



EVALUACIÓN DE DIFERENTES MARCADORES DE
FIBROSIS RENAL EN LA PROGRESIÓN DEL DAÑO
RENAL AGUDO A ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA

EVALUATION OF DIFFERENT RENAL FIBROSIS
MARKERS IN THE PROGRESSION FROM ACUTE KIDNEY
INJURY TO CHRONIC KIDNEY DISEASE

GRADO EN BIOLOGÍA
FACULTAD DE BIOLOGÍA

Paula F. García-Cruces Collado
20TFG318

En Salamanca a 8 de Junio de 2020, curso académico 2019/2020

ÍNDICE

RESUMEN.....	0
ABSTRACT	0
PALABRAS CLAVE.....	1
KEY WORDS	1
LISTA DE ABREVIATURAS	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Daño renal agudo (DRA)	2
1.1.1 Tipos de DRA.....	2
1.2 Transición de daño renal agudo a enfermedad renal crónica (ERC).....	4
1.3 Enfermedad renal crónica.....	6
1.3.1 Causas y mecanismos que desencadenan la ERC	7
1.3.2 Papel del colágeno en la ERC	9
1.4 Consecuencias de la pérdida de la función renal (manifestaciones clínicas)	9
2. OBJETIVOS.....	11
2.1 Objetivo general	11
2.2 Objetivos específicos.....	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1 Materiales	12
3.2 Métodos.....	12
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
4.1 Datos colágeno I riñones izquierdos y derechos D20.....	23
4.2 Datos colágeno I riñones izquierdos y derechos D56.....	24
4.3 Datos Fibronectina riñones izquierdos y derechos D20	25
4.4 Datos Fibronectina riñones izquierdos y derechos D56	26
4.5 Comparación de la evolución de la expresión de colágeno I y fibronectina en el grupo de triple daño (CDDP5-IR/60-IR/60).....	27
5. BIBLIOGRAFÍA.....	29

RESUMEN

Las enfermedades renales suponen en la actualidad una frecuente causa de muerte, además de ocupar gran parte del presupuesto anual de Sanidad, principalmente en los tratamientos de diálisis y trasplante. Cabe destacar la enfermedad renal crónica (ERC) en la que se produce una disminución lenta e irreversible de la función renal, pudiendo llegar a la pérdida completa del órgano. Esta enfermedad aparece tras sucesivos daños reversibles en el riñón, calificados como daño renal agudo (DRA) en sus tres posibles formas (pre-renal o funcional, renal o parenquimatoso y post-renal u obstructivo) en este estadio la enfermedad es relativamente fácil de tratar, sin embargo el problema radica en la ausencia de síntomas y signos que alerten de la presencia de un daño. Todo este proceso de transición hacia la enfermedad crónica conlleva un fuerte proceso de fibrosis acompañado de una retahíla de síntomas que representan los daños consecuencia de ello. En este trabajo se estudian dos proteínas; fibronectina y colágeno tipo I ambas son moléculas producidas por la matriz extracelular de diferentes tipos celulares en condiciones fisiológicas y de manera aberrante en situaciones patológicas como la que se estudia. El objetivo de este trabajo recae en determinar si estas proteínas pueden catalogarse como posibles marcadores de fibrosis renal.

ABSTRACT

Kidney diseases are currently a frequent cause of death, in addition to occupying a large part of the annual health budget, mainly in dialysis and transplant treatments. It is worth highlighting chronic kidney disease (CKD) in which there is a slow and irreversible decrease in kidney function, leading to complete organ loss. This disease appears after successive reversible damage to the kidney, known as acute kidney injury (AKI) in its three possible forms (pre-renal or functional, renal or parenchymal and post-renal or obstructive) at this stage the disease is relatively easy to heal. However, the problem lies in the absence of symptoms and signs that warn of the presence of damage. All this process of transition to chronic disease involves a strong process of fibrosis accompanied by a string of symptoms that represent the damages resulting from it. In this project two proteins are studied; Fibronectin and type I Collagen, both molecules are produced by the extracellular matrix of different cell types under physiological conditions and aberrantly in pathological situations such as the one under study. The aim of this project lies in determining if these proteins can be classified as possible markers of renal fibrosis.

PALABRAS CLAVE

Daño Renal Agudo (DRA), Enfermedad Renal Crónica (ERC), fibrosis, colágeno I, fibronectina

KEY WORDS

Acute Kidney Injury (AKI), Chronic Kidney Disease (CKD), fibrosis, collagen I, fibronectin

LISTA DE ABREVIATURAS

ABS: Albúmina Bovina Sérica

AINE: Antiinflamatorios No Esteroideos

CDDP5: Cisplatino dosis 5mg/kg

CTRL: Control

DRA: Daño Renal Agudo

EEM: Error Estándar de la Media

ERA: Enfermedad Renal Aguda

ERC: Enfermedad Renal Crónica

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato Deshidrogenasa

IECA: Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina

I/R60': Isquemia con Reperfusión durante 60 minutos

MEC: Matriz Extracelular

OMS: Organización Mundial de la Salud

O UU: Obstrucción Ureteral Unilateral

SBF: Suero Bobino Fetal

SHAM: Cirugía simulada

TFG- β 1: Factor de Crecimiento Transformante β 1

TFG: Tasa de Filtración Glomerular

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos

VEGF: Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular

WB: Western Blot

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades renales presentan especial importancia a nivel mundial debido a su gran impacto sobre la salud de las personas, convirtiéndose en una importante causa de mortalidad. Recientes estudios hablan de que algunas enfermedades renales como la enfermedad renal crónica, de la que hablaremos más adelante, afecta a uno de cada siete adultos en España, teniendo una prevalencia mayor de la esperada y que va a la par con la observada en países como Estados Unidos.¹

Un estudio en 2013 del Estudio de la Carga Global de las Enfermedades estimó que 956.200 del total de las muertes a nivel mundial se atribuían directamente a las enfermedades renales en sus últimos estadios, además en este mismo año se le atribuyó el puesto número 19 dentro de las mayores causas de mortalidad², lo que nos indica la importancia de continuar investigando nuevas formas de prevención, detección precoz y tratamiento.

Los riñones tienen un papel fundamental ya que no solo filtran sustancias tóxicas derivadas del catabolismo (principalmente productos nitrogenados orgánicos) y reabsorben agua e iones, regulando así el volumen y la composición de los líquidos internos, sino que también forman parte de la regulación endocrina de procesos esenciales para el correcto funcionamiento y la homeostasis del organismo, como son la hidratación, la presión arterial y el metabolismo del calcio.

Dos de las enfermedades renales más frecuentes se definen en función de la rapidez con la que aparecen y el tiempo que perduran (daño renal agudo y enfermedad renal crónica).

1.1 Daño renal agudo (DRA)

El **daño renal agudo (DRA)** se define como el deterioro o la disminución rápida de la función renal, observándose una elevación de la creatinina plasmática en el curso de días y es potencialmente reversible. Se estima que al menos el 10% de los pacientes hospitalizados presentan esta enfermedad, mientras que puede aparecer hasta en el 50% de los pacientes ingresados en las unidades de cuidados intensivos (UCI).³

1.1.1 Tipos de DRA

Dentro del DRA existen tres tipos en función del lugar donde se encuentra la alteración:

DRA pre-renal o funcional (50%), causa más frecuente de DRA, no hay una lesión estructural, sino que se trata de un fallo funcional, por tanto es reversible, y principalmente se origina por una hipoperfusión renal que afecta a la presión que llega al glomérulo.⁴ Esta disminución del riego sanguíneo puede ser producida por diversos factores como hipovolemia secundaria a otra afección, como por ejemplo la deshidratación o hemorragia. Estos factores pueden tener causa iatrogénica, ya que los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina II (IECAs) inhiben la síntesis de prostaglandinas y bloquean el sistema renina-angiotensina-aldosterona que regulan la función renal.^{5,6}

DRA renal o parenquimatoso (40%), en este caso si hay una causa estructural, es decir, un daño en la estructura del riñón.⁴ Las causas se dividen en tres posibles condiciones: (1) alteraciones vasculares que provocan lesión en los capilares glomerulares, (2) afecciones que dañan el epitelio tubular renal (p.ej. necrosis tubular), la más frecuente y por último (3) daños en el intersticio renal (tejido conectivo compuesto por células que producen su matriz extracelular, dando soporte a las diferentes estructuras que conforman los riñones). Esta clasificación hace alusión a los sitios donde se produce la alteración o daño inicial, sin embargo, se ha observado que el daño puede comenzar en un punto y acabar afectando al resto de estructuras.^{5,6}

DRA post-renal u obstructivo (10%), alteración retrógrada de la función renal, impidiendo el correcto filtrado o la excreción de orina causado por una obstrucción.⁴

- Obstrucción intratubular

Una de las principales causas es la diabetes ya que en estos enfermos se produce la acumulación de glucosa en las paredes de la arteria eferente del glomérulo, provocando el estrechamiento de la luz del vaso y la rigidez de este, un proceso denominado arterioesclerosis hialina. Todo ello crea una obstrucción que dificulta la salida de la sangre filtrada por la nefrona, de manera que esta retorna al glomérulo aumentando la presión y dándose hiperfiltración. Las células mesangiales presentes para dar soporte al glomérulo, responden con un aumento en la producción de matriz extracelular (MEC), lo cual aumenta el tamaño del glomérulo que se atrofia y pierde la función.^{6,7}

- Obstrucción ureteral

Otra de las principales causas de DRA obstructivo es la obstrucción de los uréteres que provoca un flujo retrógrado de la orina; esta, al no ser expulsada se almacena en los riñones provocando su

distensión, dando lugar al síndrome hidronefrótico. Las enfermedades de la próstata son causa frecuente de obstrucción ureteral en ancianos.^{8,9}

La obstrucción ureteral unilateral (OUU) se realiza mediante un procedimiento quirúrgico muy común, que se lleva a cabo para la obtención de modelos animales de fibrosis para experimentación.

A pesar de que esta clasificación es la que se emplea actualmente, se plantean nuevos estudios que permitan afinar más el criterio, de forma que se habla de descripciones sindrómicas más específicas en las que se tiene en cuenta dentro del diagnóstico el resto de afecciones causadas por o causantes del daño renal. Entre otras se encuentran DRA hepatorenal¹⁰, DRA cardiorenal¹¹ y sepsis asociada a DRA¹².

Ahondar en los mecanismos, causas y consecuencias de cada caso, permitirá obtener un sistema de personalización del tratamiento para dispensar al paciente el tratamiento individualizado que más se adecue a su situación.

1.2 Transición de daño renal agudo a enfermedad renal crónica (ERC)

Algunos autores denominan a esta transición enfermedad renal aguda (ERA), pero por el momento no existen evidencias que clarifiquen y definan cuando se produce la transición de DRA a ERC y cuáles son los mecanismos que participan, por ello se ha llegado a un consenso que estipula que cuando la TFG se mantiene por debajo de 60 ml/min/1.73 m² durante un periodo superior a tres meses se puede hablar de ERC.¹³

Se han propuesto una serie de mecanismos que, de manera conjunta, pueden ser los responsables de esta transición; la pérdida de nefronas causada por la hipertrofia glomerular (entre otras causas), lesión del endotelio con rarefacción vascular e hipoxia, que induce la liberación de factores que provocan inflamación del tejido y activación de fibroblastos, provocando la acumulación de tejido fibrótico, desencadenando un proceso anormal de reparación de los tejidos que han sufrido una lesión, además se producen cambios epigenéticos en los ciclos celulares de las células que conforman los epitelios.^{14,15} Por ello se cree que la hipoxia y el proceso de fibrosis, en el que se comienza a sustituir el tejido funcional por tejido fibrótico, son los mecanismos realmente importantes en la progresión de la enfermedad renal.

