

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Cilastina en la prevención y tratamiento del fracaso renal  
agudo parenquimatoso de origen endotóxico: sepsis y  
rabdomiólisis**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**María Ángeles González-Nicolás González**

**Director**

**Alberto Lázaro Fernández**

**Madrid**

**© María Ángeles González-Nicolás González, 2022**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS DOCTORAL**

CILASTATINA EN LA PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DEL FRACASO RENAL  
AGUDO PARENQUIMATOSO DE ORIGEN ENDOTÓXICO: SEPSIS Y RABDOMIÓLISIS

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

MARÍA ÁNGELES GONZÁLEZ-NICOLÁS GONZÁLEZ

DIRECTOR

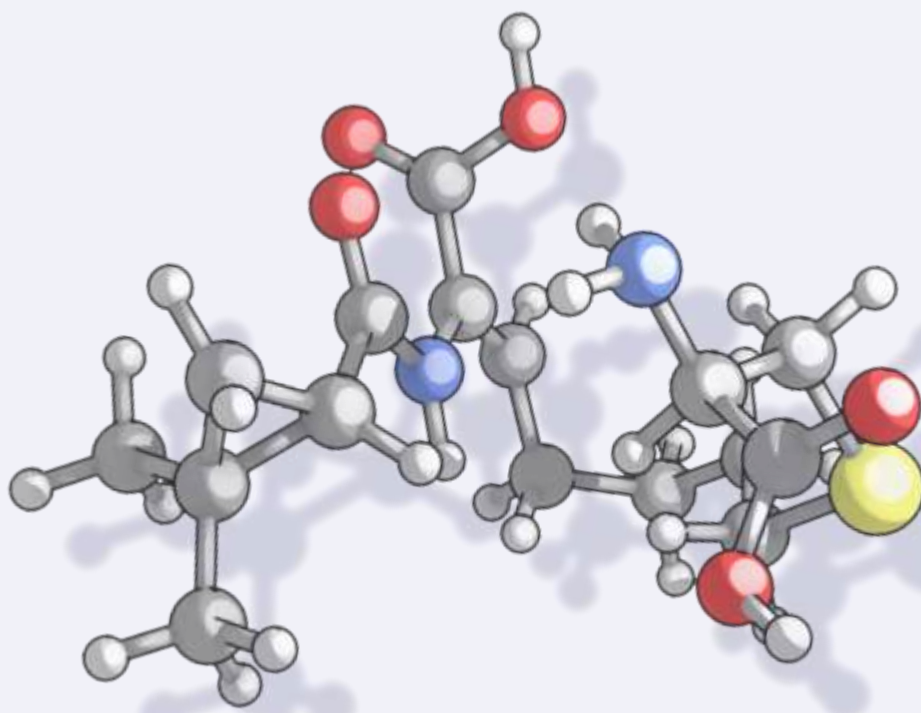
ALBERTO LÁZARO FERNÁNDEZ

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**CILASTATINA EN LA PREVENCIÓN Y  
TRATAMIENTO DEL FRACASO RENAL AGUDO  
PARENQUIMATOSO DE ORIGEN ENDOTÓXICO:  
SEPSIS Y RABDOMIÓLISIS**



**MARÍA ÁNGELES GONZÁLEZ-NICOLÁS GONZÁLEZ**

DIRECTOR

**ALBERTO LÁZARO FERNÁNDEZ**

2021

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**TESIS DOCTORAL**

**CILASTATINA EN LA PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DEL  
FRACASO RENAL AGUDO PARENQUIMATOSO DE ORIGEN  
ENDOTÓXICO: SEPSIS Y RABDOMIÓLISIS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**MARÍA ÁNGELES GONZÁLEZ-NICOLÁS GONZÁLEZ**

DIRECTOR

**ALBERTO LÁZARO FERNÁNDEZ**

Madrid, 2021





Todo es silencio, la vía láctea duerme en el cielo, duermen las estrellas fugaces,  
duerme el perímetro austral de la tierra con sus bosques y alimañas,  
duermen los libros con sus letras ateridas ante tanto silencio de miradas,  
duermen los "papers" subrayados en las carpetas que nadie abrirá ya nunca.  
Duermen las preguntas y el dolor que las genera y duermen para siempre  
las respuestas, duerme el mundo, duerme el cielo y duerme el infierno.  
Alberto se ha dormido, el dolor y el sufrimiento se han dormido,  
ya todo reposa en la oscura esfera de la muerte,  
un estremecimiento ha sacudido el mundo...  
y todo es silencio,  
y ya no hay cantos ni sonidos  
en el mundo entero  
Alberto Tejedor se ha dormido, y todo duerme a su lado.

*"Gran Elegía a Alberto Tejedor"*  
*Pepe Alcamí*



"Ser diferente no es ni bueno ni malo... Simplemente significa que se tiene suficiente coraje  
de ser uno mismo"

Albert Camus

"La ciencia es más que un simple conjunto de conocimientos: es una manera de pensar"

Carl Sagan

"Me enseñaron que el camino del progreso no era rápido ni fácil"

"No hay nada más maravilloso que ser un científico, en ninguna parte preferiría estar más  
que en mi laboratorio, manchando mi ropa y cobrando por jugar"

Marie Curie



*A mi familia, por su apoyo incondicional*

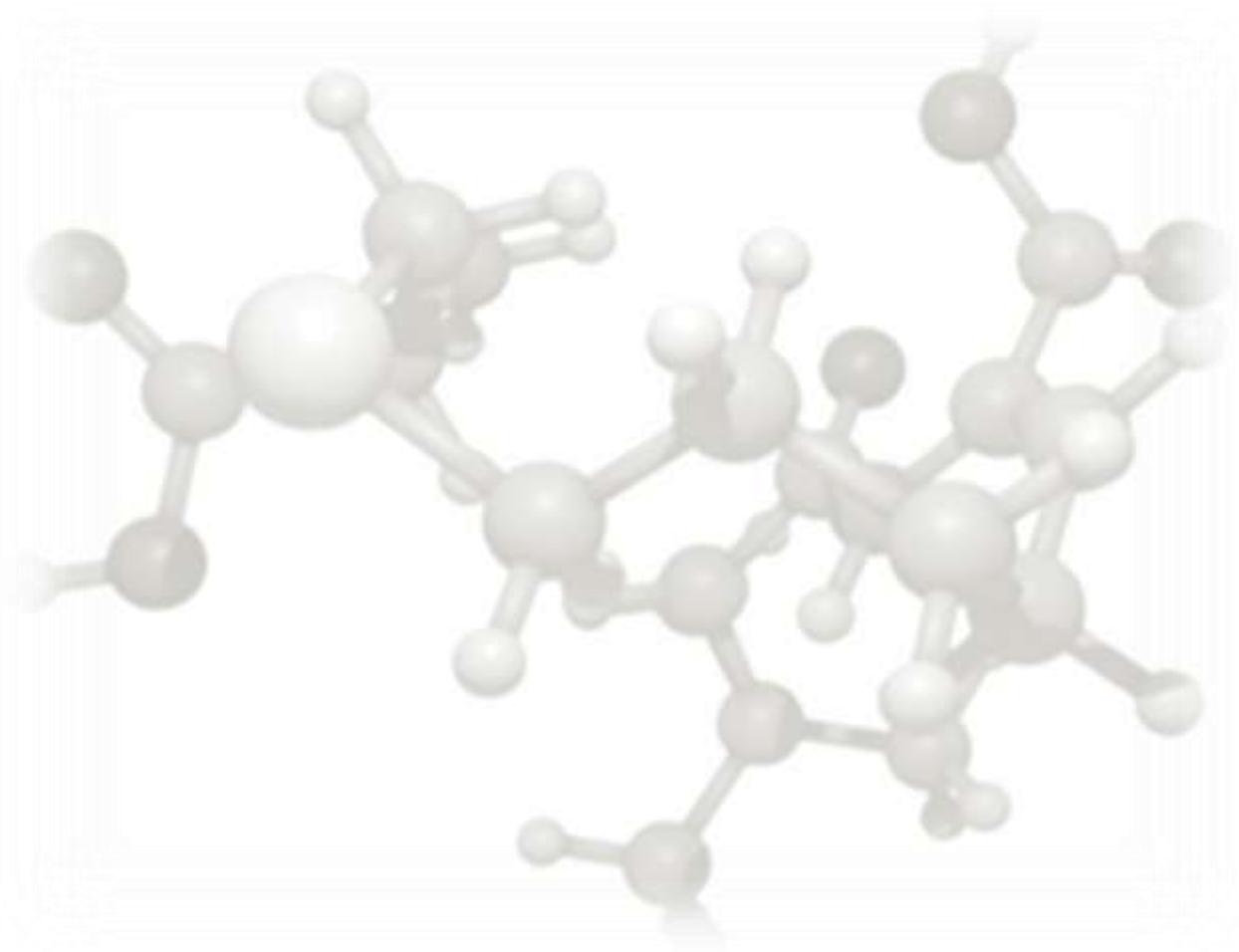
*A Rubén, el amor y pilar de mi vida*

*A mis dos soles, Michi y Luna, siempre a mi lado*

*Os quiero*



# **AGRADECIMIENTOS**



Recuerdo cuando asistía a las tesis de mis amigos y compañeros y pensaba en el gran trabajo que habían hecho y en cómo se sentirían. Me sentía orgullosa y emocionada pensando que yo nunca tendría esa oportunidad. Leía sus agradecimientos tan emotivos y personales, y todos coincidían en que era la parte más difícil de escribir de toda la tesis. Pensaba, menos mal que yo no tendré que hacerlo porque no sabría ni por dónde empezar y con lo mal que se me dan estas cosas.... Pues aquí estoy, quién me lo iba a decir después de tanto tiempo, y sí, es la parte más difícil de todas. Hay tanta gente a la que darle las gracias que siento si se me olvida alguien, pero lo importante no es estar en un papel si no en el corazón.

