



UNIVERSIDAD DE JAÉN

**FACULTAD DE CIENCIAS
EXPERIMENTALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE
LA SALUD**

TESIS DOCTORAL

**GLUTAMIL AMINOPEPTIDASA
EN ORINA, EN MICROVESÍCULAS Y EN
EXOSOMAS COMO MARCADOR DE LA
NEFROTOXICIDAD INDUCIDA POR EL
CISPLATINO EN RATAS**

**PRESENTADA POR:
SEBASTIÁN MONTORO MOLINA**

**DIRIGIDA POR:
DRA. D.^a ROSEMARY WANGENSTEEN FUENTES**

JAÉN, 7 DE JULIO DE 2017

ISBN 978-84-9159-148-1

**Glutamil aminopeptidasa en orina, en
microvesículas y en exosomas urinarios como
marcador de la nefrotoxicidad inducida por el
cisplatino en ratas**



UNIVERSIDAD DE JAÉN

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

TESIS DOCTORAL

SEBASTIÁN MONTORO MOLINA

2017

D^a Rosemary Wangensteen Fuentes, doctora en Farmacia y Profesora Titular del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad de Jaén

Certifica:

Que la tesis doctoral titulada: *“Glutamil aminopeptidasa en orina, en microvesículas y en exosomas urinarios como marcador de la nefrotoxicidad inducida por el cisplatino en ratas”* presentada por Sebastián Montoro Molina, ha sido realizada bajo mi supervisión y dirección, reuniendo las condiciones académicas necesarias para su presentación para optar al grado de doctor.

Y para que conste donde proceda, firmo la presente en

Jaén, a de de 2017

Fdo. Rosemary Wangensteen Fuentes

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral han sido publicados en los siguientes artículos científicos:

- **Montoro-Molina S**, Quesada A, Zafra-Ruiz PV, O´Valle F, Vargas F, de Gracia MC, Osuna A, Wangenstein R. Immunological detection of glutamyl aminopeptidase in urine samples from cisplatin-treated rats. *Proteomics Clin Appl.* 2015; 9: 630-635.
- Quesada A, Segarra AB, **Montoro-Molina S**, de Gracia MC, Osuna A, O´Valle F, Gómez-Guzman M, Vargas F, Wangenstein R. Glutamyl aminopeptidase in microvesicular and exosomal fractions of urine is related with renal dysfunction in cisplatin-treated rats. *PLoS One.* 2017; 12: e0175462.

A mis padres.

Agradecimientos

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de alguna manera han hecho posible la realización de esta tesis, en especial a la directora de la misma, Dra. D^a Rosemary Wangenstein Fuentes, por todo su tiempo y dedicación hacia mi. Su ayuda, consejos y sabiduría han sido esenciales para que este trabajo saliera adelante. Desde el primer momento me transmitió su pasión por la investigación, haciendo mucho más fácil esta etapa de mi vida. Todo agradecimiento será insuficiente para mostrar lo que ha hecho por mí.

También me gustaría agradecer a las demás personas que forman parte del Departamento de Fisiología de la Universidad de Jaén:

A D. Manuel Ramírez, D^a Isabel Prieto, D^a Ana Belén Segarra y D^a Inmaculada Banegas, que me abrieron las puertas del Departamento desde que llegué, y gracias a ellos, me he sentido siempre como en casa. Y en especial a D. Andrés Quesada por todo lo que ha hecho por mí, por todo lo que me ha enseñado y por prestarme siempre que lo he necesitado su desinteresada ayuda.

Por otro lado, agradecimiento especial merece mi novia Mayte, por estar acompañándome en este camino desde el inicio, dándome siempre su apoyo en los buenos y no tan buenos momentos, y siendo un pilar fundamental para que este proyecto de mi vida llegase a buen puerto. Gracias por estar siempre a mi lado y por sus consejos que siempre son útiles.

Y por último, no tengo palabras de agradecimiento para mis padres, Juan y Julia, y mi hermana Anabel. Sin ellos, nada de esto hubiera sido posible. Los valores que me han inculcado desde que nací han hecho posible todo lo que soy. Gracias por todo lo que habéis hecho por mí y por ser como sois. Os estaré eternamente agradecido. Esto también es vuestro logro.

A todos, gracias de corazón.

ÍNDICE

1. Introducción

1.1.	Daño renal agudo	1
1.1.1.	<i>Definición</i>	1
1.1.2.	<i>Fisiopatología del daño renal agudo</i>	4
1.1.2.1.	Etiología.....	4
1.1.2.2.	Daños celulares.....	6
1.1.2.3.	Mediadores inflamatorios.....	8
1.1.2.4.	Apoptosis y necrosis.....	9
1.1.2.5.	Autofagia y reparación del daño.....	14
1.1.3.	<i>Interrelación entre daño renal agudo y enfermedad renal crónica</i>	18
1.1.4.	<i>Diagnóstico del daño renal agudo</i>	19
1.1.4.1.	Marcadores de daño renal agudo.....	21
1.1.4.1.1.	Marcadores urinarios.....	22
1.1.4.1.2.	Marcadores plasmáticos.....	24
1.2.	Modelos experimentales de daño renal agudo	26
1.2.1.	<i>Isquemia/reperfusión</i>	27
1.2.2.	<i>Daño renal agudo inducido por ácido fólico</i>	29
1.2.3.	<i>Daño renal agudo asociado al ácido aristolóquico</i>	30
1.2.4.	<i>Nefropatía inducida por pigmentos</i>	31
1.2.5.	<i>Daño renal agudo inducido por glicerol</i>	32

1.2.6.	<i>Daño renal agudo inducido por warfarina.....</i>	32
1.2.7.	<i>Daño renal agudo obstructivo.....</i>	34
1.2.8.	<i>Daño renal agudo endotóxico.....</i>	34
1.2.9.	<i>Fisiopatología del daño renal provocado por cisplatino.....</i>	36
1.3.	Aminopeptidasas como marcadores de daño renal agudo...	39
1.4.	Vesículas extracelulares.....	41
1.4.1.	<i>Terminología, origen y propiedades de las vesículas extracelulares.....</i>	41
1.4.2.	<i>Micropartículas.....</i>	48
1.4.3.	<i>Exosomas.....</i>	50
1.4.3.1.	Funciones biológicas de los exosomas.....	50
1.4.3.1.1.	Comunicación intercelular.....	50
1.4.3.1.2.	Vía no clásica de secreción de proteínas.....	51
1.4.3.1.3.	Funciones en el sistema inmunológico.....	52
1.4.3.1.4.	Biología de patógenos.....	52
1.4.3.1.5.	Roles en la progresión del cáncer.....	52
1.4.3.2.	Exosomas urinarios.....	53
2.	Planteamiento y objetivos.....	57
3.	Materiales y métodos.....	61
3.1.	Reactivos e instrumentos utilizados.....	63

3.1.1.	<i>Reactivos utilizados</i>	63
3.1.2.	<i>Instrumentos utilizados</i>	64
3.2.	Métodos experimentales	66
3.2.1.	<i>Diseño experimental</i>	66
3.2.2.	<i>Procesamiento de las muestras de orina</i>	67
3.2.3.	<i>Determinación de la actividad enzimática</i>	68
3.2.4.	<i>ELISA</i>	69
3.2.5.	<i>Inmunobloting</i>	69
3.2.6.	<i>Otros procedimientos analíticos</i>	72
3.2.6.1.	Determinación de las proteínas totales.....	72
3.2.6.2.	Determinación de la creatinina.....	73
3.2.7.	<i>Preparación de equitensina</i>	74
3.2.8.	<i>Bioética</i>	74
3.2.9.	<i>Análisis estadístico</i>	74
4.	Resultados	77
4.1.	Efecto del cisplatino sobre el peso, la ingesta hídrica, la ingesta de comida y la diuresis	79
4.2.	Efectos del cisplatino sobre variables plasmáticas, urinarias y morfológicas	83
4.3.	Evolución de la actividad urinaria de la GluAp y de la proteinuria en los días posteriores al tratamiento	84
4.4.	Detección inmunológica de GluAp en orina	86

4.4.1.	<i>Inmunobloting</i>	86
4.4.2.	<i>ELISA</i>	87
4.5.	Correlación entre la actividad enzimática de GluAP y creatinina sérica y entre la actividad enzimática de GluAP y el incremento de peso.....	88
4.6.	Correlación entre la cantidad de GluAP excretada en la orina y creatinina sérica y entre la cantidad de GluAP excretada en la orina y el incremento de peso.....	89
4.7.	Contenido de GluAP en la fracción microvesicular.....	90
4.8.	Contenido de GluAP en la fracción exosomal.....	91
4.9.	Variables urinarias 24 horas después de la inyección.....	93
4.10.	Correlación entre GluAP microvesicular y la disfunción renal.....	94
4.11.	Correlación entre la GluAP exosomal y la disfunción renal.....	95
4.12.	Correlación entre la GluAP microvesicular expresada en ng/100g/día y la disfunción renal.....	96
4.13.	Correlación entre la GluAP microvesicular expresada en ng/mg proteína con la disfunción renal.....	97
4.14.	Correlación entre la GluAP exosomal expresada en ng/100g/día y la disfunción renal.....	98
4.15.	Correlación entre la GluAP exosomal expresada en ng/mg proteína y la disfunción renal.....	99
4.16.	Correlación de la enzima GluAP entre las diferentes fracciones urinarias.....	100

4.17.	Porcentajes de distribución de GluAp en las diferentes fracciones.....	101
4.18.	Cantidad de GluAp expresada en ng/mg proteína en las diferentes fracciones urinarias.....	102
4.19.	Correlación entre GluAp y AlaAp en sobrenadante, GluAp y AlaAp en fracción microvesicular y GluAp y AlaAp en fracción exosomal expresadas en mU por mililitro a los 3 días de la inyección del cisplatino en ratas.....	103
4.20.	Creatinina sérica e incremento de peso corporal en el grupo cisplatino y grupo control a las 72 horas del tratamiento.....	105
4.21.	Inmunoblotting de GluAp, Alix y TSG101 en fracción microvesicular y fracción exosomal a las 72 horas del tratamiento con cisplatino.....	106
4.22.	Variables urinarias 3 días después de la inyección.....	108
5.	Discusión.....	109
6.	Conclusiones.....	121
7.	Bibliografía.....	125

INTRODUCCIÓN

1.1. Daño renal agudo

1.1.1. Definición

El daño renal agudo se define generalmente como una disminución brusca y sostenida de la función renal que provoca una acumulación progresiva de productos nitrogenados y toxinas en el plasma y que está acompañada de alteraciones en los líquidos corporales, en los niveles de electrolitos y en el equilibrio ácido-base (Lisowska-Myjak, 2010).

La Acute Kidney Injury Network (AKIN) describe el daño renal agudo como las “anormalidades funcionales o estructurales o en los marcadores de daño renal, incluyendo anormalidades en sangre, orina, pruebas tisulares o estudios de imagen presentes en los últimos tres meses” (Vaidya y cols., 2008).

Por norma general, el daño renal agudo está asociado con la retención de creatinina, urea y otros productos metabólicos de desecho que son normalmente excretados por el riñón. Aunque en los casos más severos se observa oliguria o, incluso, anuria, el volumen de orina puede ser también normal o alto (Mehta y Chertow, 2003).

Una de las funciones más importantes de los riñones es la filtración y excreción de productos de desecho nitrogenados de la sangre. Los aumentos en la concentración de urea y creatinina en sangre sirven como indicadores de la disminución de la función renal, indicativo de la disminución del aclaramiento en estos productos de desecho.

En los últimos cincuenta años, las tasas de mortalidad de los pacientes con daño renal agudo en la UCI se han mantenido altas, aproximadamente del 50% al 70% (Waikar y cols., 2006). Un estudio internacional a gran escala de la epidemiología del daño renal agudo en pacientes adultos en estado crítico reportó una tasa de mortalidad en el hospital del 60% (Uchino y cols., 2005). En otro estudio, de los pacientes que sobrevivieron hasta el alta hospitalaria, el 13% se mantuvo sometido al tratamiento de diálisis (Nash y cols., 2002). Por lo tanto, el daño renal agudo es una patología que presenta una alta tasa de mortalidad, y tanto su detección precoz como su clasificación diagnóstica son de gran importancia.

La clasificación de consenso RIFLE (riesgo, lesión, fracaso, pérdida, y etapa final de la enfermedad renal) define tres grados de severidad (de riesgo, lesión y fallo) y dos fases de relevancia clínica (pérdida de la función renal y etapa final de la enfermedad renal). Los criterios RIFLE son una forma útil de evaluar las sucesivas etapas del desarrollo de la insuficiencia renal (Schrier y cols., 2004; Soni y cols., 2009; Bagshaw y Gigney, 2008) (Tabla 1).

Etapa	Criterios de creatinina	Criterios de excreción urinaria
1 (Riesgo)	Incremento de la creatinina excretada de $\geq 0,3$ mg/dl o incremento a $\geq 150\%$ - 200% de la basal	Orina excretada $<0,5$ ml/kg/h durante >6 horas
2 (Daño)	Incremento de la creatinina excretada a $> 200\%$ -300%	Orina excretada $<0,5$ ml/kg/h durante > 12 horas
3 (Fracaso)	Incremento de la creatinina excretada a $> 300\%$ de la basal (o la creatinina excretada ≥ 4 mg/dl) (subida aguda $\geq 0,5$ mg/dl)	Orina excretada $< 0,3$ ml/kg/h por 24 horas o anuria por 12 horas.
Pérdida	Completa pérdida de la función renal > 4 semanas	
ESKD	Etapa final de la enfermedad renal (>3 meses)	

Tabla 1. Criterios RIFLE para la clasificación de la enfermedad renal. Vaidya y cols., 2008.

1.1.2. *Fisiopatología del daño renal agudo*

1.1.2.1. Etiología

El daño renal agudo puede ser ocasionado por una disminución en la perfusión renal o intrarrenal, por una agresión tóxica u obstrucción de los túbulos renales, por la inflamación tubulointersticial y edema, o por una reducción en la capacidad de filtración del glomérulo (Thadhani y cols., 1996).

Debido a la amplia variedad de lesiones que pueden ocurrir en el riñón, la evaluación de la etiología del daño renal agudo es compleja. En general, puede ser útil pensar en daños en las cuatro estructuras principales del riñón: los túbulos, los glomérulos, el intersticio y los vasos sanguíneos intrarrenales.

- Daño tubular: la necrosis tubular aguda es el término utilizado para designar el daño renal agudo como resultado de un daño en los túbulos. Las dos principales causas son:
 - La isquemia, resultante de la disminución grave y prolongada en la perfusión renal.
 - Nefrotóxico, resultante de una variedad de compuestos exógenos (como por ejemplo aminoglucósidos y cisplatino) y compuestos endógenos (por ejemplo, la hemoglobina en la hemólisis o la mioglobina en la rbdomiolisis) que son tóxicos o potencialmente tóxicos para el riñón.

- Daño glomerular: el daño renal agudo por un daño glomerular ocurre en casos severos de glomerulonefritis aguda.
- Daño intersticial: el daño renal agudo por daño intersticial puede ser el resultado de una nefritis intersticial aguda debido a una reacción alérgica a una gran variedad de medicamentos (comúnmente antibióticos como penicilinas, cefalosporinas, sulfonamidas) o una infección (enfermedades bacterianas tales como la leptospirosis, legionella y enfermedades virales como el virus Hanta) (Quiros y cols., 2011).
- Daño vascular: el daño renal agudo por daño vascular se produce debido a una lesión en los vasos intrarrenales porque decrece la perfusión renal y disminuye la tasa de filtración glomerular. Las causas de la lesión vascular incluyen hipertensión, enfermedad renal ateroembólica, preeclampsia/eclampsia, etc. (Thadhani y cols., 1996).

A menudo, el daño renal agudo está causado por la combinación de la isquemia y de productos tóxicos en pacientes aquejados de sepsis. Se estima que el 19-33% de los casos de daño renal agudo en los pacientes hospitalizados se atribuyen a la nefrotoxicidad provocada por la administración de fármacos (Choudhury y Ziauddin, 2005; Kleinknecht y cols., 1987).

En un 80% de los pacientes con daño renal agudo, las células tubulares sufren necrosis (Trof y cols., 2006).

Los antibióticos, en particular, aminoglucósidos como la gentamicina y tobramicina, son los fármacos más frecuentemente citados como

nefrotóxicos, seguidos por los analgésicos. Otros compuestos que pueden derivar en daño renal agudo son los agentes quimioterápicos como el cisplatino, inmunosupresores como la ciclosporina y tacrolimus, contaminantes ambientales, tales como el cadmio, el mercurio y otros metales pesados (Vaidya y cols., 2008).

1.1.2.2. Daños celulares

A nivel celular, el daño está provocado por una rápida pérdida de la integridad del citoesqueleto y de la polaridad celular, con la deslocalización de moléculas de adhesión y otras proteínas de membrana como la ATPasa de Na-K y β integrinas, así como la apoptosis y necrosis (Zuk y cols., 1998) (Figura 4). La comprensión de las respuestas celulares que conducen tanto a la lesión letal como a la subletal representa un elemento importante en la comprensión de la fisiopatología subyacente del daño renal agudo. La variación en la sensibilidad de las células renales al daño es consecuencia de alteraciones en parámetros fisiológicos que incluyen la relación del sustrato energético con la demanda metabólica, la localización física de las células en el riñón, el estado de oxigenación y la permeabilidad de la membrana.

Una de las características morfológicas más tempranas en el daño renal agudo es la rápida pérdida del borde en cepillo renal que se debe a la ruptura de elementos del citoesqueleto (Venkatachalam y cols., 1978). La respuesta del citoesqueleto se atribuye a la sensibilidad de la actina a la polimerización, la cual se produce dependiendo de los niveles de ATP celulares. La reducción en el ATP celular resulta en una pérdida de f-actina de las microvellosidades apicales (Kellerman y Bogusky, 1992). Esta

disminución de f-actina también dificulta la asociación de complejos de proteínas del citoesqueleto que median la interacción célula-célula, así como las interacciones sustrato-célula, contribuyendo así a la pérdida de la polaridad celular (Molitoris, 1991). Los procesos dinámicos de polimerización/despolimerización de actina son mal regulados cuando los niveles de ATP son reducidos. Las alteraciones en la estructura del citoesqueleto provocan una pérdida de la polaridad epitelial y de la función de barrera. La polaridad celular es establecida en parte por la función de las uniones estrechas y uniones adherentes, los cuales tienen una red estructural similar consistente en proteínas transmembrana y proteínas citoplasmáticas que se unen a la red cortical de actina (Lee y cols., 2006).

Las células del túbulo proximal requieren la unión a la membrana basal para la integridad y función adecuadas. Las adhesiones célula-matriz están mediadas por receptores de adhesión celular de la familia de las integrinas, proteínas de múltiples subunidades, que abarcan la membrana plasmática (Hamerski y Santoro, 1999). Goligorsky y cols. (1993) propusieron que la pérdida de la expresión basolateral de los receptores de integrinas es responsable de la exfoliación de células proximales epiteliales viables y que la redistribución de receptores de integrinas facilita la autoadhesión y agregación de las células *in situ*.

Con las lesiones graves, las células viables y no viables son descamadas, dejando a las regiones donde la membrana basal se mantiene como la única barrera entre el filtrado y el intersticio peritubular. Esto permite un reflujo del filtrado, sobre todo en circunstancias en que la presión en el túbulo se

incrementa debido a la obstrucción intratubular resultante de los desechos celulares en la luz del tubo (Zuk y cols., 1998).

1.1.2.3. Mediadores inflamatorios

Esta lesión en el epitelio genera mediadores inflamatorios y vasoactivos. Por lo tanto, la inflamación contribuye de manera fundamental a la fisiopatología del daño renal agudo (Bonventre, 2007). La inflamación está mediada en parte por la adhesión de los leucocitos a células endoteliales afectadas. Hay un aumento en la expresión de moléculas de adhesión de leucocitos (ICAM-1 y P y E-selectina) en la superficie de células endoteliales en respuesta al daño (Fuller y cols., 2001). Estudios de imágenes *in vivo* han mostrado la adhesividad de los leucocitos a la pared de los capilares peritubulares que ocurre pocas horas después de la reperusión (Kelly y cols., 2004). La mayoría de estudios en modelos animales confirman un papel importante de la inflamación en el establecimiento del daño renal agudo (Furuichi y cols., 2002). El grado en que los neutrófilos contribuyen realmente a la lesión renal sigue siendo algo poco claro (Friedewald y cols., 2004). Recientes evidencias demuestran que los monocitos, pueden desempeñar un papel importante en el daño renal agudo (Friedewald y cols., 2004). Los macrófagos son derivados de los monocitos y tienen capacidades fagocíticas. Los macrófagos se infiltran en el riñón lesionado. Esta actividad es mediada por fractalquina (CX3CL1), la cual es expresada por células endoteliales dañadas y es un potente quimioatrayente y una molécula de adhesión para receptores de CX3CL1 (Li y cols., 2008). El papel de las células dendríticas en el daño renal agudo no está todavía claro.

Mientras la activación de las células dendríticas ha sido sugerida para permitir la producción de TNF- α en el daño renal agudo, hay pocos estudios funcionales de la actividad de las células dendríticas en el proceso del daño (Dong y cols., 2007). En resumen, las observaciones generales descritas anteriormente sugieren una compleja interacción con varias señales pro-inflamatorias. Las fuentes de estas diversas señales y la forma en que están reguladas a nivel molecular están empezando a entenderse.

El daño tubular renal puede desencadenar una serie de eventos que alteran las respuestas fisiológicas en órganos distantes y que pueden desempeñar un papel importante en la mortalidad. El daño renal agudo aumenta el riesgo de muerte en pacientes con otras enfermedades (Jo y cols., 2007).

1.1.2.4. Apoptosis y necrosis

Un examen de la lesión celular en el daño renal agudo inevitablemente resulta en una discusión con respecto al modo de la muerte celular que se produce en el riñón y la distinción entre muerte necrótica y apoptótica (también referida como muerte celular programada) como formas de muerte celular. Los términos apoptosis y necrosis surgen de términos patológicos clásicos basados en distinciones morfológicas bien definidas. Tanto la apoptosis como la necrosis utilizan distintos y comunes procesos bioquímicos. Ya que esto representa un área en el que las potenciales dianas terapéuticas pueden emerger, el estudio de estos procesos es un área de intensa investigación.

El término apoptosis fue descrito originariamente por Kerr en 1972, destacando su papel en la renovación de las células normales y que se distingue de la muerte celular necrótica después de una lesión traumática (Kerr y cols., 1972). En su forma clásica, la apoptosis es un proceso altamente ordenado mediado por cascadas de enzimas pre-existentes y que requiere energía en forma de ATP. Las características más tempranas de la apoptosis se definen por la reducción citoplasmática y nuclear, la fragmentación de la cromatina y la ruptura de la célula en múltiples cuerpos esféricos (es decir, cuerpos apoptóticos) que retienen la integridad de la membrana (Figura 1) (Figura 2) (Padanilam y cols., 2003). Un rasgo distintivo de la apoptosis es la retención de la integridad de la membrana, lo que impide el derrame del contenido celular en el intersticio, la prevención de una reacción inflamatoria y la limitación de la extensión del daño en el tejido circundante (Padanilam y cols., 2003) (Figura 1). Aunque los componentes de la membrana permanecen intactos, residuos de fosfatidil serina que se localizan en la membrana interna se exponen en el exterior de la membrana plasmática antes de la fragmentación celular. Cuando la apoptosis se produce durante la normal renovación de las células y en respuesta a una lesión modesta, hay poco efecto sobre el tejido circundante (Padanilam y cols., 2003). La apoptosis es regulada por varias vías bioquímicas interrelacionadas dirigidas hacia la autodestrucción programada de la célula de una manera ordenada. Un rasgo distintivo de la apoptosis es la degradación del ADN por endonucleasas específicas. La activación de las nucleasas representa un punto de no retorno en el proceso de la lesión. Basnakian y cols. Identificaron abundante expresión del gen que codifica la ADNasa I en el riñón de rata y demostraron que su actividad se incrementa

en respuesta a la lesión por isquemia/reperfusión y por cisplatino (Basnakian y cols., 2005). La inhibición específica de la ADNasa I con oligonucleótidos antisentido protege a las células epiteliales tubulares contra la hipoxia en cultivos celulares (Basnakian y cols., 2005). También hay evidencia de otras endonucleasas activadas en respuesta a la lesión. Por ejemplo, la endonucleasa G (Endo G) es una pequeña proteína de 27 kDa que se encuentra en el espacio de la membrana interna de las mitocondrias y que puede llegar al núcleo bajo condiciones apoptóticas (Li y cols., 2001). En las células epiteliales tubulares del riñón de rata, Endo G es transportada al núcleo en respuesta a la hipoxia. Tanto la ADNasa I como la Endo G pueden jugar un papel complementario y sinérgico en la actividad endonucleasa en modelos de daño renal agudo. Además, otra endonucleasa, denominada factor inductor de apoptosis (AIF) puede ser activada en respuesta a la lesión con cisplatino (Liu cols., 2010).

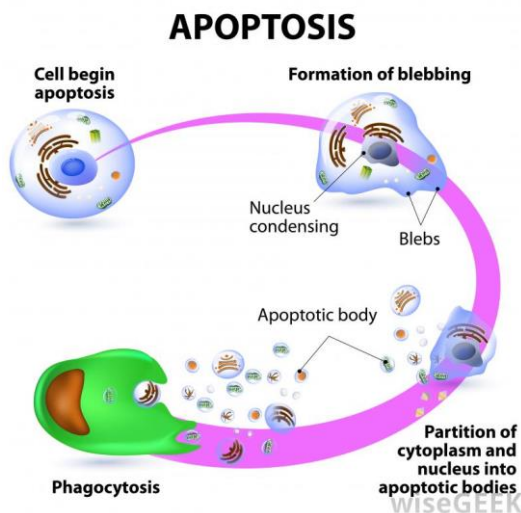


Figura 1. Representación esquemática de la muerte celular programada (apoptosis).

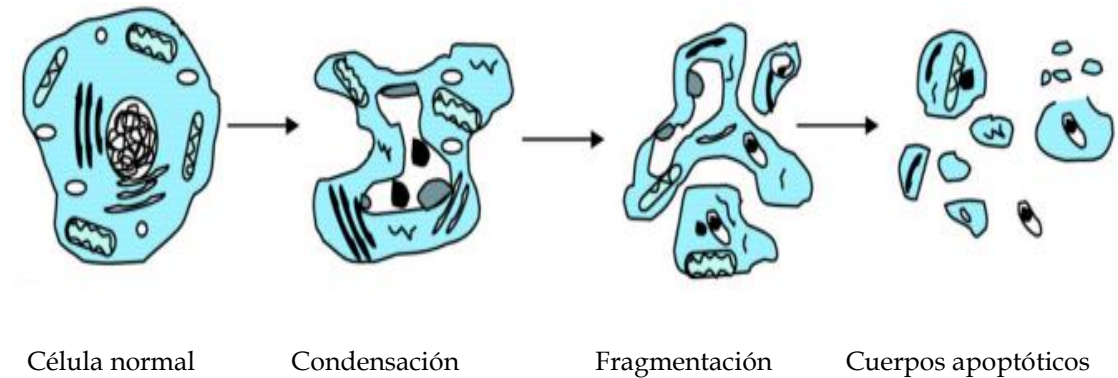


Figura 2. Representación de los cambios celulares incluyendo la condensación, los cambios en la estructura nuclear, y la fragmentación de la célula en pequeños cuerpos apoptóticos.

Por el contrario, la morfología de la necrosis es claramente diferente y se caracteriza por la inflamación y la degeneración de todo el citoplasma. La cromatina no se empaqueta en partículas de membrana, hay dilatación y fragmentación del retículo endoplasmático rugoso y los polirribosomas se disocian y se dispersan por todo el citoplasma (Figura 3). La membrana plasmática no permanece intacta y hay derramamiento del contenido citoplasmático, debido a lo cual aumentan las reacciones inflamatorias (Padanilam y cols., 2003). La muerte celular necrótica ha sido históricamente vista como un proceso pasivo secundario al desajuste de la energética celular. Las reducciones en los niveles celulares de ATP son resultantes de la reducción de la actividad de la Na-K ATPasa y la afluencia neta de Na asociado con la inflamación del compartimento citosólico (Figura 2) (Bonvetre y cols., 2003).

