mortality^{2,6}.

Unlike the heart or brain, the kidney can completely recover from an ischemic or toxic insult that results in cell death. Kidneys have a great intrinsic capacity for regeneration after an acute injury. However, under certain circumstances, renal repair is maladaptive with inflammation, fibrosis and vascular rarefaction leading to persistent cell and tissue malfunction^{7,8}. It seems to be essential to understand the mechanisms responsible for a complete or maladaptive repair. This knowledge would allow us to alter the acute course of established AKI. The mechanisms underlying the renal repair process after AKI have been mainly studied in in vivo model⁷. For many years, there was a broad debate about the origin of the cells responsible for the regeneration process. Nowadays it has been accepted that surviving tubular cells are the main source for kidney regeneration, while bone marrow-derived stem cells have a paracrine role through growth factor secretion. However, the entity of the surviving tubular cells continues generating controversy. It has been proposed that they are: (i) surviving epithelial tubular cells which dedifferentiate, migrate, proliferate and re-differentiate to restore nephron structure and function or (ii) intratubular progenitor cells, poised in a quiescent state, that re-

enter the cell cycle to replace the cells that have been lost. Recent evidence strongly points toward surviving differentiated tubular epithelial cells as the responsible cells of the regeneration process. They dedifferentiate upon injury and acquire progenitor cell phenotype (called STC phenotype). Then STCs migrate to the empty area of the basal membrane where they proliferate and finally re-differentiate into fully functional mature epithelial cells^{4,5,8-10}.

According to previous evidences it is really important to identify in which patients the recovery process has been successful and when it has been maladaptive, as in this case patients have an increased risk for morbid-mortality. However, there is not any defined or standard definition of renal recovery. All the definitions of renal recovery which are used nowadays are based on serum creatinine (sCr) levels. However sCr is considered a suboptimal and insensitive marker of renal function for several reasons^{6,11-13}:

- Several factors modify sCr, independently of renal function, like muscular mass or protein intake
- The fraction of creatinine secreted in the kidney increases when glomerular filtration rate (GFR) is reduced.
- Structural and anatomical changes occurring in the kidney during kidney function recovery are not detected by sCr. sCr reflect changes in GFR, and even with a 50% loss of functioning renal mass, GFR values remain within the normal range, therefore increases in sCr occur when more than 50% nephrons are lost. Consequently, after an episode of AKI, sCr may return to basal levels in presence of renal mass loss.

The limitations of sCr as indicator of kidney recovery are well documented. In this context it is a priority the development of new therapeutic tools which allow us to assess kidneys function and structure during the repair process after an AKI episode, and not only to evaluate renal filtration as sCr does. Although a lot of urinary biomarkers have been identified for early detection of kidney structural damage, little is known about biomarkers that reflect kidney tissue repair¹¹. Trials evaluating biomarkers for prediction of recovery after AKI have been few and focused on the differentiation between transient AKI and acute kidney disease (AKD)⁷.

According to the above mentioned antecedents, the aim of this research project is:

- 1- To characterize subclinical structural and functional alterations which may be present in the kidney after an AKI episode .
- 2- To identify urinary biomarkers that allow us to monitor the repair process after an episode of AKI

METHODOLOGY

Animal experimental model

Male Wistar rats were used (220-240g). AKI was induced by administration of a single toxic dose of cisplatin, CDDP (5mg/kg). Control group (CT) received a similar volume of saline.

Animals were divided in the following groups:

- Previously to CDDP administration: Basal (B)
- The day of maximum kidney damage (highest sCr levels): D4, day 4.
- At different points once the animal recovered renal function after AKI (sCr returns to basal levels):
 - ❖ The day of the recovery: R0.
 - ❖ One week after renal function recovery: R1
 - ❖ Two weeks after renal function recovery: R2
 - ❖ Three weeks after renal function recovery: R3
 - ❖ Four weeks after renal function recovery: R4

Blood and urine samples were collected in every time point. Finally, rats were sacrificed to obtain the kidneys in all different points of the study.

Renal function was analyzed by the determination of: serum creatinine, creatinine clearance (as a measure of glomerular filtration rate) and proteinuria. AKI was established if sCr was ≥ 1.5 mg/dl. Histological studies of kidneys were performed by hematoxylin-eosin and periodic acid Schiff (PAS) staining. The presence or absence of biomarkers in urine samples was analyzed by western blot and ELISA. Expression of the biomarkers identified in urine was analyzed in kidney tissue by qt-PCR.