La culpa de todo esto la tienen las obras del pabellón de MCEX, de otra forma jamás habría conocido a unas personas maravillosas que son las responsables de que yo esté aquí hoy. Quien me iba a decir que los "Nefros" Alberto y Blanca que venían a mi labo en la mater serían mis futuros compañeros y que un tal Alberto Tejedor que venía a enseñar los riñones decelularizados sería mi futuro jefe. No hay días en esta vida para agradecerles a "Los Albertos" la oportunidad que me dieron al ficharme para su labo, entrando a formar parte de la familia "Nefro" y poder realizar un trabajo increíble. Gracias infinitas a Alberto, amigo, compañero, jefe, por apoyarme en todos los aspectos, por confiar en mí y creer desde el primer momento que yo podía hacer una tesis. Eres grande Alberto, tanto como persona como investigador, y nos quedan muchas cosas por hacer, muchos modelos por explotar y muchos éxitos que cosechar. Mi querido Alberto Tejedor, que ya no estás, pero siempre estás, nunca te fuiste. Gracias por permitirme ser "Nefro", te bastó el visto bueno de Alberto para acogerme en tu labo, sin más. Te fuiste demasiado pronto y nos dejaste huérfanos de tus conocimientos, de tu saber, de tu amabilidad y de tu sonrisa. Maravillosa persona, increíble médico y excelente profesor, nunca olvidaré tus consejos, enseñanzas y formas de hacer. Siempre estás y estarás presente, seguiremos luchando para que al final cilastatina llegue al paciente como tu querías. Blanca, amiga y querida compañera, gracias por todo y ánimo, aún nos quedan muchas cosas que celebrar. Recuerdo cuando íbamos a Getafe para hacer el modelo y vaya odisea, cuántos inconvenientes, problemas y discusiones. Pensábamos que al final no lo haríamos y al final mira, lo conseguimos. A los "Ex - Nefros", porque esta tesis es en parte vuestra, cada uno con vuestro granito de arena lo habéis hecho posible, José, Sonia, Cristian, Ana, todos. A Marta Tejedor, por sus ánimos y optimismo, ejemplo de fortaleza y entereza. A David y a su increíble equipo que siempre nos ha apoyado y animado, y sin él no habiéramos llegado tan lejos, eres grande amigo no cambies. A Teresa mi tutora, por sus consejos y sus ánimos durante estos años, espero que sigamos en contacto durante mucho tiempo.

A la gente del pabellón MCEX, que ya son como una segunda familia. A mi querida Bea, gracias por tus consejos, por tu ayuda, por esas charlas tardías y por escucharme con mis cosas, seguro que te va a ir todo genial. Marta, quién me iba a decir cuando ibas por la mater que seríamos compis de bancada. Gracias por tus consejos, por ayudarme siempre que he tenido dudas y por cuidar de nosotros. A Christian, Iris y EVO, sois increíbles. Gracias por vuestros ánimos en los momentos bajos y por ayudarme siempre, por nuestras charlas y por las risas, que buenos momentos. Espero que nuestros caminos se sigan cruzando en un futuro, os merecéis todo lo mejor. A Carol, Joha, Elena, David y Ester, no perdáis nunca esa alegría y espero seguir compartiendo con vosotros buenos momentos. A Maribel, Laura y Diana, pedazo de mamas e incansables luchadoras. Gracias por vuestros consejos, por animarme mil veces cuando estaba desbordada. Gracias Santi, por tu apoyo siempre y por esos desayunos que tenemos que retomar. A Rafa, Amaya, Sara, Paloma, Nieves, Miguel, Javi, Pancho, porque siempre aprendo cosas nuevas con vosotros, gracias por vuestros valiosos consejos y ánimos. A la gente que ya no está. Carolina, la alegría del experimental, como se te echa de menos, gracias por tu ayuda y por tus ánimos siempre, por tu sonrisa y alegría, incansable trabajadora. Raquel, Ale y Carmen espero que todo os vaya genial, os lo merecéis. A Juanan, que tiene mucha culpa de que yo esté aquí ahora mismo.

A la gente del animalario, Fernando, Pedro, Ali, Marisa, Charo y el resto del equipo. A Paco que me ha enseñado prácticamente todo lo que sé sobre animales, siempre dispuesto a ayudar. A las chicas del LIM, Sandra, Yoli y María, que grandes sois. Mil gracias por estar siempre ahí, por ayudarme cada vez que tenía problemas y por vuestros valiosos consejos. A Mario veterinario de Getafe, porque sin él la mitad de este trabajo no hubiera sido posible.

A los chic@s de la Complu, Meritxell, Eva, Bea, Diego, Ricardo y Miguel, por vuestros ánimos. Creo que el futuro nos depara grandes cosas juntos. A mis queridas ex-LOBAS Almudena y Lucía, por esos buenos y no tan buenos momentos pasados. Por nuestras largas charlas y por vuestro apoyo, que ganas de volver a retomar esas quedadas para ponernos al día.

A mis chic@s de la Funda, Prisci, Raquel, Raúl, Sandra, Morgui, Maca, Jonay, Patricia, Mati, Susana, Elisa.... Quién hubiera pensado cuando entré en la FJD que al final terminaría leyendo la tesis. Gracias por acogerme en vuestro grupo cuando llegué, por enseñarme casi todo lo que sé. Sin vuestra ayuda y apoyo en los buenos, y sobre todo en los malos momentos no sé qué hubiera hecho, esta tesis es un poquito vuestra. A Avo, Alberto, Belén, Ana... currantes incansables y grandes investigadores, gracias por vuestros consejos sois un ejemplo a seguir.

Al laboratorio de Diagnóstico Molecular, a Patricia Muñoz, que me dio la oportunidad de entrar en su labo recién salida del módulo y ya veterana. A Juan, que lo hizo posible y del que aprendí muchísimo en todos los aspectos. A Virginia, que llegó después, y a María excelentes personas, que me enseñaron todo acerca de la PCR.

A mis queridos amigos, Ricardo y Ana, David y Sonia, Víctor, los Canillejas City: Kike, Lucia, David, los Carlos, Guiller, Chus, Francis, Aixa, Rubén, los Rafas, Iván. Por acogerme como una más hace mil años ya y por demostrarme cada día el valor de la amistad. Gracias por vuestro apoyo, por las reuniones que hace siglos que no hacemos y que espero que podamos retomar cuando todo esto haya pasado celebrándolo como se merece, con una buena barbacoa.

A mis padres, las mejores personas que conozco y el mejor ejemplo a seguir. Gracias por inculcarme el amor por los libros, por la naturaleza, a ser mejor persona y a superarme. Gracias por estar ahí siempre sin condiciones, por apoyarme en todas mis decisiones y aconsejarme. A mis hermanos Cris y Toñín, y a Eva que es como si lo fuera, no se pueden tener unos hermanos mejores. Currantes incansables, ejemplo de fortaleza y superación, siempre apoyándome y animándome, os quiero. Ari, seguro que harás grandes cosas en el futuro y espero que algún día te encamines por esta senda dura pero fascinante de la ciencia, ya tienes esa curiosidad por lo científico que sin duda le viene de familia. Gracias porque siempre me habéis apoyado y por estar siempre ahí.