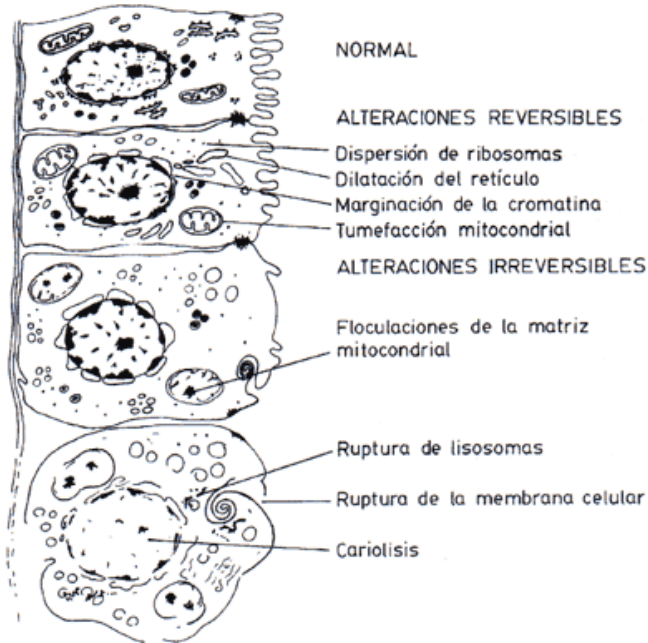


Figura 3. Representación esquemática de las alteraciones reversibles e irreversibles producidas en el transcurso de la muerte celular por necrosis.

Dentro del contexto del daño renal agudo, la apoptosis y la necrosis pueden ocurrir simultáneamente. El uso de biopsias después de un trasplante o análisis histológico post-mortem de pacientes con daño renal agudo, demuestra la presencia de ambas células, necróticas y apoptóticas (Toronyi y cols., 2001). Las distinciones difusas entre la apoptosis y la necrosis han llevado a proponer el término necrapoptosis, para describir las observaciones que demuestran que ambas formas de muerte celular pueden ser observadas en tejidos sometidos a isquemia o a toxicidad (Lemaster y cols., 1999). El término necrapoptosis sugiere que tanto la apoptosis como la necrosis pueden ser activados por un mecanismo común, pero que culmina

en lisis celular (necrosis) o en muerte celular programada (apoptosis) en función de la naturaleza de otros factores de modificación (Lemaster y cols., 1999). Durante el curso de la muerte celular apoptótica, si el daño es severo y hay una disminución de ATP, se producirá una muerte celular necrótica. Si los niveles de ATP se mantienen, la muerte celular que se produce es por apoptosis. En el daño renal agudo, la preponderancia de muerte celular apoptótica vs muerte celular necrótica puede diferir sustancialmente dependiendo de parámetros experimentales tales como el agente, la dosis y las especies que se están investigando.

1.1.2.5. Autofagia y reparación del daño

La autofagia es el proceso celular de degradación de orgánulos dañados, agregados de proteínas y macromoléculas en el citoplasma (Periyasamy-Thandavan y cols., 2009). Es una respuesta que contribuye a la muerte celular. Periyasamy-Thandavan y cols. sugirieron que este proceso es protector renal en el daño renal agudo. En un modelo de lesión inducida por cisplatino, vesículas autofágicas y autofagosomas se identificaron en células tubulares antes de la muerte celular apoptótica (Periyasamy-Thandavan, 2008). Cuando la autofagia fue bloqueada farmacológicamente, se mejoró la apoptosis de las células tubulares. Sin embargo, el papel de la autofagia en la muerte celular o la citoprotección en el contexto del daño renal agudo es controvertido.

Al contrario de lo que ocurre en corazón o cerebro, el riñón restaura eficientemente las células que se pierden debido a una lesión isquémica o tóxica que produce la muerte celular (Park y cols., 2003).

Las células que sobreviven y que quedan adheridas contribuyen a la reparación (Figura 4). De este modo, el riñón tiene la capacidad para recuperar gran parte de la función renal. (Humphreys y Bonventre, 2007).

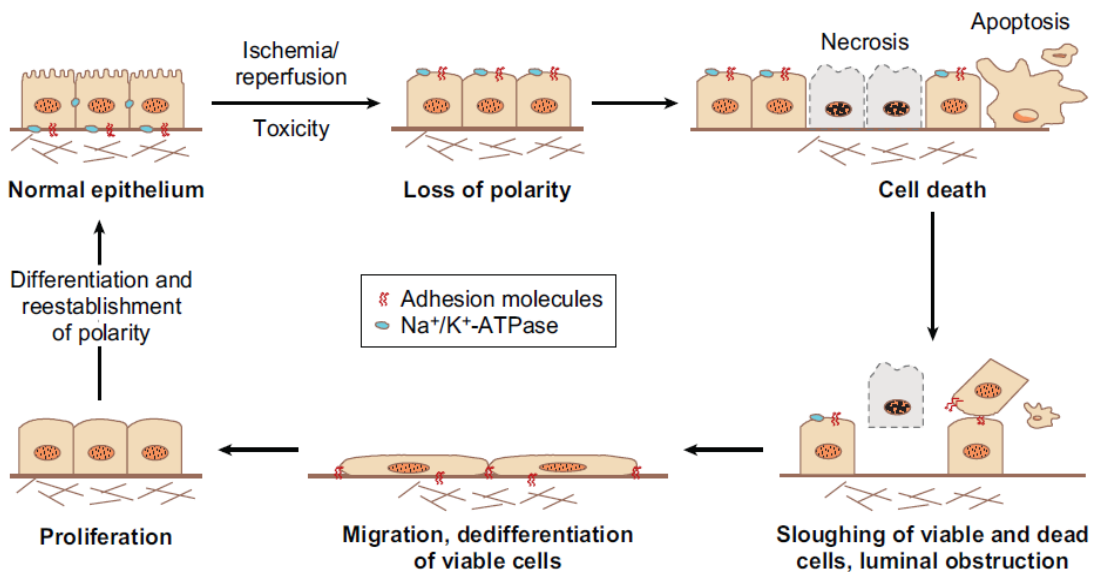


Figura 4. Representación esquemática del mecanismo celular del daño renal agudo y su reparación. Vaidya y cols., 2008.

Como se describió anteriormente, la respuesta celular a la lesión es heterogénea, con algunas células sometidas a necrosis o apoptosis, mientras que otras son subletalmente dañadas. La gravedad y duración del daño renal agudo puede estar relacionado con la proporción de células subletalmente dañadas que son capaces para mantener la viabilidad y

contribuir a un proceso de reparación coordinado restaurando la estructura y función del riñón. Un examen de la expresión génica después de la lesión renal revela grupos de genes que están asociados con la adaptación de la lesión (Devarajan y cols., 2003).

La activación de tales vías representa posibles dianas terapéuticas para disminuir la severidad del daño renal agudo, mientras que la baja regulación de este tipo de vías puede agravar la lesión y puede representar factores de riesgo clínicamente relevantes para el desarrollo del daño renal agudo.

La restauración de la estructura del riñón después de la lesión ha sido objeto de numerosas investigaciones. Se han observado evidencias de respuestas de recuperación en el periodo posterior a la lesión en biopsias de pacientes después de una lesión isquémica (Racusen, 1995). Además de la proliferación celular, la restauración de la estructura y la función del túbulo proximal requiere de una gran variedad de actividades celulares complejas y bien coordinadas (Nony y Schnellmann, 2003).

Los picos de actividad proliferativa coinciden en el tiempo estrechamente con la gravedad de la lesión, lo que sugiere que la inducción de la proliferación representa un mecanismo de defensa intrínseca. Células del túbulo proximal cultivadas proliferan en respuesta a una amplia variedad de mitógenos tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Norman y cols., 1987), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (Stracke y cols., 1998) y factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) (Zhang y cols., 1991).

Un avance significativo se realizó en un artículo publicado en 1989 por Humes y cols. Investigando el efecto de EGF exógeno sobre el curso de la

lesión renal en respuesta a la isquemia en ratas. La administración de EGF a las ratas en el momento de la lesión isquémica por reperfusión redujo la gravedad de la lesión inicial medida por la creatinina sérica, y aceleró la recuperación de vuelta a los niveles de control simulados (Humes y cols., 1989). Esto fue también asociado con un aumento significativo en el número de células del túbulo proximal mitóticas en el riñón de ratas dañadas tratadas con EGF (Humes y cols., 1989).

Este hallazgo dio lugar a una serie de estudios investigando una variedad de factores de crecimiento polipeptídicos que promueven el crecimiento en varios modelos de daño renal agudo, tales como HGF (Miller y cols., 1994) y IGF-I (Basile y cols., 1996).

Mientras que los experimentos descritos anteriormente proporcionan la principal prueba de que los factores de crecimiento pueden facilitar la regeneración renal, el grado en que la actividad endógena de factores de crecimiento media en la respuesta de reparación es menos claro. Por ejemplo, la expresión de IGF-I es mejorada en las células tubulares dañadas las cuales se están regenerando (Matejka y Jennische, 1992). Sin embargo, ratones knockout IGF-I no son viables y no hay informes que demuestren un papel definitivo para este factor en la reparación de los riñones (Liu y cols., 1993). Del mismo modo, mientras que la expresión molecular del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y su receptor se incrementan en riñones en modelos de ratas con daño renal agudo (Igawa y cols., 1993) y HGF está elevado en la orina de pacientes con daño renal agudo (Taman y cols., 1997), no hay datos definitivos que apoyen un papel de la actividad HGF endógena en modelos de daño de túbulo proximal.

1.1.3. Interrelación entre daño renal agudo y enfermedad renal crónica

Aunque habitualmente no se piensa que el daño renal agudo predisponga al desarrollo de complicaciones a largo plazo del riñón, se sabe desde hace varias décadas que muchos pacientes adultos que sufren daño renal agudo nunca recuperan completamente la función renal (Finn, 1993).

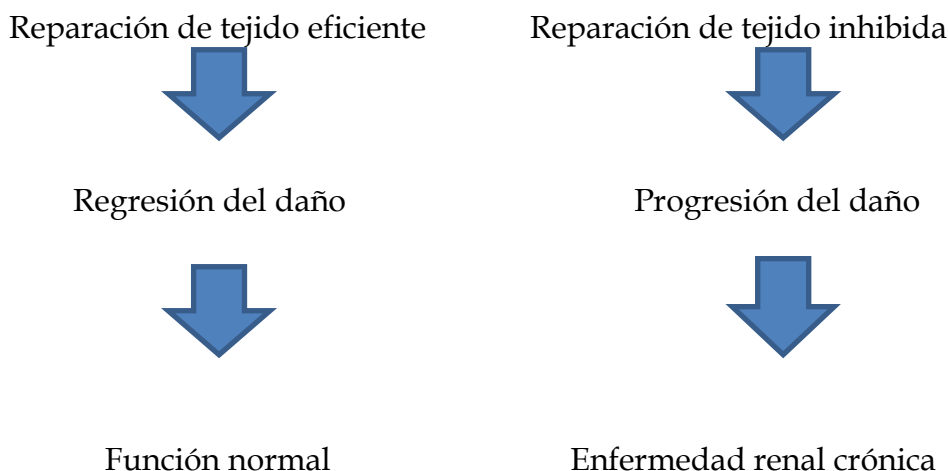


Figura 5. Representación esquemática de diferentes comportamientos dentro del daño renal agudo.

El daño renal agudo y la enfermedad renal crónica comparten factores de riesgo comunes. Cuando el daño renal agudo se produce sin enfermedad renal preexistente, se puede desarrollar la enfermedad renal crónica. Por el contrario, la presencia de enfermedad renal crónica es un factor de riesgo importante para el desarrollo del daño renal agudo (Chawla y cols., 2014).

Algunos procesos patológicos (evaluados principalmente en modelos animales) que persisten después del daño renal agudo son similares a los que se han pensado que causan la progresión de la enfermedad renal crónica.

La fibrosis puede continuar después del daño renal agudo, presumiblemente porque las células fibrogenéticas no vuelven a su estado de reposo debido en parte a factores epigenéticos (Bechtel y cols., 2010).

El curso de la enfermedad renal después de un episodio de daño renal agudo se determina por el grado de la disminución de la tasa de filtración glomerular, la reversibilidad de la lesión, y el equilibrio temporal entre la reparación efectiva y la mala reparación (Chawla y Kimmel, 2012).

La insuficiencia cardiaca, que suele estar presente tanto en pacientes con daño renal agudo como en aquellos con enfermedad renal crónica, puede estar asociada a cambios agudos en la función renal. El corazón sufre alteraciones moleculares progresivas similares a las que ocurren en el riñón después de la lesión (Chawla y Kimmel, 2012).

En modelos animales, la enfermedad renal crónica aumenta dramáticamente la gravedad de la sepsis y la sepsis inducida por el daño renal agudo (Leelahavanichkul y cols., 2011)

1.1.4. Diagnóstico del daño renal agudo

A lo largo de la historia, se han utilizado diversas medidas para evaluar la función renal y definir la función anormal para orientar el diagnóstico. Se

estima que hay más de 30 definiciones diferentes de daño renal agudo en la literatura, que van desde severas a leves (Kellum y cols., 2002; Mehta y Chertow, 2003).

Como resultado de los diferentes criterios de valoración clínicos y fisiológicos, la investigación, los estudios epidemiológicos, así como los ensayos de prevención y la intervención, a menudo no son comparables (Bellomo y cols., 2004).

Se ha sugerido que pequeños cambios en la creatinina sérica pueden tener un valor pronóstico sobre el daño renal agudo. Sin embargo, para predecir el daño mediante la creatinina sérica, el aumento en la misma debe ser $\geq 50\%$ o haber una reducción en la producción de orina (oliguria) de ≤ 0.5 ml/kg/h (Mehta y cols., 2007).

Una de las deficiencias predominantes en el diagnóstico del daño renal es que se sigue haciendo sobre la base de un aumento de creatinina sérica o una disminución en el volumen de orina. Por desgracia, la creatinina no es un óptimo marcador después de una lesión, cuando sus niveles a menudo no reflejan la tasa de filtración glomerular (TFG) debido a una serie de influencias renales y extrarrenales en los niveles de creatinina. El desfase entre los cambios en la creatinina sérica y los cambios en la TFG impide estimar con precisión el momento de la lesión y la gravedad de la lesión después de la disfunción (Moran y Myers, 1985).

La tasa de aumento de la creatinina sérica tras el daño renal agudo depende de muchos factores, incluyendo la TFG, la tasa de secreción tubular, la tasa de generación y el volumen de distribución (Star, 1998; Moran y Myers, 1985).

Grandes cambios en la TFG pueden estar asociados con cambios relativamente pequeños en la creatinina sérica tras las primeras 24-48 horas después del daño renal agudo, lo que resulta no sólo en el retraso en el diagnóstico y la intervención, sino también en la subestimación del grado de lesión (Bellomo y cols., 2004).

Hay una necesidad urgente de biomarcadores mejores que permitan un diagnóstico más oportuno del daño renal agudo, la predicción de la gravedad de la lesión, y la evaluación de la seguridad durante el desarrollo de fármacos. Mejores biomarcadores ayudarán a los desarrolladores de medicamentos a tomar decisiones más acertadas a la hora de establecer las dosis adecuadas y de diseñar ensayos clínicos que proporcionen información clara tanto sobre los beneficios del producto como sobre su seguridad (Vaidya y Bonventre, 2006).

1.1.4.1. Marcadores de daño renal agudo

Durante la última década se han presentado numerosos nuevos marcadores, medidos en sangre y orina, que tratan de cumplir los requisitos específicos para el diagnóstico del daño renal agudo.

Un biomarcador ideal para daño renal agudo debería (Lisowska-Myjak, 2010):

- Ser altamente órgano-específico y permitir la diferenciación entre las causas pre-renales, intra-renales y post-renales del daño renal agudo.
- Permitir el reconocimiento de la etiología del daño renal agudo (hipoxia, toxinas, sepsis, o una combinación de estos factores).

- Correlacionar con los hallazgos histológicos en muestras de biopsia renal.
- Ser específicos para detectar lesiones tempranas e identificar cambios patológicos en los diversos segmentos de los túbulos renales (la patogénesis del daño renal agudo consiste en lesiones que afectan a diferentes sitios dentro de los túbulos renales).
- Correlacionar con el grado de lesión tubular y tener alta sensibilidad para la detección temprana de cambios menores y la aparición de daños más graves. Un marcador debería ser detectable durante todo el curso del daño renal agudo con los valores límite definidos para evaluar la progresión y la regresión del daño renal. Hasta ahora, no hay ningún método adecuado para diferenciar entre disfunción renal benigna, ligera, moderada o severa.
- La investigación debe de ser no invasiva.
- Las pertinentes pruebas de laboratorio deben ser simples y rápidas de realizar, precisas, fiables, baratas, reproducibles y que permitan la determinación en serie de un gran número de muestras.

1.1.4.1.1. Marcadores urinarios

El análisis de orina es un método tradicional no invasivo utilizado para diagnosticar, caracterizar y predecir el resultado clínico de numerosas enfermedades renales. Recientemente, ha sido evaluada la utilidad de nuevos marcadores de laboratorio determinados en la orina para el diagnóstico del daño renal agudo. Algunas de estas enzimas y proteínas son bien conocidas en la medicina de laboratorio, ya que se han utilizado rutinariamente en otras pruebas de diagnóstico, mientras que algunos

fueron investigados en estudios recientemente publicados, con el punto de mira en la búsqueda de marcadores específicamente relacionados con el daño renal agudo. Los últimos marcadores son genes, obtenidos bajo condiciones experimentales en cultivos celulares o ensayos sobre animales. El progreso de las técnicas de la biología molecular, tales como el análisis del proteoma de la orina, ofrece una herramienta confiable para la investigación de las proteínas, que están directamente relacionadas con la patogénesis y el desarrollo del daño renal agudo (Nguyen y Devarajan, 2008; Rabb, 2003; Bonventre, 2007).

Los biomarcadores de daño renal agudo medidos en la orina deben tener las siguientes características:

- Especificidad diagnóstica para la detección de lesiones de los túbulos renales.
- Permitir la detección precoz del daño renal (antes de que se produzcan aumentos en la creatinina sérica).
- Sus concentraciones en la orina deben correlacionar con la gravedad de la enfermedad renal.
- Permitir la predicción del desarrollo de la enfermedad.
- Facilitar las decisiones oportunas para seleccionar el mejor tratamiento.

Los marcadores de daño renal agudo pueden clasificarse como (Lisowska-Myjak, 2010):

- Enzimas liberadas de las células tubulares dañadas, disfuncionales o con necrosis/apoptosis: fosfatasa alcalina, gamma-

glutamyltranspeptidasa, alanina aminopeptidasa, isoenzimas de la glutatión transferasa, N-acetil- β -D-Glucosaminidasa (NAG).

- Proteínas de bajo peso molecular (<40 kDa) cuya presencia en orina refleja una disminución en la reabsorción por parte de las células del túbulo proximal: α 1-microglobulina, β 2-microglobulina, proteína transportadora de retinol (RBP), cistatina C.
- Proteínas específicamente producidas en el riñón durante el transcurso del daño renal: lipocalina asociada a la gelatinasa del neutrófilo (NGAL), molécula de daño renal (KIM-1), citoquinas y quimoquinas (Gro- α , IL-18).
- Proteínas estructurales y funcionales de los túbulos renales: F-actina, intercambiador sodio/hidrógeno (NHE-3).

1.1.4.1.2. Marcadores plasmáticos

Los compuestos nitrogenados acumulados en la sangre, nitrógeno ureico en sangre (BUN) y la creatinina sérica son los marcadores utilizados normalmente en las etapas iniciales del daño renal agudo.

En la práctica clínica, el daño renal agudo se detecta cuando las concentraciones séricas de creatinina aumentan en un corto periodo de tiempo, con o sin oliguria. Las mediciones de los marcadores de daño renal agudo en el suero pueden ser especialmente útiles en pacientes con oliguria severa, en los cuales resulta difícil la obtención de muestras urinarias (Schrier y cols., 2004; Venkataraman y Kellum, 2007; Dent y cols., 2007).

Sin embargo, muchos estudios (Schrier y cols., 2004; Nguyen y Devarajan, 2008; Bagshaw y Gigney, 2008; Coca y cols., 2008; Bonventre, 2007) indican

que la concentración de creatinina no es un marcador determinante en el diagnóstico del daño renal agudo, debido a las siguientes razones:

- La elevación en las concentraciones de creatinina sérica no es específica del daño renal agudo y requiere la diferenciación de otras causas pre-renales o extra renales de azotemia.
- Las concentraciones séricas de creatinina no son específicas de las lesiones renales tubulares, patológicamente relacionadas con el desarrollo del daño renal agudo, sino que parecen reflejar la pérdida de la filtración glomerular, que acompaña al desarrollo del daño renal agudo.
- El aumento en la creatinina sérica se detecta más tarde que los cambios en la tasa de filtración glomerular, ya que la creatinina se va acumulando en el plasma a lo largo del tiempo.
- La creatinina sérica es un marcador pobre de la disfunción renal, ya que los cambios en sus concentraciones no son ni sensibles ni específicos en respuesta a las ligeras alteraciones en la tasa de filtración glomerular y sólo se hacen aparentes cuando los riñones han perdido el 50% de su capacidad funcional.
- Los cambios en la creatinina sérica pueden estar influenciados por otros factores que no estén relacionados directamente con los daños en los riñones, tales como la edad, el sexo, la masa corporal, la hidratación y el estado nutricional.

La lipocalina asociada a la gelatinasa de los neutrófilos (NGAL), una proteína de 25kDa unida covalentemente a la gelatinasa humana determinada en el suero, ha sido propuesta como un biomarcador sensible, específico y precoz, y altamente predictivo para el daño renal agudo. Las

mediciones de NGAL en el suero predicen el daño renal agudo que sigue al bypass cardiopulmonar (Dent y cols., 2007).

La cistatina C, determinada en el suero, es un marcador endógeno de la función renal, detectado antes que la creatinina. Sirve para diagnosticar la disfunción renal e identificar el progreso de la lesión renal aguda. La cistatina C es una proteína no glicosilada, un inhibidor endógeno de proteinasas de cisteína, producido por todas las células nucleadas del cuerpo y se libera en el torrente sanguíneo a una velocidad constante. Las concentraciones de cistatina C sérica son independientes de la edad, el sexo, la raza, la masa corporal y el nivel de hidratación y puede ser medida por un sencillo método. Debido a la constante velocidad de su producción, la evaluación de las concentraciones de la cistatina C sérica puede ser un marcador de filtración glomerular (Venkataraman y Kellum, 2007; Trof y cols., 2006; Royakkers y cols., 2007).

Se ha propuesto que las concentraciones séricas de cistatina C se pueden usar para la detección de la disfunción renal en pacientes críticamente enfermos con daño renal agudo 24-48 horas antes que las mediciones de creatinina (Trof y cols., 2006; Coca y cols., 2008).

1.2. Modelos experimentales de daño renal agudo

Los modelos convencionales de daño renal agudo son el resultado de la isquemia-reperfusión renal, la exposición a toxinas endógenas y exógenas y la obstrucción de las vías urinarias (Sanz y cols., 2013). Por definición, el daño renal agudo humano implica un decrecimiento de la tasa de filtración

glomerular. Sin embargo, esto puede no ser el caso para modelos animales si sólo un riñón es lesionado.

1.2.1. Isquemia/reperfusión

La isquemia/reperfusión es una de las principales causas del daño renal agudo. La isquemia/reperfusión desencadena alteraciones funcionales y estructurales que afectan a las células tubulares proximales principalmente y al endotelio (Pickering y Endre, 2014). La lesión del túbulo proximal y la activación del endotelio desencadenan respuestas inflamatorias, que incluyen el reclutamiento de células inflamatorias. Los eventos celulares durante la lesión por isquemia/reperfusión incluyen la desorganización del citoesqueleto, la pérdida de la adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular, el desprendimiento celular y la apoptosis, así como necrosis seguida de la generación de especies reactivas de oxígeno, movilización del calcio intracelular y desequilibrios en intermediarios de adenosina fosfato, entre otros (Sáenz-Morales y cols., 2006). Los riñones pueden recuperarse si la lesión no es muy severa mediante la activación de la diferenciación y proliferación de las células restantes no letalmente dañadas (Bonventre y Yang, 2011). La contribución de las células pluripotenciales externas a esta recuperación es todavía una controversia, al menos desde el punto de vista de estas células realmente se diferencian en células renales (Bagul y cols., 2013).

La fisiopatología de la lesión renal por isquemia-reperfusión se ha estudiado en cultivos y ex-vivo, incluyendo líneas de cultivos de células renales,

túbulos renales primarios aislados y riñones perfundidos aislados. Sin embargo, sólo los modelos animales in vivo reproducen la respuesta renal y de todo el cuerpo a la isquemia-reperfusión (Lieberthal y Nigam, 2000). El modelo más utilizado es la isquemia-reperfusión renal, ya sea bilateral o unilateral, este último con o sin nefrectomía contralateral. El daño renal agudo por isquemia-reperfusión bilateral es la situación clínica más frecuente. Sin embargo, a pesar de la abundante literatura sobre la patogénesis de la isquemia-reperfusión, no ha llegado aún ninguna terapia a la clínica.

Muchas especies (cerdos, perros, conejos, ratas y ratones) se han utilizado para estudiar la isquemia-reperfusión. Las especies más grandes, en particular los cerdos, son valiosos para estudios de isquemia-reperfusión asociada a las maniobras de trasplante debido a la similitud anatómica y de tamaño a los seres humanos. Para el resto de los estudios, las ratas son los animales más ampliamente elegidos aunque la disponibilidad de los ratones knockout aumenta notablemente el interés de esta especie. Además, el tamaño de un ratón es también una ventaja para caracterizar enfoques terapéuticos. En modelos murinos, la susceptibilidad a la lesión renal se ve influenciada por la edad, el sexo y la tensión. Los animales más viejos y los machos son más sensibles a las lesiones. Además, la recuperación se ve afectada en los animales más viejos (Wei y Dong, 2012).

Técnicamente, la sujeción de la arteria renal unilateral o bilateral es un procedimiento fácilmente reproducible. El tiempo de sujeción (30-45 minutos), el mantenimiento de la temperatura corporal y el tipo de anestesia también son parámetros clave a ser estandarizados para la reproducibilidad.

Dependiendo de la gravedad de la lesión original, el daño renal agudo inducido por isquemia-reperfusión es seguido por fibrosis renal, aunque no suele ser caracterizado por el aumento de los niveles de creatinina en suero.

1.2.2. Daño renal agudo inducido por ácido fólico.

Una sobredosis de ácido fólico (Figura 6) también induce daño renal agudo en los seres humanos (por accidente) y en roedores (Szczyпка y cols., 2005). En ratones y ratas, una inyección intraperitoneal de 250 mg/kg de ácido fólico en tampón bicarbonato reproduce mecanismos patológicos reportados por el daño renal agudo en humanos (Szczyпка y cols., 2005). Los cristales de ácido fólico causan obstrucción intratubular y daño de las células tubulares, promoviendo la liberación de citoquinas inflamatorias y aún más la lesión celular tubular seguida de la regeneración (Sanz y cols., 2008).

La exposición repetitiva al ácido fólico o variaciones en la dosis de ácido fólico puede inducir la inflamación crónica y fibrosis, y este modelo ha sido utilizado para ver la transición del daño renal agudo a la enfermedad crónica renal (Fang y cols., 2005).

Tanshinona IIA es una molécula bioactiva derivada de la raíz de *Salvia miltiorrhiza*, la cual ha sido ampliamente usada para el tratamiento de diversas enfermedades en Asia. Estudios recientes han demostrado que Tanshinona IIA posee efectos protectores prominentes en las células o tejidos, que ejerce mediante la atenuación de daño tóxico, la modulación de la proliferación celular y la apoptosis, inhibición de la inflamación y el estrés oxidativo, y la prevención de fibrosis (Hong y cols., 2012). Tanshinona IIA

mostró efectos beneficiosos en los riñones en un modelo de ratón de lesión renal inducida por el ácido fólico. Además, Tanshinona IIA también puede conferir efectos protectores en una variedad de enfermedades del riñón experimentales, tales como la nefropatía por ácido úrico, la nefropatía diabética y la hipotermia o doxorubicina nefropática inducida (Kim y cols., 2009).

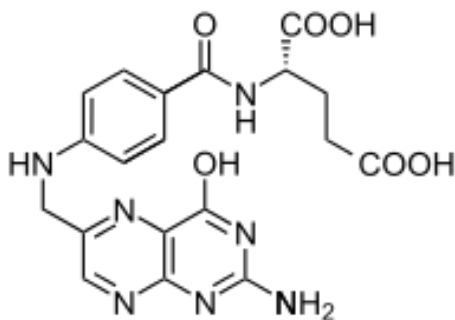


Figura 6. Estructura molecular del ácido fólico.