Cuando se produce la pérdida irreversible de la función de algunas nefronas, las que permanecen funcionales comienzan a recibir mayor cantidad de flujo como mecanismo de compensación, ocurriendo lo que se denomina hiperfiltración glomerular, de forma que la tasa de filtración glomerular (TFG) aparentemente se mantiene similar a la TFG de una persona sana. Este exceso de función lleva finalmente a la esclerosis de los glomérulos, perdiéndose así la función de dicha nefrona. Este ciclo continúa hasta que se van perdiendo progresivamente el resto de nefronas, dando lugar a una disminución de la TFG, hasta llegar a la pérdida total de la función renal.^{6,16}

Uno de los principales problemas de esta enfermedad, recae en que la progresión a ERC cursa en la mayoría de los casos de manera asintomática, debido a que el principal parámetro que se emplea como diagnóstico en clínica, la creatinina plasmática, vuelve a retornar a sus valores normales a pesar de que pueda seguir habiendo algún tipo de lesión renal. Lo cual hace pensar que el riñón se ha recuperado, pero lo que puede estar ocurriendo es una transición hacia algo peor.^{6,16}

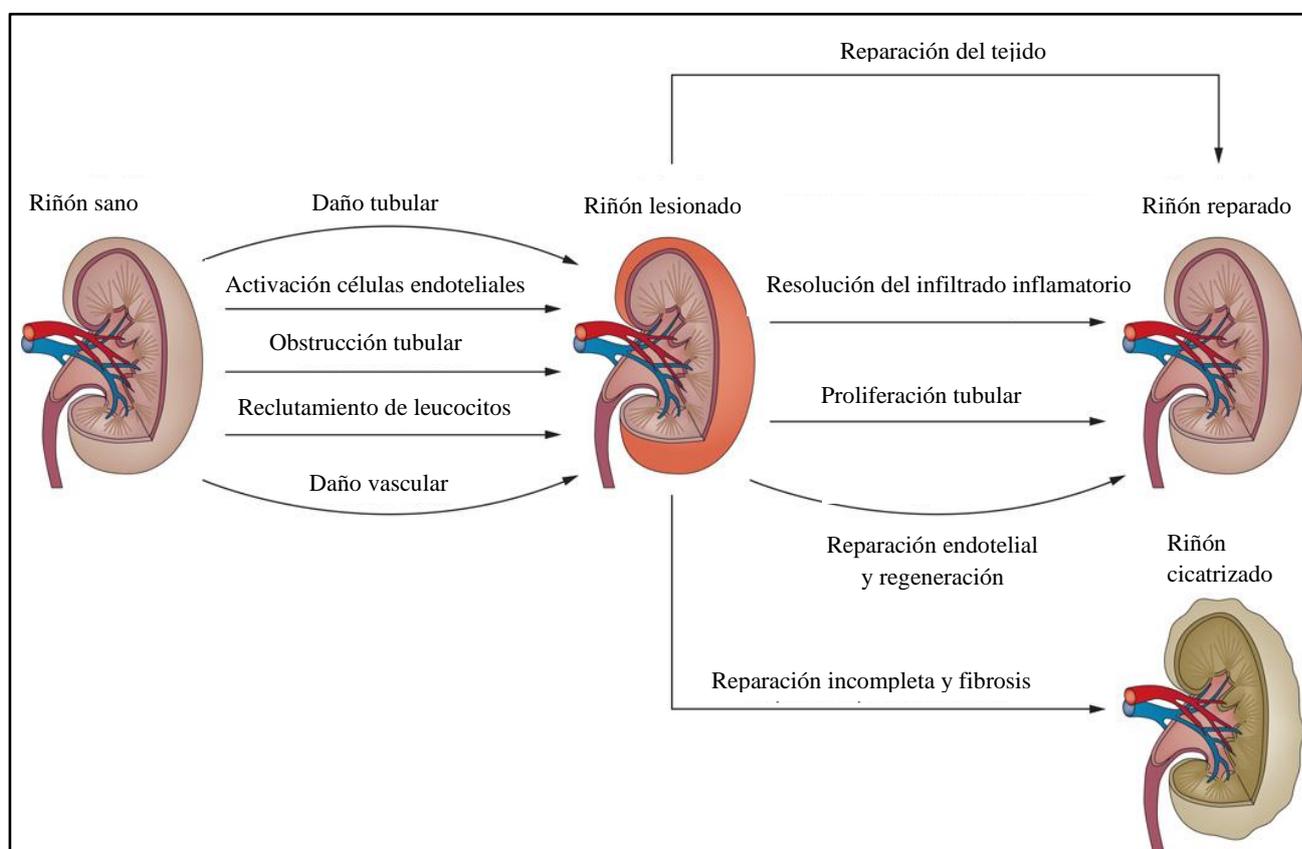


Figura 1: Mecanismos de reparación maladaptada tras un DRA desencadenando el envejecimiento prematuro del riñón dando lugar a ERC (traducido y adaptado de Ferenbach y Bonventre, 2015).

En esta imagen, se representan algunos de los mecanismos que están involucrados en la lesión inicial del tejido, que posteriormente podrá ser reparado, recuperando así su funcionalidad. En caso de que

se lleve a cabo una reparación incompleta o una maladaptación, se desarrollará un proceso fibrótico que desencadenará una ERC.¹⁶

1.3 Enfermedad renal crónica

La ERC se define como la pérdida lenta e irreversible de la función renal caracterizada principalmente por una disminución de la TFG aproximadamente inferior a 60 ml/min/1.73 m² durante un periodo de tiempo de al menos tres meses.¹³

La ERC comúnmente está asociada a otras enfermedades, como la enfermedad cardiovascular y la diabetes, y se asocia a un mayor riesgo de mortalidad. Esta enfermedad ha aumentado su prevalencia en las últimas décadas, convirtiéndose en un problema de salud pública de interés mundial. A pesar de que estas dos son las causas más frecuentes, existen otras como la vasculitis renal, glomerulonefritis infecciosa, alteraciones genéticas, obstrucción ureteral y enfermedades autoinmunes, que también son causantes de ERC.¹⁷

En España, se estima que entre el 9 y el 10% de la población presenta esta enfermedad y de ellos aproximadamente el 1% (más de 50000 personas) se encuentra en la fase terminal que requiere diálisis y/o trasplante de riñón, lo cual reduce drásticamente la esperanza de vida del paciente, y además suponen unos de los tratamientos más caros de los sistemas públicos de salud.¹⁸

Según la OMS, se estima que ésta junto con el resto de patologías crónicas supone el 75% del gasto sanitario, calculándose que cada tratamiento de hemodiálisis tiene un coste medio anual por paciente de 46.659,83€ y el coste medio anual de un paciente en diálisis peritoneal es de 32.432,07€. De esta forma, el tratamiento de la ERC en todos sus estadios supone un 3% del presupuesto anual de salud que se prevé en aumento debido a la elevada esperanza de vida de los españoles y de los habitantes de los países de nuestro entorno socioeconómico, dando lugar a una población cada vez más envejecida y con más enfermedades crónicas.¹⁹

La prevalencia de la ERC se estima creciente debido, en parte, al aumento de prevalencia de otras enfermedades asociadas a esta, como la diabetes o la hipertensión y a la elevada esperanza de vida de los españoles, de forma que la prevalencia de la ERC aumenta hasta un 22% en mayores de 64 años y hasta un 40% en mayores de 80 años¹⁸, lo cual marca la importancia de continuar investigando para encontrar nuevas y mejores formas de detección precoz.

1.3.1 Causas y mecanismos que desencadenan la ERC

Una de las causas más comunes de ERC es la hipoxia desencadenada por hipertensión. En situación de hipertensión, las paredes de las arterias que irrigan el riñón comienzan a engrosarse para resistir la fuerza que ejerce la sangre, lo que resulta en un estrechamiento del lumen y una luz del vaso más estrecha que implica menor llegada de sangre y oxígeno al riñón, pudiendo llegar a darse una situación de hipoxia en el tejido. Otra de las causas principales de hipoxia renal ocurre cuando el riñón está sufriendo un daño agudo y se produce la rarefacción de los capilares inducida por la disminución de factores de crecimiento vascular, como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) o por el desprendimiento de los pericitos.^{20,21}

La falta de oxígeno comienza a provocar daños e incluso la apoptosis de células epiteliales tubulares, la activación de fibroblastos y desencadenamiento de reacciones inflamatorias debido al reclutamiento de células sanguíneas en respuesta a diferentes estímulos. Todos estos factores convergen en un proceso de fibrosis túbulo intersticial, que a su vez agrava la falta de oxígeno; de esta forma, se dice que la fibrosis túbulo intersticial y la hipoxia conforman un círculo vicioso que desencadena la aparición de ERC.²²

En esta situación, determinados tipos celulares como los macrófagos m1 y los neutrófilos, comienzan a dañar el glomérulo, a inducir la apoptosis celular y a secretar factores de crecimiento, que van a inducir la desdiferenciación de las células mesangiales a estados más inmaduros, los mesangioblastos que comenzarán a producir en exceso proteínas de la MEC, lo cual nos lleva al siguiente mecanismo desencadenante de la enfermedad renal crónica: la fibrosis renal.²²

La fibrosis se puede definir como la acumulación de proteínas procedentes de la MEC, resultado de una recuperación anormal o cicatrización defectuosa frente a una lesión. La MEC es un entramado de moléculas principalmente estructurales y de adhesión, entre las que se encuentran: polisacáridos como los proteoglicanos, glucosaminoglicanos y glicoproteínas y proteínas como colágeno (tipo I, tipo III y tipo IV), elastina, fibronectina y laminina.²³

En riñones sanos no se observa la presencia de miofibroblastos, sin embargo si se encuentran sus precursores, los fibroblastos (tipo celular presente en el tejido conectivo, cuya función principal es la de sintetizar los componentes y mantener la MEC), que aparecen en los espacios intersticiales y comenzarán a multiplicarse en respuesta a un estímulo, principalmente el factor de crecimiento

transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)^{24,25} hasta transformarse en miofibroblastos que serán los responsables principales del proceso de fibrosis junto con las células tubulares epiteliales que se transforman en células mesenquimales²⁶, que darán lugar al tejido conectivo. Recientemente se ha visto que los pericitos constituyen una de las fuentes principales de miofibroblastos; la activación de los pericitos hace que estos migren hacia el espacio intersticial, de manera que se desanclan de los capilares a los que apoyaban provocando la pérdida de los mismos. De esta forma, los pericitos libres proliferan y se transforman en miofibroblastos.²⁷

Los miofibroblastos son fibroblastos especializados que reúnen ciertas características de los fibroblastos y de las células musculares lisas. Estas células presentan un papel fundamental en los procesos de inflamación, reparación y cicatrización de los tejidos.