Tubular function was evaluated by fractional excretion of sodium (FENa) and glucose (FEGlc)

To check if rats were predisposed to suffer new episodes of AKI during the recovery phase, a test of functional risk was performed. For that purpose, rats received a single toxic dose of cisplatin (5mg/kg) to induce AKI. Control group received an equivalent saline dose. To characterize the state of renal sensibility at different recovery points, rats received gentamicin at subtoxic doses (50mg/kg/day) during 6 days. We also administered gentamicin 50mg/kg/day to the control group in order to check the absence of toxicity of gentamicin at this dose. The administration of gentamicin started in the different recovery points evaluated in this study (R0, R1 and R2).

Samples of urine and plasma were collected every two days. Later, rats were sacrificed and kidneys removed at the end of gentamicin treatment .

RESULTS AND DISCUSSION

1. Subclinical alterations during the recovery phase of an AKI episode

For this analysis, an animal model of nephrotoxic AKI with recovery of renal function has been used. CDDP (5mg/kg) induced AKI 4 days after administration, characterized by increases in serum creatinine (sCr) and proteinuria and a significant reduction in creatinine clearance (ClCr). Recovery of renal function happened between 7 and 9 days after CDDP administration, when all renal parameters evaluated returned to basal levels. A normal renal function was observed during all the recovery phase analyzed (until R4, 4 weeks after kidney recovery) (Figure A).

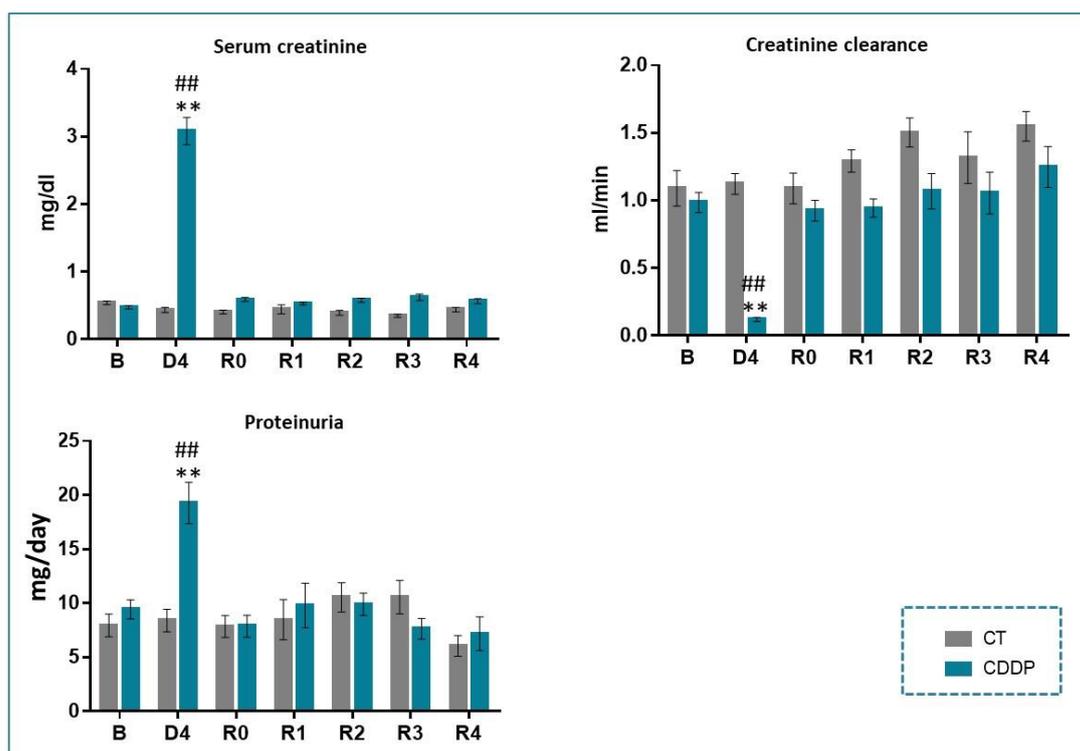


Figure A: Renal function characterization. CDDP: animals treated with cisplatin (n=5-35); CT: control (n=6-12); **p<0,01vs control at the same point of study; ##p<0,01 vs CDDP in basal point.

CDDP is a chemotherapy agent widely used for the treatment of solid tumors. It is estimated that one-third of patients receiving CDDP therapy at doses higher than 50mg/m² experience nephrotoxicity. As our data show, an animal model of recovery of AKI has been used as sCr increase and later return to basal levels. The clinical diagnosis of AKI and recovery are based on sCr levels^{6,7,12}.

1.1. Subclinical structural alterations

To evaluate if during the recovery period of AKI and, although renal function returns to basal levels, there are structural renal abnormalities, kidney histology was analyzed by hematoxylin-eosin (figure B) and PAS staining (figure C).

Our data show that CDDP induced a severe damage in kidney structure, as the day in which AKI is established we detected severe necrosis, cast formation, tubular debris and loss of brush border.