A Rubén, la persona más importante y el pilar de mi vida, sin ti la vida no sería nada. Gracias por tu apoyo incondicional, por estar siempre ahí, en lo bueno y en lo malo, por ser tan increíble y tan buena persona. Por aguantar mis días malos, mis noches sin dormir, a mi Iker Jiménez y mis frikadas. Por intentar entender "mis cosas" y por aguantar mis brasas, mis cabreos y mis indignaciones. Gracias por esas sesiones de internet viendo chorradas, los Nadie y más los dos juntos con nuestras "gatis". Por llevarme a sitios maravillosos y haber podido compartirlos contigo, aunque nada como estar "en casa". Porque solo con mirarnos ya sabemos lo que piensa el otro y sobran las palabras. Todo te lo debo a ti y espero que podamos envejecer juntos en nuestra casa amarillo pollo. Y por último a mis dos soles y los amores de mi vida, Michi y Luna, que llevan 11 años alegrándonos la vida, que no me han dejado ni a sol ni a sombra y han estado siempre a mi lado, seguro que saben tanto como yo de cilastatina.

A todos los que me habéis acompañado en este increíble viaje, gracias.

Marian.



# ÍNDICE



<b>RESUMEN</b> .....	<b>7</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>11</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>15</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>21</b>
<b>1 EL RIÑÓN Y SU FISIOPATOLOGÍA</b> .....	<b>23</b>
<b>1.1 Estructura y función</b> .....	<b>23</b>
<b>1.2 El túbulo proximal</b> .....	<b>25</b>
<b>1.3 Daño renal</b> .....	<b>27</b>
1.3.1 Fracaso renal agudo.....	28
1.3.1.1 Situación actual de la enfermedad.....	28
1.3.1.2 Clasificaciones de FRA .....	29
1.3.1.3 Fases del FRA .....	30
1.3.1.4 FRA parenquimatoso de origen endotóxico.....	32
1.3.2 Fracaso renal crónico.....	33
<b>2 SEPSIS</b> .....	<b>34</b>
<b>2.1 Definiciones y clasificación</b> .....	<b>34</b>
<b>2.2 Situación actual</b> .....	<b>35</b>
<b>2.3 Etiología</b> .....	<b>36</b>
<b>2.4 Fisiopatología de la sepsis</b> .....	<b>36</b>
<b>2.5 Fisiopatología del FRA inducido por sepsis</b> .....	<b>38</b>
2.5.1 Disfunción microvascular y endotelial .....	40
2.5.2 Alteraciones en la coagulación .....	41
2.5.3 Respuesta inflamatoria.....	42
2.5.4 Disfunción mitocondrial y estrés oxidativo .....	44
2.5.5 Apoptosis .....	44
<b>2.6 Manejo y tratamiento</b> .....	<b>45</b>
<b>3 RABDOMIÓLISIS</b> .....	<b>48</b>
<b>3.1 Antecedentes y situación actual</b> .....	<b>48</b>
<b>3.2 Mioglobina</b> .....	<b>48</b>
<b>3.3 Etiopatología</b> .....	<b>49</b>
<b>3.4 Fisiopatología de la rabdomiólisis</b> .....	<b>50</b>
<b>3.5 Fisiopatología del FRA asociado a rabdomiólisis</b> .....	<b>51</b>
3.5.1 Vasoconstricción renal.....	51
3.5.2 Efecto tóxico directo de la mioglobina .....	52
3.5.3 Obstrucción tubular.....	54
<b>3.6 Mecanismos de protección</b> .....	<b>55</b>
<b>3.7 Manejo y tratamiento</b> .....	<b>56</b>
<b>4 INFLAMASOMA Y FIBROSIS EN EL FRA ENDOTÓXICO</b> .....	<b>58</b>
<b>4.1 Inflamasoma</b> .....	<b>58</b>
<b>4.2 Transición epitelio-mesénquima</b> .....	<b>60</b>
<b>4.3 Fibrosis</b> .....	<b>61</b>
<b>5 CILASTATINA</b> .....	<b>64</b>
<b>5.1 Imipenem/Cilastatina</b> .....	<b>64</b>
5.1.1 Perspectiva histórica.....	64
5.1.2 Estructura y función de cilastatina .....	64
<b>5.2 Dehidropeptidasa-I</b> .....	<b>66</b>
<b>5.3 Balsas de colesterol</b> .....	<b>66</b>

5.4 Evidencias de nefroprotección por cilastatina .....	67
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>71</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>75</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>79</b>
1 MODELOS EXPERIMENTALES.....	81
<b>1.1 Modelo de FRA inducido por sepsis</b> .....	<b>81</b>
1.1.1 Estudio de supervivencia .....	83
<b>1.2 Modelo de FRA inducido por rabdomiólisis</b> .....	<b>84</b>
2 EXTRACCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS .....	86
3 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y HEMATOLÓGICOS .....	86
4 ESTUDIOS MORFOLÓGICOS E HISTOPATOLÓGICOS .....	87
<b>4.1 Estudios morfológicos</b> .....	<b>87</b>
<b>4.2 Determinación de fibrosis</b> .....	<b>88</b>
<b>4.3 Determinación de hierro</b> .....	<b>88</b>
5 ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS .....	89
<b>5.1 Inmunohistoquímica</b> .....	<b>89</b>
<b>5.2 Inmunofluorescencia</b> .....	<b>90</b>
6. ANÁLISIS PROTEICOS .....	92
<b>6.1 Extracción de proteínas totales</b> .....	<b>92</b>
<b>6.2 Western blot</b> .....	<b>92</b>
<b>6.3 Técnicas de ELISA</b> .....	<b>94</b>
7 MEDIDA DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	94
8 QUANTIBODY RAT CYTOKINE ARRAY 67.....	95
9 ANÁLISIS GENÉTICOS .....	96
<b>9.1 Extracción de ARN total</b> .....	<b>96</b>
<b>9.2 PCR en tiempo real</b> .....	<b>97</b>
10 ENSAYO DE TUNEL.....	98
11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	98
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>99</b>
1 EFECTO DE CILASTATINA EN EL FRA INDUCIDO POR SEPSIS.....	101
<b>1.1 Efecto de cilastatina sobre el peso corporal</b> .....	<b>101</b>
<b>1.2 Cilastatina restaura la función renal</b> .....	<b>101</b>
1.2.1 Parámetros bioquímicos en suero.....	101
1.2.2 Parámetros bioquímicos en orina.....	103
1.2.3 Parámetros estimados de función renal.....	104
<b>1.3 Cilastatina mejora los parámetros hematológicos</b> .....	<b>104</b>
<b>1.4 Estudio de la morfología renal</b> .....	<b>105</b>
<b>1.5 Cilastatina reduce la expresión de KIM-1</b> .....	<b>106</b>
<b>1.6 Efecto de cilastatina sobre la apoptosis</b> .....	<b>107</b>
1.6.1 Cilastatina bloquea la vía intrínseca .....	107
1.6.1.1 Efecto de cilastatina sobre proteínas de la familia Bcl-2.....	107
1.6.1.2 Efecto de cilastatina sobre caspasa-9.....	108
1.6.2 Cilastatina bloquea la vía extrínseca .....	109
1.6.2.1 Efecto de cilastatina sobre el complejo Fas/FasL .....	109
1.6.2.2 Efecto de cilastatina sobre caspasa-8.....	111
1.6.3 Efecto de cilastatina sobre caspasa-3.....	112
<b>1.7 Cilastatina impide la fragmentación del ADN</b> .....	<b>113</b>
<b>1.8 Efecto de cilastatina sobre el estrés oxidativo</b> .....	<b>114</b>