El continuo acúmulo de proteínas de la MEC genera cicatrices fibrosas que distorsionan la estructura del riñón, dificultando su función hasta llegar a perderla por completo.²⁸

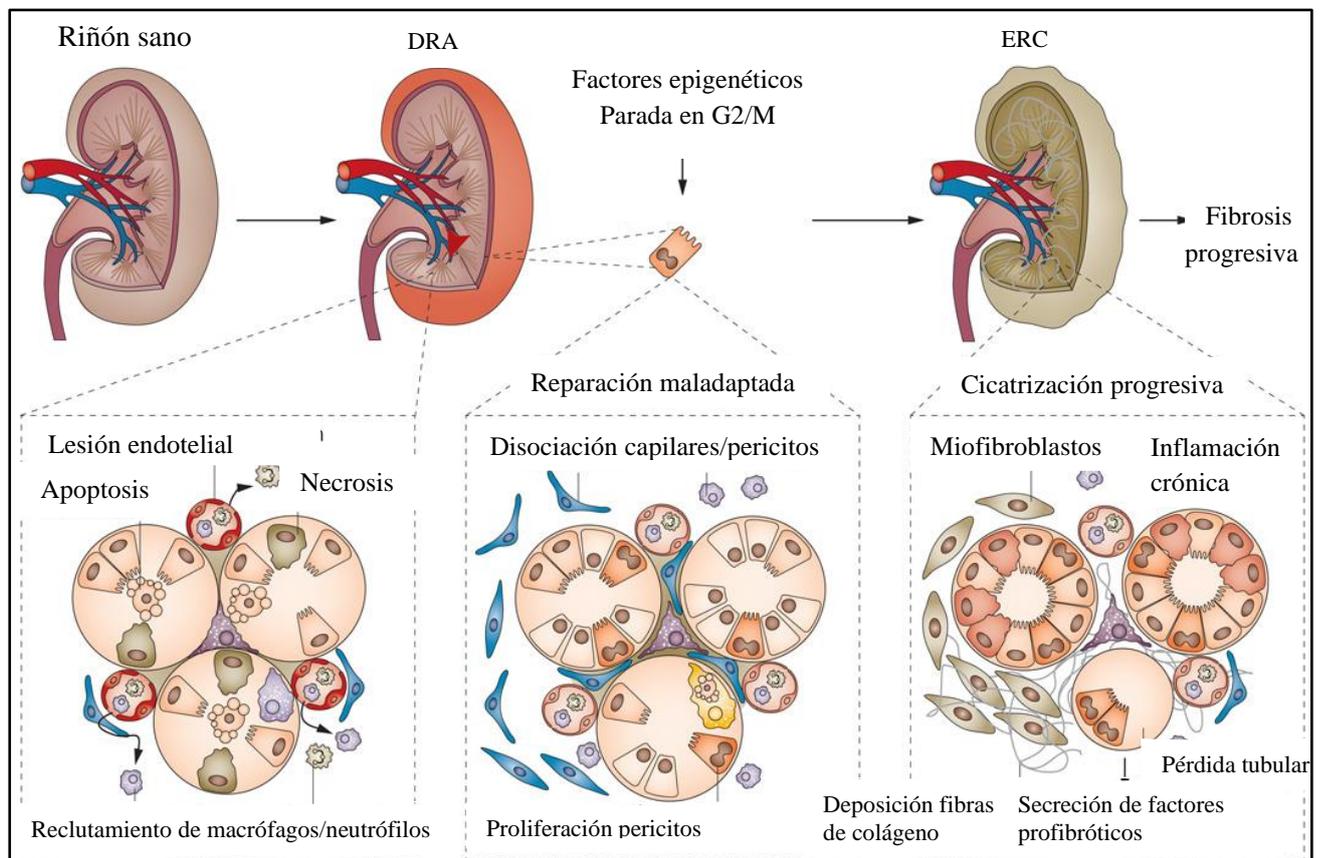


Figura 2: Mecanismos de reparación maladaptada tras un DRA desencadenando el envejecimiento prematuro del riñón dando lugar a ERC (traducido y adaptado de Ferenbach y Bonventre, 2015).

En esta imagen se puede observar cómo se va produciendo la transición y el papel que juegan los diferentes tipos celulares en este procedimiento.

Los pericitos inicialmente están adheridos al endotelio de los vasos y comienzan a despegarse, a proliferar y adquieren forma más alargada hasta convertirse en miofibroblastos. Por último, se ve como los miofibroblastos comienzan a producir MEC en la que destacan las fibras de colágeno.

La problemática de este proceso patológico de reparación del tejido en respuesta a una lesión recae en que esta situación es progresiva e irreversible, de forma que no se sustituye el tejido fibrótico por nuevas células funcionales, perdiéndose así la funcionalidad.¹⁶

1.3.2 Papel del colágeno en la ERC

Se ha observado que la proteína estructural de mayor importancia cuantitativamente en situación patológica es el colágeno de tipo I, por ello va a ser el principal protagonista de este trabajo. El colágeno tipo I promueve, junto a otros factores, la transdiferenciación epitelio-mesenquimal²⁹, un proceso en el que se produce la rotura de las uniones entre las células epiteliales que se desprenden de los túbulos, de manera que pierden su polaridad apical-basal, transformándose en fibroblastos que comienzan a sintetizar MEC favoreciendo el proceso de fibrosis. Este proceso de transdiferenciación ocurre generalmente en condiciones patológicas.³⁰

Además del colágeno tipo I, en este estudio se va a analizar la presencia de fibronectina como marcador de transición a ERC. La fibronectina es una glucoproteína que forma parte de la MEC uniéndose a otras proteínas y moléculas de adhesión para ayudar a mantener la estructura de la célula y de los tejidos. Colágeno tipo I y fibronectina son los componentes mayoritarios de la MEC sintetizada en condiciones patológicas.⁶

1.4 Consecuencias de la pérdida de la función renal (manifestaciones clínicas)

La disminución de la TFG conduce a un aumento en la retención de sodio y agua, que son excretados de manera anormal por los riñones, aumentando la presión arterial y la posibilidad de sufrir edemas, principalmente debido a un incremento en la volemia.³¹

También vamos a observar un aumento de la concentración de potasio, ya que este tampoco va a ser excretado, lo que provoca debilidad muscular y cambios en el electrocardiograma, es decir, alteraciones del ritmo cardíaco.³¹

Otra consecuencia muy común de la pérdida de función renal es la acidosis metabólica causada por la dificultad para eliminar hidrogeniones y la disminución de la amoniogénesis tubular, pudiendo llegar a la descalcificación de algunos huesos.³¹

Cuando se produce la pérdida de función de las nefronas, los riñones dejan de producir la hormona calcitriol, fundamental para el metabolismo del calcio, de manera que disminuye la reabsorción de calcio, lo que da lugar a patologías como hiperparatiroidismo secundario. El déficit de esta hormona también tiene como consecuencia la pérdida o disminución de la absorción de calcio en el intestino, lo cual lleva otras consecuencias asociadas.³¹

Además, la disminución de la TFG va a originar una disminución de la excreción de sustancias de desecho y por tanto la acumulación de las mismas en la sangre, provocando así azotemia, entre otras alteraciones.³¹

En conclusión, vista la prevalencia que tiene la ERC y la dificultad de diagnóstico, ya que no comienza a presentar signos y síntomas claros hasta estadios muy avanzados, es preciso conocer y comprender el periodo de transición de DRA a ERC con el fin de obtener métodos de diagnóstico precoz, de manera que no se permita la progresión hacia la enfermedad crónica pudiendo así impedir el desarrollo de la enfermedad. Visto además que la fibrosis constituye uno de los mecanismos etiológicos más importantes que desencadenan la ERC, en este trabajo se estudia y evalúa la presencia de algunas moléculas que componen la MEC en el curso de la transición a la enfermedad, con el fin de analizar la evolución temporal de marcadores de fibrosis renal.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

El objetivo general de este Trabajo de Fin de Grado es el estudio de la evolución temporal de marcadores de fibrosis tisular que permitan caracterizar la transición de DRA a ERC.

2.2 Objetivos específicos

- Evaluación de la expresión de colágeno tipo I como marcador de evolución temporal de fibrosis renal en la transición de DRA a ERC.
- Evaluación de la expresión de fibronectina como marcador de evolución temporal de fibrosis renal en la transición de DRA a ERC.

Para el desarrollo de estos objetivos, hemos utilizado un modelo experimental *in vivo* de transición de DRA a ERC (que se describe a continuación, sección de *Métodos*) que combina un daño nefrotóxico (inducido por cisplatino) con otro daño inducido por isquemia/reperfusión.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

Salvo en los casos concretos en los que se indica procedencia, todos los reactivos se obtuvieron en Sigma-Aldrich (Madrid, España)

3.2 Métodos

- Modelo animal de transición DRA a ERC

Para este trabajo se utilizaron ratas Wistar macho con un peso que oscila entre 230 y 270g proporcionadas por el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca.

Estas ratas fueron sometidas a varias intervenciones experimentales para inducirles DRA: administración por vía intraperitoneal del fármaco tóxico cisplatino (CDDP)³² e isquemia con reperusión durante 60 minutos (I/R60')³³. Los animales se mantuvieron tanto en jaulas estándar en las que pueden moverse libremente, como en jaulas metabólicas, siendo estas necesarias para tomar muestras de heces y orina. Las condiciones de temperatura y humedad en las que se mantenían a los animales, al igual que el estado de salud de estos, fue controlado en todo momento según lo dispuesto en el reglamento y aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca.

El **cisplatino (CDDP)** es una de las drogas antineoplásicas más usadas en quimioterapia frente a tumores sólidos, no obstante, se ha observado que se trata de una potente nefrotoxina llegando a provocar daños renales y favoreciendo la progresión de DRA a ERC; se ha visto que en el 30% de los pacientes tratados con cisplatino se observaba algún tipo de DRA. Esto ha ocasionado que a pesar de ser un fármaco muy eficaz se deba limitar su dosis.³²

La **lesión por isquemia/reperusión** en el riñón ocurre cuando se produce una disminución repentina pero mantenida del flujo sanguíneo en el riñón lo cual ocasiona tanto la pérdida de nutrientes y oxígeno, como la dificultad para poder excretar las sustancias de desecho de la sangre. Esta lesión trae consigo estrés oxidativo e inflamación en respuesta a la hipoxia y la reperusión. Todo ello implica la pérdida transitoria de la función renal.³⁴

Se trabajó con un total de 92 ratas que han sido divididas en 9 grupos experimentales en función de las intervenciones a las que fueron sometidas. Para este proyecto hemos trabajado con cuatro grupos experimentales que se detallan a continuación (Tabla 1).

Tabla 1. Grupos experimentales.

Grupo control	CTRL-SHAM-CTRL
Grupo con un solo daño (cisplatino)	CDDP5-SHAM-CTRL
Grupo con un solo daño (isquemia)	CTRL-I/R60'-CTRL
Grupo con triple daño	CDDP5-I/R60'-I/R60'
Grupo "doble daño" *	CDDP5-I/R60'-CTRL*

CDDP5: Cisplatino dosis 5mg/Kg de peso, CTRL: control, I/R60': isquemia con reperfusión durante 60 minutos, SHAM: cirugía de simulación. Elaboración propia.

El **grupo control** recibió inyecciones de solución salina en el día 0 e intervención "sham" el día 8 en la que se simula el proceso de isquemia omitiendo el clampaje de la vena.

Al **grupo con un solo daño CDDP5** se le administró en el día 0 una dosis de CDDP5 de 5mg/kg de peso y se le sometió en el día 8 a la intervención "sham".

El **grupo con un solo daño I/R60'** recibió inyecciones de solución salina en el día 0 y se le sometió el día 8 a una intervención isquémica durante 60 minutos con reperfusión en el riñón izquierdo.

Al **grupo con triple daño** se le administró en el día 0 una dosis de CDDP5 de 5mg/kg de peso, el día 8 se le sometió a una intervención isquémica durante 60 minutos con reperfusión en el riñón izquierdo y el día 25 se le sometió a una intervención isquémica durante 60 minutos con reperfusión en el riñón derecho.

El día 20 y día 56 se sacrificaron algunas ratas para la extracción de sus riñones.

- Administración del fármaco

La administración tanto de las diferentes dosis de CDDP como de suero salino se llevan a cabo por vía intraperitoneal. El mismo día que se va a realizar la administración, se debe preparar el fármaco y calcular las dosis, para ello se debe pesar de manera individual cada rata para poder así establecer la dosis adecuada en cada caso.

* Dado que el primer sacrificio se llevó a cabo el día 20, las ratas del grupo triple daño todavía no habían sido sometidas a la segunda isquemia en el riñón derecho, por ello en los análisis del día 20 se van a considerar como grupo de doble daño.