However, when kidney recovery occurs (R0 point), relevant abnormalities in kidney structure are still detected. We observed alterations related to an acute tubular necrosis (ATN) episode, like necrosis and cellular debris although in a much smaller degree that

in D4. Besides there is epithelial disorganization. Other important alteration observed is tubular dilatation, presence of flattened tubular epithelium and lack of brush border in cells of the proximal tubule. Tubular dilatation has been described in the early recovery phase after an episode of ATN, and could be due to tubular obstruction or to the presence of regenerated epithelial hyperplasia and abnormalities in basal membrane following epithelial cell damage¹⁴. Along the analyzed recovery phase, structural alterations decrease, and 4 weeks after recovery, renal histology is nearby normal, with some epithelial disorganization. At this point basal membrane has a normal appearance and brush border has been restored.

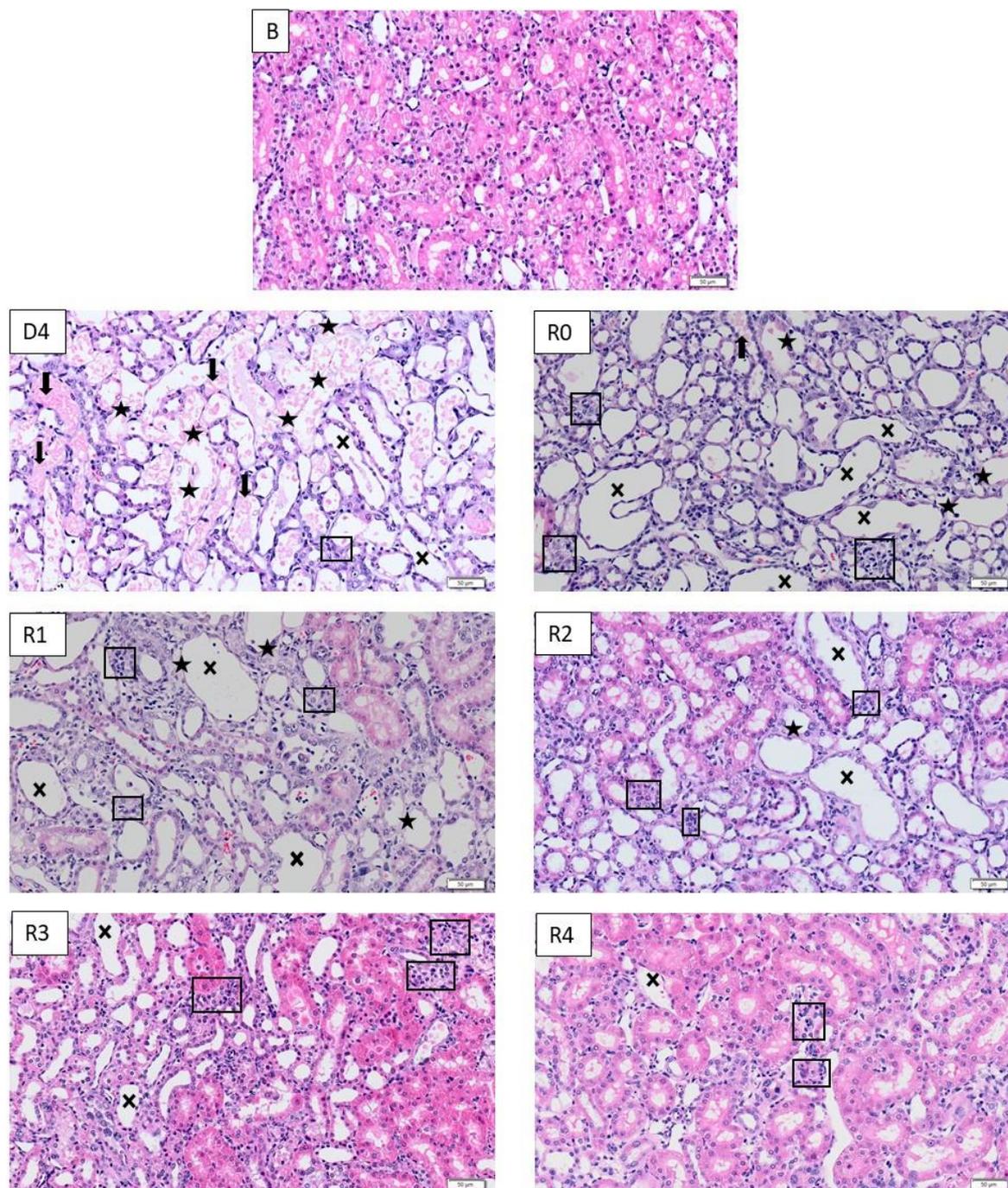


Figure B: Representative images (200X) of hematoxylin-eosin staining in kidneys from rats treated with CDDP. The star indicates necrosis, the x tubular dilatation, the rectangle tubular disorganization and the arrow tubular debris. For control animals, hematoxylin-eosin staining has also been performed, and no alterations have been identified (data not shown).