1.8.1 Cilastatina mejora la capacidad antioxidante.....	114
1.8.2 Cilastatina impide la disminución de la enzima Cu/Zn SOD .....	115
1.8.3 Cilastatina mejora la síntesis de catalasa .....	117
1.8.4 Efecto de cilastatina en la síntesis de proteínas de choque térmico.....	117
1.8.5 Cilastatina reduce la peroxidación lipídica .....	119
1.8.5.1 Cilastatina reduce la aparición de 4-HNE y MDA .....	119
<b>1.9 Efecto de cilastatina sobre la inflamación .....</b>	<b>120</b>
1.9.1 Cilastatina disminuye la infiltración de macrófagos .....	120
1.9.2 Efecto de cilastatina sobre citoquinas inflamatorias.....	121
1.9.3 Efecto de cilastatina sobre el eje TLR/MyD88 .....	122
1.9.3.1 Cilastatina bloquea la unión LBP-LPS/CD14 .....	122
1.9.3.2 Cilastatina bloquea la activación de TLR4 y TLR2.....	123
1.9.3.3 Efecto de cilastatina sobre MyD88.....	124
1.9.4 Cilastatina reduce la expresión de NFκB .....	126
1.9.5 Cilastatina bloquea la activación del inflamasoma NLRP3 .....	127
<b>1.10 Efecto de cilastatina sobre moléculas de adhesión.....</b>	<b>128</b>
<b>1.11 Efecto de cilastatina sobre la aparición de fibrosis .....</b>	<b>129</b>
1.11.1 Cilastatina disminuye la expresión de TGFβ y CTGF .....	129
1.11.2 Cilastatina bloquea la transición epitelio-mesénquima .....	131
<b>1.12 Cilastatina aumenta la supervivencia .....</b>	<b>131</b>
<b>2 EFECTO DE CILASTATINA EN EL FRA INDUCIDO POR RABDOMIÓLISIS .....</b>	<b>133</b>
<b>2.1 Efecto de cilastatina en la pérdida de peso corporal e hipertrofia renal .....</b>	<b>133</b>
<b>2.2 Cilastatina restaura la función renal.....</b>	<b>134</b>
2.2.1 Parámetros bioquímicos en suero .....	134
2.2.2 Parámetros bioquímicos en orina.....	137
2.2.3 Parámetros bioquímicos estimados de función renal .....	138
<b>2.3 Estudio de la morfología renal .....</b>	<b>139</b>
<b>2.4 Cilastatina reduce la expresión de KIM-1 .....</b>	<b>140</b>
<b>2.5 Efecto de cilastatina sobre la apoptosis .....</b>	<b>142</b>
2.5.1 Cilastatina bloquea la vía intrínseca .....	142
2.5.1.1 Efecto de cilastatina sobre proteínas de la familia Bcl-2.....	142
2.5.1.2 Efecto de cilastatina sobre caspasa-9.....	143
2.5.2 Cilastatina bloquea la vía extrínseca .....	144
2.5.2.1 Efecto de cilastatina sobre el complejo Fas/FasL .....	144
2.5.2.2 Efecto de cilastatina sobre caspasa-8.....	146
2.5.3 Efecto de cilastatina sobre caspasa-3.....	146
<b>2.6 Cilastatina bloquea la fragmentación del ADN.....</b>	<b>148</b>
<b>2.7 Efecto de cilastatina en la aparición de estrés oxidativo .....</b>	<b>149</b>
2.7.1 Cilastatina recupera la capacidad antioxidante.....	149
2.7.2 Cilastatina impide la disminución de la Cu/Zn SOD .....	149
2.7.3 Cilastatina mejora la síntesis de catalasa .....	151
2.7.4 Efecto de cilastatina en la síntesis de proteínas de choque térmico.....	152
<b>2.8 Cilastatina reduce la peroxidación lipídica .....</b>	<b>153</b>
<b>2.9 Efecto de cilastatina sobre la inflamación .....</b>	<b>153</b>
2.9.1 Cilastatina disminuye la infiltración de macrófagos .....	154
2.9.2 Efecto de cilastatina sobre macrófagos M1/M2.....	155
2.9.3 Efecto de cilastatina sobre citoquinas inflamatorias.....	156
2.9.4 Efecto de cilastatina en la activación del inflamasoma .....	157

2.9.5 Cilastatina reduce la expresión de NFκB .....	158
<b>2.10 Efecto de cilastatina sobre moléculas de adhesión.....</b>	<b>159</b>
<b>2.11 Efecto de cilastatina sobre la TEM y fibrosis .....</b>	<b>160</b>
2.11.1 Cilastatina disminuye la expresión de TGFβ y CTGF .....	160
2.11.2 Cilastatina bloquea la transición epitelio-mesénquima .....	162
<b>2.12 Efecto de cilastatina sobre la acumulación del hierro .....</b>	<b>163</b>
2.12.1 Cilastatina reduce la acumulación de hierro .....	163
2.12.2 Cilastatina reduce la expresión de ferritina.....	164
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>167</b>
<b>A. FRA INDUCIDO POR SEPSIS .....</b>	<b>171</b>
A.1 Cilastatina mejora la función renal y el daño tisular .....	172
A.2 Cilastatina reduce la muerte celular .....	173
A.3 Cilastatina reduce el estrés oxidativo .....	174
A.4 Cilastatina bloquea la vía inflamatoria.....	175
A.5 Cilastatina reduce la aparición de fibrosis .....	178
<b>B. FRA INDUCIDO POR RABDOMIÓLISIS .....</b>	<b>179</b>
B.1 Cilastatina mejora la función renal y el daño tisular .....	180
B.2 Cilastatina reduce la muerte celular .....	181
B.3 Cilastatina reduce el estrés oxidativo.....	182
B.4 Cilastatina bloquea la vía inflamatoria .....	183
B.5 Cilastatina reduce la aparición de fibrosis.....	185
B.6 Cilastatina reduce la acumulación de hierro .....	186
<b>C. CILASTATINA COMO NEFROPROTECTOR FRENTE AL FRA PARENQUIMATOSO ENDOTÓXICO.....</b>	<b>187</b>
<b>D. PERSPECTIVA DE FUTURO DEL FÁRMACO CILASTATINA.....</b>	<b>191</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>193</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>197</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>221</b>
A) PERFIL DE CITOQUINAS MODELO FRA INDUCIDO POR RABDOMIÓLISIS .....	223
B) PATENTES .....	225
C) PUBLICACIONES.....	226
D) PRESENTACIONES EN CONGRESOS .....	227

# **RESUMEN**



## **CILASTATINA EN LA PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DEL FRACASO RENAL AGUDO PARENQUIMATOSO DE ORIGEN ENDOTÓXICO: SEPSIS Y RABDOMIÓLISIS**

**INTRODUCCIÓN:** El fracaso renal agudo (FRA) parenquimatoso se define como un síndrome clínico secundario a múltiples causas en el que tiene lugar un deterioro brusco de las funciones renales, alterando la homeostasis y la composición del medio interno. La sepsis y la rabdomiólisis son dos síndromes complejos, que se incluyen como causas dentro del FRA parenquimatoso endotóxico debido a que el daño es producido por moléculas endógenas derivadas de los mismos, como son el lipopolisacárido (LPS) y la mioglobina que se comportan como endotoxinas. Ambos producen daño por vasoconstricción renal, inflamación, estrés oxidativo, muerte celular y obstrucción tubular. Actualmente no existe ningún fármaco específico para la prevención o el tratamiento del FRA, por lo que la búsqueda de novedosas estrategias protectoras es una tarea prioritaria. Cilastatina, un inhibidor competitivo de la enzima renal dehidropeptidasa-I (DHP-I) localizada en las balsas de colesterol (BDC) de las células epiteliales del túbulo proximal, ha demostrado tener un efecto protector en estudios previos de nuestro grupo. En modelos de FRA inducido por diferentes nefrotóxicos de uso común en clínica, el efecto protector de cilastatina era debido en parte a la interferencia con las BDC, que reducía o cancelaba pasos claves de la señalización auto y paracrina de la ruta extrínseca de la apoptosis.

**HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:** Tras estas observaciones se planteó la hipótesis desarrollada en esta tesis, si un FRA endotóxico puede beneficiarse también del mismo tipo de protección con el fármaco cilastatina. Por ello, el objetivo prioritario es la demostración de que la inhibición de la DHP-I con el fármaco cilastatina, es una alternativa terapéutica segura y eficaz para reducir el daño renal provocado por un FRA de tipo endotóxico, como el inducido por sepsis y rabdomiólisis.

**MATERIALES Y MÉTODOS:** Para la demostración del objetivo se llevaron a cabo dos modelos experimentales en rata, uno de FRA inducido por sepsis mediante ligadura y punción cecal, y otro inducido por rabdomiólisis mediante la administración de glicerol. Para valorar el efecto de cilastatina como nefroprotector, analizamos en cada modelo mediante diferentes técnicas y aproximaciones, la morfología tisular, la capacidad antiapoptótica y antioxidante, así como mecanismos de daño inflamatorios y profibróticos. También determinamos la

interferencia sobre las BDC y su efecto sobre los receptores localizados en ellas como Fas, TLRs y megalina.

**RESULTADOS:** Cilastatina fue capaz de recuperar la función renal y la morfología tisular tras el daño producido en ambos modelos. También fue capaz de reducir los mediadores apoptóticos y los radicales libres liberados, disminuyendo el estrés oxidativo y la peroxidación lipídica, característicos del FRA parenquimatoso endotóxico. Así mismo, redujo la respuesta inflamatoria interfiriendo en la activación del inflammasoma, y evitó la transición epitelio-mesenquimal y la síntesis de mediadores profibróticos que aparecen de manera precoz amplificando la señal de daño hacia el desarrollo de fracaso renal crónico (FRC). El análisis específico de vías de señalización apoptóticas, inflamatorias e inductoras de daño que parten de las BDC, mostró que cilastatina era capaz de reducir o cancelar pasos claves en las mismas, y específicamente a nivel del receptor Fas, los TLR, y megalina, disminuyendo respectivamente la activación de la vía extrínseca de la apoptosis, la activación de las vías inflamatorias y la entrada de mioglobina al interior celular, que en conjunto protegen a las células tubulares proximales. Cilastatina por sí sola, no modificó de modo significativo ninguno de los parámetros estudiados.