- **Isquemia con reperfusión**

Para llevar a cabo este tipo de intervención los animales son anestesiados con una mezcla de ketamina/xilacina en una dosis de 80/10 mg por Kg de peso, por vía intraperitoneal. Desde el momento en que el animal es anestesiado se mantiene sobre una manta térmica a 37° para evitar que baje su temperatura corporal. Este anestésico debe ser preparado el mismo día de la intervención. La intervención se lleva a cabo realizando una incisión en la línea alba para localizar y aislar el riñón y en concreto su pedículo vascular, que se clampará durante 60 minutos para impedir el flujo sanguíneo. Transcurrido este tiempo se procede a realizar la reperfusión, para ello se libera el clampaje pudiéndose observar como el riñón retorna a su color característico.

- **Preparación de muestras y extracción de proteínas**

Tras el sacrificio se han almacenado los riñones en formol y se han procesado siguiendo un protocolo para la extracción de proteínas: para ello se golpean los riñones previamente congelados a una temperatura de -80° con un martillo y se pesan, todo ello en hielo seco para evitar que se deteriore el tejido.

Para la preparación del tampón de lisis se prepara un stock inicial de tampón que se deberá dejar reposar antes de añadirle los inhibidores. La composición para 100mL de preparado consta de: 4,7mL de NaCl 3M, 2mL de EDTA 0,5M, 10mL de Glicerol, 1mL de IGEPAL CA-630, 2mL de Tris 1M pH7,5 y agua MQ hasta enrasar. Aproximadamente 24 horas después, una vez que haya reposado el tampón de lisis, se añade un preparado de inhibidores de proteasas y fosfatasa compuesto por: 1mL de leupeptina 1mg/mL, 200µL de aprotinina 1mg/mL, 1mL de PMSF 100mM, 5mL NaF 0,5M y 1mL de Na₃VO₄ 100mM. Esto se debe hacer justo en el momento de uso ya que los inhibidores de proteasas y fosfatasa se degradan con rapidez.

Se tomaron aproximadamente 100µg de cada riñón depositados en tubos *ependorf* previamente etiquetados y para dicha cantidad de tejido se añadieron 1000µl de la solución de tampón de lisis junto con los inhibidores preparada antes de la extracción y mantenida en nevera a 4°C. En cualquier parte del procedimiento en la que esté implicado el tejido se debe realizar en hielo seco por el motivo ya descrito.

Para proceder a la extracción de proteínas en los propios tubos *ependorf* se homogenizan las muestras con el homogeneizador Kinematica Polytron PT 1300D Fisher scientific. Una vez homogeneizadas todas las muestras se centrifugan a 21.000 g y 4°C durante 15 minutos. Después se recoge el sobrenadante.

De estas muestras se han obtenido alícuotas que fueron almacenadas a -20°C para su inmediata utilización, mientras que la parte restante de las muestras se almacenaron a -80°C .

- **Técnica colorimétrica de valoración de proteínas según el método Lowry**

Se realizó la técnica de detección de proteínas por el método Lowry con el fin de determinar la concentración de proteínas de cada muestra y hacer las diluciones necesarias para tener la misma concentración de proteínas en todas las muestras ($50\mu\text{g}$). Se hizo una recta patrón o de calibrado de 9 puntos con concentraciones crecientes partiendo de un blanco, a partir de una solución estándar de albúmina bovina sérica (ABS) (2mg/ml), de manera que la concentración de cada una de las muestras se extrapola de los valores de absorbancia frente a concentración de la recta patrón.

- **Técnica semicuantitativa de detección de proteínas Western Blot (WB)**

Se ha realizado la técnica de WB según protocolo de la casa comercial Bio Rad (Madrid, España) para evaluar dos posibles marcadores de fibrosis; colágeno de tipo I y fibronectina.

Ha sido necesario añadir ciertas modificaciones en el procedimiento para llevar a cabo esta técnica según dicho protocolo, ya que el protocolo “estándar” no nos permitía identificar correctamente la banda de colágeno debido a la inestabilidad de esta molécula.

- **Modificaciones WB de colágeno I**

Debido a la inestabilidad de la molécula de colágeno I, se emplearon condiciones no desnaturizantes y no reductoras, de forma que se utilizó un tampón de carga 4X compuesto por 1mL de glicerol al 40%, $0,5\text{mL}$ de azul de bromofenol al 0,05%, $2,5\text{mL}$ de SDS al 8% y $0,2\text{mL}$ de β -mercaptoetanol. Sin embargo, para realizar esta técnica omitimos el β -mercaptoetanol, ya que se trata de un compuesto que actúa como agente reductor de los puentes disulfuro, de manera que facilita la desnaturización y el desplegado completo de las proteínas. Además de omitir este compuesto en el tampón de carga, no se calentaron las muestras antes de cargarlas, dado que el anticuerpo primario (Collagene 1 Abcam ab34710 dilución 1:1000 1% en una solución de ABS diluida en agua MQ, suero bovino fetal (SBF) y Tween (tensioactivo utilizado como detergente)) reconoce un epítipo en la estructura terciaria del colágeno y su estabilidad térmica es de aproximadamente 10°C , por ello siempre se debían mantener las muestras en hielo y evitar el contacto con sustancias reductoras que alteren la estructura terciaria de la proteína.

- **WB de colágeno tipo I**

En un principio iniciamos los experimentos utilizando geles de electroforesis manufacturados en el laboratorio con reactivos de Bio Rad, de manera que obteníamos geles de 10 pocillos. Los geles se colocan en la cubeta y son cubiertos con tampón de electroforesis, cuya composición para 1L consta de: 100mL de reactivo 10X TG (Tris Glicina), 5mL de SDS 20% y agua MQ hasta enrasar. Para llevar a cabo la transferencia se utilizaron membranas de nitrocelulosa de Bio Rad, que deben ser previamente activadas sumergiéndolas 1 minuto en metanol puro y después en tampón de transferencia casero, cuya composición para 1L consta de: 100mL de tampón de electroforesis 10X (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0.1% SDS, pH 8,3), 200mL de metanol puro y 700mL de agua MQ. Una vez activadas se procede a realizar la transferencia en húmedo, durante la noche, con agitador para evitar que el tampón de transferencia precipite, cubierto por hielo y en cámara fría a 4° para mantener la estabilidad del colágeno y evitar que se calienten las membranas. Una vez finalizada la transferencia, las membranas son bloqueadas con una solución de ABS diluida en agua MQ, Tween y SBF al 5% durante aproximadamente 6 horas en cámara fría y agitación oscilante. Después de la transferencia se incuba la membrana con el anticuerpo primario durante la noche y posteriormente 1 hora con el anticuerpo secundario (Goat anti-rabbit IgG SouthernBiotec 4052-05 dilución 1:10000 3% en una solución de ABS diluida en agua MQ, SBF y Tween).

A pesar de que esta técnica comenzaba a dar buenos resultados se empezó a probar con geles comerciales de Bio Rad 4%-20% Criterion™ TGX Stain-Free™ Gels y con transferencia en húmedo con las mismas condiciones. El motivo de usar geles comerciales con tecnología *Stain free* es que estos presentan en su composición compuestos trihalo (2,2,2-Trichloroethanol) que se unirán de manera covalente a los residuos de triptófano presentes en las proteínas cuando son expuestos a luz UV en el ChemiDoc™ MP Imager, un sistema de imagen para detectar fluorescencia e irradiación. El resultado de estas uniones al triptófano tras la excitación va a emitir fluorescencia, lo que facilita la visualización y cuantificación de las proteínas totales que se han separado en cada carril, tanto en el propio gel como en la membrana después de la transferencia de las proteínas, sin necesidad de hacer tinciones y antes de la incubación con los anticuerpos.³⁵

Con este método, solo se pueden visualizar las proteínas que contengan al menos un residuo de triptófano, sin embargo, diversos estudios afirman que al menos el 90% de las proteínas en los diferentes tejidos de un organismo van a contener triptófano.³⁶

Por otro lado, el colágeno no presenta residuos de triptófano en su estructura, de manera que no se va a visualizar con este método, no obstante ello no es un problema ya que la banda de colágeno va a poder visualizarse cuando sea incubada la membrana con los anticuerpos primario y secundario.

Se ha observado que este método *Stain free* no altera la composición de las proteínas, ni la capacidad de unión a los anticuerpos, sin embargo pudimos observar que la fotoactivación del gel dificulta la transferencia de las proteínas desde el gel a la membrana, siendo necesario emplear más horas para que se pudiera completar la transferencia; por otro lado, tras tantas horas en la cámara fría, los geles comerciales tendían a encogerse.

Viendo que esta técnica nos daba ciertos problemas y además requería varias horas, hicimos la transferencia con el aparato Trans-Blot® Turbo™ Transfer System de Bio Rad. Este tipo de transferencia dura tan solo 7 minutos y se lleva a cabo en seco, pero somete a la membrana a temperaturas muy elevadas, por ello llevamos a cabo una transferencia durante 9 minutos en la que cada 2 minutos la interrumpíamos para enfriar la membrana y las placas del Trans Blot con tampón de transferencia comercial cuya composición para 0'5L es de: 100mL de Trans-Blot turbo 5X Transfer Buffer, 100mL de metanol puro y 300mL de agua MQ. El bloqueo de las membranas y la incubación con los anticuerpos primario y secundario se mantuvo igual. Con estas variaciones consideramos la técnica de WB adaptada a las necesidades de este trabajo.

Todos los estudios de WB se llevaron a cabo comparando los resultados obtenidos en las diferentes muestras frente a una recta de regresión realizada con una muestra de un lisado de tejido obtenido en un modelo experimental de OUU (descrito en apartado *Introducción*) con cuatro puntos de concentraciones decrecientes (1:1, 1:2, 1:4 y 1:8), siendo el punto 1:1 además el control positivo.

- **WB de fibronectina**

Los WB para detectar fibronectina se realizaron según el protocolo de la casa comercial Bio Rad sin introducir modificaciones, de manera que se emplearon condiciones reductoras y desnaturizantes, es decir, se utilizó tampón de carga con β -mercaptoetanol y se calentaron las muestras para desnaturizar las proteínas y lograr que se muestre un epítipo de la estructura primaria que es reconocido por el anticuerpo primario para fibronectina (Fibronectina Abcam, ab2431, 1:1000 1% en ABS SBF-Tween). El anticuerpo secundario que se utilizó en este caso es el mismo que para el colágeno I (Goat f(AB')₂ anti-rabbit IgG(H+L)H/M ads SouthernBiotec 4052-051:10000 3% en una solución de ABS diluida en agua MQ, SBF y Tween).

En este caso también se realizaron interrupciones cada 2 minutos durante la transferencia ya que se observó que, aunque no afectaba a la estructura de la proteína, las membranas se veían más limpias.

- **Análisis semicuantitativo de los WB con el programa *Image Lab***

Con el programa *Image Lab 6.0.1 software* (Bio Rad) se llevaron a cabo dos tipos de análisis:

Análisis de la absorbancia extrapolando los valores de concentración a partir de la recta de regresión (Figura 3). Cuando se procede a cuantificar las bandas es muy importante tener en cuenta dos factores; la corrección del ruido de fondo y verificar que no se haya llegado al rango de saturación, porque en esta circunstancia el valor de las medidas no será fiable ya que llegado el punto de saturación los valores por encima de éste no serán detectados, de esta forma no se podrá apreciar la diferencia entre los valores más bajos y los valores más altos. Esta medida se lleva a cabo en el ChemiDoc™ MP Imager que nos va a detectar la quimioluminiscencia emitida. Esto se realiza después de haber incubado las membranas con los anticuerpos primario y secundario durante el tiempo y de la forma ya descritos. Por último, se incubará durante un minuto la membrana con ECL, un sustrato quimioluminiscente basado en luminol que, junto con peróxido de hidrógeno Sigma H6520 al 3%, se une al anticuerpo secundario emitiendo fluorescencia y permitiéndonos ver las proteínas en forma de banda.