1.2.3. Daño renal agudo asociado al ácido aristolóquico

El ácido aristolóquico (Figura 7) es una toxina herbal, carcinógeno de roedores y un compuesto muy nefrotóxico que promueve el daño renal agudo, como por ejemplo, en roedores después de una inyección intraperitoneal de 5mg/kg durante 5 días (Matsui y cols., 2011). El daño renal agudo inducido por el ácido aristolóquico se caracteriza por la pérdida progresiva del borde en cepillo del túbulo proximal (Lebeau y cols., 2005) y por la muerte celular en el epitelio tubular proximal relacionada con el estrés oxidativo (Chen y cols., 2010). Los estudios experimentales realizados en conejos y ratas confirmaron que el ácido aristolóquico era un

nefrotóxico y condujo al concepto de la nefropatía endémica de los Balcanes y la nefropatía de la hierba china (Gökmen y cols., 2013). Los modelos animales confirman el potencial fibrogénico del ácido aristolóquico in vivo (Cosyns y cols., 1994; De Broe, 2012; Debelle y cols., 2012).

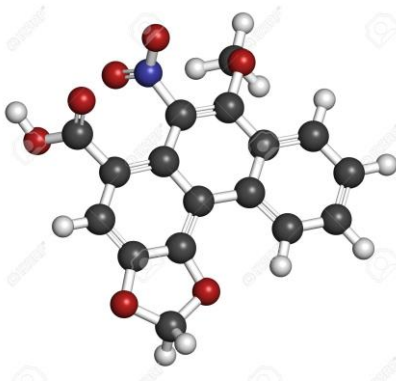


Figura 7. Estructura tridimensional del ácido aristolóquico.

1.2.4. Nefropatía inducida por pigmentos

La hemoglobina y la mioglobina son proteínas de pequeño tamaño que, cuando se liberan en la circulación, se filtran libremente por el glomérulo y son reabsorbidas por las células tubulares proximales, donde se libera hierro contenido en el anillo de hemo y puede provocar estrés oxidativo (Ortiz y cols., 2015). El daño renal agudo asociado con el incremento de la carga de pigmentos en la rabiomiolisis a menudo puede conducir a un daño renal irreversible. El daño renal agudo es la complicación más grave de la rabiomiolisis. En este síndrome, la liberación del pigmento hemo induce una lesión que se distingue por una vasoconstricción glomerular y una toxicidad celular directa con componente oxidativo (Martim y cols., 2007).

La toxicidad tubular renal del pigmento hemo, resultante de la hemólisis, se caracteriza por la obstrucción intratubular por cilindros pigmentados, la toxicidad tubular mediada por el hierro quelado libre y la vasoconstricción renal debida a la inhibición del efecto vasodilatador del óxido nítrico.

1.2.5. Daño renal agudo inducido por glicerol

El daño renal agudo inducido por glicerol imita las condiciones clínicas de rabdomiólisis en los seres humanos (mioglobinuria, necrosis tubular y vasoconstricción). En ratas, la inyección intramuscular de 8ml/kg al 50% de glicerol en ambas patas traseras promueve rabdomiólisis abrupta y daño renal agudo (Thiel y cols., 1967). Un modelo de conejo también existe (Trillaud y cols., 1995). La rabdomiólisis es el resultado de la deshidratación, la lesión isquémica y nefrotoxicidad tubular, la inflamación y el estrés oxidativo causado por la mioglobina y la obstrucción tubular (Curry y cols., 1989). La infusión de mioglobina también es tóxica, pero no reproduce fisiopatología humana (Heyman y cols., 1996). El daño renal agudo inducido por glicerol es un modelo agudo que no ha sido utilizado aún en las terapias usadas en clínica.

1.2.6. Daño renal agudo inducido por warfarina

La warfarina (Figura 8) es un medicamento anticoagulante oral que se usa para prevenir la formación de trombos y émbolos. Inhibe la producción de factores de coagulación dependientes de la vitamina K y así reduce la

capacidad de la sangre de coagular. La warfarina se deriva de la micotoxina anticoagulante natural dicumarol, que se encuentra en el trébol dulce putrefacto y que causa la muerte por sangrado excesivo de los animales que comen la planta.

El potencial efecto perjudicial de la warfarina en pacientes con enfermedad renal se observó por primera vez en la década de 1970 (Ng y cols., 2016).

Recientemente, la asociación entre la sobre-anticoagulación y el daño renal agudo ha sido descrito y nombrado nefropatía relacionada con warfarina (WRN) (Brodsky y cols., 2009).

Un nuevo modelo de daño renal inducido por warfarina ha sido desarrollado para estudiar los mecanismos patológicos involucrados en la nefropatía por warfarina descrita recientemente en humanos (Ware y cols., 2011). Este modelo es causado por la obstrucción de los túbulos renales por eritrocitos y el aumento de estrés oxidativo por la hemoglobina liberada (Ware y cols., 2013) y afecta más frecuentemente a pacientes con enfermedad renal crónica (Brodsky y cols., 2011).

También se ha observado que la nefropatía relacionada con warfarina (WRN) puede ocurrir en algunos pacientes que no tienen el diagnóstico clínico de la enfermedad renal crónica (Brodsky, 2014).

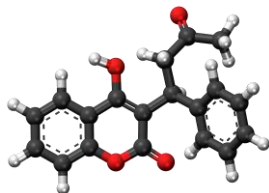


Figura 8. Estructura tridimensional de la warfarina.

1.2.7. *Daño renal agudo obstructivo*

El modelo de obstrucción ureteral unilateral (OUU) se ha utilizado ampliamente para investigar los mecanismos implicados en la transición del daño renal agudo a la enfermedad renal crónica (Ucero y cols., 2014). Sin embargo, puesto que es unilateral, normalmente no se observa un incremento de la creatinina sérica, aunque el riñón lesionado desarrolla todas las características de la enfermedad renal crónica: inflamación intersticial, daño celular tubular y fibrosis. Este modelo se puede reproducir en el laboratorio y el tiempo para llegar a las principales características de la enfermedad renal crónica es corto (2 semanas), permitiendo una fácil prueba de enfoques terapéuticos (Ucero y cols., 2010). La ligadura de un uréter causa un aumento de la presión hidrostática intratubular e isquemia secundaria que conduce a la destrucción de nefronas. Tanto la tensión mecánica como el reclutamiento de inflamación y los mediadores de fibrosis contribuyen a la lesión (Ucero y cols., 2014).

En este sentido, hay que destacar que el modelo OUU no pretende descubrir nuevos enfoques de la obstrucción del tracto urinario (que se resuelve fácilmente por la urología intervencionista) sino más bien, para descubrir los mecanismos moleculares de la enfermedad renal crónica.

1.2.8. *Daño renal agudo endotóxico*

La sepsis con endotoxemia se identificó por primera vez en el siglo XIX como un síndrome grave caracterizado por un incremento de la inflamación de todo el cuerpo seguido por una inmunosupresión. La incidencia de la

sepsis ha aumentado rápidamente en los últimos años, a pesar de que son aplicados más terapias clínicas y tratamientos. La sepsis causa el daño de múltiples órganos que se asocia frecuentemente con la muerte del paciente. El daño renal agudo es una de las complicaciones bien documentadas en la sepsis que se asocia con una alta morbilidad y mortalidad en pacientes hospitalizados, especialmente en la unidad de cuidados intensivos. La activación sistémica de múltiples vías inflamatorias en el contexto de un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica o sepsis a menudo conduce al daño renal agudo. El daño renal agudo producido por una sepsis implica una compleja patogénesis, incluyendo la inflamación, daño celular de los túbulos epiteliales, y disfunción endotelial y vascular (Mei y cols., 2016).

Los modelos animales de daño renal agudo asociados a la sepsis se obtienen por la inyección de lipopolisacárido bacteriano (LPS) (Remick y cols., 2000). El daño renal agudo inducido por LPS se ha estudiado principalmente en ratas y ratones, que reciben por lo general una sola inyección intraperitoneal de unos 10-15 mg/kg de LPS, dependiendo de la especificidad del LPS y los animales utilizados. Al igual que en los modelos de isquemia, los machos se utilizan sobre todo debido a los resultados más reproducibles. Este es un modelo agudo, los animales son estudiados generalmente durante 72-96 horas, y hay poca información sobre la transición del daño renal agudo a la enfermedad renal crónica.

La unión de LPS a proteínas de unión formando LBP y las proteínas CD14 en las células del túbulo proximal desencadena una respuesta celular local (Solovéva y cols., 2013). Además, la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, así como el óxido nítrico (NO) provocan alteraciones

hemodinámicas que contribuyen al daño renal agudo (Venkatachalam y Weinberg, 2012). Tanto la inflamación como la inestabilidad hemodinámica son también características del shock humano.

1.2.9. Fisiopatología del daño renal provocado por cisplatino

El cisplatino (CDDP) (Figura 9) es un importante medicamento antineoplásico utilizado en el tratamiento de tumores sólidos tales como los de pulmón, cabeza y cuello, ovario y cáncer testicular (Kim y cols. 2015). Sin embargo, causa diferentes tipos de toxicidad, entre las que se incluye la nefrotoxicidad. El 20% de los pacientes que reciben altas dosis de cisplatino tienen disfunción renal grave. Suele tener menos toxicidad en las células no proliferantes, sin embargo, las células del túbulo proximal en reposo son dañadas por el cisplatino. Los estudios sugieren que la inflamación, el estrés oxidativo y la apoptosis probablemente expliquen parte de esta lesión. (Thadhani y cols., 1996; Merouani y cols., 1996). Siendo uno de los pocas terapias frente al cáncer basadas en un metal, el cisplatino se ha convertido en uno de los fármacos contra el cáncer más ampliamente utilizado. Sin embargo, como se ha visto en la mayoría de los fármacos frente al cáncer, la resistencia al tratamiento y los efectos secundarios en los tejidos normales son los dos principales retos en el uso del cisplatino (Dasari y Tchounwou, 2014).

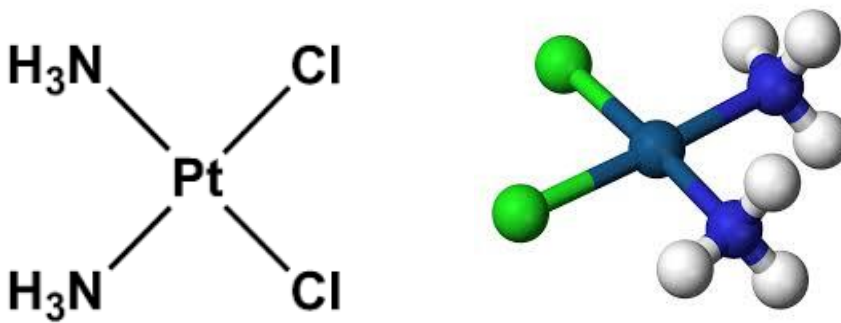


Figura 9. Fórmula química esquematizada y tridimensional del cisplatino.

La captación de cisplatino por las células renales principalmente se produce a través del transportador de cationes orgánicos. El transportador de cationes orgánicos (OCT 2) es el transportador para la captación de cisplatino en los túbulos proximales, tanto en los animales como en los seres humanos (Ciarimboli y cols., 2005).

El riñón acumula cisplatino en un grado mayor que otros órganos. La concentración de cisplatino en las células epiteliales tubulares proximales es alrededor de 5 veces mayor que en el suero (Kuhlmann y cols., 1997). Esta desproporcionada acumulación de cisplatino en el tejido renal contribuye a la nefrotoxicidad (Arany y Safirstein, 2003). Para que se produzca el daño celular se requiere la conversión de las moléculas de cisplatino a otros productos nefrotóxicos en las células del túbulo proximal (Townsend y cols., 2003). Desde el punto de vista molecular, el cisplatino representa un ejemplo perfecto de cómo una pequeña alteración en la estructura química puede afectar significativamente a la actividad biológica en la célula diana (Goodsell, 2006).

Los efectos intracelulares del cisplatino incluyen la reducción de la actividad natural de la ATPasa, daño mitocondrial, la detención del ciclo celular, y la alteración en el sistema del transporte celular. La suma de estos efectos puede inducir apoptosis o necrosis (Chirino y Pedraza-Chaverri, 2009).

El estrés oxidativo está involucrado activamente en la patogénesis inducida por el cisplatino. Las especies de oxígeno reactivas (ROS) actúan directamente sobre los componentes celulares y destruyen su estructura. Las ROS se producen a través del sistema xantina oxidasa mitocondrial y NADPH oxidasa, ya que los aumentos en el nivel de calcio intracelular activan a la NADPH oxidasa y se estimula la producción de ROS (Kawai y cols., 2006).

Además, se ha observado una disminución en la producción de antioxidantes tras la administración de cisplatino (Yilmaz y cols., 2004).

Los radicales libres dañan los componentes lipídicos de la membrana celular por peroxidación y desnaturalizan proteínas, que conducen a la inactivación enzimática. Éstos pueden también causar disfunción mitocondrial (Yilmaz y cols., 2004). El contenido renal de óxido nítrico y peroxinitrito se incrementa en ratas tratadas con cisplatino (Chirino y cols., 2004). El peroxinitrito causa cambios en la estructura y función de las proteínas, la peroxidación de lípidos, la escisión química de ADN y la reducción de las defensas celulares (Yildirim y cols., 2003).

Además, el cisplatino induce una serie de cambios inflamatorios que median la lesión renal. Evidencias recientes indican que la inflamación tiene un papel importante en la patogénesis de la lesión renal inducida por cisplatino.

Así, se ha observado un aumento de TNF- α y de otras citoquinas en el riñón (Ramesh y Reeves, 2004).

Todos estos factores causan daño tubular y disfunción. En este sentido, hay un creciente interés en la búsqueda de nuevos remedios para minimizar la nefrotoxicidad inducida por cisplatino.

1.3. Aminopeptidasas como marcadores de daño renal agudo

Las enzimas liberadas de las células tubulares dañadas y excretadas a la orina son los biomarcadores más prometedores para una detección temprana del daño renal agudo. Su determinación puede proporcionar información detallada sobre la naturaleza, el tamaño y el sitio del daño de las células tubulares y su posible necrosis o disfunción (Lisowska-Myjak, 2010).

Una de estas enzimas, AlaAp (Alanil-aminopeptidasa, CE 3.4.11.2, también conocida como aminopeptidasa N), es una exopeptidasa de 937 aminoácidos en la estructura primaria que se encuentra en el borde en cepillo propuesta a principios de los años setenta como un marcador urinario de la enfermedad renal (Peters y cols., 1972). La AlaAp desempeña funciones muy importantes en diferentes procesos fisiológicos que incluyen el metabolismo de los péptidos relacionados con la analgesia, las etapas finales de la digestión, el control de la presión arterial, la motilidad y la adhesión celular así como actúan de receptores para la entrada de varios coronavirus. Adicionalmente, una elevada actividad de esta enzima se encuentra implicada en la patogénesis de varios desórdenes humanos como el cáncer, la inflamación,

la desregulación de la presión arterial, entre otros. Por estas razones, esta enzima es blanco hoy en día para el desarrollo de inhibidores con potenciales aplicaciones biomédicas (Pascual y cols., 2015).

GluAp (también conocida como aminopeptidasa A, CE 3.4.11.7 o Glutamil aminopeptidasa) es una ectoenzima homodimérica metalopeptidasa unida a membrana dependiente de zinc de 170 kDa que hidroliza selectivamente residuos de aminoácidos ácidos desde el extremo amino de oligopéptidos. La enzima degrada angiotensina II en angiotensina III y por tanto, ayuda a regular la presión arterial. GluAp se expresa fuertemente en los tejidos periféricos tales como el intestinal y las células epiteliales renales, y en el endotelio vascular (Lojda y Gossrau, 1980). Además, GluAp se encuentra en las células del estroma de la médula ósea y la corteza tímica, y en subpoblaciones de células en el ovario y la placenta (Li, 1993) (Mizutani y cols., 1981). El extremo amino terminal del residuo aspartil de la angiotensina II se puede eliminar por GluAp para producir la menos activa angiotensina III. Por lo tanto, la GluAp también se define como una angiotensinasa y está implicada en la regulación de la presión arterial al afectar a las angiotensinas circulantes. (Zini y cols., 1997).

AlaAp, junto con GluAp están presentes en las células tubulares renales (Albiston y cols., 2011; Kenny y Maroux, 1982; Song y cols., 1994) y ellas tienen una función aminopeptidásica en el metabolismo de la angiotensina II, una hormona vasoactiva intrarrenal que es un sustrato para la GluAp y que se incrementa en las enfermedades renales.

Según Quesada y cols. (2012), las actividades de la GluAp y AlaAp son biomarcadores urinarios precoces y predictivos del daño renal agudo

inducido por cisplatino, y su determinación puede ser útil en la detección temprana y monitorización del daño renal (Quesada y cols., 2012). AlaAp y GluAp son altamente órgano-específicas porque están presentes en el borde en cepillo de la membrana de las células tubulares renales (Kenny y Maroux, 1982) y exhiben pesos moleculares altos (140kDa) que hacen difícil que su presencia en orina pueda ser debido a alteraciones en la barrera glomerular. Estas enzimas participan en el sistema intrarrenal renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) (Segarra y cols., 2006).

1.4. Vesículas extracelulares

1.4.1. Terminología, origen y propiedades de las vesículas extracelulares.

Las células liberan varios tipos de vesículas de membrana bajo condiciones fisiológicas normales y condiciones patológicas (Figura 10). Estas vesículas son secretadas tanto por células normales como por células cancerosas como un medio de comunicación célula-célula. (Raposo y cols., 1996; Blanchard y cols., 2002). Estudios recientes sugieren que la tasa de liberación de vesículas es reforzada por procesos oncogénicos (Taylor y Gercel-Taylor, 2008) (Rabinowits y cols., 2009). Aunque estas vesículas varían en origen subcelular, comparten varios rasgos comunes. Todas ellas son aproximadamente esféricas, contienen proteínas solubles en su lumen, y están delimitadas por una bicapa lipídica similar a otras membranas celulares. Una vesícula formada a partir de la membrana plasmática se mostrará hacia el exterior de la superficie extracelular de la célula (They y cols., 2009).

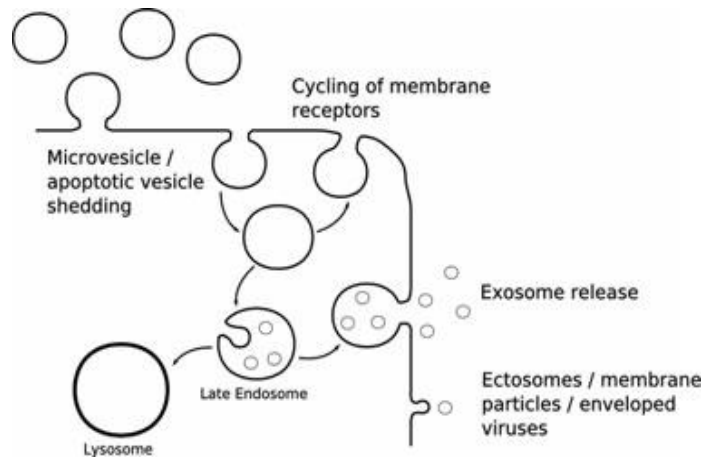


Figura 10. Las células liberan una variedad de diferentes vesículas de membrana. Dear y cols., 2013.

Las vesículas liberadas varían en el sitio de origen, tamaño, densidad, y contenido de proteínas y lípidos. Esta heterogeneidad no siempre está clara en los artículos publicados, donde la terminología para diferentes partículas puede ser confusa para el lector (Simpson y cols., 2009). Si bien estas vesículas extracelulares constituyen una plataforma prometedora para el desarrollo de biomarcadores, la terminología utilizada para describir estas vesículas no se ha estandarizado. El término de micropartículas se utiliza a menudo para describir las vesículas de membrana que no se han caracterizado a fondo o muestras que contienen una mezcla de vesículas de diferentes tipos, como es el caso de biofluidos complejos tales como el plasma. Al considerar el uso de las vesículas extracelulares como biomarcadores, es importante reconocer y entender qué múltiples tipos de vesículas extracelulares pueden estar presentes en un biofluido.

Los exosomas son un tipo específico derivados de células formados como parte de la ruta endosomal dentro de las células eucariotas. Se distinguen de

otras micropartículas por su tamaño y el hecho de que se formen intracelularmente, mientras que micropartículas (de 100nm a 1000nm de diámetro) se desprenden a partir de la superficie de la membrana plasmática. Por su parte, los cuerpos apoptóticos son restos celulares formados en la etapa tardía del proceso de apoptosis que sufren determinadas células de un tejido y que se forman como consecuencia de la fragmentación de la célula durante este proceso. Los análisis bioquímicos ponen de manifiesto que estos cuerpos presentan un alto contenido en proteínas muy empaquetadas y resistentes a la proteólisis. En la fase final de la apoptosis las células circundantes y los macrófagos fagocitan los cuerpos apoptóticos para su completa degradación (Figura 11) (Tabla2) (Fang y cols., 2013).

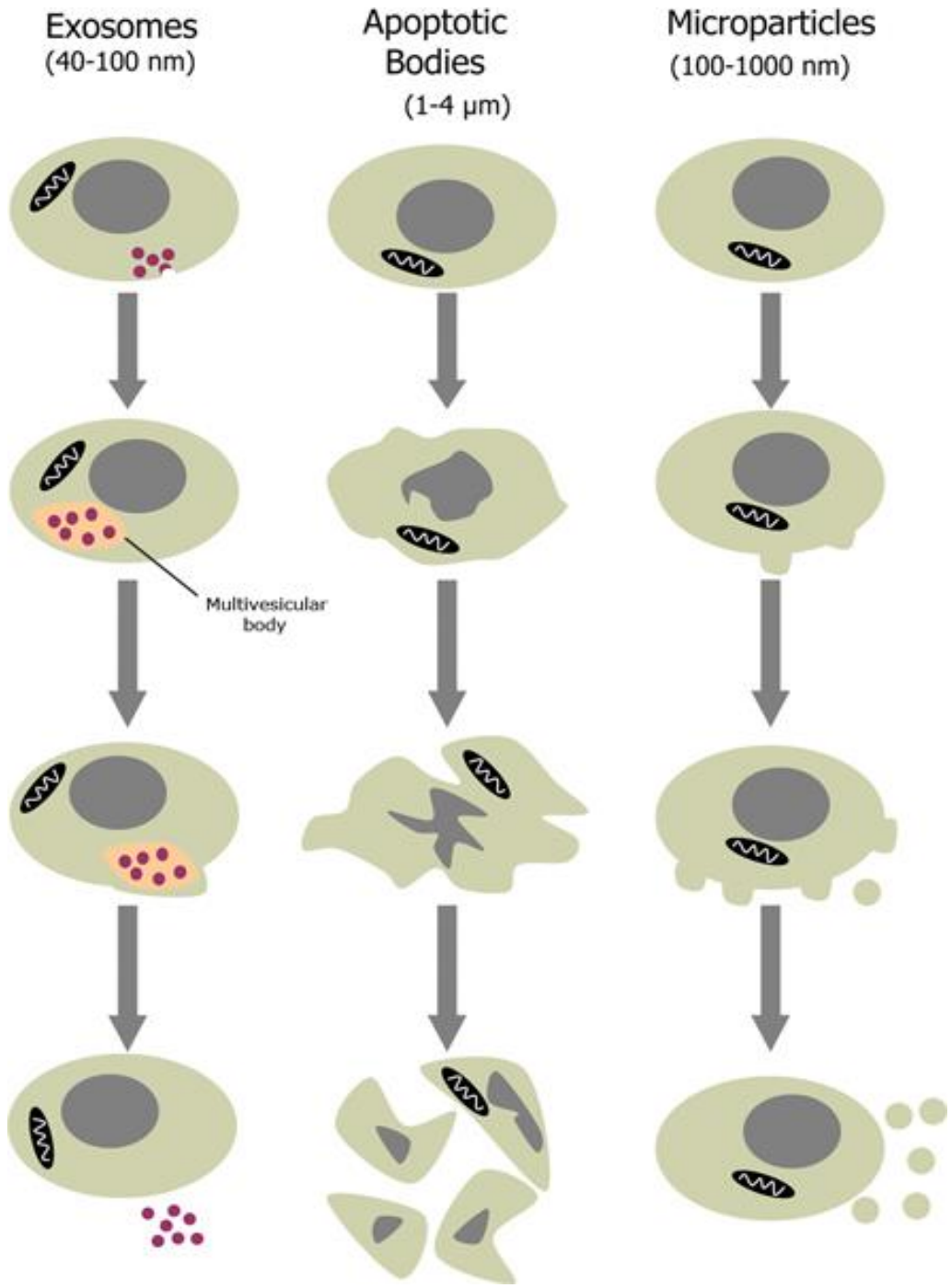


Figura 11. Biogénesis de los exosomas, cuerpos apoptóticos y micropartículas. Burger y cols., 2013.

	Exosomas	Micropartículas	Cuerpos apoptóticos
Talla	20-100nm	100-1000nm	Mayores de 4000nm
Formación y liberación	Formados intracelularmente dentro de cuerpos multivesiculares	Superficie de la membrana plasmática	Lanzamiento de vesículas celulares durante la apoptosis
Aislamiento y detección	Ultracentrifugación, microscopía electrónica, Western Blot, espectrometría de masas, análisis de seguimiento de nanopartículas	Centrifugación diferencial, citometría de flujo, microscopía electrónica, Western Blot, espectrometría de masas, análisis de seguimiento de nanopartículas	Citometría de flujo, microscopía electrónica

Tabla 2. Características de exosomas, micropartículas y cuerpos apoptóticos. Fang y cols., 2013.

La invaginación de la membrana plasmática forma endosomas tempranos que maduran en endosomas tardíos (Figura 10). Así, los lúmenes de estos

futuros endosomas capturan una pequeña porción del citosol, llevando consigo un cargamento de proteínas solubles, ARNm, los miRNAs y otras moléculas citosólicas (Pan y cols., 1983). Durante la maduración, la membrana de los endosomas tempranos sufre invaginación formando pequeñas vesículas en el lumen del endosoma. En la clásica vía endosomal, los endosomas tardíos se fusionan con los lisosomas y las vesículas contenidas y las proteínas se degradan. Sin embargo, los endosomas tardíos pueden fusionarse con la membrana plasmática, liberando el contenido endosomal en el espacio extracelular. Las vesículas liberadas son denominadas exosomas (Johnstone y cols., 1987) (Figura 10) (Figura 11) (Figura 12).

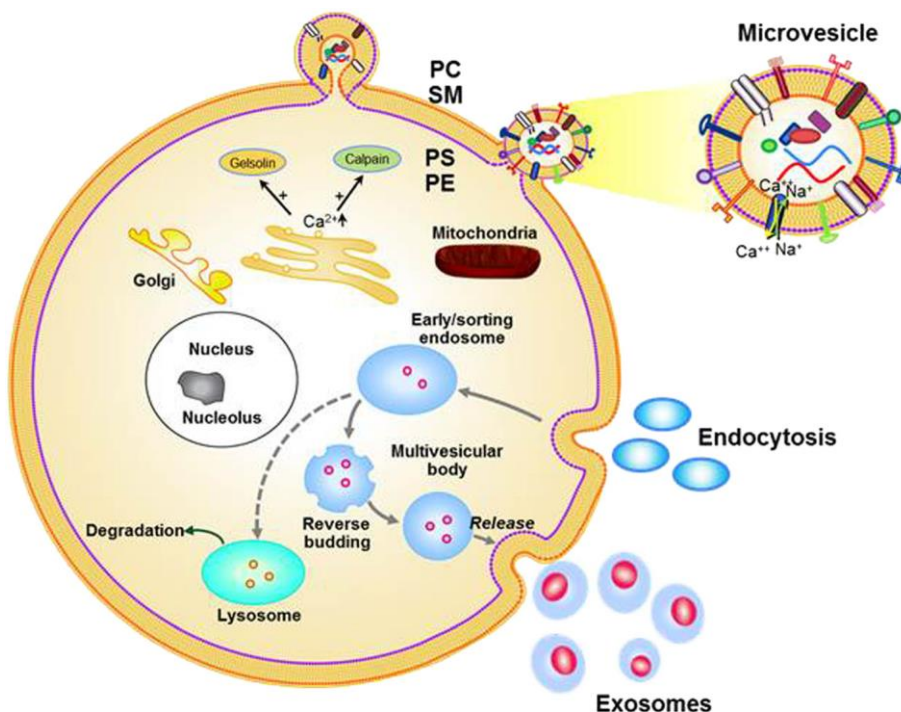


Figura 12. Biogénesis de microvesículas y exosomas. Jayachandran y cols., 2015.