**CONCLUSIONES:** El tratamiento con cilastatina es capaz de prevenir y proteger el FRA inducido por sepsis y rabdomiólisis, mediante la reducción de la vías apoptóticas, oxidativas e inflamatorias de daño. Además, evita el desarrollo de fibrosis impidiendo la transición hacia el FRC en etapas muy precoces del FRA. El mecanismo de protección ejercido por cilastatina ocurre al menos en parte tras su unión con la DHP-I a nivel de las BDC, proceso que altera la membrana a nivel de estas estructuras que interfiere en la acción de los receptores o transportadores localizados en ellas implicados en la amplificación del daño inflamatorio, apoptótico y oxidativo que ocurren en el FRA endotóxico, quedando por tanto bloqueado.

Todos nuestros resultados muestran que cilastatina es un fármaco seguro que puede representar una importante alternativa terapéutica, eficaz y prometedora en el tratamiento del FRA de origen endotóxico como los inducidos por sepsis y rabdomiólisis, en la actualidad dos de las complicaciones más graves del FRA parenquimatoso.

# **SUMMARY**



## **CILASTATIN IN THE PREVENTION AND TREATMENT OF PARENCHYMAL ACUTE RENAL FAILURE OF ENDOTOXIC ORIGIN: SEPSIS AND RHABDOMYOLYSIS**

**INTRODUCTION:** Parenchymal acute renal failure (ARF) is defined as a clinical entity secondary to multiple causes in which an abrupt deterioration of renal functions alters homeostasis and the composition of the internal environment. Sepsis and rhabdomyolysis are two complex syndromes that causes endotoxic parenchymal ARF due to the presence of lipopolysaccharide (LPS) and myoglobin respectively, which act as endotoxins. Both produce damage by inducing renal vasoconstriction, inflammation, oxidative stress, cell death and tubular obstruction. There is currently no specific drug for the prevention or treatment of ARF in the context of sepsis and rhabdomyolysis so, the search for novel protective strategies with clinical application is a priority task. In previous studies by our group that cilastatin, a competitive inhibitor of the renal dehydropeptidase-I (DHP-I) enzyme located in the cholesterol rafts (CR) of proximal tubule epithelial cells, protects renal tubule from damage. In models of ARF induced by different compounds commonly used in the clinic with nephrotoxic properties, the protective effect of cilastatin was due in part to interference with the CR, which either reduced or halted key steps in the auto- and paracrine signaling of the extrinsic pathway of apoptosis.

**HYPOTHESIS AND OBJECTIVES:** Based on these observations, the hypothesis assessed in this thesis is whether an endotoxic ARF can also benefit from the same type of protection with the drug cilastatin. Therefore, the main objective is to demonstrate that DHP-I inhibition with the drug cilastatin is a safe and effective therapeutic alternative to reduce renal damage caused by endotoxic ARF, such as that induced by sepsis and rhabdomyolysis.

**MATERIALS AND METHODS:** To demonstrate the objective, two experimental models were carried out in rats. One model of ARF induced by sepsis through cecal ligation and puncture, and one model of ARF induced by rhabdomyolysis through the administration of glycerol. To assess the effect of cilastatin as a nephroprotector, we analyzed the tissue morphology, antiapoptotic and antioxidant capacity of the treatment, as well as the inflammatory and profibrotic damage mechanisms, by different techniques in both models. We also determined the interference on CR and some receptors associated to this membrane structure such as Fas, TLRs and megalin, which are relevant for these cellular processes.

**RESULTS:** Cilastatin improved renal function and tissue morphology after damage in both models. It also reduced the release of apoptotic mediators and free radicals, decreasing oxidative stress and lipid peroxidation, characteristic of endotoxic parenchymal ARF. In addition, cilastatin prevented the progression of ARF to chronic renal failure (CRF) by reducing the inflammatory response and the activation of the inflammasome, as well as by limiting the epithelial-mesenchymal transition and the early synthesis of profibrotic mediators. We analyzed the specific proapoptotic and proinflammatory signalling downstream receptor activation at the CR on the renal tubular cell membrane. Cilastatin decreased apoptosis, inflammation and myoglobin uptake in renal tubular proximal cells, by inhibiting Fas receptor, TLRs and megalin respectively. Cilastatin did not significantly modify any of these parameters in healthy kidneys.

**CONCLUSIONS:** Cilastatin treatment protects from sepsis- and rhabdomyolysis-induced ARF by reducing apoptotic, oxidative stress and inflammatory pathways, and thus, limiting parenchymal damage. In addition, it prevents the development of CRF by preventing fibrosis at very early stages of ARF. The protective mechanism exerted by cilastatin occurs, at least in part, after its binding to DHP-I at the CR. Cilastatin interferes with the action of receptors or transporters located at the CR, which are involved in the amplification of the inflammatory, apoptotic and oxidative damage that occurs during endotoxic ARF.

All our results show that cilastatin may represent a safe and effective therapeutic opportunity in the endotoxin-induced parenchymal ARF, the main Clinical complication during sepsis and rhabdomyolysis syndromes.

# **ABREVIATURAS**



A continuación, se recoge la relación de abreviaturas que aparecen en el texto. En ocasiones se ha mantenido la correspondiente abreviatura y definición en inglés debido a su mayor uso en el lenguaje científico:

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	ADN copia
<b>ALT</b>	Alanina aminotransferasa
<b>APC</b>	Células presentadoras de antígeno
<b>APTT</b>	Tiempo de tromboplastina parcial activada
<b>Arg</b>	Arginasa
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferasa
<b>ATP</b>	Adenosin trifosfato
<b>Bcl-2</b>	<i>B-cell lymphoma 2</i>
<b>Bax</b>	<i>Bcl-2-associated X Protein</i>
<b>BDC</b>	Balsas de colesterol
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>BUN</b>	Nitrógeno ureico en sangre
<b>CD</b>	<i>Cluster of Differentiation</i>
<b>CID</b>	Coagulación intravascular diseminada
<b>CIL</b>	Cilastatina
<b>CIP</b>	Cóctel inhibidores de proteasas
<b>Cl</b>	Cloro
<b>ClH<sub>2</sub>O</b>	Aclaramiento de agua libre
<b>CLP</b>	Ligadura y punción cecal
<b>cm</b>	Centímetro
<b>CREA</b>	Creatinina
<b>CsA</b>	Ciclosporina A
<b>CTGF</b>	Factor de crecimiento de tejido conectivo
<b>Cu/Zn SOD</b>	Cobre/Zinc superóxido dismutasa
<b>Cy3</b>	<i>Cyanine</i>
<b>Da</b>	Dalton
<b>DAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a daño
<b>DAPI</b>	Diclorhidrato de 4´6-diamidino-2-fenilindol
<b>DD</b>	Dímero D
<b>DHP-I</b>	Dehidropeptidasa I
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>DS</b>	Desviación estándar
<b>ECL</b>	Sustrato para inmunotransferencia mejorada
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EEM</b>	Error estándar de la media
<b>EFH<sub>2</sub>O</b>	Excreción fraccional de agua

---

<b>EFNa<sup>+</sup></b>	Excreción fraccional de sodio
<b>EGTA</b>	Ácido etilen-glicol-tetraacético
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<b>ERT</b>	Enfermedad renal terminal
<b>EO</b>	Estrés oxidativo
<b>EPO</b>	Eritropoyetina
<b>ET</b>	Trampas extracelulares
<b>FasL</b>	Ligando de Fas
<b>Fe</b>	Hierro
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>FRA</b>	Fracaso renal agudo
<b>FRC</b>	Fracaso renal crónico
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulante de colonias-granulocito macrófago
<b>GPI</b>	Glicosil fosfatidil inositol
<b>GTTK</b>	Gradiente transtubular de potasio
<b>4-HNE</b>	4-hidroxi-2-nonenal
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>HGUGM</b>	Hospital General Universitario Gregorio Marañón
<b>HMGB1</b>	<i>High Mobility Group box 1 Protein</i>
<b>HO-1</b>	Hemoxigenasa 1/HSP32
<b>HSP</b>	Proteína de choque térmico
<b>Hz</b>	Hercio
<b>i.m.</b>	Vía intramuscular
<b>i.p.</b>	Vía intraperitoneal
<b>i.v.</b>	Vía intravenosa
<b>I/C</b>	Imipenem/Cilastatina
<b>ICAM-1</b>	Molécula de adhesión intracelular-1
<b>IFN</b>	Interferón
<b>IIS-GM</b>	Instituto de Investigación Sanitaria-Gregorio Marañón
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintasa inducible
<b>K<sup>+</sup></b>	Potasio
<b>Kg</b>	Kilogramo
<b>KIM-1</b>	Molécula de daño renal-1
<b>LBP</b>	Proteína de unión al LPS
<b>LDH</b>	Lactato deshidrogenasa
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>LUC</b>	Células grandes no teñidas
<b>M</b>	Molar
<b>MCP-1</b>	Proteína quimioatrayente de macrófagos 1
<b>MD2</b>	Factor de diferenciación mieloide 2
<b>MDA</b>	Malondialdehído
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>g</b>	Gramo