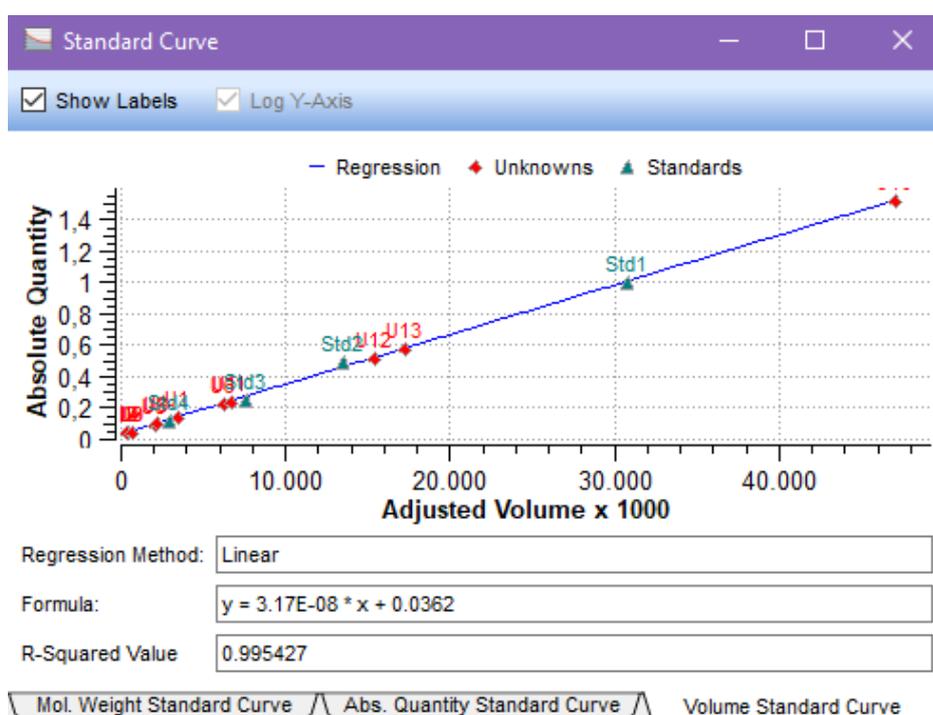


Figura 3: Recta de regresión obtenida mediante el programa *Image Lab*. Elaboración propia.

Análisis de la cantidad de proteínas totales en cada carril: para llevar a cabo este tipo de cuantificación es imprescindible que, una vez finalizada la electroforesis y antes de realizar la transferencia, el gel, que estará después en contacto con la membrana en la transferencia, haya sido previamente activado durante 5 minutos en ChemiDoc™ MP Imager para lograr excitar los residuos de triptófano presentes en las proteínas que se unirán covalentemente a los compuestos trihalo presentes en el gel, lo que, como ya se ha explicado en el apartado anterior *WB de colágeno tipo I*, emitirá una fluorescencia que será captada por el visualizador, lo que nos va a permitir observar las proteínas totales de cada carril. La membrana también será activada previamente durante 1 minuto con metanol puro.

Se toma una imagen de la membrana una vez finalizada la transferencia, donde se van a observar las proteínas totales que se han separado a lo largo de cada carril, gracias a la fotoactivación que habíamos hecho del gel (Figura 4). Cuando ya tenemos esta imagen, procedemos a incubar la membrana con los anticuerpos correspondientes y por último con ECL y peróxido de hidrógeno. En este momento obtendremos una imagen en la que se ha captado la quimioluminiscencia emitida en forma de bandas (Figura 5).



Figura 4: Imagen Stain free Blot tomada con ChemiDoc™ MP Imager después de realizar la transferencia. Elaboración propia.

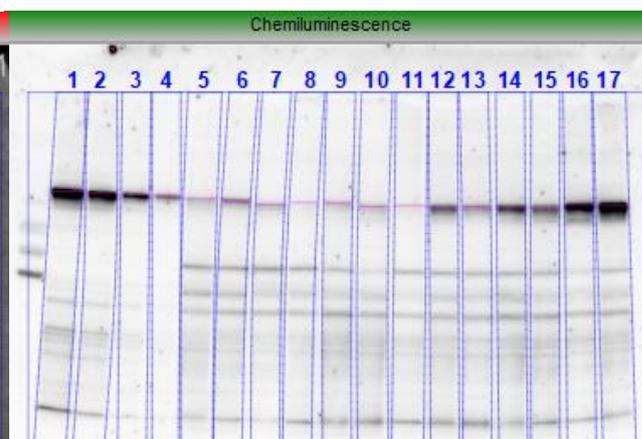


Figura 5: Imagen Chemiluminescence tomada con ChemiDoc™ MP Imager después de incubar la membrana con los anticuerpos primario y secundario. Elaboración propia.

Empleando la herramienta *Image Lab 6.0.1 software* (Bio Rad) se van a superponer estas dos imágenes creando lo que se denomina una *multichannel image* (Figura 6), en la que se encuentran superpuestas la imagen que habíamos obtenido de las proteínas totales en cada carril junto con la imagen de las bandas que corresponden a la proteína que estamos buscando.

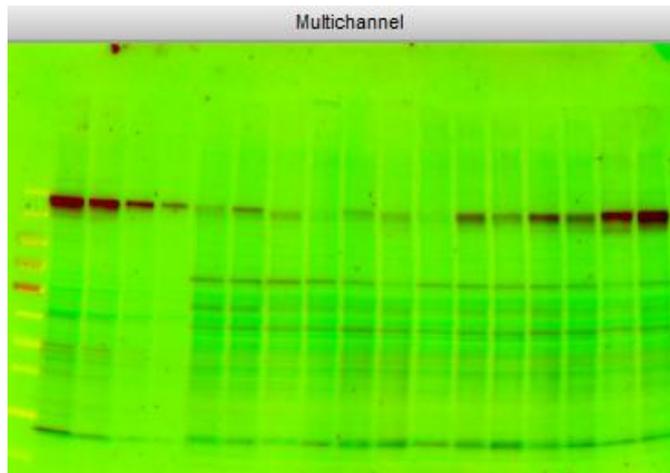


Figura 6: Imagen multicanal tomada con el programa Image Lab. Elaboración propia.

Esto nos va a permitir que el programa calcule la densidad proteica total en cada carril, correlacionándolo con la densidad proteica en la banda que se corresponde con nuestra proteína, obteniéndose así un perfil en 3D de las diferentes densidades (Figura 7), este perfil va a permitir eliminar el ruido de fondo y afinar la medida de las bandas de interés a lo largo del carril. De esta forma el software nos va a normalizar los valores de proteína en cada banda con respecto al total de proteína de cada carril. Este tipo de normalización se conoce con el nombre de “normalización mediante proteínas totales”.

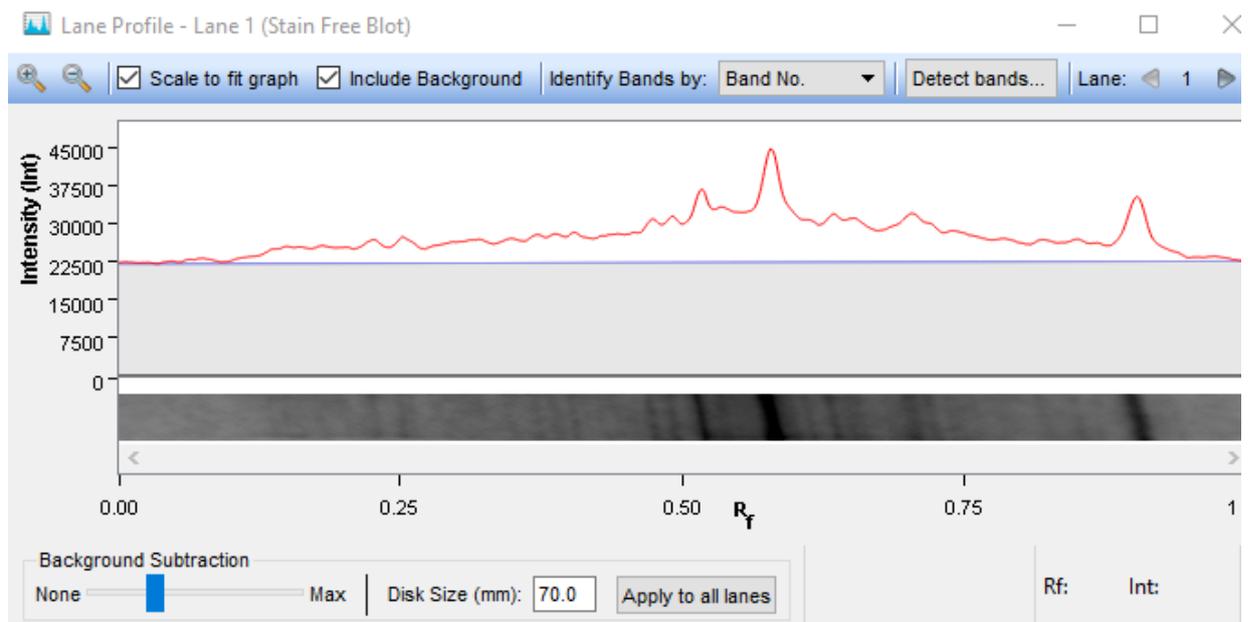


Figura 7: perfil en 3 dimensiones de las diferentes densidades proteicas presentes en un carril obtenido con el programa Image Lab. Elaboración propia.

Se han realizado ensayos comparativos en los que se observa cómo se lleva a cabo una normalización mediante proteínas conocidas habitualmente como “controles de carga”, como por ejemplo la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), que es muy expresada en la gran mayoría de tejidos, frente a la normalización mediante proteínas totales con la herramienta *Image Lab 6.0.1 software* (Bio Rad). Este estudio nos confirma que la normalización mediante proteínas totales resulta un método mucho más eficiente que la normalización mediante *stripping* de las membranas con controles de carga, por diversas razones como la eliminación de posibles errores en la manipulación, ya que esta herramienta tiene en cuenta la variación de la intensidad de todas las proteínas, los posibles errores al cargar las muestras y las variaciones durante la electroforesis o la transferencia.^{37,38}

Por todas estas razones y sobre todo porque trabajamos con un tejido que ha sido sometido a hipoxia y esta situación altera la expresión de algunas proteínas que se emplean como controles de carga, hemos decidido emplear este método de normalización mediante proteínas totales.

- **Análisis estadístico de los resultados**

Una vez obtenidos los datos de concentración de las bandas, se analizaron con el programa estadístico *GraphPad Prism*. Se evaluaron por separado los datos de cada grupo en los días 20 y 56 calculando la media de todos los valores dentro de cada grupo teniendo en cuenta el error estándar de la media (Media \pm EEM). Todos los análisis se llevaron a cabo con un Anova de vía simple y un post test de Dunnet que consiste en una comparación múltiple de cada grupo con respecto al grupo control para determinar el grado de significación en cada grupo.

Los datos se han calculado agrupados en tipo de proteína y día de obtención de la muestra. Por último se ha realizado un estudio de comparación empleando únicamente los datos obtenidos del grupo de interés, en este caso el grupo de triple daño CDD5-IR/60-IR/60.

Modificaciones sobre el proyecto original:

Una parte del diseño experimental de este estudio se ha visto interrumpido debido al estado de alarma decretado el 15 de marzo de 2020, como consecuencia de la pandemia provocada por el SARSCov2. Contemplaba el análisis de las muestras obtenidas en días 165 y 270 que ya estaban procesadas y preparadas para hacer los correspondientes WB.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como ya se ha descrito en apartados anteriores, las determinaciones se corresponden a los riñones obtenidos los días 20 y 56, de los grupos **Sham** (grupo de cirugía simulada e inyecciones de suero salino; control), **I/R60** (grupo con una isquemia-reperfusión en el riñón izquierdo e inyecciones de suero salino), **CDDP5-Sham** (grupo con inyecciones de cisplatino y cirugía simulada) y **CDDP5-I/R60-I/R60** (grupo con inyecciones de cisplatino, una isquemia-reperfusión en el riñón izquierdo y una isquemia-reperfusión en el riñón derecho).