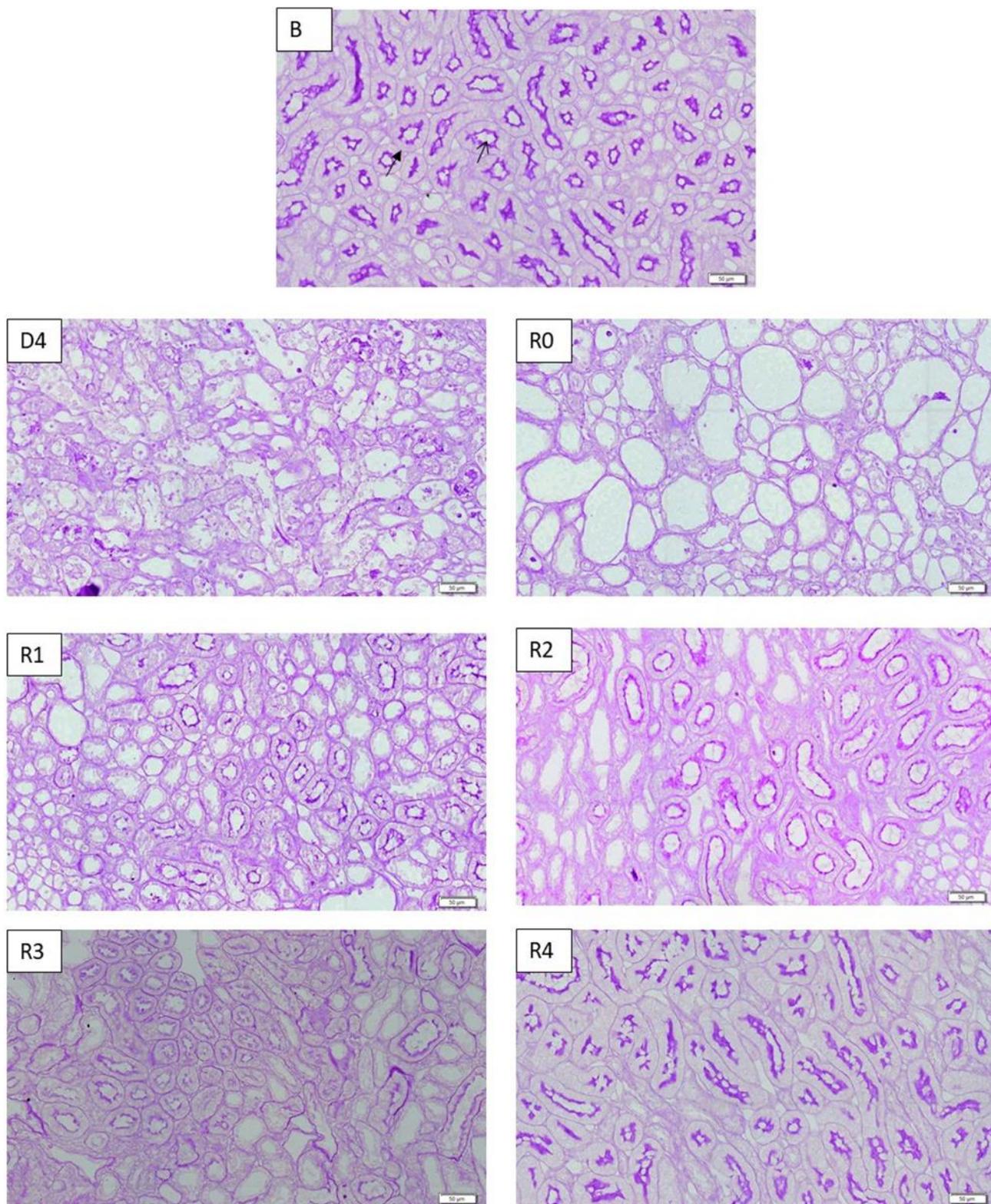


Figure C: Representative images (200X) of PAS staining in kidneys from rats treated with CDDP. Brush border and basal membrane can be observed. For control animals, PAS staining has also been performed, and no alterations have been identified (data not shown).

In summary, sCr, ClCr or proteinuria are not good markers of kidney recovery. Although their values return to basal levels, there are relevant structural alterations in the kidney which course in a subclinical way as they cannot be diagnosed. The fact that these conventional parameters of renal function return to basal levels is not synonymous of complete restoration of tissue integrity after AKI.