---

<b>miRNAs</b>	microARNs
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milimetro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mmHg</b>	Milímetros de mercurio
<b>MMP</b>	Metaloproteinasa de matriz
<b>MV</b>	Microvesículas
<b>MyD88</b>	<i>Myeloid Differentiation Primary Response 88</i>
<b>μG</b>	Microgramo
<b>μL</b>	Microlitro
<b>μM</b>	Micromolar
<b>NaCl</b>	Cloruro sódico
<b>NaF</b>	Fluoruro sódico
<b>NFκB</b>	Factor nuclear κB
<b>NHE-3</b>	Intercambiador sodio/protones de tipo 3
<b>NK</b>	<i>Natural Killer</i>
<b>NLRP3</b>	<i>NOD-Like Receptor Protein 3</i>
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NP40</b>	Tergitol-type NP-40/nonyl phenoxyethoxyethanol
<b>NTA</b>	Necrosis tubular aguda
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Anión superóxido
<b>OAT</b>	Transportadores de aniones orgánicos
<b>PAMP</b>	Patrón molecular asociado a patógeno
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PBS-T</b>	PBS-Tween 20
<b>PCR</b>	Proteína C reactiva
<b>PCT</b>	Procalcitonina
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>PTEC</b>	Célula epitelial de túbulo proximal
<b>qSOFA</b>	<i>Quick SOFA/SOFA</i> rápido
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>RIFLE</b>	Acrónimo: riesgo, lesión, fallo, pérdida, enfermedad renal terminal
<b>RNS</b>	Especies reactivas de nitrógeno
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>Rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RT</b>	Temperatura ambiente
<b>RT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real (RT)
<b>pg</b>	Picogramo
<b>PRR</b>	Receptores de reconocimiento de patrones
<b>SDMO</b>	Síndrome de disfunción multiorgánica
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico
<b>SGLT</b>	<i>Sodium and glucose linked transporter</i>

---

<b>SIRS</b>	Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>SOFA</b>	<i>Sepsis-related Organ Failure Assessment</i>
<b>SER</b>	Sistema reticuloendotelial
<b>SSC</b>	<i>Surviving Sepsis Campaign</i>
<b>TBS</b>	Tampón Tris salino
<b>TBS-T</b>	TBS-Tween 20
<b>TEM</b>	Transición epitelio-mesénquima
<b>TFG</b>	Tasa de filtración glomerular
<b>TGFβ</b>	Factor de crecimiento transformante-β
<b>Th</b>	Células T cooperadoras
<b>TLRs</b>	<i>Toll Like Receptors</i>
<b>TNFR1</b>	Receptor del factor de necrosis tumoral 1
<b>TNFα</b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>TRR</b>	Terapia de remplazamiento renal
<b>TUNEL</b>	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated DUTP nick end labeling</i>
<b>u.a.d</b>	Unidades arbitrarias de densitometrado
<b>UCI</b>	Unidad de cuidados intensivos
<b>Vol</b>	Volumen
<b>VAN</b>	Vancomicina
<b>VC</b>	Vasoconstricción
<b>VCAM-1</b>	Molécula de adhesión celular vascular-1
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento celular endotelial vascular
<b>Wnt</b>	Contracción del inglés <i>Wingless e Int</i>
<b>ZO-1</b>	<i>Zonula Occludens-1</i>

# **INTRODUCCIÓN**



# 1 EL RIÑÓN Y SU FISIOPATOLOGÍA

## 1.1 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

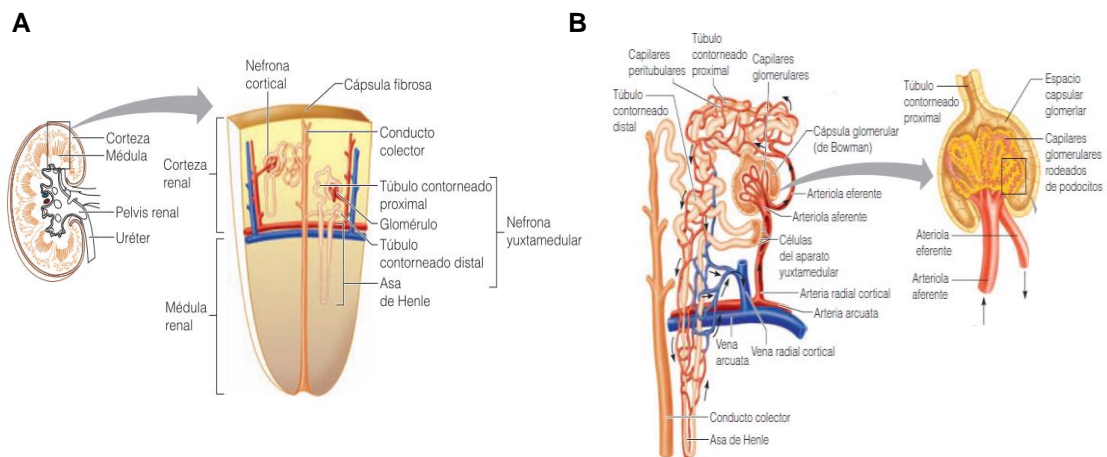
Los riñones son órganos excretores, pares, de unos 150 g y con una longitud de 12 cm y 6 cm de ancho aproximadamente. Están apoyados en la pared abdominal posterior, en posición retroperitoneal en la región lumbar superior. Se encuentran uno a cada lado de la columna vertebral desde la T12 a la L3, protegidos por la parte baja de la caja torácica. Tienen forma convexa en el lateral y en la cara medial hay una región llamada hilio renal, por donde salen y entran otras estructuras como los uréteres, vasos sanguíneos y nervios. Llevan a cabo funciones esenciales<sup>1-3</sup>:

1. *Filtración y excreción* de productos de desecho nitrogenados, toxinas, fármacos e iones excesivos como la urea, creatinina, ácido úrico o la bilirrubina mediante la orina.
2. *Función reguladora del medio interno y osmolaridad*. La excreción y la regulación del equilibrio electrolítico están íntimamente relacionadas ya que, para mantener la homeostasis, la excreción de agua y sales debe estar acorde con su ingesta<sup>4,5</sup>.
3. *Regulación del equilibrio ácido-base*. Es el único medio para eliminar ciertos tipos de ácidos generados por el metabolismo de las proteínas, como el ácido sulfúrico y el fosfórico. Interviene en el metabolismo intermediario, sobre todo en la degradación de los péptidos y los aminoácidos.
4. *Regulación de la presión arterial*. Desempeñan una función fundamental en la regulación a largo plazo al excretar cantidades variables de sodio y agua. A corto plazo, mediante la secreción de hormonas y sustancias vasoactivas como la renina.
5. *Secreción y liberación de hormonas*. Los riñones secretan eritropoyetina (EPO), que estimula la producción de eritrocitos en la médula ósea. Producen la forma activa de la vitamina D (calcitriol), esencial para el depósito normal del calcio en el hueso y su reabsorción en el aparato digestivo. Desempeña una función importante en la regulación del calcio y potasio.
6. *Gluconeogénesis*. Los riñones sintetizan glucosa a partir de los aminoácidos y otros precursores durante el ayuno prolongado y la incorporan a la sangre.

El riñón es un órgano complejo, altamente especializado y las funciones se llevan a cabo gracias a la nefrona, que es la unidad estructural y funcional básica del riñón (**Figura 1**). En el parénquima renal hay alrededor de un millón y no se pueden regenerar, por lo que cualquier

daño o el propio envejecimiento, reduce su número de forma gradual. Cada nefrona está formada por varias partes:

- **Corpúsculo renal o de Malpighi.** Está formado por la cápsula de Bowman y en su interior se encuentra el glomérulo, una red de capilares. Éste está formado por un endotelio capilar, una membrana basal y sobre ella, una capa de células epiteliales o podocitos que se entrelazan unos con otros rodeándola. La cápsula está formada por un epitelio aplanado y dos polos, el vascular y el urinario que comunica con el túbulo renal. Todo ello forma la barrera de filtración plasmática. Entre la cápsula y el glomérulo se encuentra el espacio urinario, que recoge el ultrafiltrado<sup>3</sup>.
- **Túbulo renal.** Está formado por el túbulo contorneado proximal, el asa de Henle, el túbulo contorneado distal y el conducto colector. En ellos se reabsorben entre otros sodio, agua, aminoácidos y glucosa, y se vierten otras como calcio, potasio, exceso de agua y otras sales.
- **Vasos.** Arteriolas aferente y eferente, que junto con los capilares peritubulares llevan los desechos a los túbulos para su excreción y regresan las sustancias reabsorbidas a la circulación sanguínea.