Cabe destacar que, dado que en el día 20 todavía no se había practicado el segundo daño con isquemia-reperfusión en el riñón derecho, los datos del grupo con triple daño de día 20 se van a considerar “doble daño”.

Los datos de cantidad de proteína obtenidos y normalizados según se explica en el apartado *Análisis semicuantitativo de los WB con el programa Image Lab* se agruparon en función del grupo y se han representado en un diagrama de barras, de manera que se presentan varios valores de x para cada valor de y que en este caso se corresponderá con los grupos experimentales que hemos tomado para este trabajo.

Para comenzar, se han analizado por separado los datos obtenidos de cada tipo de proteína en días separados y separando riñones izquierdos de riñones derechos.

Junto con cada gráfica se encuentran las imágenes tomadas del WB en la que se marca con un rectángulo verde las bandas correspondientes con la recta de calibrado compuesta por cuatro puntos de concentraciones decrecientes de una muestra de lisado de OUU. En un rectángulo rojo se representan las bandas que se corresponden con las muestras del grupo con triple daño, ya que el objetivo de este trabajo recae en observar la presencia de estos marcadores en dicho grupo.

Por último, se ha realizado un análisis comparativo en el que se evalúa la evolución de los valores obtenidos de cada proteína, con el fin de poder determinar si se observa una progresión de la presencia de dichas proteínas, lo cual podría ser indicativo de transición DRA-ERC.

4.1 Datos colágeno I riñones izquierdos y derechos D20

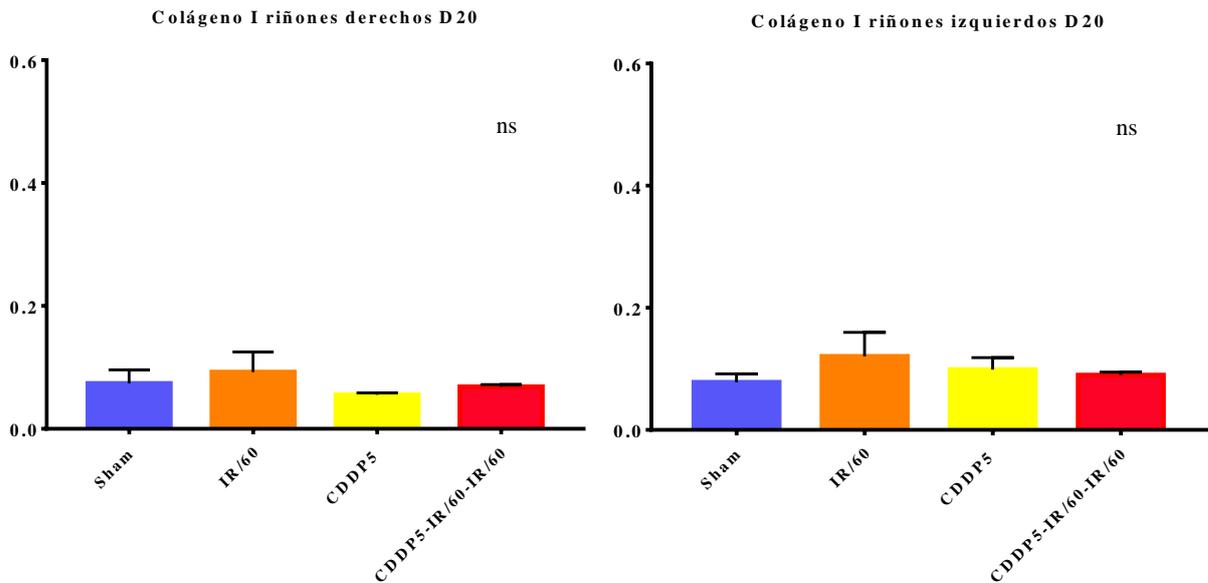


Figura 8: Expresión de colágeno en los diferentes grupos cuantificada con el programa GraphPad Prism. En el eje de ordenadas se representa los valores de concentración y en el eje de abscisas el nombre del grupo experimental. CDDP5: Cisplatino dosis 5 mg/Kg de peso, I/R60: Isquemia 60 minutos con reperusión, Sham: cirugía de simulación. Elaboración propia.

Para realizar este análisis se emplearon un total de 13 ratas divididas en diferentes grupos; 5 ratas del grupo Sham, 3 ratas del grupo IR/60, 2 ratas del grupo CDDP5 y 3 ratas del grupo CDDP5-IR/60-IR/60.

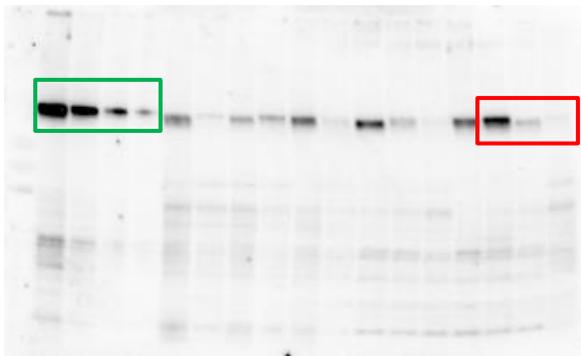


Figura 9: WB de Colágeno I riñones derechos D20. El recuadro verde se corresponde con la recta de calibrado y el recuadro rojo son los grupos de triple daño. Elaboración propia.

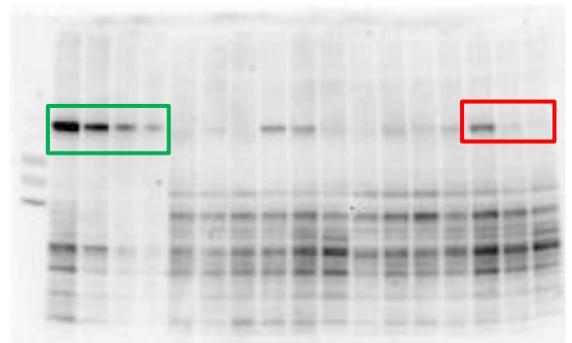


Figura 10: WB de Colágeno I riñones izquierdos D20. El recuadro verde se corresponde con la recta de calibrado y el recuadro rojo son los grupos de triple daño. Elaboración propia.

En este caso se observa en el diagrama de barras una clara similitud entre los valores. Era de esperar que en estas muestras no obtuvieramos valores elevados de colágeno tipo I ya que estos riñones no habían sido sometidos a la segunda isquemia.

4.2 Datos colágeno I riñones izquierdos y derechos D56

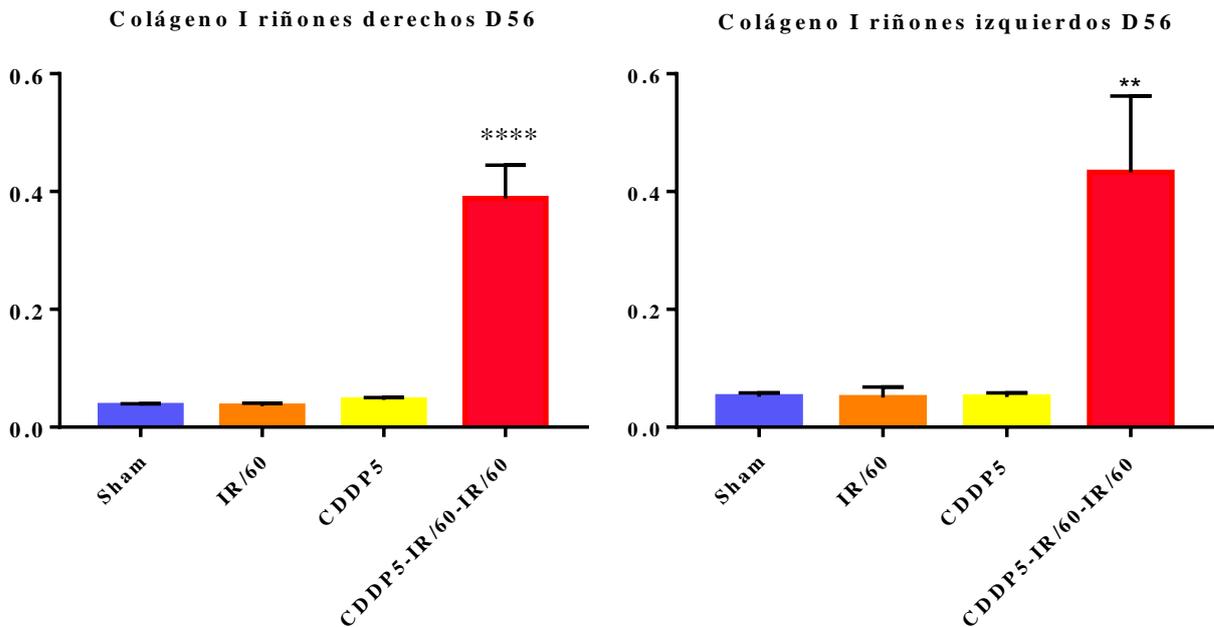


Figura 11: Expresión de colágeno en los diferentes grupos cuantificada con el programa GraphPad Prism. En el eje de ordenadas se representa los valores de concentración y en el eje de abscisas el nombre del grupo experimental. CDDP5: Cisplatino dosis 5 mg/Kg de peso, I/R60: Isquemia 60 minutos con reperusión, Sham: cirugía de simulación. Los asteriscos indican el nivel de significación. Elaboración propia.

Para realizar este análisis se emplearon un total de 26 ratas divididas en dos grupos de 13 compuesto por: 5 ratas del grupo Sham, 3 ratas del grupo IR/60, 3 ratas del grupo CDDP5 y 3 ratas del grupo CDDP5-IR/60- IR/60. Los datos resultantes se han obtenido de la media de los dos análisis de WB realizadas a cada grupo de 13 ratas.

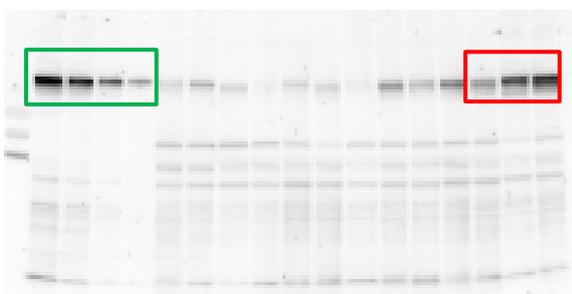


Figura 12: WB de Colágeno I riñones derechos D56. El recuadro verde se corresponde con la recta de calibrado y el recuadro rojo señala los grupos de triple daño. Elaboración propia.

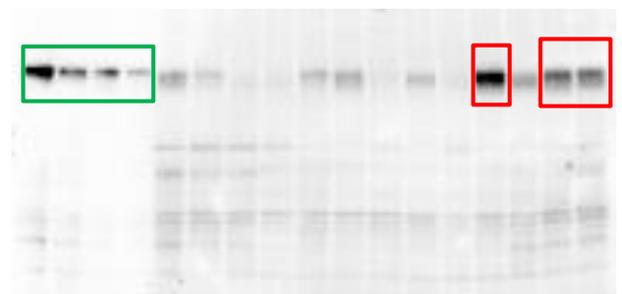


Figura 13: WB de Colágeno I riñones izquierdos D56. El recuadro verde se corresponde con la recta de calibrado y el recuadro rojo señala los grupos de triple daño. Elaboración propia.