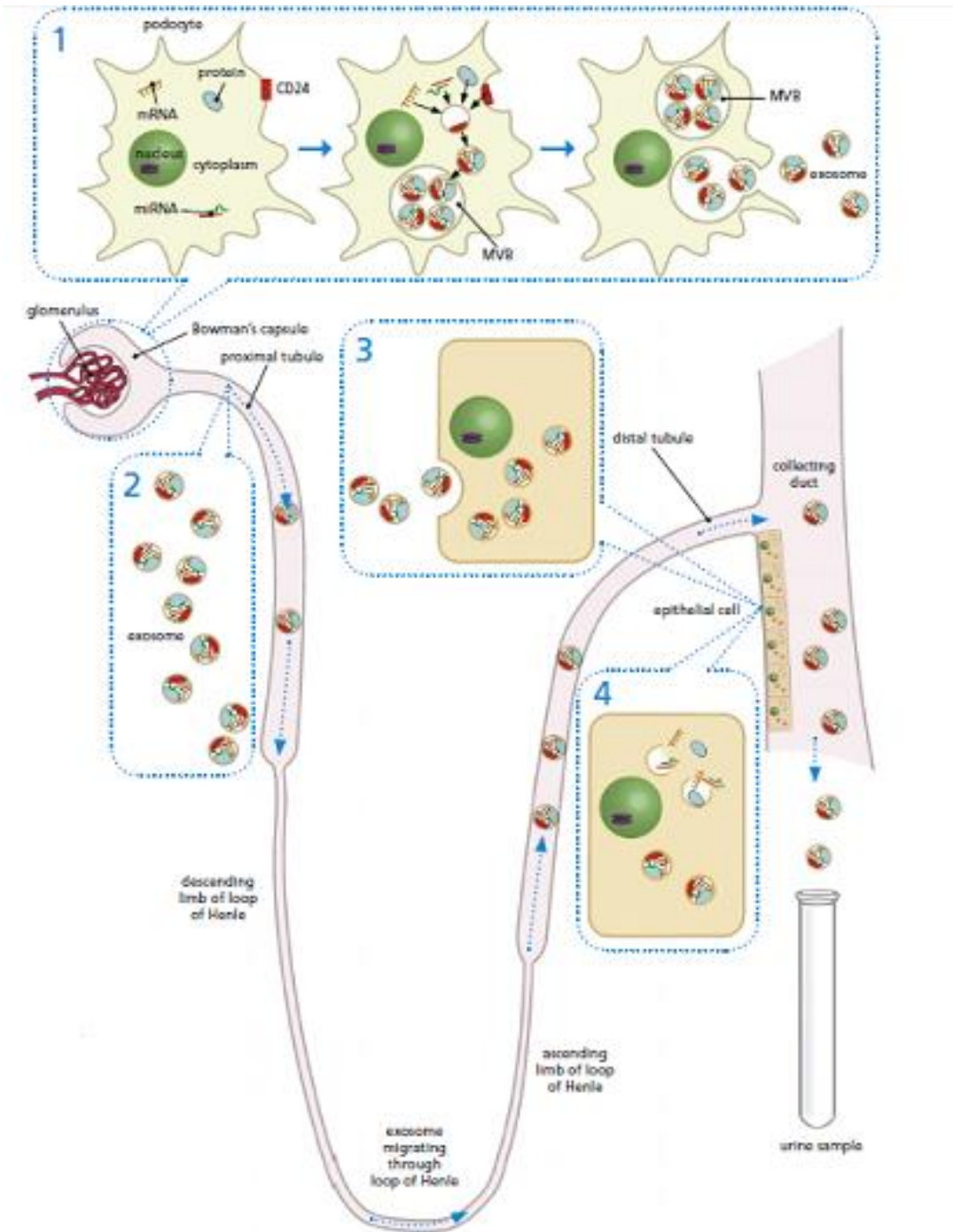


Figura 13. Representación esquemática de la biogénesis de los exosomas y su contenido de proteínas, mRNAs y microRNAs. Fang y cols., 2013.

Un panel de propiedades fisicoquímicas se utiliza para distinguir exosomas de otras vesículas derivadas de células. Ellos tienen un tamaño entre 20 y 100 nm, aparecen en forma de copa cuando son visualizados por microscopía electrónica de transmisión (Pisitkun y cols., 2004), tienen una densidad de 1,10 a 1,19g/ml (Keller y cols., 2007; Graner y cols., 2009) y contienen características proteicas que son fundamentales para su producción (Thery y cols., 2009) y mRNAs y microRNAs. Los investigadores deberían tener cuidado al utilizar sólo una proteína para establecer la presencia de exosomas en una muestra. Es necesario múltiples ensayos de proteínas exosomales.

1.4.2. *Micropartículas*

El modo de la biogénesis de exosomas es distinto de vesículas que surgen a través de la fusión directa de la membrana plasmática. Para distinguir las vesículas por su modo de biogénesis, estas vesículas se denominan habitualmente como micropartículas (Cocucci y cols., 2009). El término “ectosomas” también se ha acuñado para describir estas vesículas (Hess y cols., 1999; Stein y Luzio, 1991). Las microvesículas tienden a ser más grandes en tamaño. Aunque los intervalos de tamaño se superponen entre estos dos tipos de vesículas, es importante señalar que el mecanismo de biogénesis permite establecer la distinción principal entre ellos.

La formación microvesicular es el resultado de la interacción dinámica entre la redistribución de fosfolípidos y la contracción de las proteínas del citoesqueleto. Las proteínas y la distribución de fosfolípidos dentro de la

membrana plasmática está lejos de ser uniforme y forma microdominios. La distribución asimétrica es fuertemente regulada por la translocasa de aminofosfolípidos. (Zwaal y Schroit, 1997; Bevers y cols., 1999), proteínas que transfieren fosfolípidos desde una parte de la membrana plasmática a otra. El proceso es completado por la contracción de las estructuras del citoesqueleto por interacciones actina-miosina (Muralidharan-Chari y cols., 2009; McConnell y cols., 2009).

Al igual que los exosomas, el contenido de microvesículas aparece altamente enriquecido por un subconjunto de proteínas.

La investigación de micropartículas está creciendo rápidamente, y si bien existe una creciente literatura sobre el tema, actualmente los estudios se centran en las micropartículas como marcadores de la patología y como vectores de comunicación celular.

Se cree que son formadas por todos los tipos de células. La formación de micropartículas se ha observado en células endoteliales, plaquetas, leucocitos y células vasculares de músculo liso, (Rautou y cols., 2011) eritrocitos (Tissot y cols., 2010), cardiomiocitos (Antoniak y cols., 2009), podocitos (Burger y cols., 2013), células cancerosas (Zahra y cols., 2011) y poblaciones de células progenitoras (Chen y cols., 2010; Pirro y cols., 2008).

1.4.3. *Exosomas*

1.4.3.1. Funciones biológicas de los exosomas.

Las funciones biológicas y fisiológicas de los exosomas todavía se están descubriendo. Se sabe que juegan un papel importante en la comunicación intercelular, en la secreción de proteínas no clásica, inmunomodulación, en la biología de agentes patógenos y en la progresión del cáncer.

1.4.3.1.1. Comunicación intercelular

Se pensó que la comunicación intercelular estaba limitada al contacto célula-célula o a señales secretadas, como las hormonas, neurotransmisores y citosinas liberadas por las células y que actúan de manera autocrina o paracrina. Los exosomas pueden mediar un mecanismo de comunicación intercelular. Pueden ser transportados entre diferentes células y se adhieren a las células con alta especificidad a través de moléculas receptoras o de adhesión, pero sin fusión de la membrana. Alternativamente, los exosomas pueden fusionarse con células o ser incorporados por células vía endocitosis (Skog y cols., 2008; Fitzner y cols., 2011). Los RNAs transferidos pueden afectar a la producción de proteínas (Pegtel y cols., 2010). La bicapa lipídica exosomal protege a las proteínas, mRNAs y microRNAs de la degradación, que puede hacer esta vía de comunicación intercelular más fiable en comparación con las proteínas y RNAs flotantes.

Un ejemplo de su papel en la comunicación intercelular es la observación de que los exosomas derivados del borde en cepillo renal pueden inducir la cristalización en la nefrolitiasis (Anderson y cols., 2010). En la misma línea,

un papel poco explorado en el trasplante o en la protección frente al daño renal agudo o tóxicos con efecto negativo han sido atribuidos a microvesículas en general y, en particular, los exosomas (Fleissner y cols., 2012; Borges y cols., 2013).

1.4.3.1.2. Vía no clásica de secreción de proteínas

Un papel fisiológico de los exosomas fue descrito en el proceso de maduración de los eritrocitos desde reticulocitos (Pan y cols., 1983; Harding y cols., 1983). Se sabe que los receptores de transferrina se pierden durante este proceso de maduración. Mediante el uso de transferrina marcada o con anticuerpos contra el receptor de la transferrina, se demostró que después de la endocitosis del receptor de la superficie y la fusión de los endosomas para formar estructuras más grandes, ocurre también en la superficie interna de las vesículas. Se forman cuerpos multivesiculares en el cuerpo principal de las vesículas. Estos cuerpos multivesiculares finalmente se fusionan con la membrana celular, lo que permite la liberación de los exosomas que permite la maduración de los reticulocitos para arrojar las proteínas de membrana obsoletas y remodelar su membrana plasmática, proporcionando una alternativa a la degradación lisosomal (Johnstone y cols., 1991). Además de la secreción de las proteínas innecesarias o dañadas, los exosomas proporcionan una vía de secreción no clásica para una amplia gama de proteínas fisiológicamente relevantes (Chairoungdua y cols., 2010).

1.4.3.1.3. Funciones en el sistema inmunológico

Los exosomas liberados por las células inmunes juegan una amplia gama de papeles importantes en el sistema inmune normal (Chaput y Théry, 2010). La presencia de moléculas funcionales de clase II del complejo principal de histocompatibilidad en exosomas derivados de células inmunes destaca su papel en la presentación de antígenos (Raposo y cols., 1996). Los exosomas son capaces de presentar antígenos derivados de patógenos (Walker y cols., 2009).

1.4.3.1.4. Biología de patógenos

Los exosomas son explotados por agentes patógenos como un medio de difusión y comunicación intercelular. Los exosomas pueden ser responsables del escape inmune de algunos patógenos (Lenassi y cols., 2010).

1.4.3.1.5. Rol en la progresión del cáncer

Durante el desarrollo del tumor, las células tumorales interactúan con su microambiente circundante para promover su crecimiento, la supervivencia y la invasión. Los exosomas derivados de los tumores están siendo descritos como importantes mediadores de muchos de estos procesos, incluyendo la proliferación de células tumorales, la angiogénesis, la metástasis y la inmunomodulación (Keller y cols., 2009; Iero y cols., 2007). En modelos experimentales de cáncer renal, vesículas derivadas de células madre del

cáncer parecen capaces de contribuir al proceso angiogénico y promover metástasis (Grange y cols., 2011).

1.4.3.2. Exosomas urinarios

Los exosomas se han purificado con éxito a partir de cultivos celulares o fluidos corporales (They y cols., 2009).

En 2004, los exosomas fueron por primera vez descritos en la orina humana por el laboratorio Knepper utilizando un protocolo de ultracentrifugación que concentró los exosomas para permitir el análisis de sus propiedades físico-químicas (Pisitkun y cols., 2004). La presencia de exosomas en la orina humana se ha demostrado mediante Western Blot, con los marcadores que resultan de la ultracentrifugación. La microscopía electrónica de transmisión identifica estructuras del tamaño y forma de los exosomas en la orina humana (Figura 14) (Pisitkun y cols., 2004). Los exosomas son demasiado pequeños para ser analizados directamente utilizando citometría de flujo estándar (Keller y cols., 2007). El número absoluto de exosomas en una muestra no se cuenta y el investigador debe utilizar medidas sustitutas, como la concentración de proteínas, para inferir la concentración de exosomas.

Los exosomas que contienen membranas vesiculares y fluidos intracelulares son normalmente secretados en la orina de todos los segmentos de la nefrona, y contienen proteínas que pueden ser alteradas en abundancia o propiedades físicas en asociación con varias enfermedades renales. Pisitkun y cols. aislaron exitosamente proteínas de membrana exosomal en orina

fresca de humano por centrifugación diferencial y demostraron la presencia de varias proteínas relacionadas con la enfermedad (Pisitkun y cols., 2004). La proteómica exosomal urinaria puede proporcionar una vía para el descubrimiento de biomarcadores urinarios útiles para la precoz detección de enfermedades renales y para la monitorización del tratamiento (Hoorn y cols., 2005).

La composición de los exosomas urinarios está reportada en la base de datos ExoCarta (<http://www.exocarta.org>) (Mathivanan y cols., 2012), la cual es una base de datos en constante evolución. La última actualización se ha realizado en el año 2015 (Keerthikumar y cols., 2015). Además de ExoCarta, los exosomas urinarios han sido caracterizados en dos estudios (Santucci y cols., 2015; Prunotto y cols., 2013): en general, ellos describieron la presencia de 2707 proteínas en los exosomas e incluyeron el panel original de 1689 proteínas publicadas en ExoCarta más 1615 proteínas descritas por Santucci (2015) y 1195 por Prunotto (2013). 292 son comunes a los últimos dos estudios.

Entre las proteínas identificadas se encuentran las enzimas aminopeptidásicas glutamil aminopeptidasa (GluAp), alanil aminopeptidasa (AlaAp) y dipeptidil peptidasa 4 (DPP4), aunque no se han realizado estudios que relacionen las alteraciones en la composición enzimática exosómica con la disfunción renal, ni se ha estudiado su posible papel como biomarcadores de la enfermedad renal.

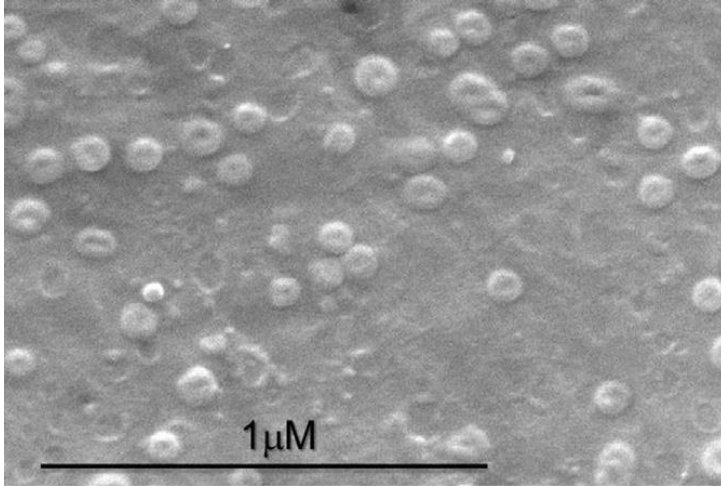


Figura 14. Exosomas urinarios visualizados al microscopio electrónico de barrido. Fang y cols., 2013.

PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

La hipótesis de la que parte el presente proyecto es que la glutamil aminopeptidasa, cuya actividad urinaria ha sido previamente estudiada en nuestro laboratorio (Quesada y cols., 2011) pueda ser cuantificada mediante métodos inmunológicos tanto en orina como en las fracciones microvesicular y exosómica. Esta cuantificación podría guardar relación con las alteraciones que provoca el cisplatino a nivel renal por lo que podría ser un marcador de disfunción renal provocada por éste y otros fármacos, enfermedades de daño renal crónico, daño renal agudo, etc.

En base a esta hipótesis, los objetivos del presente trabajo son:

1. Cuantificar la excreción de GluAp en muestras de orina mediante la utilización de métodos inmunológicos (ELISA e inmunobloting).
2. Analizar si la excreción de GluAp en orina, y en las fracciones microvesicular y exósomica urinarias se encuentra aumentada en un modelo animal de daño renal agudo obtenido mediante la administración de cisplatino.
3. Estudiar si la excreción de GluAp en las diferentes fracciones urinarias se encuentra relacionada con el daño renal observado al final del experimento, determinando la correlación existente entre la excreción de la enzima y la concentración de creatinina plasmática, que es el indicador más utilizado de daño renal, así como con el peso corporal final de los animales.
4. Comprobar si existe correlación entre la cantidad de enzima presente en cada una de las fracciones estudiadas.

5. Cuantificar la excreción de GluAp en fracciones microvesicular y exosomal.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos e instrumentos utilizados

3.1.1. Reactivos utilizados

- Cisplatino (Sigma-Aldrich)
- Cloruro sódico (Panreac Laboratories)
- Heparina (Analema)
- Hidrato de cloral (Merck)
- Pentobarbital sódico (Sigma-Aldrich)
- Propilenglicol (Merck)
- Sulfato de magnesio (Merck)
- Etanol 96% (Panreac Laboratories)
- Trizma base minimum 99,9% titration (Sigma-Aldrich)
- L-glutamyl- γ -2-naftilamida (Sigma-Aldrich)
- Alanil-2-naftilamida (Sigma-Aldrich)
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (Panreac Laboratories)
- Tween-20 (Sigma-Aldrich)
- Albúmina bovina (BSA) (Sigma-Aldrich)
- Glicerol (Spinreact)
- Azul de bromofenol (Bio-Rad)
- 2-Mercaptoetanol (Sigma-Aldrich)
- Dodecilsulfato sódico (SDS)
- Metanol (Panreac Laboratories)
- Glicina (Bio-Rad)
- Goat anti-Aminopeptidase A-antibody (Everest Biotech)
- Rabbit anti-Alix-antibody (Sigma-Aldrich)
- Rabbit anti-TSG101-antibody (Sigma-Aldrich)
- Rabbit anti-goat IgG (KPL diagnostics)

- Mouse anti-rabbit IgG (KPL diagnostics)
- Precision Plus Protein WesternC Protein Standard (Bio-Rad)
- Kit comercial DC Protein Assay Kit (Bio-Rad)
- Kit de creatinina para Spin 120 (Spinreact)
- Kit de proteínas totales para Spin 120 (Spinreact)
- Leupeptina (Sigma-Aldrich)
- Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Sigma-Aldrich)
- Leche en polvo
- Revelador de Western Blot LumiGlo Reserve (KPL diagnostics)
- Membrana PVDF (Bio-Rad)
- Geles de poliacrilamida 7.5% (Bio-Rad)

3.1.2. Instrumentos utilizados

- Agitador de placas
- Agujas
- Balanza de precisión (SBC 21, Scaltec)
- Balanza digital (Soehnle. ULTRA 2.0)
- Bisturí
- Catéter
- Centrífuga
- Criotubos
- Cubeta de electroforesis (Bio-Rad)
- Trans-Blot Turbo (Bio-Rad)
- Termoblock (Labnet International)
- Fluorímetro FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech)
- Gradillas

- Imán agitador
- Jaulas metabólicas individuales
- Jeringas de 1ml
- Jeringas de 10ml
- Medidor de pH (Crison)
- Microplacas 96x
- Multipipeta
- Pinzas
- Pipetas
- Puntas de pipeta
- Hilo de sutura
- SPIN 120 (Spinreact)
- Tijeras
- Tubos eppendorf
- Tubos estériles 10 ml
- Tubos falcon
- Cajas para congelación
- Vasos de precipitado
- Espectrofotómetro
- Ultracentrífuga
- Rotores centrífuga
- Sistema de análisis de imagen para quimioluminiscencia

3.2. Métodos experimentales

3.2.1. *Diseño experimental*

Para los experimentos realizados en la elaboración de esta tesis doctoral se emplearon ratas Wistar macho procedentes de Harlan Laboratories (Barcelona, España), con un peso de $204.5 \text{ g} \pm 3.06 \text{ g}$, utilizando 10 animales para el grupo cisplatino, y 10 animales para el grupo control. El cisplatino (Sigma-Aldrich, Madrid, España) se disolvió en solución salina estéril a la concentración de 3.5 mg/ml . Los animales del grupo cisplatino fueron inyectados subcutáneamente con 2 ml/kg de esta solución, recibiendo una dosis de 7 mg/kg de cisplatino, mientras que los animales del grupo de control se inyectaron con 2 ml/kg de solución salina estéril. Los animales se trataron siguiendo las normativas de cuidado y bienestar animal de la Comunidad Europea.

Inmediatamente después de la inyección, las ratas se introdujeron en jaulas metabólicas individuales. Se tomaron muestras de orina en una jaula metabólica durante las siguientes 24 horas, y a los 8 y 15 días después del tratamiento. A las 24 horas del tratamiento, a los 8 y a los 15 días se cuantificó el peso corporal, la diuresis, la ingesta hídrica y la ingesta de comida.

Las muestras de orina fueron centrifugadas a 1000g durante 10 minutos a 4°C y congeladas a -80°C para su almacenamiento y posterior manipulación. Previa anestesia con equitensina (2ml/kg i.p.), se llevó a cabo la extracción de sangre mediante punción intracardiaca para la posterior determinación de las diferentes variables. La sangre fue centrifugada a 1000 g durante 10 minutos en presencia de heparina sódica y el plasma obtenido se conservó a -80°C . Además, se extrajeron los riñones, previa perfusión con suero salino al

0,9% a través del ventrículo izquierdo, y se congelaron a -80°C para su posterior análisis.

Tras este experimento, se realizó un segundo experimento siguiendo un protocolo similar a éste, obteniendo la diuresis, el peso corporal, la ingesta hídrica, la ingesta de comida, el peso del riñón y el plasma de las ratas a las 72 horas después del tratamiento con cisplatino.

3.2.2. *Procesamiento de las muestras de orina*

El método de aislamiento de las fracciones microsomales y exosomales de orina se modificó a partir de Zhou y cols., 2006. La centrifugación a 1000 g durante 10 minutos a 4°C de las muestras de orina recogidas se hizo con el fin de separar las células enteras, las bacterias, los residuos celulares, y otras sustancias presentes en la orina. Los precipitados fueron descartados. Algunas alícuotas de los sobrenadantes (orina entera) se congelaron a -80°C con el fin de almacenarlas para llevar a cabo el análisis de la actividad enzimática.

El resto del sobrenadante fue tratado con inhibidores de proteasas. Se añadió 1 microlitro de 1mM de leupeptina y 50 microlitros de 10mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) a cada mililitro de sobrenadante, y algunas alícuotas también se congelaron con el fin de medir la cantidad total de GluAp mediante métodos inmunológicos (ELISA e immunoblotting).

Los sobrenadantes que contenían inhibidores de proteasas se sometieron a una segunda centrifugación de 17.000 g durante 15 minutos, a 4°C . Los precipitados que incluían la fracción microvesicular (microvesículas, ectosomas, grandes fragmentos de membrana) se resuspendieron en 0,5 ml de 20 mM HCl-Tris, pH 8,6 (2,4228 g de Trizma base en 1000 ml de agua

destilada, bajando el pH de la disolución con HCl hasta pH 8,6), y se congelaron a -80 hasta su procesamiento.

Finalmente, los sobrenadantes fueron sometidos a ultracentrifugación a 200.000 g durante 1 hora a 4°C. Los precipitados que contenían la fracción exosomal se resuspendieron en 0,3 ml de 20mM HCl-Tris, pH 8,6, y se congelaron a -80°C para su posterior análisis. El sobrenadante final también se conservó a -80°C para su análisis.

En el experimento en el que se recogieron las muestras tres días después de la inyección, a las muestras de orina no se le añadió inhibidores de proteasas, con el fin de poder medir las actividades aminopeptidásicas.

3.2.3. *Determinación de la actividad enzimática*

Las actividades fluorimétricas GluAp y AlaAp fueron determinadas por duplicado mediante un análisis de cinética fluorimétrica con el equipo Fluorímetro FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech) utilizando L-glutamyl- γ -2-naftilamida (Sigma-Aldrichm, Madrid, Spain) y alanil-2-naftilamida (Sgma Aldrich) como sustratos, respectivamente.

20 μ l de muestra fueron incubados durante 30 minutos a 37°C con 80 μ l de la solución de incubación (10 mM de sustrato, en Tris-HCl 50 mM pH 8,7). El sustrato había sido previamente disuelto en 1 ml de dimetilsulfóxido y almacenado a -20°C. La cantidad de 2-naftilamida liberada como un resultado de la actividad aminopeptidasa fue medida fluorimétricamente a una longitud de onda de emisión de 412 nm con una longitud de onda de excitación de 345 nm, y cuantificada usando una curva estándar de 2-naftilamina (0-200nmol/ml). Los datos fluorimétricos de las muestras y de la curva estándar fueron tomados cada minuto. Las actividades

aminopeptidásicas específicas fueron calculadas a partir de la pendiente de la porción lineal del ensayo enzimático, y se expresaron como nanomol de sustrato hidrolizado por minuto por mg de creatinina en orina.

3.2.4. ELISA

GluAp fue determinada en orina, en los sobrenadantes, en microvesículas y en exosomas urinarios obtenidos en las diferentes centrifugaciones previamente descritas, utilizando kits de ELISA de Sunred Biotechnologies (Shanghai, China). Todas las muestras y estándares se midieron por duplicado. Las absorbancias de todas las muestras estaban dentro del rango de la curva estándar (4-64 ng/ml). La concentración de GluAP en fracciones microsomal y exosomal fue dividida por el factor correspondiente y referida al volumen de partida de orina.

3.2.5. Immunoblotting

Las muestras de orina, que se diluyeron hasta contener 2.50 µg de creatinina, se sometieron a electroforesis SDS-PAGE usando geles preparados de 50 µl/pocillo adquiridos de Bio-Rad (Madrid, España). Previamente a la electroforesis, las proteínas de las muestras de orina fueron desnaturalizadas. Para ello, primero se preparó el tampón de carga 3X:

- 1.5 ml de Tris-HCl 1M pH 6,8
- 3 ml de glicerol
- 3 mg de azul de bromofenol
- 1 ml de agua destilada
- 3 ml de SDS 20%

- Añadir 150 μ l de mercaptoetanol

Una vez elaborado el tampón de carga, se puso en un tubo eppendorf 1/3 de volumen de tampón de carga, se añadió el volumen de muestra de orina correspondiente para que la muestra contuviera 20 μ g de creatinina y se completó hasta los 3/3 de volumen con agua destilada. Los eppendorf que contenían la mezcla de tampón de carga, agua destilada y muestra de orina se pusieron en un termoblock a 95°C durante 5 minutos con el fin de desnaturalizar las proteínas. A continuación, estos tubos se pasaron rápidamente a frío.

En este punto, cargamos en un pocillo del gel el estándar de proteínas (Bio-Rad) y las muestras en los demás pocillos del gel y realizamos la electroforesis (200 voltios durante 40 minutos). Para ello, necesitamos poner en la cubeta de electroforesis el tampón de electroforesis que se va a utilizar:

- 100 ml de Tris-Gly
- 10 ml de SDS 10%
- Completar hasta 1 litro con agua destilada

Una vez terminada la electroforesis, se hizo la transferencia en el Trans-Blot Turbo (Bio-Rad) utilizando una membrana PVDF (Bio-Rad). Para hacer la transferencia de las proteínas del gel de electroforesis a la membrana PVDF es esencial la utilización del tampón de transferencia:

- 100 ml de tampón de bloqueo (5 g de leche en polvo disueltos en 100 ml de tampón de lavado)
- 200 ml de metanol
- 700 de agua destilada

Posteriormente, se hizo el bloqueo de la membrana de PVDF con el tampón de bloqueo (1 hora a temperatura ambiente):

- 5 g de leche en polvo
- 100 ml de tampón de lavado (200 ml Tris-HCl 50mM pH 7,4, 5.8 g de NaCl y 1M Tween-20)

Tras el bloqueo, se incubó la membrana con 1 µg de goat anti-Aminopeptidase A-Antibody (anticuerpo primario) por ml de diluyente de anticuerpo (1/2 de volumen de tampón de lavado y 1/2 de volumen de tampón de bloqueo) durante alrededor de 15 horas en frío. Tras la incubación, la membrana se lavó 3 veces con el tampón de lavado.

Tras los lavados, la membrana se incubó con 20 ng de Rabbit anti-goat IgG antibody (anticuerpo secundario) por ml de diluyente de anticuerpo durante 1 hora en ausencia de luz. Tras la incubación con el anticuerpo secundario, se lavó la membrana 3 veces con tampón de lavado.

Por último, se hizo el revelado de la membrana. Se puso en la membrana el revelador durante 1 minuto en ausencia de luz, pasado este minuto se secó la membrana del exceso del revelador y se reveló en un sistema de análisis de imágenes para quimioluminiscencia. La cuantificación de las bandas de proteína se realizó con el software ImagenJ del National Institute of Health (USA).