**Figura 1. Estructura del riñón. A)** Corte esquemático del riñón que representa la topografía general del órgano. La parte del tejido renal en forma de cuña indica la posición de las nefronas en el riñón. **B)** La anatomía detallada de la nefrona y su suministro detallado de la sangre (izquierda). Detalle de la cápsula de Bowman (derecha). *Imagen tomada de Anatomía y Fisiología Humana*<sup>2</sup>.

Se pueden distinguir varias zonas en el parénquima renal. En la corteza se ubican los Corpúsculos de Malpighi y los túbulos contorneados, proximales y distales. En la médula se encuentran las asas de Henle y los túbulos colectores. La pelvis renal es una cavidad plana cerca del hilio que continúa hasta el uréter.

El riñón forma y elimina una orina cuya composición será la adecuada en cuanto a volumen y concentración, según la situación y necesidades del organismo en ese momento, siendo el resultado de tres procesos renales:

**1.- Filtración glomerular.** Es un proceso pasivo no selectivo por el cual el agua y solutos más pequeños como sales inorgánicas y pequeñas moléculas orgánicas, pasan desde la sangre por el glomérulo hacia el túbulo renal. Se obtiene un primer líquido llamado orina capsular o filtrado con una composición semejante al plasma, pero sin proteínas ya que tanto éstas como las células sanguíneas son demasiado grandes para atravesar la membrana de filtración. Esta se produce por la diferencia de presión entre la sangre de los capilares (60-70 mmHg) y la de la cápsula de Bowman (10 mmHg)<sup>1,5,6</sup>.

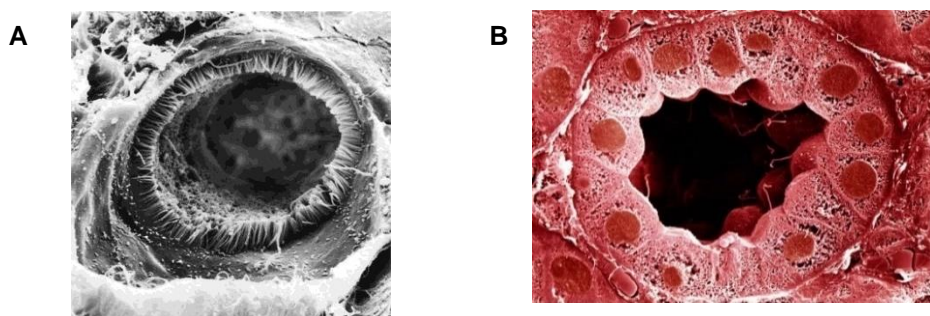
**2.- Reabsorción tubular.** Es un mecanismo activo por el cual la mayor parte de las sustancias filtradas como el 99% del agua, glucosa, aminoácidos e iones, son reabsorbidas por las paredes de los túbulos y devueltas a la sangre para su reutilización<sup>1</sup>.

**3.- Secreción tubular.** Desde la sangre se vuelcan al filtrado residuos metabólicos de desecho como hidrogeniones, potasio, creatinina, urea, amoníaco, ácido úrico y tóxicos. Ocurre con gasto de energía, pero en sentido contrario a la reabsorción<sup>1</sup>.

Los riñones son órganos muy perfundidos por los que circulan unos 1.500 litros de sangre al día. Se calcula que en 24 horas los riñones son capaces de filtrar unos 150 a 180 litros de plasma y en ellos se produce la reabsorción de más del 99% de esta cantidad, produciendo solo de 1 a 1.8 litros de orina<sup>5,6</sup>.

## 1.2 EL TUBÚLO PROXIMAL

Comienza en el polo urinario directamente contiguo al epitelio parietal de la cápsula de Bowman y termina en el asa de Henle. En él se realiza la reabsorción y secreción casi total de los principales solutos, además de la reabsorción del 70% del agua filtrada. Está formado por una capa de células de tipo cúbico (células epiteliales del túbulo proximal o PTEC) que se caracterizan por tener un borde en cepillo muy bien desarrollado en la membrana apical, aumentando la superficie de absorción (**Figura 2**). Destacan sus abundantes mitocondrias, grandes y alargadas, así como prominentes invaginaciones basolaterales. Además, poseen un abundante citoplasma y complejas uniones intercelulares que permiten el transporte iónico paracelular<sup>7,8</sup>.



**Figura 2. Imágenes del túbulo proximal renal. A)** Imagen de microscopía electrónica del túbulo contorneado proximal. Se puede observar el borde en cepillo de las PTEC. **B)** Microscopía electrónica poniendo de manifiesto el epitelio cúbico de las PTEC.

Las PTEC son muy abundantes y las células más importantes, ya que desempeñan tanto funciones reguladoras como endocrinas, localizándose en ellas numerosos transportadores. Los principales transportadores que inician la absorción y secreción en la superficie basolateral son los *transportadores de aniones orgánicos* (OAT) y los *transportadores de cationes orgánicos* (OCT). Estos tienen una amplia especificidad para gran variedad de sustancias endógenas como moléculas de señalización, toxinas urémicas y medicamentos<sup>9-11</sup>. Otros canales también importantes son: el *Intercambiador sodio/protones de tipo 3* (NHE-3), localizado principalmente en la membrana apical; el *Cotransportador sodio-fosfato tipo II* (NaPiII) que participa junto con el intercambiador NHE-3 en la reabsorción proximal de sodio; y la *Aquaporina-1*, que se localiza en la membrana apical y basolateral de las PTEC y en la rama delgada descendente del asa de Henle donde facilita la reabsorción de agua<sup>5</sup>. Otros transportadores importantes se muestran en la **Tabla 1**:

I. FAMILIA SLC22: TRANSPORTADORES DE IONES ORGÁNICOS
1. Subfamilia de transportadores orgánicos de cationes (OCT)
2. Subfamilia transportadores orgánicos de aniones (OAT)
3. Subfamilia transportadores Zwitterion (OCTN)
II. FAMILIA SLC0/SLC21: POLIPÉPTIDOS DE TRANSPORTE DE ANIONES ORGÁNICOS (Oatp)
III. FAMILIA SLC15: TRANSPORTADORES DE OLIGOPÉPTIDOS (PEPT)
IV. FAMILIA SLC17: TRANSPORTADORES $\text{Na}^+/\text{PO}_4^{3-}$ Tipo I (NPT1)
V. FAMILIA SLC47: TRANSPORTADORES MATE
VI. FAMILIA DE TRANSPORTADORES ABC ( <i>ATP-Binding Cassette</i> )
1. Basados en P-glicoproteínas (P-gp)
2. Proteínas resistentes a multidroga (MRPs)

**Tabla 1. Otros transportadores importantes localizados en el túbulo proximal renal.** MATE: Multidrug and Toxin Extrusion. *Tabla modificada de Anzai N<sup>10</sup>.*

En los últimos años han adquirido mucha relevancia los principales transportadores de glucosa: *sodium and glucose linked transporter 1 y 2* (SGLT1 y 2), expresados en el borde en cepillo de la membrana apical. En el túbulo proximal se reabsorbe casi el 100% de la glucosa, en individuos sanos unos 180 g/día<sup>12</sup>. La expresión de SGLT1 va aumentando a lo largo de todo el

túbulo proximal mientras que SGLT2 se expresa desde el inicio del espacio de Bowman hasta la zona contorneada proximal<sup>13</sup>.

Debido a estas características y a la función principal que realiza, cualquier suceso relacionado con el túbulo proximal, estará estrechamente relacionado con la patogénesis de una amplia gama de enfermedades renales. La implicación del túbulo proximal en la enfermedad renal se puede incluir en cuatro categorías: 1) Alteraciones en el transporte: lleva a desequilibrio electrolítico y ácido-base, glucosuria, fosfaturia, entre otros. 2) Lesión directa de las células epiteliales: lleva a la muerte celular debido a una agresión isquémica o tóxica, dando lugar a una lesión renal aguda. 3) Contribución a la evolución del fracaso renal crónico (FRC): debido a la liberación de citoquinas proinflamatorias e inflamatorias por parte de las células dañadas o, a la transición epitelio-mesénquima (TEM) de las células que desemboca en fibrosis renal. 4) Alteración mineral-óseo y anemia en el FRC: ocurre como consecuencia de las deficiencias de vitamina D y de EPO<sup>5</sup>.

Por todo esto, conocer el funcionamiento de los transportadores en el túbulo proximal, junto con el reconocimiento de la capacidad de respuesta inmunológica intrínseca de sus células, contribuye a comprender mejor las funciones del riñón y su patología<sup>7</sup>.