Como se observa en la figura 11, el grupo de triple daño (representado por la barra en color rojo) presenta unos valores de expresión de colágeno I muy superiores con respecto al resto de grupos. Los asteriscos sobre la barra que se corresponde con el grupo de triple daño nos indican que se trata de una diferencia muy significativa con respecto al grupo control, ya que el valor de significación estadística es en el caso de riñones derechos (tres asteriscos) $p=0,0001$, mientras que en el caso de los riñones izquierdos el grado de significación es algo menor (dos asteriscos), $p=0,0012$. Por otro lado, la imagen de WB de las figuras 12 y 13 nos permite apreciar estos resultados de una forma muy clara. Esto demuestra que los riñones han sufrido una recuperación inadecuada con un elevado grado de fibrosis.

4.3 Datos Fibronectina riñones izquierdos y derechos D20

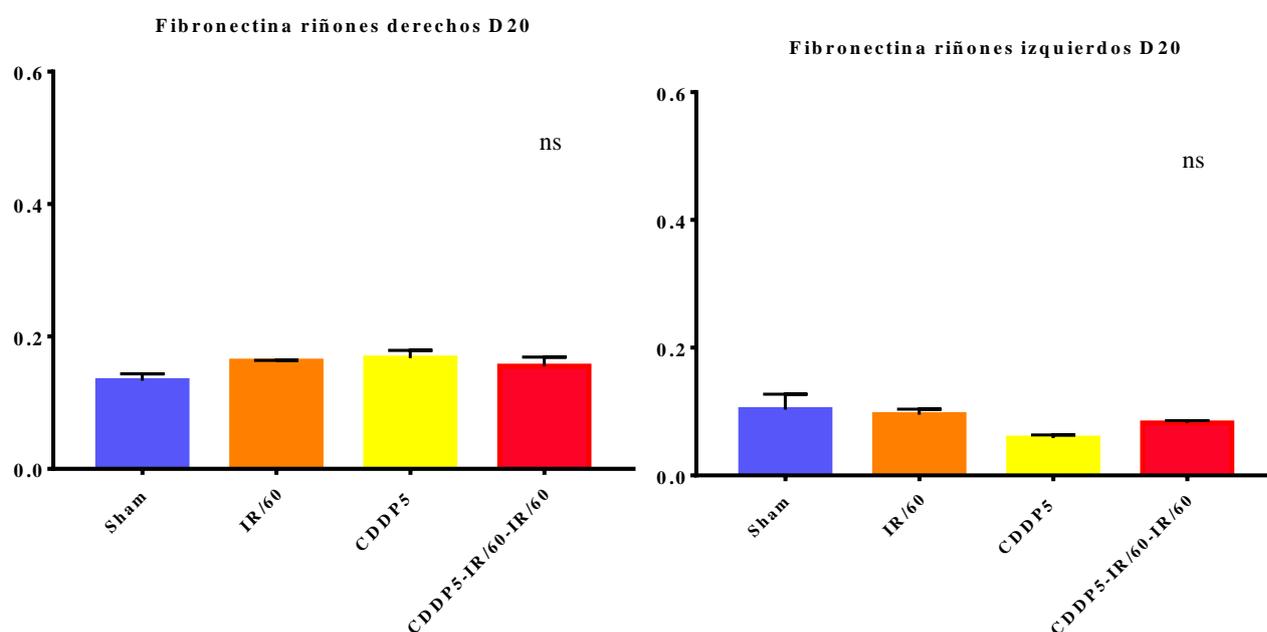


Figura 14: Expresión de colágeno en los diferentes grupos cuantificada con el programa GraphPad Prism. En el eje de ordenadas se representa los valores de concentración y en el eje de abscisas el nombre del grupo experimental. CDDP5: Cisplatino dosis 5 mg/Kg de peso, I/R60: Isquemia 60 minutos con reperusión, Sham: cirugía de simulación. Elaboración propia.

Para realizar este análisis se emplearon un total de 13 ratas divididas en diferentes grupos; 5 ratas del grupo Sham, 3 ratas del grupo IR/60, 2 ratas del grupo CDDP5 y 3 ratas del grupo CDDP5-IR/60-IR/60.

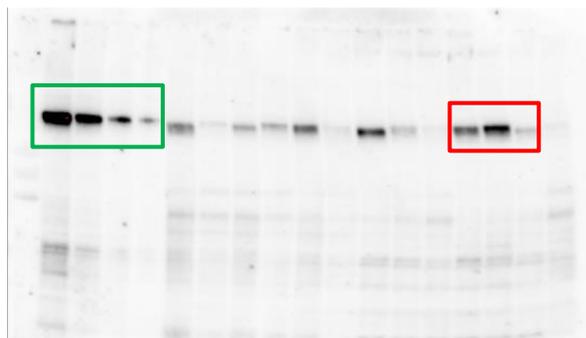


Figura 15: WB de Fibronectina riñones derechos D20. El recuadro verde se corresponde con la recta de calibrado y el recuadro rojo señala los grupos de triple daño. Elaboración propia.

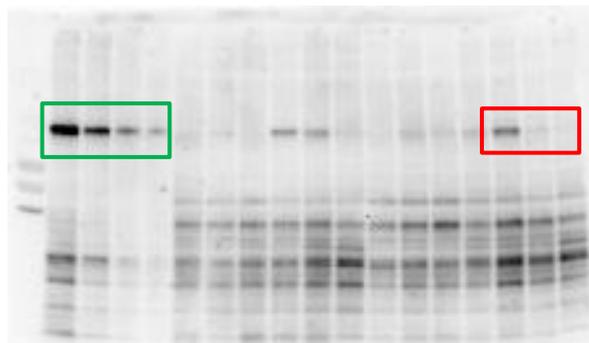


Figura 16: WB de Fibronectina riñones izquierdos D20. El recuadro verde se corresponde con la recta de calibrado y el recuadro rojo señala los grupos de triple daño. Elaboración propia.

En este caso, vemos unos resultados muy similares a los obtenidos en el D20 de colágeno, de forma que tanto en riñones derechos como en riñones izquierdos la concentración se mantiene similar en todos los grupos, aunque en el caso de los riñones derechos se observa una concentración ligeramente más elevada en todos los grupos, lo cual es irrelevante ya que son variaciones mínimas propias de la experimentación.

4.4 Datos Fibronectina riñones izquierdos y derechos D56

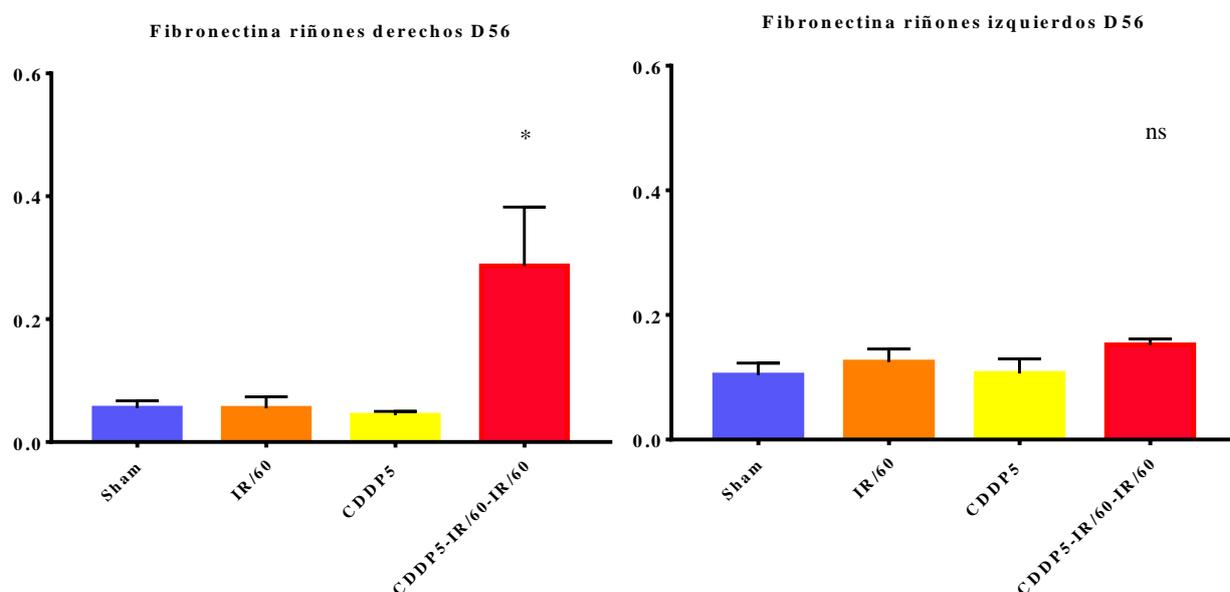


Figura 17: Expresión de fibronectina en los diferentes grupos cuantificada con el programa GraphPad Prism. En el eje de ordenadas se representa los valores de concentración y en el eje de abscisas el nombre del grupo experimental. CDDP5: Cisplatino dosis 5 mg/Kg de peso, I/R60: Isquemia 60 minutos con reperusión, Sham: cirugía de simulación. Los asteriscos indican el nivel de significación. Elaboración propia.

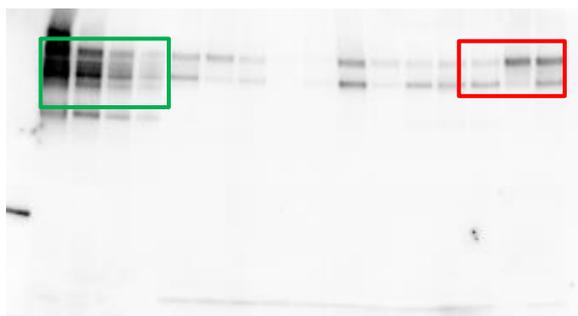


Figura 18: WB de Fibronectina riñones derechos D56. El recuadro verde se corresponde con la recta de calibrado y el recuadro rojo señala los grupos de triple daño. Elaboración propia.



Figura 19: WB de Fibronectina riñones izquierdos D56. El recuadro verde se corresponde con la recta de calibrado y el recuadro rojo señala los grupos de triple daño. Elaboración propia.

En este último caso, en los riñones derechos, se observa un claro incremento de la expresión de fibronectina en el grupo de triple daño, con una diferencia significativa con respecto al grupo control, en este caso el valor de significación $p=0,0197$. Por otro lado, los datos correspondientes a los riñones izquierdos nos indican que no hay diferencias en la expresión de fibronectina entre todos los grupos.

4.5 Comparación de la evolución de la expresión de colágeno I y fibronectina en el grupo de triple daño (CDDP5-IR/60-IR/60)

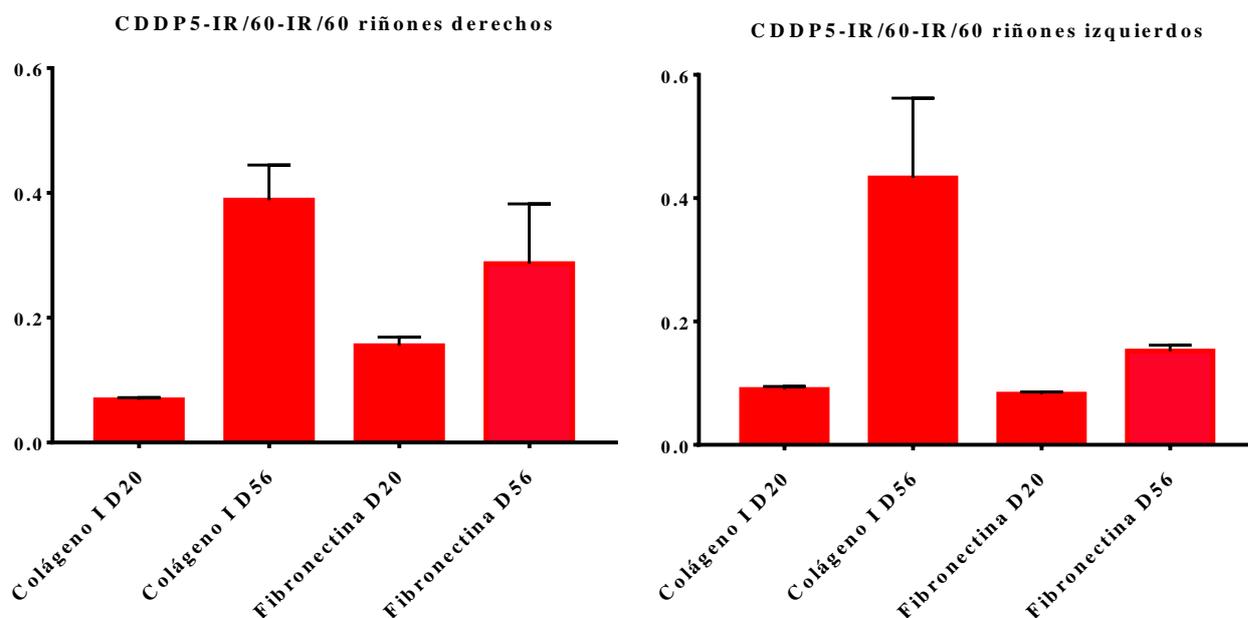


Figura 20: Expresión de colágeno y fibronectina en el grupo de triple daño cuantificada con el programa GraphPad Prism. En el eje de ordenadas se representa los valores de concentración y en el eje de abscisas el nombre del grupo experimental. CDDP5: Cisplatino dosis 5 mg/Kg de peso, I/R60: Isquemia 60 minutos con reperusión. Elaboración propia.