En el western blot de GluAp, Alix y TSG101, que se realizó de las fracciones microvesiculares y exosomales obtenidas a los 3 días del tratamiento con cisplatino, se cargaron en los pocillos del gel de electroforesis el volumen de muestra que contuviera 30 µg de proteína. Para el caso de Alix, la membrana se incubó con 1 µg/ml de rabbit anti-Alix-antibody como anticuerpo primario, en el caso de la TSG101, la membrana se incubó con 1 µg/ml de rabbit anti-TSG101-antibody como anticuerpo primario y para la GluAp, la

membrana se incubó con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de goat anti-AminopeptidaseA-Antibody como anticuerpo primario.

Después de la incubación con los anticuerpos primarios y los posteriores lavados, la membrana se incubó con 0.04 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de rabbit anti-goat IgG o 0.04 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de mouse anti-rabbit-IgG como anticuerpos secundarios.

El resto del procedimiento fue igual al descrito previamente para el caso de la orina.

3.2.6. *Otros procedimientos analíticos*

3.2.6.1. Determinación de las proteínas totales

La medida de la proteína total microvesicular y exosomal se determinó colorimétricamente a través de un kit comercial de Bio-Rad (DC Protein Assay Kit), que consiste en la reacción de las proteínas con una solución alcalina de tartrato de cobre y reactivo de Folin. En esta reacción, hay dos pasos los cuales llevan al desarrollo del color: La reacción entre la proteína y el cobre en un medio alcalino, y la subsecuente reducción del reactivo de Folin por la proteína tratada con cobre. Las proteínas efectúan una reducción del reactivo de Folin por la pérdida del átomo de oxígeno 1, 2 o 3, produciendo una o más especies reducidas que tienen un color azul característico con un máximo de absorbancia a 750 nm.

El kit comercial consta de:

- Reactivo A, una solución alcalina de tartrato de cobre.
- Reactivo B, reactivo de Folin.

Para llevar a cabo el ensayo, primero se prepararon diluciones de proteína estándar que contenían desde 0,2 mg/ml hasta 1.5 mg/ml de proteína. Posteriormente se pipetearon 5 μl de las diluciones estándar y de las

muestras en pocillos limpios de una microplaca 96x. A cada pocillo se añadió 25 µl del reactivo A y 200 µl del reactivo B y la microplaca se agitó en un agitador de placas durante 15 minutos a temperatura ambiente. Durante la agitación, la microplaca debe estar en oscuridad para evitar que la luz incida en los pocillos. Pasados estos 15 minutos, la absorbancia de cada pocillo se midió a 750 nm en el FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech). Las diferentes absorbancias determinaron la concentración de proteínas.

Las proteínas totales de la orina y de los sobrenadantes de las diferentes fracciones urinarias se determinaron mediante un kit de proteínas totales para Spin 120 (Spinreact).

3.2.6.2. Determinación de la creatinina

La creatinina es el resultado de la degradación de la creatina, componente de los músculos, y puede ser transformada en ATP, fuente de energía para las células. La producción de creatinina depende de la modificación de la masa muscular. Varía poco y los niveles suelen ser muy estables. Se elimina a través del riñón. En una insuficiencia renal progresiva hay una retención en sangre urea, creatinina y ácido úrico. Niveles altos de creatinina son indicativos de una patología renal.

La creatinina plasmática y urinaria se determinó mediante un kit comercial de creatinina para Spin 120 (Spinreact), basándose en la reacción entre la creatinina con picrato alcalino descrita por Jaffé. La creatinina reacciona con el picrato alcalino formando un complejo rojizo que se absorbe fuertemente a 492nm y donde la intensidad del color formado es proporcional a la concentración de creatinina.

3.2.7. Preparación de equitensina

Para la preparación de la equitensina, se disolvieron en estricto orden los siguientes compuestos:

- 21,25 g de hidrato de cloral en 49,4 ml de etanol absoluto.
- A continuación se añadieron 4,8 g de pentobarbital sódico previamente disuelto en 81 ml de agua bidestilada.
- Posteriormente, se añadieron 198 ml de 1,2-propilenglicol.
- A la solución así obtenida, se añadieron 10,63 g de sulfato de magnesio, previamente disuelto en 50 ml de agua bidestilada.
- La solución se completó hasta 500 ml de agua bidestilada.

3.2.8. Bioética

Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices de la Unión Europea para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y aprobado por el Comité Ético de la Universidad de Jaén y la Junta de Andalucía con el número de registro 450-5297.

3.2.9. Análisis estadístico

Se utilizó la prueba t para el análisis de las variables con distribución normal y varianzas iguales, se utilizó la modificación Welch de la prueba de t para datos con distribución normal y varianzas desiguales y la prueba de Mann-Whitney W (Wilcoxon) se utilizó para analizar las diferencias cuando los datos no correspondían a una distribución normal. Se utilizó la prueba de

Shapiro-Wilk para analizar la normalidad de las distribuciones. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para valores de $p < 0.05$.

La regresión lineal y ANOVA se realizaron con el software StatGraphics.

RESULTADOS

4.1. Efecto del cisplatino sobre el peso, la ingesta hídrica, la ingesta de comida y la diuresis

El tratamiento con cisplatino produjo una disminución del peso corporal en las ratas, habiendo diferencias significativas ($p < 0.001$) a los 8 y a los 15 días posteriores al tratamiento (Figura 1) con respecto a las ratas del grupo Control.

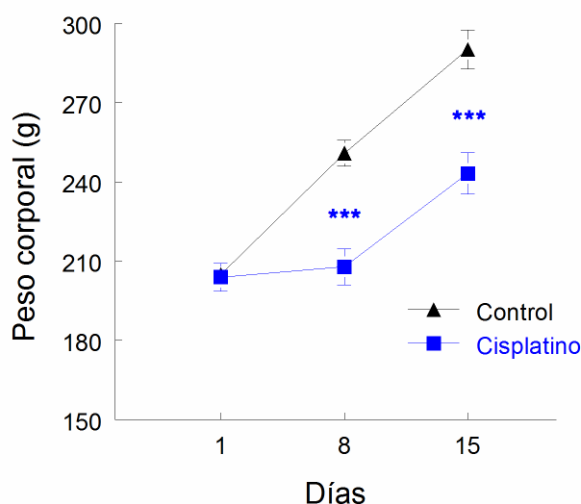


Figura 1. Evolución del peso corporal de las ratas (g) en los días 1, 8 y 15 posteriores al tratamiento con cisplatino. *** $p < 0.001$ frente al grupo Control ($n=10$ cada grupo).

El tratamiento con cisplatino produjo un aumento de la ingesta hídrica, tanto en valor absoluto (ml) como en ml por 100 gramos de rata. Cuando se

cuantificó por valor absoluto, se vio que aunque el aumento de la ingesta hídrica en las ratas del grupo cisplatino era mayor, no había diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, cuando se cuantificó la ingesta hídrica por cada 100 gramos de rata, se puso de manifiesto que a los 1, 8 y 15 días posteriores a la inyección sí había diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) (Figura 2).

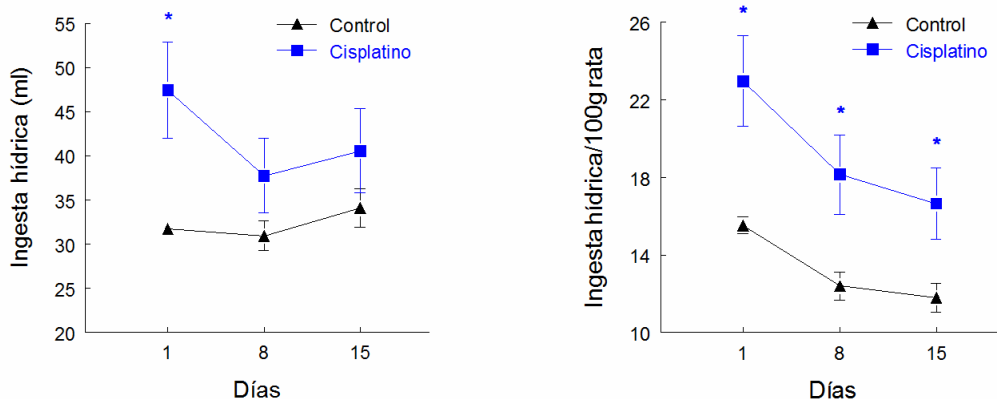


Figura 2. Evolución de la ingesta hídrica de las ratas (ml) (izquierda) y de la ingesta hídrica por 100 g de rata (derecha) en los días 1, 8 y 15 posteriores al tratamiento con cisplatino.* $p < 0.05$ frente al grupo control (n = 10 cada grupo).

Cuando se cuantificó la ingesta de comida de las ratas expresada en gramos, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$) a las 24 horas del tratamiento con cisplatino y a los 8 días, siendo menor la ingesta de comida en las ratas del grupo cisplatino. A los 15 días posteriores a la inyección, la ingesta de comida en las ratas cisplatino también era menor, pero no había diferencias significativas.

Al cuantificar la ingesta de comida expresada por 100 gramos de rata, se observaron diferencias significativas ($p < 0.001$) a las 24 horas posteriores al tratamiento, siendo la ingesta menor en las ratas del grupo cisplatino.

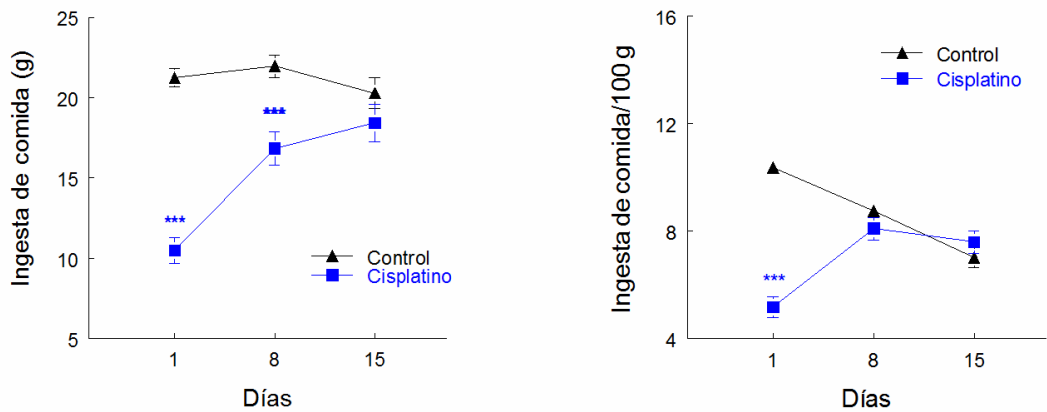


Figura 3. Evolución de la ingesta de comida de las ratas (g) (izquierda) y de la ingesta de comida por 100 g de rata (derecha) en los días 1, 8 y 15 posteriores al tratamiento con cisplatino. (n = 10 cada grupo).

En las ratas del grupo Cisplatino había una elevación de la diuresis (ml) y de la diuresis por 100 gramos de rata respecto a las ratas del grupo Control a los 1, 8 y 15 días posteriores al tratamiento con cisplatino. Cuando se cuantificó como valor absoluto (ml) se encontraron diferencias estadísticamente significativas a las 24 horas posteriores al tratamiento ($p < 0.01$). Y al cuantificar por cada 100 gramos de rata, había diferencias significativas a los 1 ($p < 0.01$) y a los 15 días ($p < 0.05$) posteriores a la inyección (Figura 4).

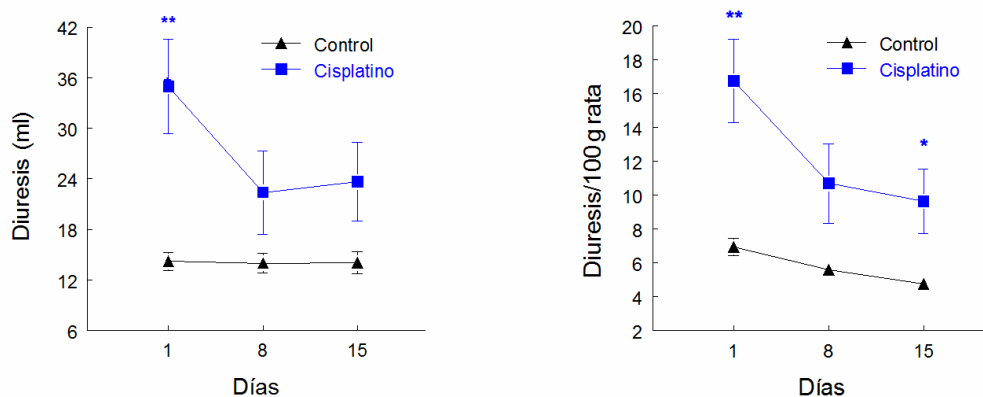


Figura 4. Evolución de la diuresis de las ratas (ml) (izquierda) y de la diuresis por 100 g de rata (derecha) en los días 1, 8 y 15 posteriores al tratamiento con cisplatino.* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ frente al grupo Control ($n = 10$ cada grupo).

4.2. Efectos del cisplatino sobre variables plasmáticas, urinarias y morfológicas

Al final del experimento, las ratas tratadas con cisplatino mostraron un significativo descenso en el peso corporal ($p < 0.001$), y un significativo incremento en la diuresis ($p < 0.05$) y en la creatinina sérica ($p < 0.05$). El aclaramiento de creatinina ($CrCl$), el peso del riñón y la creatinina urinaria estaban ligeramente disminuidos en las ratas tratadas con cisplatino pero no había diferencias estadísticamente significativas. El cociente peso del riñón/peso corporal estaba ligeramente aumentado en las ratas tratadas con cisplatino pero no había diferencias estadísticamente significativas (Tabla 1).

	Control	Cisplatino
Peso rata	290 ± 7.41	243 ± 7.86**
Δ Peso corporal (%)	141 ± 1.98	119 ± 3.37**
Peso riñón (mg)	880 ± 24.4	795 ± 20.1
Ratio peso riñón/peso corporal (mg/g)	3.04 ± 0.06	3.30 ± 0.13
Creatinina sérica (mg/dL)	0.52 ± 0.01	0.66 ± 0.05*
Creatinina urinaria (mg/dL)	45.8 ± 6.27	30.5 ± 4.57
Diuresis (ml/100g/día)	4.78 ± 0.35	9.65 ± 1.90*
Aclaramiento de creatinina (ml/min/g riñón)	0.45 ± 0.04	0.39 ± 0.04

Tabla 1. Variables plasmáticas, urinarias y morfológicas determinadas al final del experimento en los grupos Control y Cisplatino. Los datos están expresados como las medias ± error estándar o medianas ± rango intercuartílico. *p < 0.05, **p < 0.001 vs grupo Control (n = 10 cada grupo).

4.3. Evolución de la actividad urinaria de GluAp y de la proteinuria en los días posteriores al tratamiento

La actividad urinaria de GluAp estaba incrementada 24 horas después del tratamiento con cisplatino, en comparación con el grupo Control (p<0.001). No se encontraron diferencias entre ambos grupos a los 8 o 15 días después

de la inyección. Por su parte, la proteinuria se mantuvo sin cambios a las 24 horas, a los 8 y a los 15 días después del tratamiento con cisplatino (Figura 5).

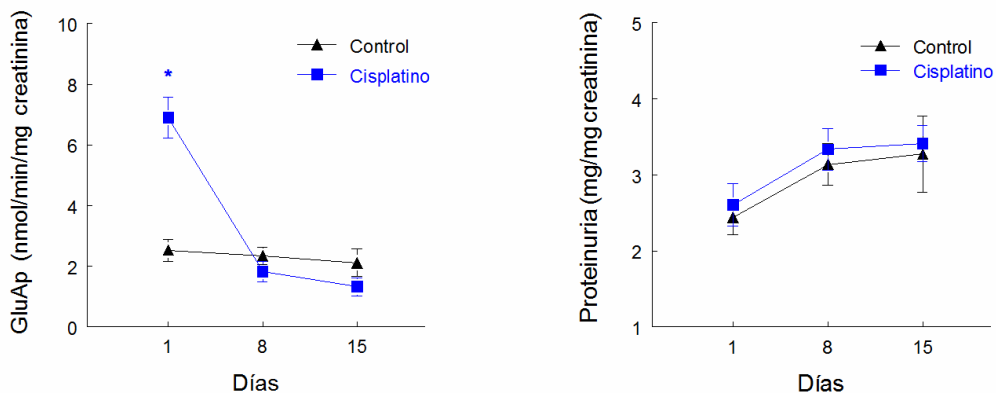


Figura 5. Actividad urinaria de GluAp (izquierda) y proteinuria (derecha) excretada por miligramo de creatinina en los días 1, 8 y 15 días después del tratamiento en los grupos Control y Cisplatino. Los datos son expresados como medias \pm error estándar o medianas \pm rango intercuartílico; * $p < 0.001$ frente al grupo Control (n=10 cada grupo).

4.4. Detección inmunológica de GluAp en orina

4.4.1. Inmunoblotting

GluAp fue detectada por inmunoblotting en las muestras de orina del grupo control y del grupo cisplatino (Figura 6), 24 horas después del tratamiento. Se observó una banda en la membrana a 170 kDa, correspondiente al peso molecular de la Glutamil aminopeptidasa. Para el Western Blot se utilizaron 4 muestras del grupo Control y 5 muestras del grupo Cisplatino, y en el pocillo restante del gel se puso el estándar de proteínas.

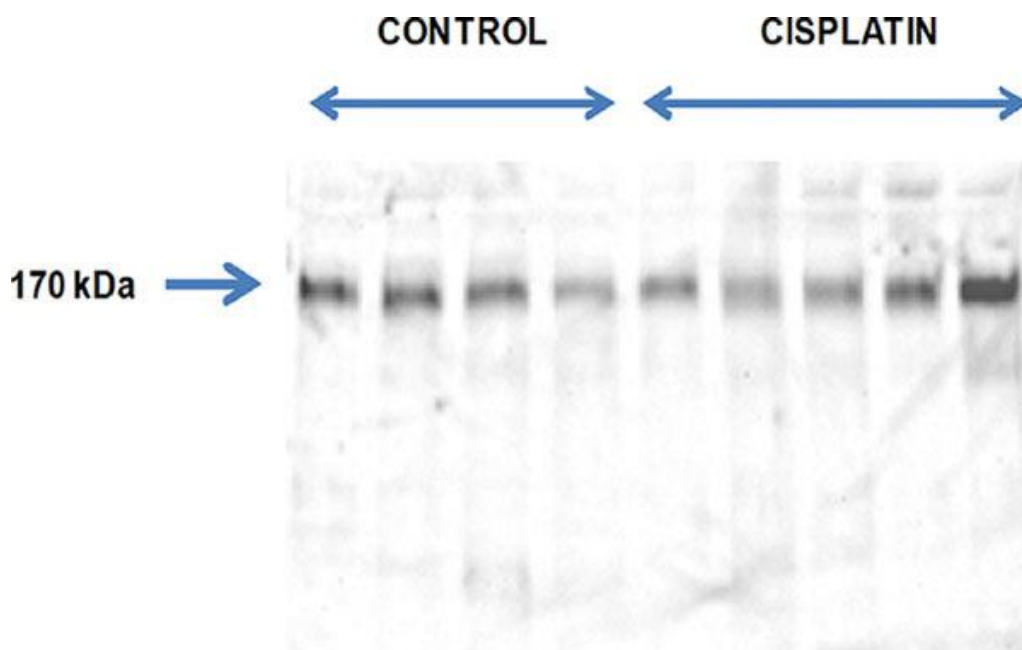


Figura 6. Inmunoblotting de GluAp en muestras de orina del grupo Control (líneas 1-4 desde la izquierda) y del grupo de ratas tratadas con cisplatino (líneas 5-9), recogidas 24 horas después de la inyección. Cada línea contiene el volumen de orina correspondiente a 2.5 μ g de creatinina.

4.4.2. ELISA

La excreción de GluAp estaba también significativamente incrementada ($p < 0.01$) cuando la GluAp fue cuantificada por ELISA 24 horas después del tratamiento (Figura 7).

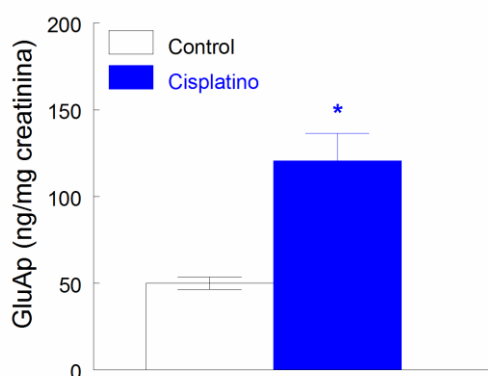


Figura 7. ELISA de GluAp en muestras de orina del grupo Control y del grupo Cisplatino recogidas 24 horas después de la inyección. La excreción de GluAp es expresada como ng/mg de creatinina. Los datos son expresados como las medias \pm error estándar; * $p < 0.01$ vs grupo control ($n = 10$ cada grupo).

Los datos de la excreción de GluAp obtenidos por ELISA estaban fuertemente correlacionados con los datos de la actividad fluorimétrica de GluAp (Figura 8).

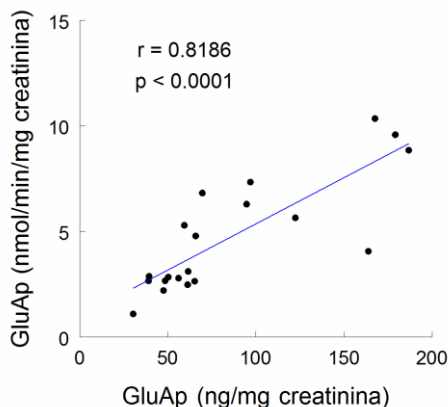


Figura 8. Regresión lineal entre los datos obtenidos por ELISA y los datos obtenidos con la actividad fluorimétrica (n=20).

4.5. Correlación entre la actividad enzimática de GluAp y creatinina sérica y entre la actividad enzimática de GluAp y el incremento de peso

Se encontró una correlación lineal entre la actividad enzimática de GluAp expresada en nmol/min/mg de creatinina y la creatinina sérica (SCr) expresada en mg/dl ($r=0.7639$; $p=0.0001$). Así mismo, se encontró una fuerte correlación lineal inversa entre la actividad enzimática de GluAp expresada en nmol/min/mg de creatinina y el incremento del peso corporal al final del experimento ($r=-0.8721$; $p < 0.0001$) (Figura 9). Ambos parámetros son indicadores de una disfunción renal.

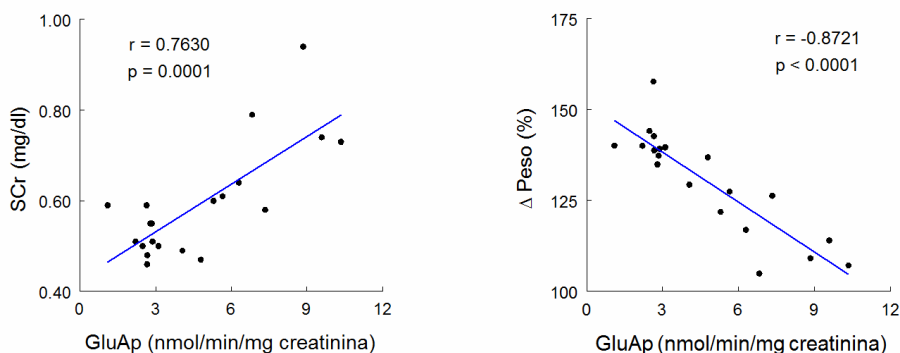


Figura 9. Regresiones lineales entre la actividad enzimática de GluAp al día 1 con la creatinina sérica (SCr) (izquierda) y entre la actividad enzimática de GluAp al día 1 con el incremento del peso corporal al final del experimento (derecha) ($n = 20$).

4.6. Correlación entre la cantidad de GluAp excretada en la orina y creatinina sérica y entre la cantidad de GluAp excretada en la orina y el incremento de peso

Se encontró una correlación lineal entre la cantidad de GluAp excretada en la orina expresada en ng/mg de creatinina y la creatinina sérica (SCr) expresada en mg/dl ($r=0.6441$; $p=0.0022$). Así mismo, se encontró una correlación lineal inversa entre la cantidad de GluAp excretada en orina

expresada en ng/mg de creatinina y el incremento del peso corporal al final del experimento ($r=-0.6709$; $p=0.0012$) (Figura 10).

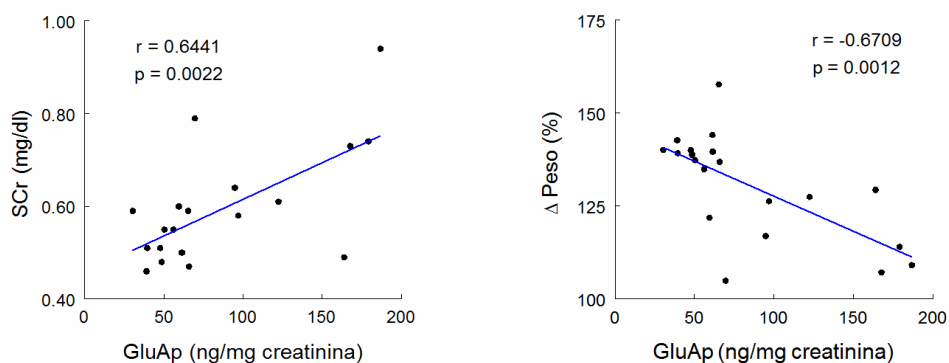


Figura 10. Regresiones lineales entre la cantidad de GluAp excretada en orina al día 1 con la creatinina sérica (SCr) (izquierda) y entre la cantidad de GluAp excretada en orina al día 1 con el incremento del peso corporal al final del experimento (derecha) ($n = 20$).

4.7. Contenido de GluAp en la fracción microvesicular

El tratamiento con cisplatino indujo un incremento significativo de la GluAp excretada en la fracción de orina microvesicular 24 horas después del tratamiento (Figura 11). Interesantemente, se encontró que la excreción de GluAp estaba incrementada en esta fracción de orina cuando los datos

fueron expresados en ng/mg creatinina (A), ng/100g/día (B) y ng/mg de proteína (C) contenida en cada fracción.

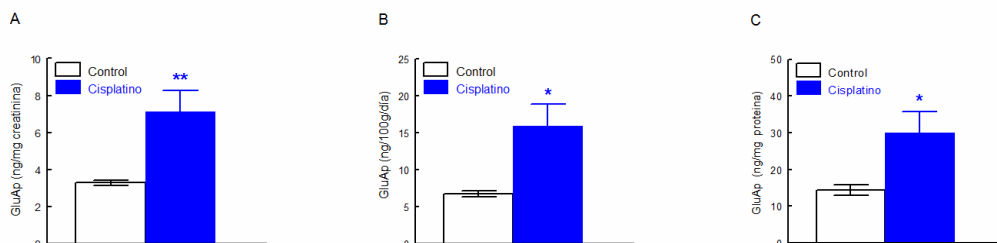


Figura 11. Excreción de GluAp en fracción microvesicular de muestras de orina de los grupos Control y Cisplatino recogidos 24 horas después de la inyección. Los datos fueron expresados en ng/mg de creatinina (A), ng/100g/día (B) y ng/mg proteína (C). Medias \pm error estándar; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ Cisplatino vs Control (n=10 cada grupo).

4.8. Contenido de GluAp en la fracción exosomal

El tratamiento con cisplatino indujo un incremento significativo de la GluAp excretada en la fracción de orina exosomal 24 horas después del tratamiento (Figura 12). Interesantemente, se encontró que la excreción de GluAp estaba

incrementada en esta fracción de orina cuando los datos fueron expresados en ng/mg creatinina (A), ng/100g/día (B) y ng/mg de proteína (C) contenida en cada fracción.

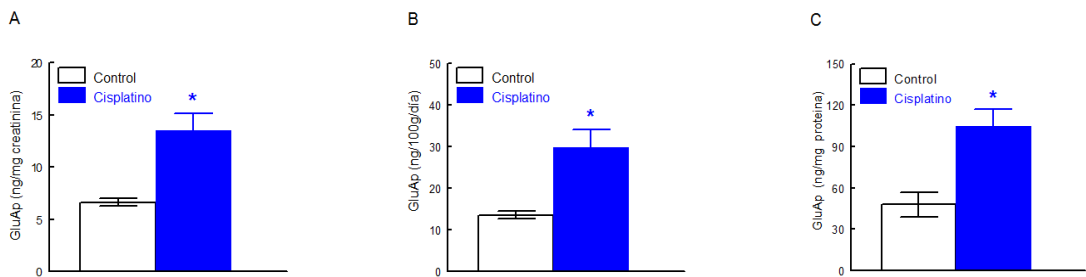


Figura 12. Excreción de GluAp en fracción exosomal de muestras de orina de los grupos Control y Cisplatino recogidos 24 horas después de la inyección. Los datos fueron expresados en ng/mg de creatinina (A), ng/100g/día (B) y ng/mg proteína (C). Medias \pm error estándar; * $p < 0.01$, Cisplatino vs Control (n=10 cada grupo).