The next step was to evaluate if as a consequence of structural abnormalities, there was tubular dysfunction.

1.2 Assessment of tubular function and renal functional risk

Fractional excretion of sodium (FENa) and glucose (FEGlc) has been calculated to evaluate tubular function. Our results show that alterations in FENa and FEGlc are only present when AKI is established (D4) (Figure D). These data would indicate tubular integrity during the recovery phase analyzed in this study.

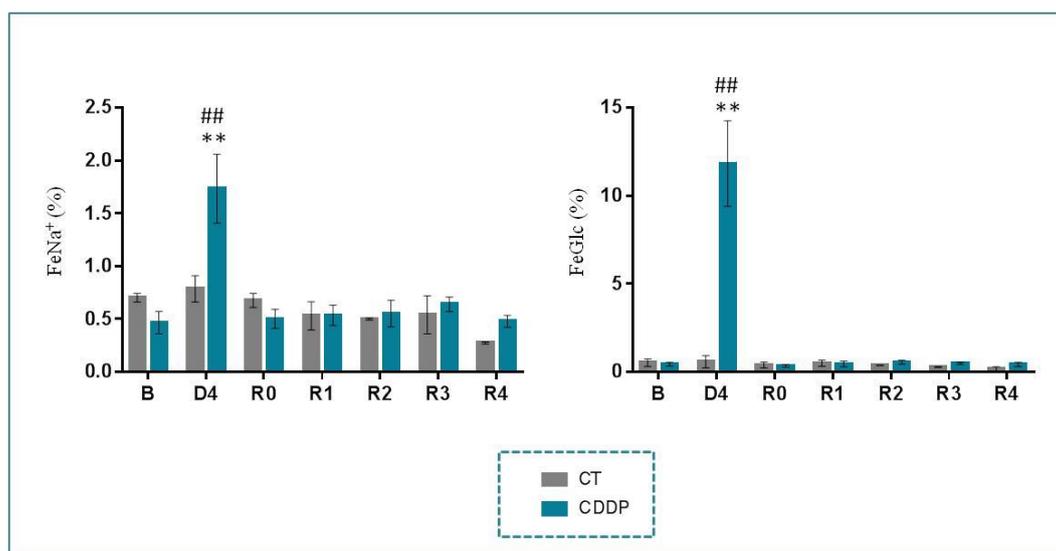


Figure D: Evaluation of the tubular function by fractional excretion of sodium (FENa) and fractional excretion of glucose (FEGlc). CDDP: animals treated with cisplatin (n=5 for each point); CT: control (n=5 for each point); **p<0,01 vs control at the same point of study; ###p<0,01 vs CDDP in basal point

El resto del contenido no está aún disponible para su lectura debido a que se encuentra en trámites de solicitud de patente.

Será publicado una vez obtenida la autorización pertinente

BIBLIOGRAPHY

1. Chertow GM, Burdick E, Honour M, Bonventre J V, Bates DW. Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(11):3365-3370. doi:10.1681/ASN.2004090740
2. Chawla LS, Amdur RL, Shaw AD, Faselis C, Palant CE, Kimmel PL. Article Association between AKI and Long-Term Renal and Cardiovascular Outcomes in United States Veterans. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014;9:448-456. doi:10.2215/CJN.02440213
3. Susantitaphong P, Cruz DN, Cerda J, et al. World incidence of AKI: a meta-analysis. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2013;8(9):1482-1493. doi:10.2215/CJN.00710113
4. Lombardi D, Becherucci F, Romagnani P. How much can the tubule regenerate and who does it? An open question. *Nephrol Dial Transplant.* 2016;31(8):1243-1250. doi:10.1093/ndt/gfv262
5. Ferenbach DA, Bonventre J V. Mechanisms of maladaptive repair after AKI leading to accelerated kidney ageing and CKD. *Nat Rev Nephrol.* 2015;11(5):264-276. doi:10.1038/nrneph.2015.3
6. Kashani K, Kellum JA. Novel biomarkers indicating repair or progression after acute kidney injury. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2015;24(1):21-27. doi:10.1097/MNH.0000000000000090
7. Forni LG, Darmon M, Ostermann M, et al. Renal recovery after acute kidney injury. *Intensive Care Med.* 2017;43(6):855-866. doi:10.1007/s00134-017-4809-x
8. Bonventre J V. Dedifferentiation and Proliferation of Surviving Epithelial Cells in Acute Renal Failure. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(90001):55S-61. doi:10.1097/01.ASN.0000067652.51441.21
9. Berger K, Moeller MJ. Mechanisms of epithelial repair and regeneration after acute kidney injury. *Semin Nephrol.* 2014;34(4):394-403. doi:10.1016/j.semnephrol.2014.06.006
10. Kramann R, Kusaba T, Humphreys BD. Who regenerates the kidney tubule? *Nephrol Dial Transplant.* 2015;30(6):903-910. doi:10.1093/ndt/gfu281
11. Humphreys BD, Cantaluppi V, Portilla D, et al. Targeting Endogenous Repair Pathways after AKI. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27:990-998. doi:10.1681/ASN.2015030286