En estos gráficos se ha representado la evolución de la expresión de colágeno tipo I y fibronectina que presenta el grupo de triple daño separando los datos obtenidos de riñones derechos y riñones izquierdos. En ambos casos, tanto fibronectina como colágeno están presentes en el día 20 (previo al tercer daño por intervención isquémica) pero de manera muy reducida, sin embargo en riñones derechos se observa una concentración algo más elevada aunque la diferencia no es significativa. Si analizamos los datos en el día 56 observamos una clara elevación de la concentración de colágeno tipo I tanto en riñones derechos como en izquierdos, lo que no ocurre con el caso de la fibronectina ya que sólo se aprecia un aumento de su expresión en los riñones derechos aunque no resulta estadísticamente significativo con respecto a los datos del día 20.

CONCLUSIONES

A pesar de que este estudio se ha realizado exclusivamente en dos puntos temporales (D20 y D56), podemos afirmar que el colágeno tipo I es un buen marcador de transición de DRA a ERC, ya que muestra una elevación muy clara de su expresión a lo largo del estudio. Para poder llevar a cabo un análisis más preciso, se debería evaluar la expresión de esta molécula en días más avanzados para así poder observar si la tendencia creciente se mantiene o no y de esta forma determinar la utilidad de este marcador.

Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo sobre la fibronectina, no nos dan información relevante sobre su utilidad como marcador de transición DRA a ERC, si bien es cierto que se observa que la expresión de esta molécula es mayor en todos los grupos, desde el grupo control a los grupos con algún tipo de daño lo que sugiere que se trata de una molécula muy presente en condiciones fisiológicas; por otro lado, se conoce que cuando se origina un proceso fibrótico desregulado, la expresión de esta molécula debería aumentar, por ello es probable que si realizáramos este estudio en días posteriores obtendríamos más información relativa al papel de la fibronectina en este proceso.

En base a los datos obtenidos se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- El estudio mediante la técnica de WB con cuantificación y normalización mediante el software *Image Lab* de colágeno de tipo I resulta fiable para caracterizar la transición de DRA a ERC.
- Este mismo estudio realizado para detectar la expresión de fibronectina no parece suficiente para determinar que esta proteína sea un buen marcador de transición, al menos hasta el día 56 tras el primer daño renal.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Gorostidi, M., Sánchez-Martínez, M., Ruilope, L. M., Graciani, A., Juan, J., Santamaría, R., ... & Banegas, J. R. (2018). Prevalencia de enfermedad renal crónica en España: impacto de la acumulación de factores de riesgo cardiovascular. *nefrología*, 38(6), 606-615.
2. Mills, K. T., Xu, Y., Zhang, W., Bundy, J. D., Chen, C. S., Kelly, T. N., ... & He, J. (2015). A systematic analysis of worldwide population-based data on the global burden of chronic kidney disease in 2010. *Kidney international*, 88(5), 950-957.
3. Ronco, C., Bellomo, R., & Kellum, J. A. (2019). Acute kidney injury. *The Lancet*, 394(10212), 1949-1964.
4. Nally, J. V. (2002). Acute renal failure in hospitalized patients. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 69(7), 569-574.
5. Martín-Govantes, J. U. A. N. (2006). Insuficiencia renal aguda. *An Pediatr Contin*, 4(3), 151-58.
6. Guyton, A. C. y Hall, J. E. (2011). Tratado de Fisiología Médica. *McGraw-Hill Interamericana*. Cap 26 y 27.
7. Díez, J. (2004). Enfermedad renal y patología cardiovascular. Bases fisiopatológicas de la asociación. *Nefrología*, 24, 21-26.
8. Carracedo, A. G., & Muñana, E. A. (2012). Insuficiencia renal crónica. *Química. Es*, 637-46.
9. Tenorio Cañamás, M. T., Galeano Álvarez, C., Rodríguez Mendiola, N., & Liaño García, F. (2010). Diagnóstico diferencial de la insuficiencia renal aguda. *Nefrología*, 3(2), 16-32.
10. Al-Khafaji, A., Nadim, M. K., & Kellum, J. A. (2015). Hepatorenal disorders. *Chest*, 148(2), 550-558.
11. Vandenberghe, W., Gevaert, S., Kellum, J. A., Bagshaw, S. M., Peperstraete, H., Herck, I., ... & Hoste, E. A. (2016). Acute kidney injury in cardiorenal syndrome type 1 patients: a systematic review and meta-analysis. *Cardiorenal medicine*, 6(2), 116-128.
12. Gomez, H., Ince, C., De Backer, D., Pickkers, P., Payen, D., Hotchkiss, J., & Kellum, J. A. (2014). A unified theory of sepsis-induced acute kidney injury: inflammation, microcirculatory dysfunction, bioenergetics and the tubular cell adaptation to injury. *Shock (Augusta, Ga.)*, 41(1), 3.
13. Cabrera, S. S. (2004). Definición y clasificación de los estadios de la enfermedad renal crónica. Prevalencia. Claves para el diagnóstico precoz. Factores de riesgo de enfermedad renal crónica. *Nefrología*, 24, 27-34.
14. Basile, D. P., Anderson, M. D., & Sutton, T. A. (2011). Pathophysiology of acute kidney injury. *Comprehensive Physiology*, 2(2), 1303-1353.
15. Basile, D. P., Donohoe, D., Roethe, K., & Osborn, J. L. (2001). Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*.
- 16 y Figura 1: Ferenbach, D. A., & Bonventre, J. V. (2015). Mechanisms of maladaptive repair after AKI leading to accelerated kidney ageing and CKD. *Nature Reviews Nephrology*, 11(5), 264
17. López-Novoa, J. M., Martínez-Salgado, C., Rodríguez-Peña, A. B., & Hernández, F. J. L. (2010). Common pathophysiological mechanisms of chronic kidney disease: therapeutic perspectives. *Pharmacology & therapeutics*, 128(1), 61-81.
18. COHESIÓN, S. G. D. C. Y., & DE LAS CCAA, C. D. S. (2015). Documento Marco sobre Enfermedad Renal Crónica (ERC) dentro de la Estrategia de Abordaje a la Cronicidad en el SNS.
19. Lorenzo, V., Perestelo, L., Barroso, M., Torres, A., & Nazco, J. (2010). Economic evaluation of haemodialysis. Analysis of cost components based on patient-specific data. *Nefrología (English Edition)*, 30(4), 403-412.

20. Schrimpf, C., Teebken, O. E., Wilhelmi, M., & Duffield, J. S. (2014). The role of pericyte detachment in vascular rarefaction. *Journal of vascular research*, 51(4), 247-258.
21. Tanaka, S., Tanaka, T., & Nangaku, M. (2014). Hypoxia as a key player in the AKI-to-CKD transition. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 307(11), F1187-F1195.
22. Eddy, A. A. (2005). Progression in chronic kidney disease. *Advances in chronic kidney disease*, 12(4), 353-365.
23. Bosman, F. T., & Stamenkovic, I. (2003). Functional structure and composition of the extracellular matrix. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 200(4), 423-428.
24. Prieto, M., Rivas, J. V., PÉREZ-BARRIOCANAL, F., & NOVOA, J. L. (2002). El TGF-β: síntesis y mecanismo de acción. *Nefrología*, 22(2), 135-143.
25. Liu, Y. (2006). Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney international*, 69(2), 213-217.
26. Docherty, N. G., Morales, A. I., Novoa, J. M. L., & Barriocanal, F. P. (2007). La transición de células epiteliales a miofibroblastos. Mecanismos involucrados y su posible relación con la fibrosis renal. *Nefrología*, 27(6), 681-688.
27. Gomez, I. G., Roach, A. M., Nakagawa, N., Amatucci, A., Johnson, B. G., Dunn, K., ... & Peppiatt-Wildman, C. M. (2016). TWEAK-Fn14 signaling activates myofibroblasts to drive progression of fibrotic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 27(12), 3639-3652.
28. Hirschberg, R. (2005). Wound healing in the kidney: complex interactions in renal interstitial fibrogenesis.
- Imagen 2:** Ferenbach, D. A., & Bonventre, J. V. (2015). Mechanisms of maladaptive repair after AKI leading to accelerated kidney ageing and CKD. *Nature Reviews Nephrology*, 11(5), 264.
29. Zeisberg, M., Bonner, G., Maeshima, Y., Colorado, P., Müller, G. A., Strutz, F., & Kalluri, R. (2001). Renal fibrosis: collagen composition and assembly regulates epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *The American journal of pathology*, 159(4), 1313-1321.
30. DÍAZ, C., SELGAS, R., BAJO, M., DEL PESO, G., Cirugeda, A., SÁNCHEZ-TOMERO, J. A., ... & HEFF, J. J. (2004). Transición epitelio-mesenquimal en procesos fibrosantes. Células mesoteliales obtenidas ex vivo de pacientes tratados con diálisis peritoneal como modelo de transdiferenciación. *Nefrología*, 24(1), 34-39.
31. Chronic Kidney Disease: Practice Essentials, Pathophysiology, Etiology. (2019, noviembre 11). <https://emedicine.medscape.com/article/238798-overview#a1>
32. Sharp, C. N., & Siskind, L. J. (2017). Developing better mouse models to study cisplatin-induced kidney injury. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 313(4), F835-F841.
33. Wei, Q., & Dong, Z. (2012). Mouse model of ischemic acute kidney injury: technical notes and tricks. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 303(11), F1487-F1494.
34. Malek, M., & Nematbakhsh, M. (2015). Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. *Journal of renal injury prevention*, 4(2), 20.
35. Ladner, C. L., Yang, J., Turner, R. J., & Edwards, R. A. (2004). Visible fluorescent detection of proteins in polyacrylamide gels without staining. *Analytical biochemistry*, 326(1), 13-20.
36. Schwartz, R., Ting, C. S., & King, J. (2001). Whole proteome pI values correlate with subcellular localizations of proteins for organisms within the three domains of life. *Genome research*, 11(5), 703-709.
37. Gürtler, A., Kunz, N., Gomolka, M., Hornhardt, S., Friedl, A. A., McDonald, K., ... & Posch, A. (2013). Stain-Free technology as a normalization tool in Western blot analysis. *Analytical biochemistry*, 433(2), 105-111.
38. Total Protein Normalization | LSR | Bio-Rad. <https://www.bio-rad.com/es>