4.9. Variables urinarias 24 horas después de la inyección

24 horas después de la inyección se cuantificó la diuresis en ml por 100 gramos de rata, estando más alta en las ratas cisplatino, habiendo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la creatinina urinaria, en la proteína microvesicular ni en la proteína exosomal.

	Control	Cisplatino
Creatinina urinaria (UCr) (mg/100g/día)	2.03 ± 0.07	2.15 ± 0.12
Proteína microvesicular (µg/mg crea)	250 ± 25.5	246 ± 9.56
Proteína exosomal (µg/mg crea)	191 ± 36.4	130 ± 7.66
Diuresis (ml/100g)	6.94 ± 0.52	16.8 ± 2.47*

Tabla 2. Excreción de creatinina urinaria (UCr; mg/100g/día), proteína microvesicular (µ/mg crea) y exosomal (µ/mg crea) y diuresis (ml/100g) en grupos Control y Cisplatino 24 horas después de la inyección. Los datos son expresados como medias ± error estándar. * < 0.01 Cisplatino *vs* Control (n=10 cada grupo).

4.10. Correlación entre GluAp microvesicular y la disfunción renal

Se observó una correlación lineal entre la GluAp microvesicular (ng/mg crea) excretada 24 horas después del tratamiento con cisplatino y la creatinina sérica al final del experimento (mg/dl) y una fuerte correlación lineal inversa entre la GluAp microvesicular (ng/mg crea) excretada 24 horas después del tratamiento con cisplatino y el incremento del peso corporal.

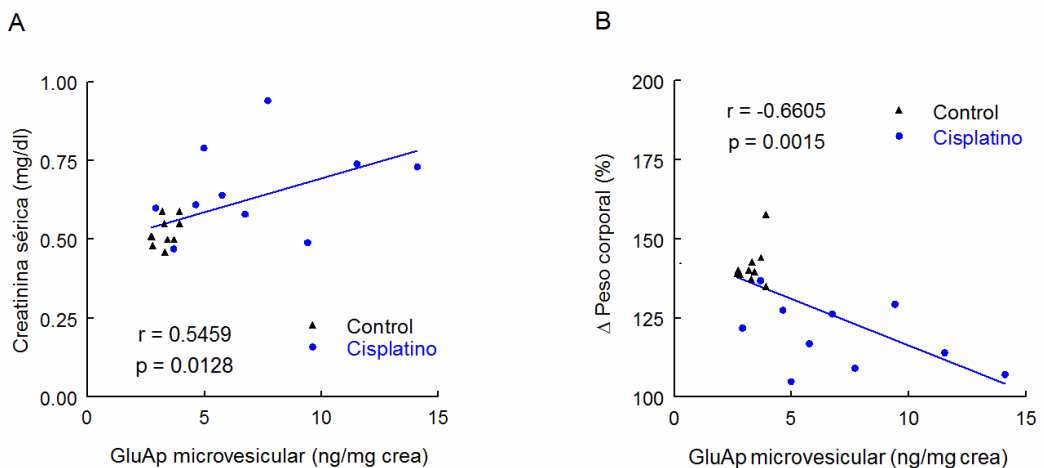


Figura 13. Regresiones lineales entre la excreción de GluAp expresada en ng/mg creatinina en fracción microvesicular de muestras de orina recogidas 24 horas después de la inyección con concentración de creatinina sérica (A) e incremento de peso corporal (B) determinado al final del experimento.

4.11. Correlación entre la GluAp exosomal y la disfunción renal

Se observó una fuerte correlación lineal entre la GluAp exosomal (ng/mg crea) excretada 24 horas después del tratamiento con cisplatino y la creatinina sérica al final del experimento (mg/dl) y una fuerte correlación lineal inversa entre la GluAp exosomal (ng/mg crea) excretada 24 horas después del tratamiento con cisplatino y el incremento del peso corporal.

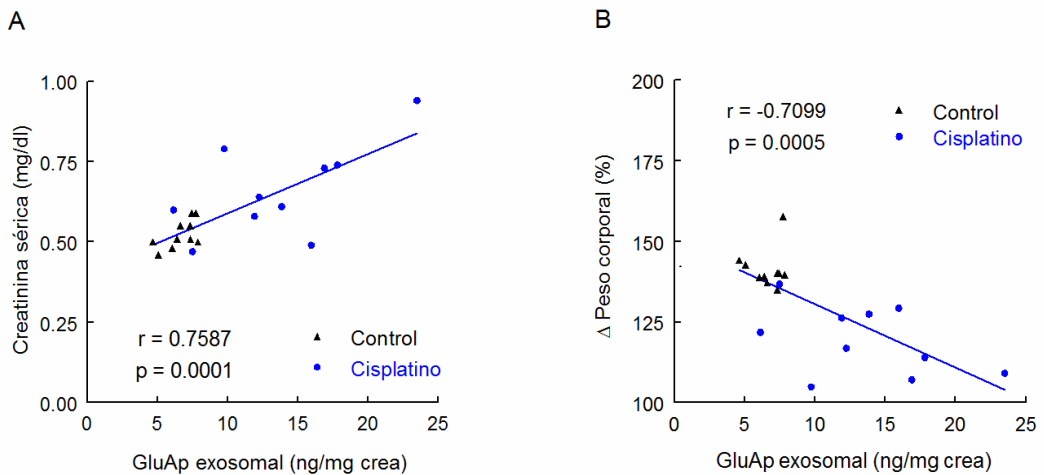


Figura 14. Regresiones lineales entre la excreción de GluAp expresada en ng/mg creatinina en fracción exosomal de muestras de orina recogidas 24 horas después de la inyección con concentración de creatinina sérica (A) e incremento de peso corporal (B) determinado al final del experimento.

4.12. Correlación entre la GluAp microvesicular expresada en ng/100g/día y la disfunción renal

Se observó una correlación lineal entre la GluAp microvesicular (ng/100g/día) excretada 24 horas después del tratamiento con cisplatino y la creatinina sérica al final del experimento (mg/dl) y una correlación lineal inversa entre la GluAp microvesicular (ng/100g/día) excretada 24 horas después del tratamiento con cisplatino y el incremento del peso corporal.

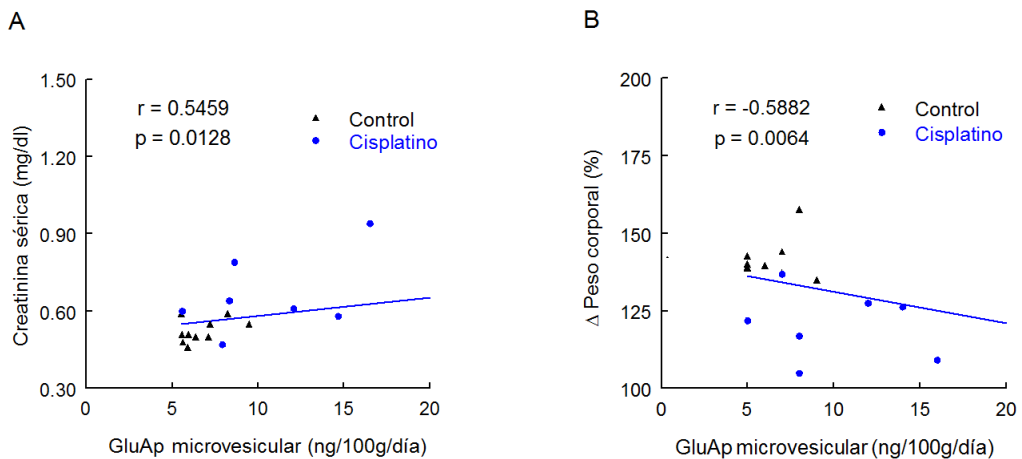


Figura 15. Regresiones lineales entre la excreción de GluAp (ng/100g/día) en fracción microvesicular de muestras de orina recogidas 24 horas después de la inyección con concentración de creatinina sérica (A) e incremento de peso corporal (B) determinado al final del experimento.

4.13. Correlación entre la GluAp microvesicular expresada en ng/mg proteína y la disfunción renal

Se observó una correlación lineal entre la GluAp microvesicular (ng/mg prot) excretada 24 horas después del tratamiento con cisplatino y la creatinina sérica al final del experimento (mg/dl) y una correlación lineal inversa entre la GluAp microvesicular (ng/mg prot) excretada 24 horas después del tratamiento con cisplatino y el incremento del peso corporal.

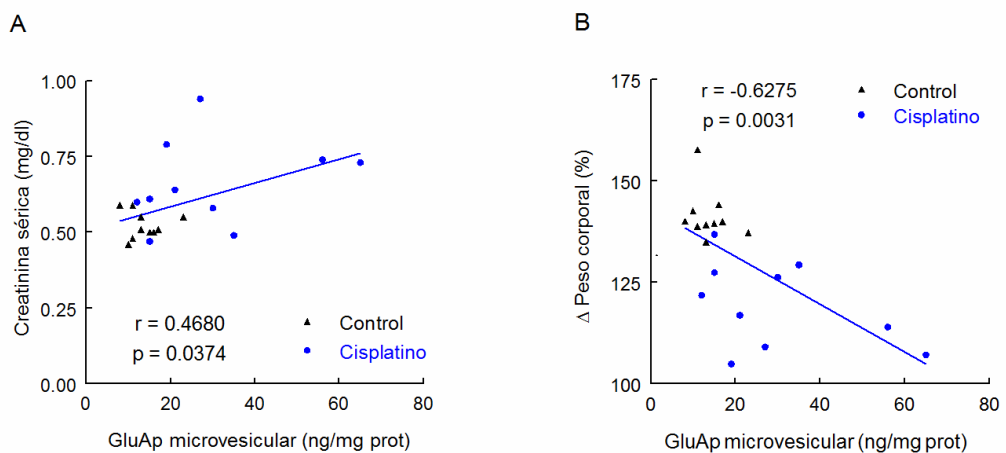


Figura 16. Regresiones lineales entre la excreción de GluAp (ng/mg prot) en fracción microvesicular de muestras de orina recogidas 24 horas después de la inyección con concentración de creatinina sérica (A) e incremento de peso corporal (B) determinado al final del experimento.

4.14. Correlación entre la GluAp exosomal expresada en ng/100g/día y la disfunción renal

Se observó una correlación lineal entre la GluAp exosomal (ng/100g/día) excretada 24 horas después del tratamiento con cisplatino y la creatinina sérica al final del experimento (mg/dl) y una correlación lineal inversa entre la GluAp exosomal (ng/100g/día) excretada 24 horas después del tratamiento con cisplatino y el incremento del peso corporal.

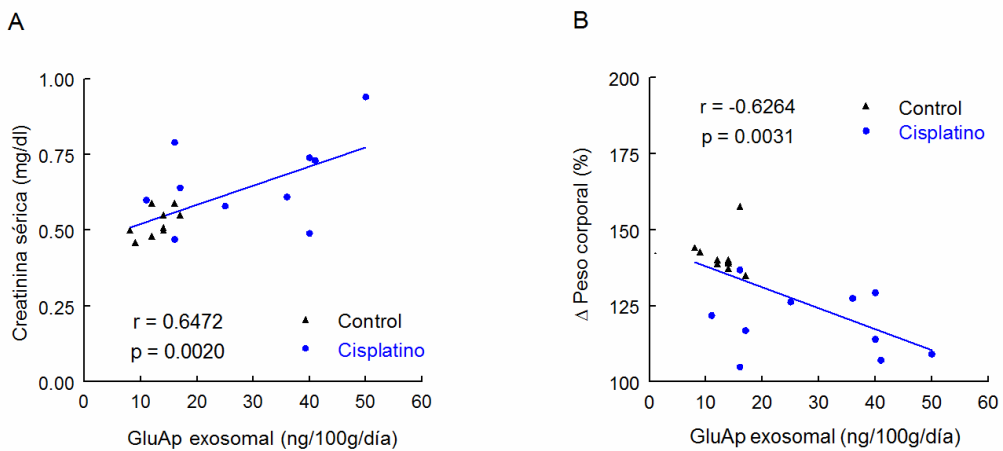


Figura 17. Regresiones lineales entre la excreción de GluAp (ng/100g/día) en fracción exosomal de muestras de orina recogidas 24 horas después de la inyección con concentración de creatinina sérica (A) e incremento de peso corporal (B) determinado al final del experimento.

4.15. Correlación entre la GluAp exosomal expresada en ng/mg proteína y la disfunción renal

Se observó una correlación lineal entre la GluAp exosomal (ng/mg prot) excretada 24 horas después del tratamiento con cisplatino y la creatinina sérica al final del experimento (mg/dl) y una correlación lineal inversa entre la GluAp exosomal (ng/mg prot) excretada 24 horas después del tratamiento con cisplatino y el incremento del peso corporal.

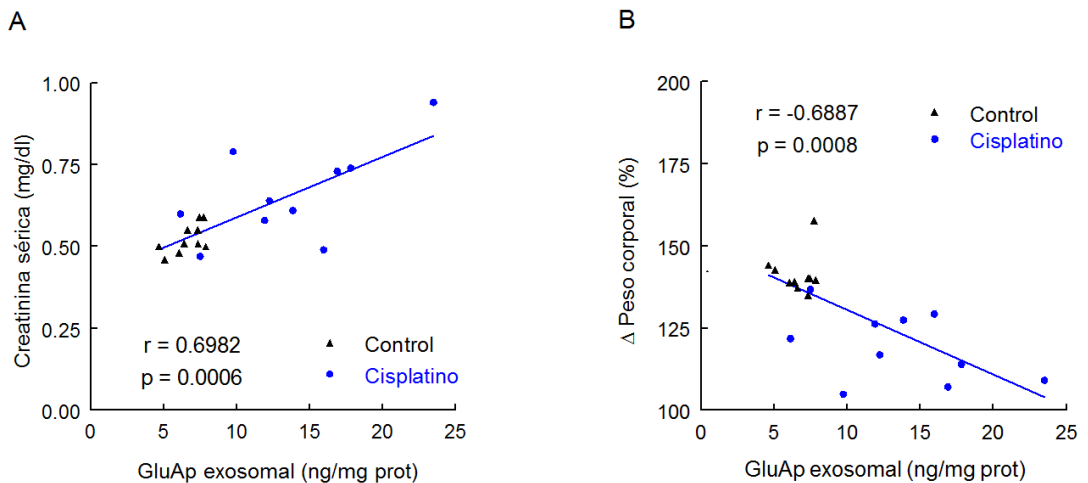


Figura 18. Regresiones lineales entre la excreción de GluAp (ng/mg prot) en fracción exosomal de muestras de orina recogidas 24 horas después de la inyección con concentración de creatinina sérica (A) e incremento de peso corporal (B) determinado al final del experimento.

4.16. Correlación de la enzima GluAp entre las diferentes fracciones urinarias

Se observó una fuerte correlación entre la GluAp en el sobrenadante (ng/mg crea) y la GluAp exosomal (ng/mg crea), entre la GluAp en el sobrenadante (ng/mg crea) y la GluAp microvesicular (ng/mg crea) y entre la GluAp microvesicular (ng/mg crea) y la GluAp exosomal (ng/mg crea). La correlación más fuerte fue entre la GluAp en el sobrenadante y la GluAp exosomal.

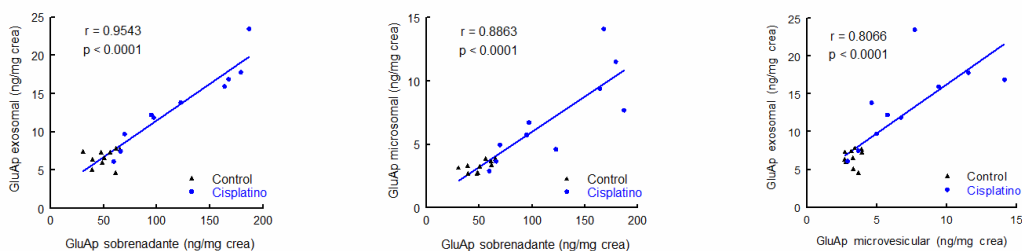


Figura 19. Correlación de GluAp entre las diferentes fracciones urinarias: GluAp en el sobrenadante, GluAp microvesicular y GluAp exosomal.

4.17. Porcentajes de distribución de GluAp en las diferentes fracciones

Se observó que tanto en las muestras del grupo Control como en las del grupo Cisplatino había una distribución de la enzima similar, observándose mayor porcentaje de GluAp en el sobrenadante y menor en la fracción microvesicular.

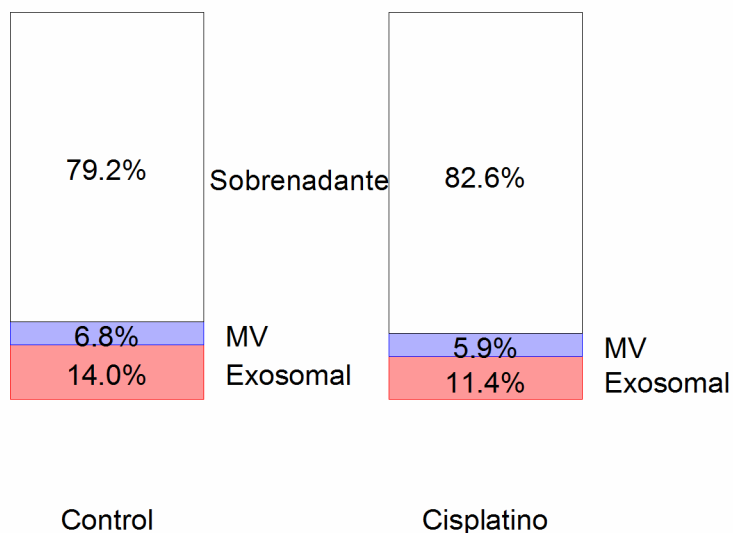


Figura 20. Distribución de porcentajes de GluAp (ng) en las fracciones sobrenadante, microvesicular y exosomal en los grupos Control y Cisplatino a las 24 horas de la inyección. MV= microvesicular.

4.18. Cantidad de GluAp expresada en ng/mg proteína en las diferentes fracciones urinarias

Se observaron diferencias significativas en la GluAp (ng/mg proteína) de la fracción exosomal con respecto al sobrenadante y a la fracción microvesicular, encontrándose mayor cantidad de enzima por mg de proteína en la fracción exosomal, tanto en el grupo Control como en el grupo Cisplatino.

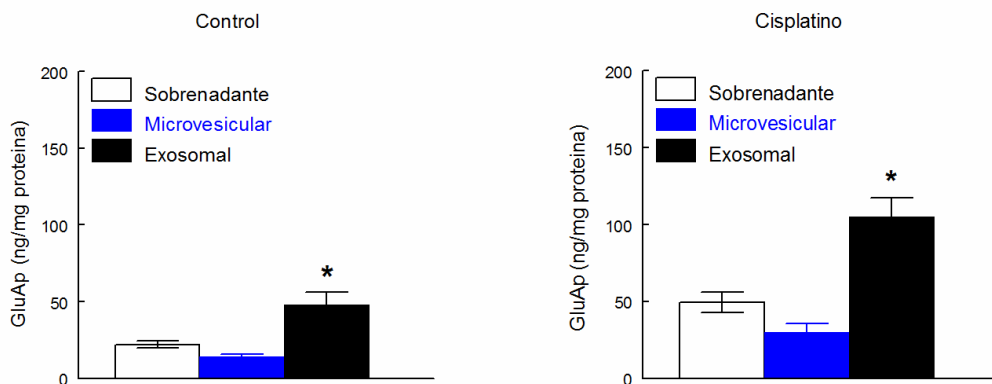


Figura 21. GluAp (ng/mg proteína) en las fracciones microvesicular, exosomal y sobrenadante en los grupos Control y Cisplatino. * $p < 0,05$.

4.19. Correlación entre GluAp y AlaAp en sobrenadante, GluAp y AlaAp en fracción microvesicular y GluAp y AlaAp en fracción exosomal expresadas en mU por mililitro a los 3 días de la inyección del cisplatino en ratas

Se encontró una correlación lineal entre la actividad enzimática de GluAp del sobrenadante expresada en mU/ml y la actividad enzimática de AlaAp del sobrenadante expresada en mU/ml ($r=0.9403$; $p<0.0001$). Así mismo, se encontró una fuerte correlación lineal entre la actividad enzimática de GluAp microvesicular expresada en mU/ml y la actividad enzimática de AlaAp microvesicular expresada en mU/ml ($r=0.9466$; $p < 0.0001$). También se encontró una correlación lineal entre la actividad enzimática de GluAp exosomal expresada en mU/ml y la actividad enzimática de AlaAp expresada en mU/ml ($r=0.8307$; $p < 0.0001$). La actividad enzimática de ambas enzimas, tanto en sobrenadante como en fracción microvesicular y exosomal fueron medidas 72 horas después del tratamiento con cisplatino.

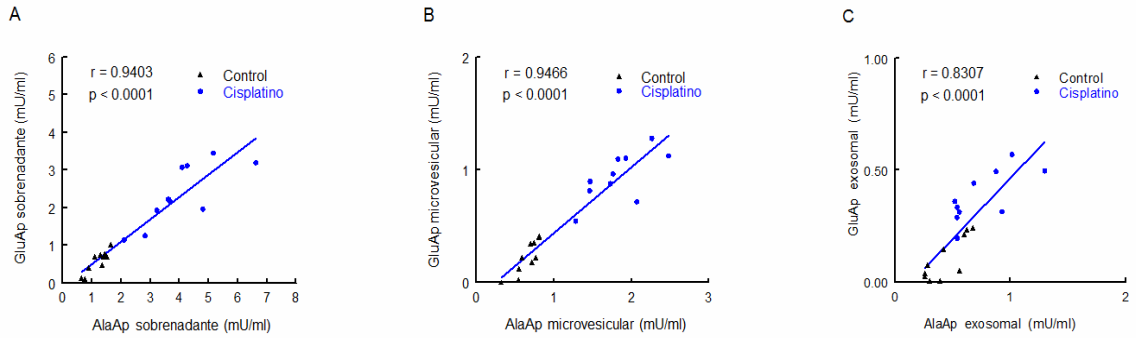


Figura 22. Regresiones lineales entre la actividad aminopeptidásica de GluAp (mU/ml) y la actividad aminopeptidásica de AlaAp (mU/ml) en sobrenadante (A), fracción microvesicular (B) y fracción exosomal (C) de muestras de orina recogidas 72 horas después de la inyección de cisplatino.

4.20. Creatinina sérica e incremento de peso corporal en el grupo cisplatino y grupo control a las 72 horas del tratamiento

La creatinina sérica (mg/dl) estaba significativamente aumentada en el grupo control con respecto al grupo cisplatino a las 72 horas del tratamiento con cisplatino (A) y el incremento de peso corporal (%) estaba significativamente disminuido en las ratas del grupo cisplatino con respecto a las ratas del grupo control 72 horas posteriores al tratamiento.

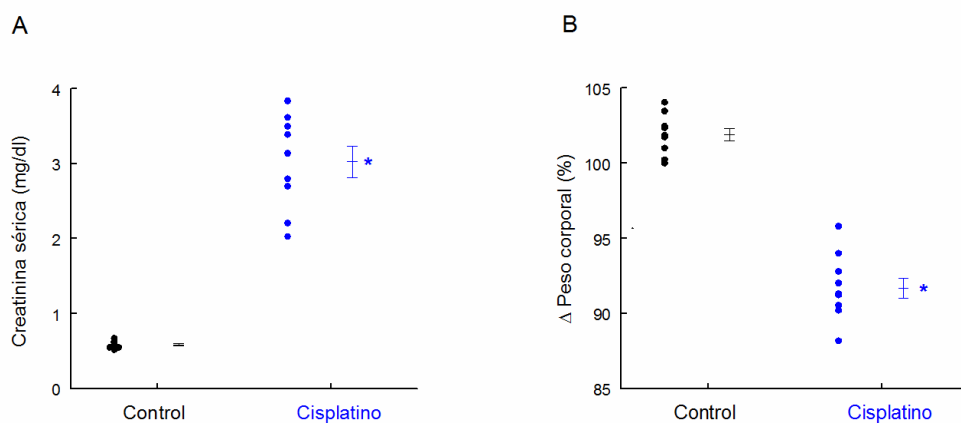


Figura 23. Cantidad de creatinina sérica (mg/dl) en muestras de orina del Grupo Control y del Grupo Cisplatino e incremento de peso corporal (%) en muestras de orina del Grupo Control y del Grupo Cisplatino a las 72 horas de la inyección del cisplatino.

4.21. Inmunoblotting de GluAp, Alix y TSG101 en fracción microvesicular y fracción exosomal a las 72 horas del tratamiento con cisplatino

El inmunoblotting también demostró que la GluAp estaba incrementada por mg de proteína en fracciones microvesicular y exosomal de orina en ratas tratadas con cisplatino 72 horas después del tratamiento. Además, se detectó la presencia de dos marcadores exosómicos, Alix y TSG101, en las fracciones exosómicas tanto del grupo control como del grupo tratado con cisplatino. En la fracción microvesicular estas proteínas se expresaban en menor cantidad y el perfil electroforético era muy diferente al de la fracción exosómica.

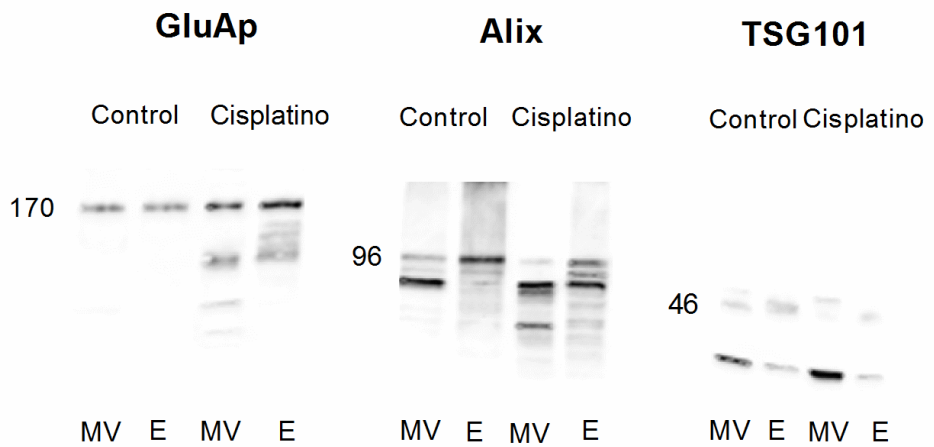


Figura 24. Inmunoblotting de GluAp, Alix y TSG101 en fracción microvesicular (MV) y fracción exosomal (E) del grupo Control y del grupo de ratas tratadas con cisplatino, recogidas 72 horas después de la inyección. Cada línea contiene el volumen de fracción correspondiente a 30 μ g de proteína total.

4.22. Variables urinarias 3 días después de la inyección

A los 3 días de la inyección del cisplatino, la creatinina urinaria expresada en mg/100g/día se encontró significativamente disminuida en las ratas del grupo cisplatino. Así mismo, la proteinuria expresada el mg/mg creatinina, la proteína microvesicular expresada en $\mu\text{g}/\text{mg}$ creatinina, la proteína exosomal expresada en $\mu\text{g}/\text{mg}$ creatinina y la diuresis expresada en ml/100g estaban significativamente aumentadas en las ratas cisplatino con respecto a las ratas del grupo control.

	Control	Cisplatino
Creatinina urinaria (mg/100g/día)	2.14 \pm 0.11	1.23 \pm 0.15**
Proteinuria (mg/mg crea)	0.82 \pm 0.03	7.31 \pm 0.72**
Proteína microvesicular ($\mu\text{g}/\text{mg}$ crea)	145 \pm 9.34	705 \pm 118**
Proteína exosomal ($\mu\text{g}/\text{mg}$ crea)	168 \pm 16.8	491 \pm 88.5**
Diuresis (ml/100g)	3.95 \pm 0.47	10.3 \pm 1.36*

Tabla 3. Variables urinarias 3 días después de la inyección. Excreción de creatinina urinaria (UCr;mg/100g/día), proteinuria (mg/mg creatinina), proteína microvesicular ($\mu\text{g}/\text{mg}$ creatinina), proteína exosomal ($\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína) y diuresis (ml/100g) en los grupos control y cisplatino 72 horas después de la inyección. Los datos están expresados como las medias \pm error estándar. *p < 0.01, **p < 0.001 cisplatino vs grupo Control (n = 10 cada grupo).

DISCUSIÓN

Los principales resultados de esta tesis son que la excreción de GluAp en muestras de orina puede ser cuantificada mediante la utilización de métodos inmunológicos (ELISA e inmunobloting), que la excreción de GluAp en orina, y en las fracciones microvesicular y exosómica urinarias se encuentra aumentada en un modelo animal de daño renal agudo obtenido mediante la administración de cisplatino y que la excreción de GluAp en estas fracciones se encuentra relacionada con el daño renal observado al final del experimento.