12. George B, Wen X, Mercke N, et al. Profiling of Kidney Injury Biomarkers in Patients Receiving Cisplatin: Time-dependent Changes in the Absence of Clinical Nephrotoxicity. *Clin Pharmacol Ther.* 2017;101(4):510-518. doi:10.1002/cpt.606
13. Goldstein SL, Chawla L, Ronco C, Kellum JA. Renal recovery. *Crit Care.* 2014;18(1):301. doi:10.1186/cc13180
14. Shimizu A, Masuda Y, Ishizaki M, Sugisaki Y, Yamanaka N. Tubular dilatation in the repair process of ischaemic tubular necrosis. *Virchows Arch.* 1994;425(3):281-290. doi:10.1007/BF00196151

**MATERIAL
SUPPLEMENTARIO**

MATERIAL SUPLEMENTARIO

- **Figura S1:** Evaluación de la histología renal en animales control.
- **Figura S2:** Evaluación del borde en cepillo y de la membrana basal de las células renales en animales control.
- **Figura S3:** Evaluación de la proliferación celular renal en animales control.

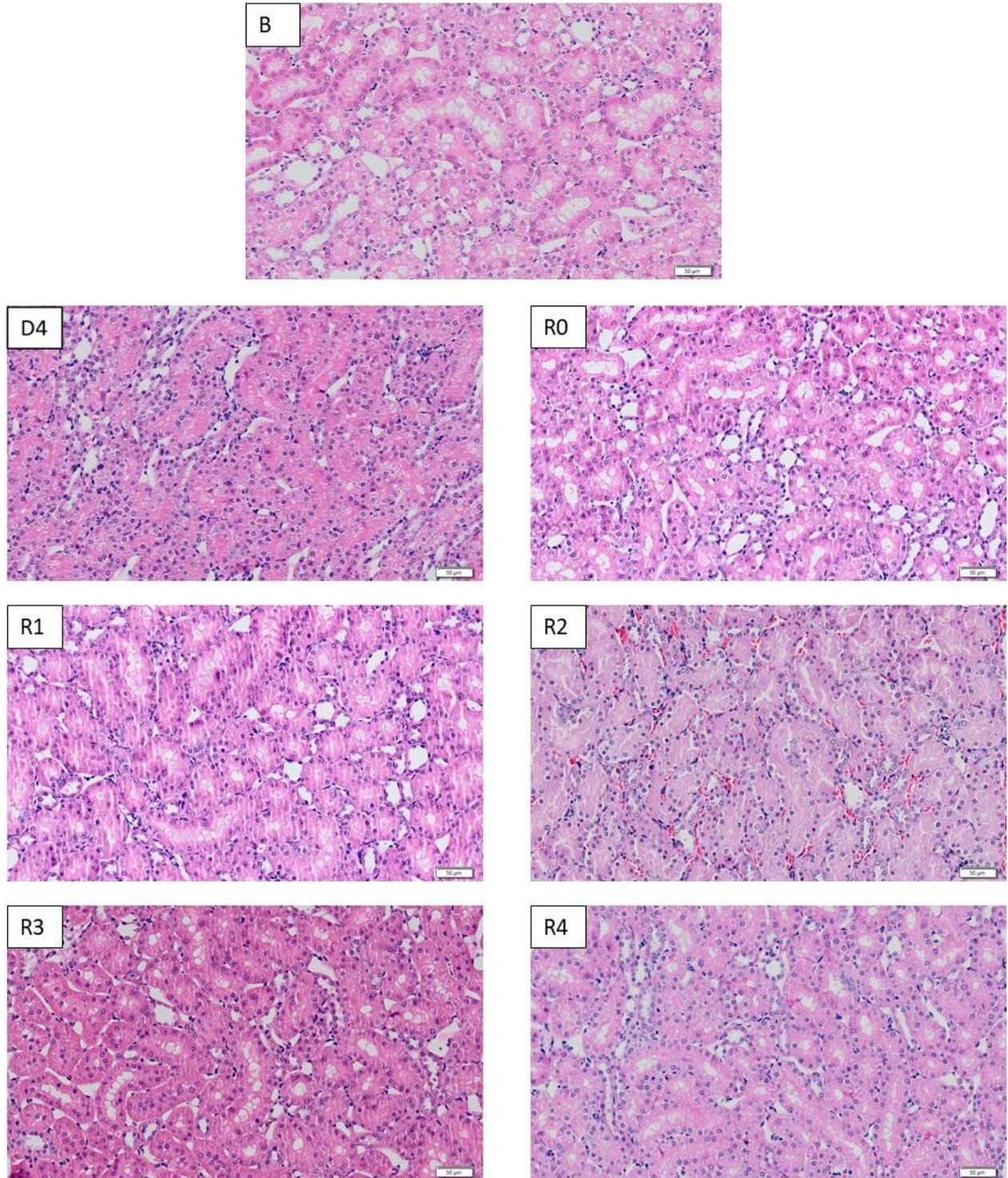


Figura S1: Evaluación de la histología renal en animales control. Imágenes representativas (200X) de cortes histológicos de la médula externa renal teñidos con hematoxilina-eosina. Las imágenes corresponden a animales control en los diferentes puntos de estudio. Se indica la escala (50 µm).

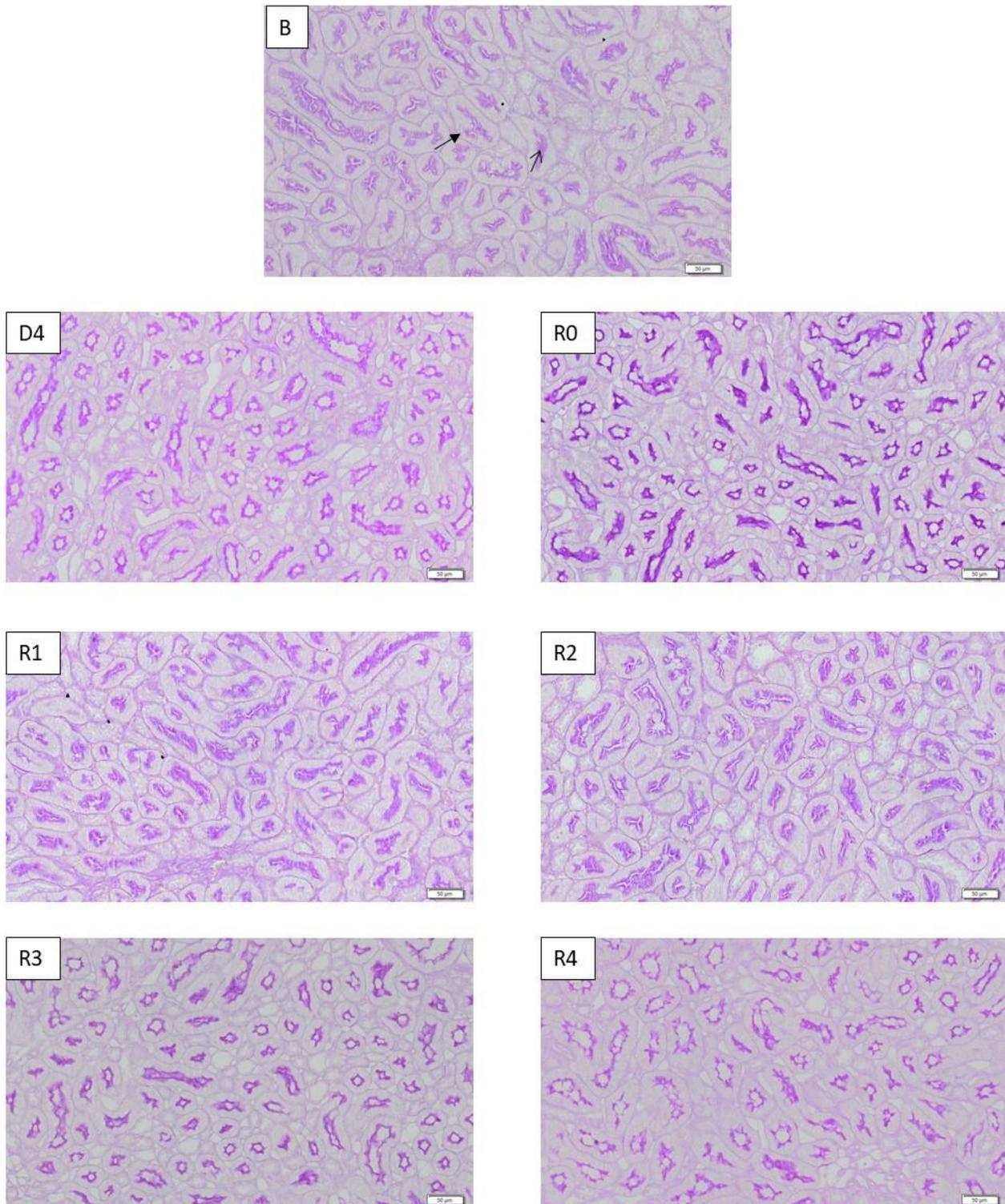


Figura S2: Evaluación del borde en cepillo y de la membrana basal de las células renales en animales control. Imágenes representativas (200X) de cortes histológicos de la zona de la médula externa teñidos con ácido peryódico de Schiff. Las imágenes corresponden a animales control en los diferentes puntos de estudio. Las flechas con punta triangular señalan la membrana basal y las flechas con punta abierta representan el borde en cepillo.