La detección temprana de la disfunción renal sigue siendo un desafío, porque los marcadores tradicionales como el nitrógeno ureico en sangre y la creatinina sérica (SCr) son marcadores retardados que progresivamente se acumulan en la sangre, y los cambios en las concentraciones de creatinina sólo se manifiestan cuando los riñones han perdido al menos el 50% de su capacidad funcional (Bonvetre y cols., 2010; Devarajan P, 2007). Además, numerosos estados fisiológicos y patológicos, como por ejemplo, dietas enriquecidas en proteínas, hemorragias digestivas, enfermedades musculares, o deshidratación pueden afectar a la sensibilidad y especificidad diagnóstica de estos marcadores sanguíneos sobre la disfunción renal.

En la última década se han propuestos diferentes marcadores urinarios para la detección precoz del daño renal (Vaidya y cols., 2008; Lysowska-Myjak, 2010).

Las enzimas liberadas de las células tubulares dañadas y excretadas a la orina han sido descritas como los biomarcadores más prometedores para la detección temprana del daño renal agudo (Lysowska-Myjak, 2010), ya que

las lesiones tubulares preceden y, en la mayoría de los casos, son los factores desencadenantes del desarrollo del daño renal. Por lo tanto, la cuantificación de diferentes biomarcadores excretados en la orina puede ser de relevancia diagnóstica para evaluar el daño renal inicial o predecir el grado de lesión renal.

La administración de diferentes sustancias nefrotóxicas que afectan a la función tubular ha sido ampliamente utilizada como un modelo de experimentación para evaluar la relación entre la excreción de biomarcadores y la disfunción renal (Inselmann y cols., 2003; Naghibi y cols., 2007). El cisplatino es un fármaco antineoplásico que provoca disfunción renal en animales y humanos, incluyendo alteraciones tubulares y glomerulares y desarrollo de fibrosis intersticial (Yao y cols., 2007).

Las enzimas aminopeptidásicas, que están presentes en el borde en cepillo de las células tubulares renales, pueden ser liberadas al ultrafiltrado después de la inyección del cisplatino y pueden actuar como biomarcadores de disfunción renal. Nuestro grupo ha demostrado en trabajos previos un incremento en las actividades aminopeptidásicas urinarias en ratas hipertiroideas tratadas con sal (Pérez-Abud y cols., 2011) y en ratas tratadas con cisplatino (Quesada y cols., 2012). En las ratas tratadas con cisplatino, las actividades aminopeptidásicas se relacionaron con la disfunción renal (Quesada y cols., 2012).

Uno de los resultados de este trabajo es que la GluAp puede ser detectada y cuantificada en muestras de orina por métodos inmunológicos y su excreción temprana correlaciona con diversos parámetros de disfunción renal en ratas tratadas con cisplatino, como previamente nosotros hemos

observado en este modelo de nefrotoxicidad cuando la actividad urinaria de esta enzima fue cuantificada por fluorimetría cinética (Quesada y cols., 2012).

Las enzimas aminopeptidásicas están presentes en el borde en cepillo de las células tubulares renales (Kenny y Maroux, 1982) y la GluAp fue identificada y localizada en el riñón por Song y cols. (1994). Sin embargo, esta es la primera vez que la GluAp es identificada por métodos inmunológicos en muestras de orina entera. De hecho, la actividad que ha sido clásicamente atribuida a glutamil-transpeptidasa puede ser debida a la presencia de GluAp que nosotros hemos demostrado en este trabajo, porque ambas enzimas hidrolizan residuos de glutamil de las proteínas. Es de interés que la GluAp, pero no la γ -glutamilaminopeptidasa, fue una de las enzimas que fueron identificadas en la fracción exosómica en la orina por Gonsales y cols. (2009) por análisis proteómico, y que la alanil aminopeptidasa (AlaAp) se identificó en el análisis proteómico de los exosomas urinarios de pacientes de nefropatía temprana y nefropatía de membrana basal delgada (Moon y cols., 2011).

La presencia en la orina de estas enzimas del borde en cepillo puede ser debida a la inversión de la polaridad celular que tiene lugar en las etapas tempranas del daño renal (Zuk y cols., 1998) y podría provocar la liberación de estas enzimas desde la membrana celular al ultrafiltrado. Este fenómeno podría estar asociado a una inducción en su producción porque la endocitosis de albúmina está mediado por angiotensina II (Caruso-Neves y cols., 2005) y estas enzimas participan en la degradación de angiotensina II.

Además, el alto peso molecular que tiene la GluAp, de 170 kDa, asegura que la enzima que es detectada en las muestras de orina proviene del riñón, porque no pasan a través de la barrera glomerular, aunque no se puede descartar que una cierta cantidad de enzima podría proceder de las células epiteliales del sistema urinario. Independientemente de su origen, nosotros hemos demostrado en este trabajo que hay una alta correlación entre la excreción temprana de GluAp con la SCr y con la disminución del peso corporal de los animales. Por tanto, la detección inmunológica de GluAp es un marcador precoz de la disfunción renal provocado por cisplatino en ratas.

Aunque hay una gran excreción de GluAp en los primeros momentos después de la inyección de cisplatino, su actividad no es diferente del grupo control después de 8 o 15 días. Estos resultados pueden estar relacionados con la regeneración del epitelio tubular que ha sido demostrado por otros autores 8 días después de la administración de cisplatino (Yu y cols., 2010).

En este trabajo, las ratas tratadas con cisplatino mostraron diferencias en creatinina plasmática, diuresis y peso corporal, pero no había diferencias significativas en el aclaramiento de creatinina al final del experimento. Por el contrario, en trabajos previos (Quesada y cols., 2012), nosotros habíamos observado un descenso significativo en el aclaramiento de creatinina. La razón para estas discrepancias puede estar relacionada con la edad del animal, porque los animales en este estudio tenían sobre 3 semanas de edad. De esta manera, se ha publicado que la nefrotoxicidad del cisplatino es más baja en ratas jóvenes y esto parece estar causado por un bajo estado de diferenciación de la estructura celular y la función de transporte (Appenroth

y cols., 1990) porque el cisplatino debe ser transportado a través de estos sistemas para ejercer sus efectos nefrotóxicos. Espandiari y cols., (2010) también encontraron que la nefrotoxicidad era dependiente de la edad del animal, estableciendo un orden de edad atendiendo a la nefrotoxicidad inducida por cisplatino en ratas: 80 > 40 > 10 > 25 días de edad. Por lo tanto, los resultados de nuestro estudio son coherentes con estos autores y son también coherentes con otros autores que utilizaron ratas de edad y peso similares, y que encontraron un gran aumento en la creatinina plasmática 7 días después de la inyección, pero no 14 días después (Kawai y cols., 2009).

Aunque nosotros hemos demostrado que la GluAp puede ser detectada mediante inmunoblotting, esto es un método semicuantitativo caro y laborioso de determinación, mientras que el enzimoimmunoanálisis (ELISA) está más extendido y robotizado en hospitales y presenta mayor precisión a la hora de la cuantificación de la enzima.

Por tanto, la presente tesis demuestra que la excreción de GluAp puede ser cuantificada por métodos inmunológicos en muestras de orina, incluyendo western blot y ELISA, que es el método más usado para la cuantificación de proteínas específicas en la práctica clínica, permitiendo la posibilidad de hacer determinaciones en serie de esta enzima en laboratorios clínicos o en investigación experimental con kits basados en anticuerpos, especialmente cuando la determinación de la actividad fluorimétrica no está disponible.

La detección inmunológica de la enzima también tiene un valor predictivo, al igual que la actividad fluorimétrica que se había determinado previamente en este modelo de daño renal (Quesada y cols., 2012). Aunque se ha demostrado que la excreción temprana de este marcador se relaciona

con la disfunción renal en animales tratados con cisplatino, sería de interés evaluar su papel como biomarcador en otros modelos animales y en patologías humanas que cursen con disfunción renal. Este marcador puede ser de utilidad en el diagnóstico de diversas enfermedades renales.

La orina puede contener vesículas extracelulares (VE) que se liberan del epitelio renal (Salih y cols., 2014; Gámez-Valero y cols., 2015). Aunque no hay un consenso general para los criterios de clasificación y métodos de aislamiento para los diferentes tipos de vesículas extracelulares, la centrifugación diferencial es el método más comúnmente utilizado para aislar vesículas extracelulares de biofluidos (Salih y cols., 2014). Estas vesículas extracelulares incluyen exosomas, que son nanovesículas (30-120 nm) secretadas por la células epiteliales del tracto urinario (Pisitkin y cols., 2006; Ohno y cols., 2013), y ectosomas, también llamados microvesículas, que son más grandes (100-1000 nm) que los exosomas y son producidos directamente a partir de la membrana plasmática (Ohno y cols., 2013). La cantidad y composición de los exosomas excretados en la orina puede ser importante en el diagnóstico de la disfunción renal, ya que pueden constituir una fuente no invasiva de biomarcadores que pueden ser clínicamente útiles en múltiples enfermedades (Dimov I y cols., 2009; Alvarez y cols., 2013; Dear y cols., 2013).

Los marcadores urinarios suelen normalizarse por mg de creatinina urinaria, útil para muestras puntuales, o por excreción total diaria cuando se dispone de los datos de diuresis. Sin embargo, las alteraciones en la filtración glomerular se acompañan con una baja excreción de creatinina urinaria que podría falsamente aumentar los niveles de marcadores urinarios. Además,

las alteraciones en la diuresis también pueden influir en la cuantificación de los marcadores urinarios, ya que las diferencias en el contenido de agua pueden afectar a las determinaciones bioquímicas. En nuestro estudio, el cisplatino indujo un aumento en el contenido de GluAp microvesicular y exosomal normalizado por mg de proteína total en cada fracción, lo que implica que el efecto nefrotóxico del cisplatino sobre el epitelio tubular podría evaluarse independientemente de la excreción de creatinina o de la diuresis.

En nuestro experimento, el aumento de la excreción de GluAp a las 24 horas del tratamiento con cisplatino no estaba influenciado en gran medida por la excreción de creatinina o por el contenido total de proteínas en cada fracción, ya que no hubo diferencias en estas variables entre ambos grupos de ratas, aunque la diuresis fue significativamente mayor en las ratas tratadas con cisplatino.

El alto contenido de GluAp en las fracciones exosomal y microsomal que hemos encontrado en este estudio podría ser debido a un efecto directo del cisplatino sobre el túbulo proximal que provocaría una mayor liberación de microvesículas y exosomas de esta sección de la nefrona donde se expresan principalmente las enzimas aminopeptidásicas (Kenny y Maroux, 1982; Song y cols., 1994).

Esto podría explicar que las fracciones microsomal y exosomal fueron más ricas en el contenido de GluAp en las ratas tratadas con cisplatino que en el grupo control. De esta manera, otros autores han afirmado que los exosomas pueden ser la mejor fuente de biomarcadores para las tubulopatías renales,

es decir, los trastornos que afectan a la función del epitelio de los túbulos renales (Pisitkun y cols., 2006).

El contenido de GluAp en la fracción microvesicular estaba correlacionado significativamente con la creatinina plasmática y correlacionado negativamente con el incremento del peso corporal, indicando que la determinación de esta enzima en microvesículas puede ser también un marcador temprano del daño renal.

La GluAp exosomal expresada en ng/mg creatinina mostró una correlación muy fuerte con la SCr y la disminución del peso corporal. El coeficiente de correlación fue mayor que el obtenido para el sobrenadante, y también fue superior al que se obtuvo en el caso de la GluAp microvesicular o de la GluAp exosomal expresada en ng/100g/día o en ng/mg proteína.

Por lo tanto, en nuestro estudio la cuantificación de la GluAp exosomal en ng/mg de creatinina estaba más relacionada con la disfunción renal, probablemente debido a que las ligeras alteraciones en la excreción de creatinina también pueden contribuir a la disfunción renal posterior. Pero la correlación de GluAp exosomal expresada en ng/mg de proteína también era muy elevada, y podría ser un marcador de gran utilidad en patologías donde la evaluación del daño tubular temprano tenga relevancia, como es el caso de los pacientes que desarrollan daño renal agudo.

En nuestros trabajos previos encontramos un alto incremento en la excreción temprana y en la actividad (Quesada y cols., 2012) de esta enzima en el sobrenadante de la orina de ratas tratadas con cisplatino que se correlacionaba con el daño renal. La medida de GluAp en las fracciones

exosomal y microvesicular puede suponer una mejora técnica con respecto al análisis de orina, ya que las muestras se someten a dos etapas de centrifugación y los precipitados se disuelven en un tampón (Zhou y cols., 2006). Por lo tanto, se evitan interferencias en la determinación de biomarcadores que pueden estar provocadas por el contenido de urea, la fuerza iónica u otros componentes de la orina.

La alta correlación que encontramos entre la excreción de la enzima en estas fracciones urinarias con el aumento en la concentración de SCr o la disminución del peso corporal también puede constituir una herramienta útil para clasificar diferentes niveles de disfunción renal.

La fracción exosomal ha sido ampliamente utilizada para estudios de investigación de biomarcadores, y existen evidencias de papeles fisiológicos y patológicos de los exosomas en el riñón, donde se regula el funcionamiento entre diferentes partes de la nefrona, a través de la secreción y reabsorción de sus contenidos como mRNAs y miRNAs que pueden afectar a la función de la célula receptora (Dimov y cols., 2009; Fang y cols., 2013). Sin embargo, las microvesículas no han recibido suficiente atención en la investigación de biomarcadores, aunque su secreción se ha estudiado en algunas patologías renales (Jayachandran y cols, 2015; Viñuela-Berni y cols., 2015) y también contienen mRNA y miRNA que podrían desempeñar un papel en la transferencia de información en el riñón (LV y cols., 2013; Murakami y cols., 2014). La obtención de la fracción microsomal es más fácil y rápida que la fracción exosomal, y nuestros resultados demuestran que también puede constituir una fuente importante de biomarcadores relacionados con la disfunción renal.

Para comprobar el enriquecimiento en vesículas extracelulares de las fracciones urinarias utilizadas en este estudio, se analizó la expresión de Alix y TSG101, proteínas accesorias necesarias para la formación de cuerpos multivesiculares (Morita y cols., 2007) y que están presentes en los exosomas independientemente del tipo celular (Thery y cols., 2001). TSG101 también se ha descrito en microvesículas donde está implicada en el desarrollo directo de la membrana (Nabhan y cols., 2012). En nuestro estudio, encontramos una expresión más alta de Alix y TSG101 a 46 kDa en fracciones exosomales que en fracciones microvesiculares tanto del grupo control como del grupo tratado con cisplatino, confirmando la presencia y enriquecimiento de exosomas en esta fracción.

Curiosamente, tanto Alix como TSG101 también se detectaron en la fracción microvesicular, pero el patrón de expresión fue completamente diferente al de la fracción exosomal. Estas diferencias en la migración electroforética pueden deberse al hecho de que las microvesículas transportan más proteínas con modificaciones postraduccionales en comparación con los exosomas (Palmisano y cols., 2012). En el caso de la TSG101, hubo incluso una banda accesoria a 25 kDa que era muy patente en la fracción microvesicular de los grupos control y cisplatino, pero se detectó ligeramente en la fracción exosomal.

También es notable que la expresión de Alix y TSG101 fue muy similar tanto en el grupo cisplatino como en el grupo control, y la GluAp fue el único marcador que estaba claramente sobreexpresado en las ratas tratadas con cisplatino en ambas fracciones, reforzando el papel del contenido de GluAp en estas fracciones como un marcador de nefrotoxicidad.

CONCLUSIONES

1. La excreción de GluAp puede ser cuantificada en muestras de orina mediante métodos inmunológicos, como ELISA o inmunoblotting.
2. Tanto la actividad enzimática de GluAp como su excreción determinada por métodos inmunológicos en orina, en fracción microvesicular y en fracción exosómica urinaria son biomarcadores del daño renal provocado por la administración de cisplatino en ratas.
3. La normalización de los valores de GluAp en función de la proteína total presente en las fracciones microvesicular y exosómica permite evaluar la lesión del túbulo proximal de manera independiente a la excreción de creatinina, posibilitando la cuantificación del daño tubular en situaciones fisiopatológicas que cursen con alteraciones en la tasa de filtración glomerular.

BIBLIOGRAFÍA

1. Anderson HC, Mulhall D, Garimella R. Role of extracellular membrane vesicles in the pathogenesis of various diseases, including cancer, renal diseases, atherosclerosis, and arthritis. *Lab Invest.* 2010; 90:1549–57. doi:10.1038/labinvest.2010.152.
2. Alvarez S, Suazo C, Boltansky A, Ursu M, Carvajal D, Innocenti G et al. Urinary exosomes as a source of kidney dysfunction biomarker in renal transplantation. *Transplant Proc.* 2013; 45: 3719–3723.
3. Albiston AL, Yeatman HR, Pham V, Fuller SJ, Diwakarla S, et al.. Distinct distribution of GLUT4 and insulin regulated aminopeptidase in the mouse kidney. *Regul Pept.* 2011;166: 83–89.
4. Antoniak S, Boltzen U, Eisenreich A, Stellbaum C, Poller W, Schultheiss HP and Rauch U. Regulation of cardiomyocyte full-length tissue factor expression and microparticle release under inflammatory conditions in vitro. *J. Thromb. Haemostasis.* 2009; 7, 871–878.
5. Appenroth D, Gambaryan S, Gerhardt S, Kersten L, Braünlich H. Age dependent differences in the functional and morphological impairment of kidney following cisplatin administration. *Exp Pathol.* 1990;38, 231–239.
6. Arany I, Safirstein RL. Cisplatin nephrotoxicity. *Semin Nephrol.* 2003;23:460–4.

7. Bagshaw S, Gigney N. Conventional markers of kidney function. *Crit Care Med.* 2008; 36;4.
8. Bagul A, Frost JH, Drage M. Stem cells and their role in renal ischaemia reperfusion injury. *Am J Nephrol.* 2013; 37,16–29.
9. Basile DP, Rovak JM, Martin DR, Hammerman MR. Increased transforming growth factor- α expression in regenerating rat renal tubules following ischemic injury. *American Journal of Physiology.* 1996; 270 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 39):F500–F509.
10. Basnakian AG, Apostolov EO, Yin X, Napirei M, Mannherz HG, Shah SV. Cisplatin Nephrotoxicity Is Mediated by Deoxyribonuclease I. *J Am Soc Nephrol.* 2005; 16:697–702.
11. Bechtel W, McGoohan S, Zeisberg EM, Müller GA, Kalbacher H, Salant DJ, Müller CA, Kalluri R, Zeisberg M. Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney. *Nat Med.* 2010;16:544-50.
12. Bevers EM et al. Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1439(3):317–330.
13. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P. 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. *Crit. Care*. 2004; 8:204–12.
14. Blanchard N et al. TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex. *J Immunol*. 2002;168(7):3235–3241.
 15. Bonventre JV. Diagnosis of acute kidney injury: from classic parameters to new biomarkers. *Contrib Nephrol*. 2007; 156: 213– 219.
 16. Bonventre JV, Vaidya VS, Schmolder R, Feig P, Dieterle F. Next-generation biomarkers for detecting kidney toxicity. *Nat. Biotechnol*. 2010; 28, 436–440.
 17. Bonventre JV, Weinberg JM. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2003; 14:2199–2210.
 18. Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Investig*. 2011; 121, 4210–4221.

19. Borges FT, Reis LA, Schor N. Extracellular vesicles: structure, function, and potential clinical uses in renal diseases. *Braz J Med Biol Res.* 2013; 46:824–30. doi:10.1590/1414-431X20132964.
20. Brodsky SV. Anticoagulants and acute kidney injury: clinical and pathology considerations. *Kidney Res Clin Pract.* 2014; Dec;33(4):174-80.
21. Brodsky SV, Nadasdy T, Rovin BH, Satoskar AA, Nadasdy GM, Wu HM, Bhatt UY, Herbert LA. Warfarin-related nephropathy occurs in patients with and without chronic kidney disease and is associated with an increased mortality rate. *Kidney Int.* 2011; 80: 181–189.
22. Brodsky SV, Satoskar A, Chen J, Nadasdy G, Eagen JW, Hamirani M, Herbert L, Calomeni E, Nadasdy T. Acute kidney injury during warfarin therapy associated with obstructive tubular red blood cell casts: a report of 9 cases. *Am J Kidney Dis.* 2009; 54: 1121–1126.
23. Burger D, Schock S, Thompson C, Montezano A, Hakim A, Touyz R. Microparticles: biomarkers and beyond. *Clinical Science.* 2013;124:423-441.
24. Caruso-Neves C, Kwon SH, Guggino WB. Albumin endocytosis in proximal tubule cells is modulated by angiotensin II through anAT2 receptor-mediated protein kinase B. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2005;102, 17513–17518.

25. Chen TS, Lai RC, Lee MM, Choo AB, Lee CN and Lim SK. Mesenchymal stem cell secretes microparticles enriched in pre-microRNAs. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38, 215–224.
26. Chirino YI, Hernandez-Pando R, Pedraza-Chaverri J. Peroxynitrite decomposition catalyst ameliorates renal damage and protein nitration in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *BMC Pharmacol.* 2004; 4:20.
27. Chirino YI, Pedraza-Chaverri J. Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Exp Toxicol Pathol*, 2009; 61: 223-242.
28. Ciarimboli G, Ludwig T, Lang D, et al. Cisplatin nephrotoxicity is critically mediated via the human organic cation transporter 2. *Am J Pathol.* 2005; 167:1477–84.
29. Chairoungdua A, Smith DL, Pochard P, Hull M, Caplan MJ. Exosome release of b-catenin: A novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *J Cell Biol.* 2010; 190: 1079–91.

30. Chaput N, Théry C. Exosomes: Immune properties and potential clinical implementations. *Semin. Immunopathol.* 2010; 33: 419–40.
31. Chawla LS, Eggers PW, Star RA, Kimmel PL. Acute kidney injury and chronic kidney disease as interconnected syndromes. *N England J Med.* 2014; 3;371(1):58-66.
32. Chawla LS, Kimmel PL. Acute kidney injury and chronic kidney disease: an integrated clinical syndrome. *Kidney Int.* 2012;82:516-24.
33. Chen YY, Chung JG, Wu HC, Bau DT, Wu KY, Kao ST, Hsiang CY, Ho TY, Chiang SY. Aristolochic acid suppresses DNA repair and triggers oxidative DNA damage in human kidney proximal tubular cells. *Oncol Rep.* 2010; 24, 141–153.
34. Chirino YI, Hernandez-Pando R, Pedraza-Chaverri J. Peroxynitrite decomposition catalyst ameliorates renal damage and protein nitration in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *BMC Pharmacol.* 2004; 4:20.
35. Choudhury D, Ziauddin A. Drug-associated renal dysfunction and injury. *Nature Reviews Nephrology.* 2005;2:80-91.

36. Coca SG, Yalavarthy R, Concato J, Parikh CR. Biomarkers for the diagnosis and risk stratification of acute kidney injury: systematic review. *Kidney Int.* 2008; 73: 1008–1016.
37. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol.* 2009; 19(2):43–51.
38. Cosyns JP, Jadoul M, Squifflet JP, DePlaen JF, Ferluga D, van Ypersele de Strihou C. Chinese herbs nephropathy: a clue to Balkan endemic nephropathy? *Kidney Int.* 1994; 45, 1680–1688.
39. Curry SC, Chang D, Connor D. Drug-andtoxin-induced rhabdomyolysis. *Ann Emerg Med.* 1989; 18, 1068–1084.
40. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2014. 740:364–378. doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.025.
41. De Broe ME. Chinese herbs nephropathy and Balkan endemic nephropathy: toward a single entity, aristolochic acid nephropathy. *Kidney Int.* 2012; 81,513–515.

42. Dear JW, Street JM, Bailey MA. Urinary exosomes: a reservoir for biomarker discovery and potential mediators of intrarenal signalling. *Proteomics* 2013; 13: 1572–1580.
43. Debelle FD, Nortier JL, De Prez EG, Garbar CH, Vienne AR, Salmon IJ, Deschodt-Lanckman MM, Vanherweghem JL. Aristolochic acids induce chronic renal failure with interstitial fibrosis in salt-depleted rats. *J Am Soc. 2012; Nephrol.* 13, 431–436.
44. Dent CL, Ma Q, Dastrala S, Bennett M, Mitsnefes MM, Barasch J, Devarajan P. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin predicts acute kidney injury, morbidity and mortality after pediatric cardiac surgery: a prospective uncontrolled cohort study. *Crit Care.* 2007; 11:R127.
45. Devarajan P. Emerging biomarkers of acute kidney injury. *Contrib. Nephrol.* 2007; 156, 203–212.
46. Devarajan P, Mishra J, Supavekin S, Patterson LT, Steven Potter S. Gene expression in early ischemic renal injury: clues towards pathogenesis, biomarker discovery, and novel therapeutics. *Molecular Genetics and Metabolism.* 2003; 80:365–376.
47. Dimov I, Jankovic Velickovic L, Stefanovic V. Urinary exosomes. *Scientific World Journal.* 2009;9: 1107-1118.

48. Dong X, Swaminathan S, Bachman LA, Croatt AJ, Nath KA, Griffin MD. Resident dendritic cells are the predominant TNF-secreting cell in early renal ischemiareperfusion injury. *Kidney Int.* 2007; 71:619–628.
49. Espandiari P, Rosenzweiga B, Zhanga J, Zhou Y. et al. Age-related differences in susceptibility to cisplatin-induced renal toxicity. *J. Appl. Toxicol.* 2010;30, 172–182.
50. Fang DY, King HW, Li JY, Gleadle JM. Exosomes and the kidney: blaming the messenger. *Nephrology (Carlton)*. 2013; Jan; 18(1):1-10. doi: 10.1111/nep.12005.
51. Fang TC, Alison MR, Cook HT, Jeffery R, Wright NA, Poulsom R. Proliferation of bone marrow-derived cells contributes to regeneration after folic acid-induced acute tubular injury. *J Am Soc Nephrol.* 2005; 16, 1723–1732.
52. Finn, WF. Recovery from acute renal failure. In: Lazarus, JM.; B B., editors. *Acute Renal Failure*. New York: Churchill Livingstone; 1993. p. 553-596.
53. Fitzner D, Schnaars M, van Rossum D et al. Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *J Cell Sci.* 2011; 124: 447–58.

54. Fleissner F, Goerzig Y, Haverich A, Thum T. Microvesicles as novel biomarkers and therapeutic targets in transplantation medicine. *Am J Transplant.* 2012; 12:289-97. doi:10.1111/j.1600-6143.2011.03790.
55. Friedewald JJ, Rabb H. Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. *Kidney Int.* 2004; 66:486-491.
56. Fuller TF, Sattler B, Binder L, Vetterlein F, Ringe B, Lorf T. Reduction of severe ischemia/reperfusion injury in rat kidney grafts by a soluble P-Selectin glycoprotein ligand. *Transplantation.* 2001; 72:216-222.
57. Furuichi K, Wada T, Iwata Y, Sakai N, Yoshimoto K, Kobayashi K, Mukaida N, Matsushima K, Yokoyama H. Administration of FR167653, a new anti inflammatory compound, prevents renal ischaemia/reperfusion injury in mice. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2002; 17:399-407.
58. Gámez-Valero A, Lozano-Ramos SI, Bancu I, Lauzurica-Valdemoros R, Borrás FE. Urinary extracellular vesicles as source of biomarkers in kidney diseases. *Front Immunol.* 2015; 6: 1-10.
59. Gonsales PA, Pisitkun T, Hoffert JD, Tchapyjnikov D et al. Large-scale proteomics and phosphoproteomics of urinary exosomes. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2009; 20, 363-379.

60. Goodsell DS. The molecular perspective: Cisplatin. *Stem Cells*. 2006; 24:514–515. [PubMed: 16582013].
61. Gökmen MR, Cosyns JP, Arlt VM, Stiborová M, Phillips DH, Schmeiser HH, Simmonds MS, Cook HT, Vanherweghem JL, Nortier JL, Lord GM. The epidemiology, diagnosis, and management of aristolochic acid nephropathy: a narrative review. *Ann Intern Med*. 2013; 158,469–477.
62. Goligorsky MS, Lieberthal W, Racusen L, Simon EE. Integrin receptors in renal tubular epithelium: new insights into pathophysiology of acute renal failure. *American Journal of Physiology*. 1993; 264:F1–F8.
63. Graner MW, Alzate O, Dechkovskaia AM, Keene JD et al. Proteomic and immunologic analyses of brain tumor exosomes. *Faseb J*. 2009; 23, 1541–1557.
64. Grange C, Tapparo M, Collino F et al. Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche. *Cancer Res*. 2011; 71: 5346–56.
65. Hamerski DA, Santoro SA. Integrins and the kidney: biology and pathobiology. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 1999; 8:9–14.

66. Harding C, Heuser J, Stahl P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol.* 1983; 97: 329–39.
67. Hess C et al. Ectosomes released by human neutrophils are specialized functional units. *J Immunol.* 1999; 163(8):4564–4573.
68. Heyman SN, Rosen S, Fuchs S, Epstein FH, Brezis M. Myoglobinuric acute renal failure in the rat: a role for medullary hypoperfusion, hypoxia, and tubular obstruction. *J Am Soc Nephrol.* 1996; 7, 1066–1074.
69. Hong HJ, Liu JC, Chen PY, Chen JJ, Chan P, Cheng TH. Tanshinone IIA prevents doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis through Akt-dependent pathway. *Int J Cardiol.* 2012;157: 174–179.
70. Hoorn EJ, Pisitkun T, Zietse R, et al. Prospects for urinary proteomics: Exosomes as a source of urinary biomarkers. *Nephrology (Carlton)* 2005; 10:283–90. [PubMed: 15958043]
71. Humes D, Cieslinski DA, Coimbra TM, Messina JM, Galvao C. Epidermal growth factor enhances renal tubule cell regeneration and repair and accelerates the recovery of renal function in postischemic acute renal failure. *The Journal of Clinical Investigation.* 1989; 84:1757–1761.

72. Humphreys BD, Bonventre JV. The contribution of adult stem cells to renal repair. *Nephrol Ther.* 2007; 3:3–10.
73. Iero M, Valenti R, Huber V et al. Tumour-released exosomes and their implications in cancer immunity. *Cell Death Differ.* 2007; 15: 80–88.
74. Igawa T, Matsumoto K, Kanda S, Saito Y, Nakamura T. Hepatocyte growth factor may function as a renotropic factor for regeneration in rats with acute renal injury. *American Journal of Physiology.* 1993; 265(Renal Fluid Electrolyte Physiol. 34):F61–F69.
75. Inselmann G, Balaschke M, Heidemann HT. Enzymuria following amphotericin B application in the rat. *Mycoses.* 2003;46, 169–173.
76. Jayachandran M, Lugo G, Heiling H, Miller VM, Rule AD, Lieske JC. Extracellular vesicles in urine of women with but not without kidney stones manifest patterns similar to men: a case control study. *Biol Sex Differ.* 2015; 6: 2.
77. Jo SK, Rosner MH, Okusa MD. Pharmacologic Treatment of Acute Kidney Injury: Why Drugs Haven't Worked and What Is on the Horizon. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology.* 2007; 2:356–365.

78. Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem.* 1987; 262, 9412–9420.
79. Johnstone RM, Mathew A, Mason AB, Teng K. Exosome formation during maturation of mammalian and avian reticulocytes: Evidence that exosome release is a major route for externalization of obsolete membrane proteins. *J Cell Physiol.* 1991; 147: 27–36.
80. Kawai Y, Nakao T, Kunimura N, et al. Relationship of intracellular calcium and oxygen radicals to Cisplatin-related renal cell injury. *J Pharmacol Sci.* 2006; 100:65–72.
81. Kawai Y, Satoh T, Hibi D, Ohno Y et al. The effect of antioxidant on development of fibrosis by cisplatin in rats. *J. Pharmacol. Sci.* 2009;111, 433–439.
82. Keerthikumar S, Chisanga D, Ariyaratne D, et al. ExoCarta: a web-based compendium of exosomal cargo. 2015; *J Mol Biol.* [In Press].
83. Keller S, König A-K, Marmé F et al. Systemic presence and tumor-growth promoting effect of ovarian carcinoma released exosomes. *Cancer Lett.* 2009; 278: 73–81.

84. Keller S, Rupp C, Stoeck A, Runz S. et al. CD24 is a marker of exosomes secreted into urine and amniotic fluid. *Kidney Int.* 2007; 72, 1095–1102.
85. Kellerman PS, Bogusky RT. Microfilament disruption occurs very early in ischemic proximal tubule cell injury. *Kidney Int.* 1992; 42:896–902.
86. Kellum JA, Levin N, Bouman C, Lameire N. Developing a consensus classification system for acute renal failure. *Curr. Opin. Crit. Care.* 2002; 8:509–14.
87. Kelly KJ, Sutton TA, Weathered N, Ray N, Caldwell EJ, Plotkin Z, Dagher PC. Minocycline inhibits apoptosis and inflammation in a rat model of ischemic renal injury. *Am J Physiol.* 2004; 287:F760–F766.
88. Kenny AJ, Maroux S. Topology of microvillar membrane hydrolases of kidney and intestine. *Physiol Rev.* 1982; 62: 91–128.
89. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972; 26:239–257.

90. Kim HJ, Park DJ, Kim JH, Jeong EY, Jung MH, Kim TH, Yang JI, Lee GW, Chung HJ, Chang SH. Glutamine protects against cisplatin-induced nephrotoxicity by decreasing cisplatin accumulation. *J Pharmacol Sci.* 2015. 127(1):117-26.

91. Kim SK, Jung KH, Lee BC. Protective effect of Tanshinone IIA on the early stage of experimental diabetic nephropathy. *Biol Pharm Bull.* 2009; 32: 220-224.

92. Kleinknecht D, Landais P, Goldfarb B. Drug-associated acute renal failure. A prospective collaborative study of 81 biopsied patients. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1987; 212:125-28.

93. Kuhlmann MK, Burkhardt G, Kohler H. Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrol Dial Transplant.* 1997; 12: 2478-80.

94. Lebeau C, Debelle FD, Arlt VM, Pozdzik A, De Prez EG, Phillips DH, Deschodt-Lanckman MM, Vanherweghem JL, Nortier JL. Early proximal tubule injury in experimental aristolochic acid nephropathy: functional and histological studies. *Nephrol Dial Transplant.* 2005; 20:2321-2332.

95. Lee DBN, Huang E, Ward HJ. Tight junction biology and kidney dysfunction. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 2006; 290:F20–F34.
96. Leelahavanichkul A, Huang Y, Hu X, Zhou H, Tsuji T, Chen R, Kopp JB, Schnermann J, Yuen PS, Star RA. Chronic kidney disease worsens sepsis and sepsis-induced acute kidney injury by releasing High Mobility Group Box Protein-1. *Kidney Int*. 2011; 80(11):1198-211.
97. Lemasters JJ. Mechanisms of Hepatic toxicity V: Necroapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *American Journal of Physiology -Gastrointest Liver Physiol*. 1999; 276:G1–G6.
98. Lenassi M, Cagney G, Liao M et al. HIV Nef is secreted in exosomes and triggers apoptosis in bystander CD4+ T cells. *Traffic*. 2010; 11: 110–22.
99. Li L, Huang L, Sung S-SJ, Vergis AL, Rosin DL, Rose CE Jr, Lobo PI, Okusa MD. The chemokine receptors CCR2 and CX3CR1 mediate monocyte//macrophage trafficking in kidney ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int*. 2008; 74:1526–1537.
100. Li L, Wu Q, Wang J, Bucy RP, Cooper MD. Widespread tissue distribution of aminopeptidase A, an evolutionarily conserved

- ectoenzyme recognized by the BP-1 antibody. *Tissue Antigens*. 1993; 42:488e96.
- 101.**Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*. 2001; 412:95–99.
- 102.**Lieberthal W, Nigam SK. Acute renal failure. II. Experimental models of acute renal failure: imperfect but indispensable. *Am J Physiol: Ren Physiol*. 2000; 278, F1–F12.
- 103.**Lisowska-Myjak B. Serum and urinary biomarker of acute kidney injury. *Blood purify*. 2010; 29: 357-365.
- 104.**Liu J-P, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell*. 1993; 75:59–72.
- 105.**Liu L, Yang C, Herzog C, Seth R, Kaushal G. Proteasome inhibitors prevent cisplatin induced mitochondrial release of apoptosis inducing factor and markedly ameliorate cisplatin nephrotoxicity. *Biochemical pharmacology*. 2010; 79:137–146.
- 106.**Lojda Z, Gossrau R. Study on aminopeptidase A. *Histochemistry*. 1980; ;67: 267e90.

- 107.Lv LL, Cao Y, Liu D, Xu M, Liu H, Tang RN, et al. Isolation and quantification of microRNAs from urinary exosomes/microvesicles for biomarker discovery. *Int J Biol Sci.* 2013;9: 1021-1031.
- 108.Martim EC, Pinto CF, Watanabe M, Vattimo Mde F. Acute kidney injury by glycerol: antioxidant effect of *Vitis vinifera* L. *Rev Bras Ter Intensiva.* 2007; Sep;19(3):292-6.
- 109.Matejka GL, Jennische E. IGF-I binding and IGF-I mRNA expression in the post-ischemic regenerating rat kidney. *Kidney Int.* 1992; 42:1113–1123.
- 110.Mathivanan S, Fahner CJ, Reid GE, Simpson RJ. ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40 (Database issue):D1241–4.
- 111.Matsui K, Kamijo-Ikemorif A, Sugaya T, Yasuda T, Kimura K. Renal liver- type fatty acid binding protein (L-FABP) attenuates acute kidney injury in aristolochic acid nephrotoxicity. *Am J Pathol.* 2011; 178,1021–1032.
- 112.McConnell RE et al. The enterocyte microvillus is a vesicle-generating organelle. *J Cell Biol.* 2009; 185(7):1285–1298.

- 113.**Mehta RL, Chertow GM. Acute renal failure definitions and classification: time for change?. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003; 14:2178–87.
- 114.**Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, et al. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcome in acute kidney injury. *Crit Care.* 2007; 11: R31.
- 115.**Mei S, Livingston M, Hao J, Li L, Mei C, Dong Z. Autophagy is activated to protect against endotoxic acute kidney injury. *Sci Rep.* 2016; Feb 26;6:22171.
- 116.**Mengs U, Stotzem CD. Renal toxicity of aristolochic acid in rats as an example of nephrotoxicity testing in routine toxicology. *Arch Toxicol.* 1993; 67:307–311.
- 117.**Merouani A, Shpall EJ, Jones RB, et al. Renal function in high dose chemotherapy and autologous hematopoietic cell support treatment for breast cancer. *Kidney Int.* 1996; 50: 1026–31.
- 118.**Miller SB, Martin DR, Kissane J, Hammerman MR. Hepatocyte growth factor accelerates recovery from acute ischemic renal injury in

- rats. *American Journal of Physiology*. 1994; 266(Renal Fluid Electrolyte Physiol. 35):F129–F134.
- 119.** Mizutani S, Okano K, Hasegawa E, Sakura H, Yamada M. Aminopeptidase A in human placenta. 1981. *Biochim Biophys Acta*;662:168e70. doi:10.1016/ 0005-2744(81)90240-0.
- 120.** Molitoris BA. Ischemia-induced loss of epithelial polarity: potential role of the actin cytoskeleton. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 1991; 260:F769–F778.
- 121.** Moon PG, Lee JE, Yo S, Kim TK et al. Proteomic analysis of urinary exosomes from patients of early IgA nephropathy and thin basement membrane nephropathy. *Proteomics*. 2011;11, 2459–2475.
- 122.** Moran SM, Myers BD. Course of acute renal failure studied by a model of creatinine kinetics. *Kidney Int*. 1985; 27:928–37.
- 123.** Morita E, Sandrin V, Chung H-Y, Morham SG, Gygi SP, Rodesch CK, et al. Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. 2007; *EMBO J*. 26: 4215–4227.
- 124.** Murakami T, Oakes M, Ogura M, Tovar V, Yamamoto C, Mitsuhashi M. Development of glomerulus-, tubule-, and collecting duct-specific

- mRNA assay in human urinary exosomes and microvesicles. *PLoS One*. 2014;2: e109074.
- 125.**Muralidharan-Chari V et al. ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Curr Biol*. 2009; 19(22):1875–1885.
- 126.**Nabhan JF, Hu R, Oh RS, Cohen SN, Lu Q. Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109: 4146–4151.
- 127.**Naghibi B, Ghafghazi T, Hajhashemi V, Talebi A. Vancomycin-induced nephrotoxicity in rats: is enzyme elevation a consistent finding in tubular injury? *J. Nephrol*. 2007;20, 482–488.
- 128.**Nash K, Hafeez A, Hou S. Hospital-acquired renal insufficiency. *Am. J*. 2002.
- 129.**Ng CY, Tan CS, Chin CT, Lim SL, Zhu L, Woo KT, Tan PH. Warfarin related nephropathy: a case report and review of the literature. *BMC Nephrol*. 2016; Feb 1;17:15.

130. Nguyen MT, Devarajan P. Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. *Pediatr Nephrol*. 2008; 23: 2151–2157.
131. Nony PA, Schnellmann RG. Mechanisms of Renal Cell Repair and Regeneration after Acute Renal Failure. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2003; 304:905–912.
132. Norman J, Badie-Dezfooly B, Nord EP, Kurtz I, Schlosser J, Chaudhari A, Fine LG. EGF-induced mitogenesis in proximal tubular cells: potentiation by angiotensin II. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 1987; 253:F299–F309.
133. Ohno S, Ishikawa A, Kuroda M. Roles of exosomes and microvesicles in disease pathogenesis. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013; 65: 398–401.
134. Ortiz A, Sanchez-Niño MD, Izquierdo MC, Martin-Cleary C, Garcia-Bermejo L, Moreno JA, Ruiz-Ortega M, Draibe J, Cruzado JM, Garcia-Gonzalez MA, Lopez-Novoa JM, Soler MJ, Sanz AB; Red de Investigacion Renal (REDINREN) y Consorcio Madrileño para investigación del fracaso renal agudo (CIFRA). Translational value of animal models of kidney failure. *Eur J Pharmacol*. 2015; 759:205-20.

135. Padanilam BJ. Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *American Journal of Physiology – Renal Fluid & Electrolyte Physiology*. 2003; 284:F608–F627.
136. Palmisano G, Jensen SS, Le Bihan M-C, Lainé J, McGuire JN, Pociot F, et al. Characterization of membrane-shed microvesicles from cytokine-stimulated β -cells using proteomics strategies. *Mol Cell Proteomics*. 2012; 11: 230–243.
137. Pan BT, Blostein R, Johnstone RM. Loss of the transferrin receptor during the maturation of sheep reticulocytes in vitro. An immunological approach. *Biochem J*. 1983; 210: 37–47.
138. Park KM, Byun JY, Kramers C, Kim JI, Huang PL, Bonventre JV. Inducible nitric-oxide synthase is an important contributor to prolonged protective effects of ischemic preconditioning in the mouse kidney. *J. Biol. Chem*. 2003; 278:27256–66.
139. Pascual I, García G, Sánchez L, Díaz L, Arzola L, Labrada N, Arrebola Y, Ernesto , Chávez MA , Valiente P, Charli JL. Aminopeptidase N from mammals: biochemical characteristics, physiological functions and implication in physiopathological processes in humans. *Revista cubana de ciencias biológicas*. 2015; 1:2-16.

- 140.** Pegtel DM, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson DA et al. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 2010; 107: 6328–33.
- 141.** Pérez-Abud R, Rodríguez-Gómez I, Villarejo AB, Moreno JM et al. Salt sensitivity in experimental thyroid disorders in rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2011;301, E281–E287.
- 142.** Periyasamy-Thandavan S, Jiang M, Schoenlein P, Dong Z. Autophagy: molecular machinery, regulation, and implications for renal pathophysiology. *American Journal of Physiology – Renal Physiology.* 2009; 297:F244–F256.
- 143.** Periyasamy-Thandavan S, Jiang M, Wei Q, Smith R, Yin X-M, Dong Z. Autophagy is cytoprotective during cisplatin injury of renal proximal tubular cells. *Kidney Int.* 2008; 74:631– 640.
- 144.** Peters JE, Mampel E, Schneider I, Burchardt U, Fukala E, et al. Alanine aminopeptidase in urine in renal diseases. *Clin Chim Acta.* 1972; 37: 213–224.
- 145.** Pickering JW, Endre ZH. The definition and detection of acute kidney injury. *J Ren Inj Prev.* 2014; 3,21–25.
- 146.** Pirro M, Schillaci G, Bagaglia F, Menecali C, Paltriccia R, Mannarino MR, Capanni M, Velardi A and Mannarino E. Microparticles derived

- from endothelial progenitor cells in patients at different cardiovascular risk. *Atherosclerosis*. 2008; 197, 757–767.
- 147.** Pisitkun T, Johnstone R, Knepper MA. Discovery of urinary biomarkers. *Mol Cell Proteomics*. 2006; 5: 1760–1771.
- 148.** Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101:13368–73. [PubMed: 15326289]
- 149.** Prunotto M, Farina A, Lane L, et al. Proteomic analysis of podocyte exosome-enriched fraction from normal human urine. *J Proteomics*. 2013; 82:193–229.
- 150.** Quesada A, Vargas F, Montoro-Molina S, O'Valle F, Rodríguez-Martínez MD, Osuna A, Prieto I, Ramírez M, Wangensteen R. Urinary aminopeptidase activities as early and predictive biomarkers of renal dysfunction in cisplatin-treated rats. *Plos One*. 2012; 7(7):e40402.
- 151.** Quiros Y, Vicente-Vicente L, Morales AI, Lopez-Novoa J, Lopez-Hernandez FJ. An integrative overview on the mechanisms underlying the renal tubular cytotoxicity of gentamicin. *Toxicological Sciences*. 2011; 119:245–256.

152. Rabb H. Novel urinary markers for early diagnosis of ARF. *Am J Kidney Dis.* 2003; 42: 599–600.
153. Rabinowits G et al. Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer. *Clin Lung Cancer.* 2009; 10(1):42–46.
154. Racusen LC. The histopathology of acute renal failure. *New Horizons.* 1995; 3:662–668.
155. Ramesh G, Reeves WB. Salicylate reduces cisplatin nephrotoxicity by inhibition of tumor necrosis factor- α . *Kidney Int.* 2004; 65:490–9.
156. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* 1996; 183: 1161–72.
157. Rautou PE, Vion AC, Amabile N, Chironi G, Simon A, Tedgui A and Boulanger CM. Microparticles, vascular function, and atherothrombosis. *Circ. Res.* 2011; 109, 593–606.
158. Remick DG, Newcomb DE, Bolgos GL, Call DR. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock.* 2000; 13, 110–116.

159. Royakkers AA, van Suijlen JD, Hofstra LS, Kuiper MA, Bouman CS, Spronk PE, Schultz MJ. Serum cystatin C - A useful endogenous marker of renal function in intensive care unit patients at risk for or with acute renal failure? *Curr Med Chem.* 2007; 14: 2314-2317.
160. Sáenz-Morales D, Escribese MM, Stamatakis K, García-Martos M, Alegre L, Conde E, Pérez Sala D, Mampaso F, García-Bermejo ML. Requirements for proximal tubule epithelial cell detachment in response to ischemia: role of oxidative stress. *Exp Cell Res.* 2006; 312, 3711-3727.
161. Salih M, Zietse R, Hoorn EJ. Urinary extracellular vesicles and the kidney: biomarkers and beyond. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2014; 306: 1251-1259.
162. Santucci L, Candiano G, Petretto A, et al. From hundreds to thousands: widening the normal human Urinome (1). *J Proteomics.* 2015;112:53-62.
163. Sanz AB, Justo P, Sanchez-Niño MD, Blanco-Colio LM, Winkles JA, Kretzler M, Jakubowski A, Blanco J, Egido J, Ruiz-Ortega M, Ortiz A. The cytokine TWEAK modulates renal tubulointerstitial inflammation. *J Am Soc Nephrol.* 2008; 19,695-703.

164. Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Martín-Cleary C, Ortiz A, Ramos AM. Progress in the development of animal models of acute kidney injury and its impact on drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* 2013; 8,879–895.
165. Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest.* 2004; 114: 5-14.
166. Segarra AB, Ramírez M, Banegas I, Hermoso F, Vargas F, y cols. Influence of thyroid disorders on kidney angiotensinase activity. *Horm Metab Res.* 2006; 38: 48–52.
167. Simpson RJ, Lim JW, Moritz RL, Mathivanan S, Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Rev Proteome.* 2009; 6, 267–283.
168. Skog J, Würdinger T, van Rijn S et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol.* 2008; 10: 1470–76.
169. Solov'eva T, Davydova V, Krasikova I, Yermak I. Marine compounds with therapeutic potential in gram-negative sepsis. *Mar Drugs.* 2013; 11, 2216–2229.

170. Song L, Ye M, Troyanovskaya M, Wilk E, Wilk S, et al. Rat kidney glutamyl aminopeptidase (aminopeptidase A): molecular identity and cellular localization. *Am J Physiol.* 1994; 267: F546–F557.
171. Soni SS, Ronco C, Katz N, Cruz DN. Early diagnosis of acute kidney injury: the promise of novel biomarkers. *Blood Purif.* 2009; 28: 165–174).
172. Star RA. Treatment of acute renal failure. *Kidney Int.* 1998; 54:1817–31.
173. Stein JM, Luzio JP. Ectocytosis caused by sublytic autologous complement attack on human neutrophils. The sorting of endogenous plasma-membrane proteins and lipids into shed vesicles. *Biochem J.* 1991; 274(Pt 2):381–386.
174. Stracke S, Ernst F, Jehle DR, Grunewald RW, Haller H, Keller F, Jehle PM. Differentiating and proliferative effects of HGF in renal proximal tubular cells are mediated via different signalling pathways. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 1998; 13:1398–1405.
175. Szczyepka MS, Westover AJ, Clouthier SG, Ferrara JL, Humes HD. Rare incorporation of bone marrow-derived cells into kidney after folic acid-induced injury. *Stem Cells.* 2005; 23,44–54.

176. Taman M, Liu Y, Tolbert E, Dworkin L. Increase urinary hepatocyte growth factor excretion in human acute renal failure. *Clin Nephrol.* 1997; 48:241-245.
177. Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2008; 110(1):13-21.
178. Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV. Acute Renal Failure. *New England Journal of Medicine.* 1996; 334:1448-1460.
179. They C, Boussac M, Veron P, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Garin J, et al. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: A secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol.* 2001; 166: 7309-7318.
180. They C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2009; 9, 581-593.
181. Thiel G, Wilson DR, Arce ML, Oken DE. Glycerol induced hemoglobinuric acute renal failure in the rat. II. The experimental model, predisposing factors, and pathophysiologic features. *Nephron.* 1967; 4,276-297.

182. Tissot JD, Rubin O and Canellini G. Analysis and clinical relevance of microparticles from red blood cells. *Curr. Opin. Hematol.* 2010; 17, 571–577.
183. Toronyi E, Lord R, Bowen ID, Perner F, Szende B. Renal tubular cell necrosis and apoptosis in transplanted kidneys. *Cell Biology International.* 2001; 25:267–270.
184. Townsend DM, Deng M, Zhang L, et al. Metabolism of Cisplatin to a nephrotoxin in proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14:1–10.
185. Trillaud H, Degrèze P, Combe C, Deminière C, Palussière J, Benderbous S, Grenier N. USPIO-enhanced MR imaging of glycerol-induced acute renal failure in the rabbit. *Magn Reson Imaging.* 1995; 13,233–240.
186. Trof RJ, Di Maggio F, Leemreis J, Groeneveld ABJ. Biomarkers of acute renal injury and renal failure. *Shock.* 2006; 26: 245–253.
187. Ucero AC, Benito-Martin A, Izquierdo MC, Sanchez-Niño MD, Sanz AB, Ramos AM, Berzal S, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A. Unilateral

- ureteral obstruction: beyond obstruction. *Int Urol Nephrol*. 2014; 46, 765–776.
- 188.**Ucero AC, Gonçalves S, Benito-Martin A, Santamaría B, Ramos AM, Berzal S, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A. Obstructive renal injury: from fluid mechanics to molecular cell biology. *Open Access J Urol*. 2010; 2, 41–55.
- 189.**Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, Doig GS, Morimatsu H, et al. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *JAMA*. 2005; 294: 813-818.
- 190.**Vaidya VS, Bonventre JV. Mechanistic biomarkers for cytotoxic acute kidney injury. *Expert. Opin. Drug. Metab. Toxicol*. 2006; 2:697–713.
- 191.**Vaidya VS, Ferguson MA, Bonventre JV. Biomarkers of acute kidney injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2008; 48: 463-493.
- 192.**Venkatachalam MA, Bernard DB, Donohoe JF, Levinsky N. Ischemic damage and repair in the rat proximal tubule: differences among S1, S2 and S3 segments. *Kidney Int*. 1978; 14:31–49.

193. Venkatachalam MA, Weinberg JM. The tubule pathology of septic acute kidney injury: a neglected area of research comes of age. *Kidney Int.* 2012; 81, 338-340.
194. Venkataraman R, Kellum JA. Defining acute renal failure: the RIFLE criteria. *J Intensive Care Med.* 2007; 22: 187-193.
195. Viñuela-Berni V, Doníz-Padilla L, Figueroa-Vega N, Portillo-Salazar H, Abud-Mendoza C, Baranda L, et al. Proportions of several types of plasma and urine microparticles are increased in patients with rheumatoid arthritis with active disease. *Clin Exp Immunol.* 2015;180: 442-451.
196. Waikar SS, Curhan GC, Wald R, McCarthy EP, Chertow GM. Declining mortality in patients with acute renal failure, 1988 to 2002. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006;17:1143-50).
197. Walker JD, Maier CL, Pober JS. Cytomegalovirus-infected human endothelial cells can stimulate allogeneic CD4+ memory T cells by releasing antigenic exosomes. *J. Immunol.* 2009; 182: 1548-59.
198. Ware K, Brodsky P, Satoskar AA, Nadasdy T, Nadasdy G, Wu H, Rovin BH, Bhatt U, Von Visger J, Hebert LA, Brodsky SV. Warfarin-

- related nephropathy modeled by nephron reduction and excessive anticoagulation. *J Am Soc Nephrol.* 2011; 22, 1856–1862.
- 199.** Ware K, Qamri Z, Ozcan A, Satoskar AA, Nadasdy G, Rovin BH, Hebert LA, Nadasdy T, Brodsky SV. N-acetylcysteine ameliorates acute kidney injury but not glomerular hemorrhage in an animal model of warfarin-related nephropathy. *Am J Physiol: Ren Physiol.* 2013; 304, F1421–F1427.
- 200.** Wei Q, Dong Z. Mouse model of ischemic acute kidney injury: technical notes and tricks. *Am J Physiol. Ren Physiol.* 2012; 303, F1487–F1494.
- 201.** Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, Nugent K. Cisplatin nephrotoxicity: a review. *Am. J. Med. Sci.* 2007; 334, 115–124.
- 202.** Yilmaz HR, Iraz M, Sogut S, et al. The effects of erdosteine on the activities of some metabolic enzymes during cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Res.* 2004; 50:287–90.
- 203.** Yildirim Z, Sogut S, Odaci E, et al. Oral erdosteine administration attenuates cisplatin-induced renal tubular damage in rats. *Pharmacol Res.* 2003; 47:149–56.

204. Yu Y, Jin H, Holder D, Ozer JS et al. Urinary biomarkers trefoil factor 3 and albumin enable early detection of kidney tubular injury. *Nat. Biotechnol.* 2010;28, 470–477.
205. Zahra S, Anderson JA, Stirling D and Ludlam CA. Microparticles, malignancy and thrombosis. *Br. J. Haematol.* 2011; 152, 688–700.
206. Zhang GH, Ichimura T, Wallin A, Kan M, Stevens JL. Regulation of rat proximal tubule epithelial cell growth by fibroblast growth factors, insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta, and analysis of fibroblast growth factors in rat kidney. *Journal of Cellular Physiology.* 1991; 148:295–305.
207. Zhou H, Yuen PS, Pisitkun T, Gonzales PA, Yasuda H, Dear JW, Gross P, Knepper MA, Star RA. Collection, storage, preservation, and normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery. *Kidney Int.* 2006;69:1471-6.
208. Zini S, Masdehors P, Lenkei Z, Fournie-Zaluski MC, Roques BP, Corvol P, et al. Aminopeptidase A: distribution in rat brain nuclei and increased activity in spontaneously hypertensive rats. *Neuroscience.* 1997; 78:1187e 93. doi:10.1016/S0306-4522(96)00660-4.

209. Zwaal RF, Schroit AJ. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood*. 1997; 89(4):1121-1132.
210. Zuk A, Bonventre JV, Brown D, Matlin KS. Polarity, integrin, and extracellular matrix dynamics in the postischemic rat kidney. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 1998; 275:C711-31.