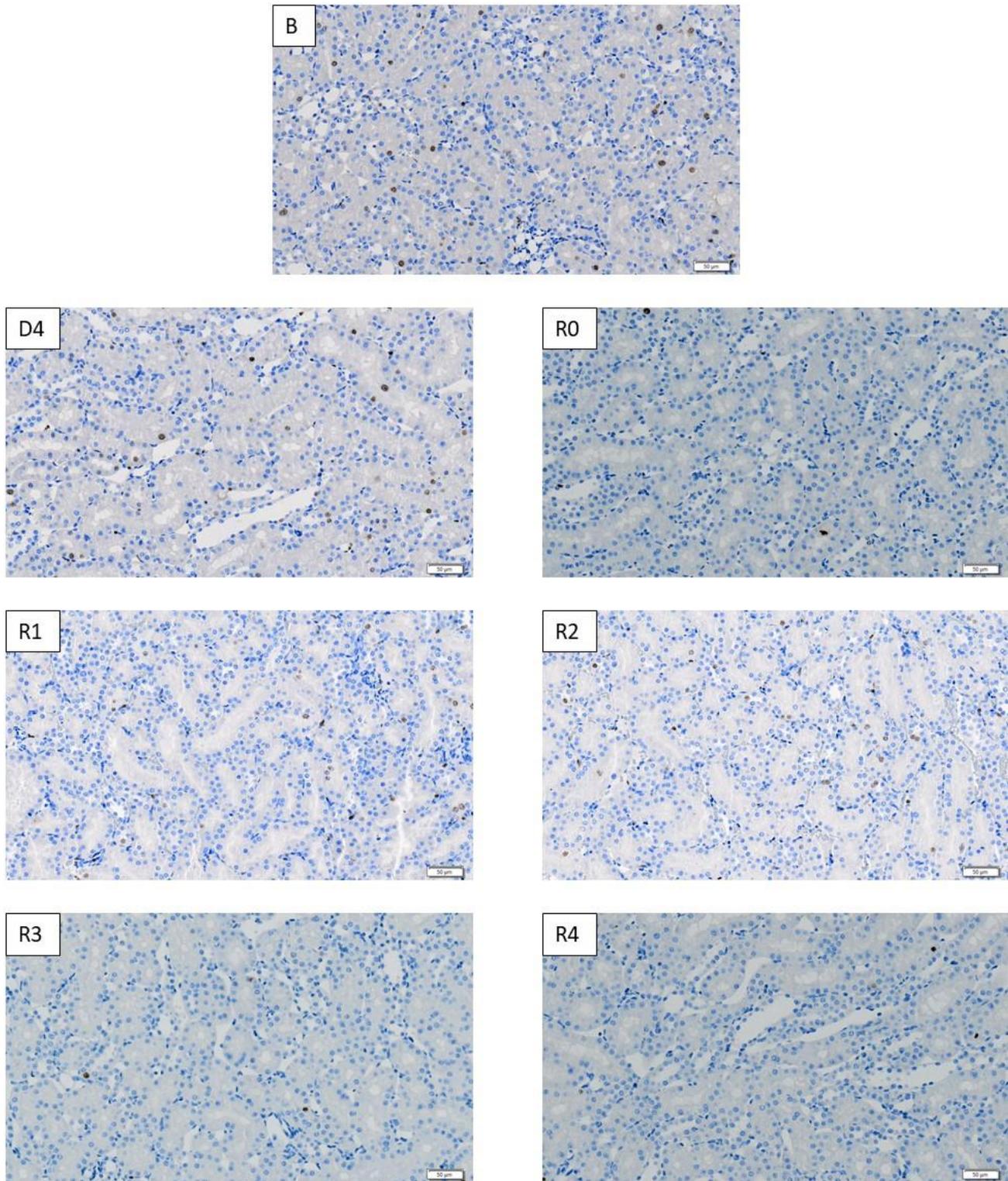


Figura S3: Evaluación de la proliferación celular en animales control. Imágenes representativas (200X) de cortes histológicos de la médula externa renal teñidos con inmunohistoquímica de Ki67. Las imágenes corresponden a animales control en los diferentes puntos de estudio. Se indica la escala (50 µm).