### 1.3 DAÑO RENAL

La enfermedad renal es un problema global de salud pública que afecta a más de 750 millones de personas en todo el mundo. Entre el 8-10% de la población adulta presenta algún tipo de daño renal y cada año millones de personas mueren prematuramente por complicaciones relacionadas con ella<sup>14,15</sup>.

En la mayoría de las enfermedades renales, el funcionamiento de las nefronas se ve alterado impidiendo la correcta eliminación de los productos de desecho formados y su acumulación en sangre. Como consecuencia del daño renal se producen también alteraciones importantes en el mantenimiento del equilibrio electrolítico y la volemia. Existen varias clasificaciones para las nefropatías. Basándonos en la naturaleza de la lesión inicial y la zona del riñón más afectada, se pueden clasificar en *glomerulares, vasculares o tubulointersticiales*. Según su evolución, se clasifican en *agudas o crónicas*, pudiendo causar fracaso renal agudo (FRA) o FRC<sup>15</sup>. Independientemente del tipo de nefropatía, la consecuencia más grave es la pérdida de las funciones del riñón que puede llevar a la muerte. La caída brusca de la función renal puede deberse a una lesión isquémica, oxidativa, inflamatoria o tóxica, dando lugar al FRA. Sin embargo, en la mayoría de las enfermedades renales hay una destrucción y reducción de las nefronas funcionales que progresivamente va dañando al resto y que lleva al FRC. Ambos son

síndromes relacionados, ya que la existencia de uno incrementa el riesgo de aparición del otro<sup>16,17</sup>. Padecer algún tipo de FRA eleva el riesgo a desarrollar FRC en los siguientes 10-15 años<sup>18</sup>. Ambos tienen respuestas adaptativas y patológicas comunes como la muerte celular o la proliferación e inflamación, que llevan al deterioro del filtrado glomerular. El aumento de la carga tubular predispone a la fibrosis y a la senescencia<sup>16</sup>.

Desafortunadamente, el tratamiento del daño renal no ha progresado demasiado en los últimos 70 años. El desarrollo de nuevos tratamientos terapéuticos más efectivos, pasa por comprender completamente todos los mecanismos moleculares responsables de la progresión del daño renal<sup>18</sup>.

### **1.3.1 FRACASO RENAL AGUDO**

#### **1.3.1.1 Situación actual de la enfermedad**

Históricamente ha sido difícil valorar la incidencia del FRA debido a la falta de consenso a la hora de establecer una definición clara<sup>19,20</sup>. De hecho, no existe una definición universal del FRA, pero a lo largo de los años se han barajado algunas atendiendo a diferentes criterios<sup>21</sup>. Quizás la más completa y la que se ajusta más a la realidad, es la que define el FRA como un síndrome clínico secundario a múltiples causas, caracterizándose por un deterioro rápido de la función renal (desde horas hasta pocos días) y con un descenso brusco de la tasa de filtración glomerular (TFG), alterando la homeostasis del organismo y la composición del medio interno. Como consecuencia, tiene lugar un aumento de la concentración de los productos nitrogenados en sangre, lo que sirve como marcador del FRA independientemente de su origen<sup>17,22,23</sup>. Es reversible en fases iniciales si se elimina el origen del daño, sin embargo puede evolucionar a la cronicidad sobre todo si existe un FRC previo<sup>24</sup>. No solo es un marcador de enfermedad severa sino un factor de riesgo de mortalidad independiente<sup>19,20</sup>, que se asocia con un incremento significativo del riesgo de mortalidad<sup>25-27</sup>. Es responsable de aproximadamente dos millones de muertes anuales en todo el mundo, siendo cada vez más frecuente en el paciente crítico<sup>16,28,29</sup>.

El término FRA refleja el amplio espectro que presenta el daño renal, desde pequeñas alteraciones en parámetros sanguíneos hasta la necesidad de diálisis. Se sabe que pequeñas elevaciones en la creatinina sérica y la duración del daño renal se asocian con peores resultados, siendo el tiempo un factor de riesgo importante<sup>19,20,28</sup>. Las causas más comunes se asocian con sepsis, cirugía cardíaca, politraumatismos, isquemia-reperfusión y daño nefrotóxico. En pacientes hospitalizados la causa suele ser multifactorial y en el paciente crítico, la sepsis destaca como la causa principal<sup>19,20,23,27</sup>. Se caracteriza por un incremento de la respuesta inflamatoria, apoptosis, necrosis y retraso en la proliferación de células renales residentes<sup>25</sup>.

Alrededor del 15% de los pacientes afectados por un daño renal serán hospitalizados y entre el 18-22% de pacientes, desarrollarán un FRA durante su estancia hospitalaria. La incidencia más alta se encuentra en la UCI, donde el 35-67% de los pacientes se verán afectados por un FRA con una mortalidad del 27%, que se eleva al 45-60% cuando existen otras complicaciones como la sepsis, llegando al 80% en los que presentan disfunción multiorgánica<sup>19,24-27,30</sup>. En aquellos pacientes con la forma más severa de FRA que requieren terapia de remplazamiento renal (TRR), la mortalidad alcanza el 50-80%. La edad avanzada predispone al FRA por lo que se espera que éste aumente por el envejecimiento de la población<sup>16,24</sup>.

### 1.3.1.2 Clasificaciones del FRA

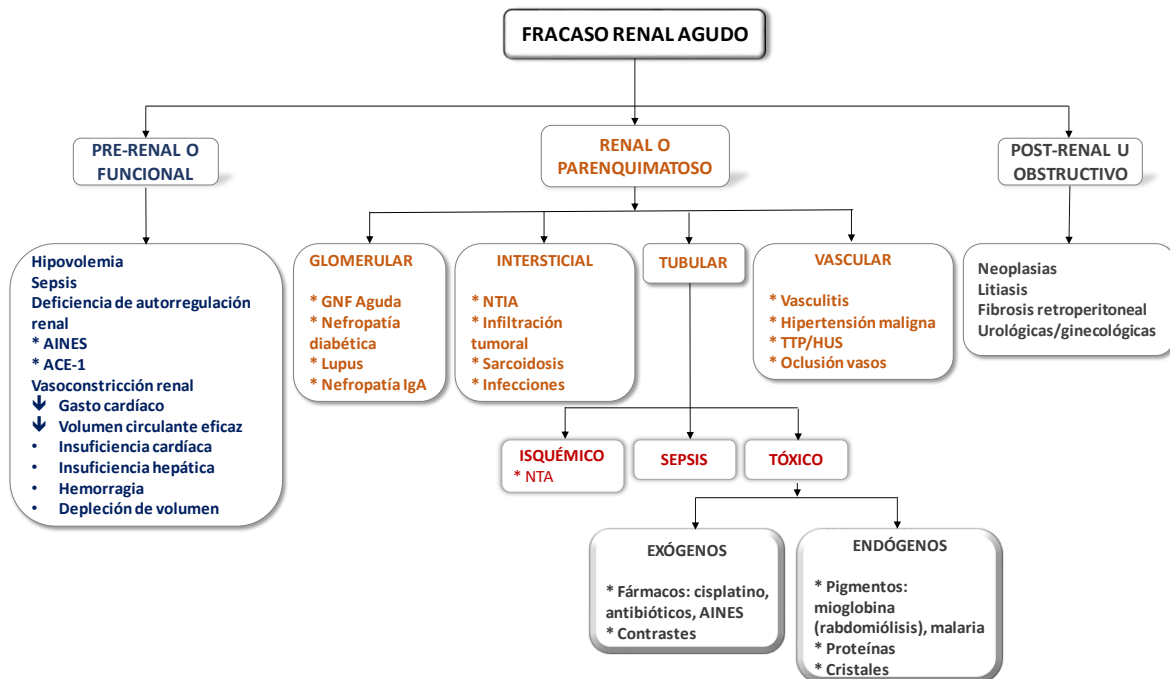
Existen varias propuestas de clasificación funcional del FRA. La primera fue desarrollada por la *Acute Dialysis Quality Initiative* (ADQI) en 2004, que estableció la clasificación diagnóstica RIFLE con el objetivo de estandarizar los estadios del FRA. RIFLE es el acrónimo en inglés de riesgo (*Risk*), lesión (*Injury*), fallo (*Failure*), pérdida de función renal (*Loss*) y enfermedad renal terminal (*End-stage, ERT*)<sup>21,24,27,30</sup>. Otras clasificaciones más sensibles son, la *Acute Kidney Injury NetWork* (AKIN) del 2007 y la descrita en 2012 por la *Kidney Disease Improving Global Outcome* (KDIGO)<sup>19,23,24</sup>, que engloba los criterios de las anteriores clasificaciones<sup>31</sup>. Existe una clasificación del 2013, basada en la cinética de la creatinina a lo largo de 48 horas que ofrece algunas ventajas en pacientes con enfermedad crónica previa<sup>32</sup>.

Para que el riñón funcione correctamente tienen que darse tres condiciones: adecuada perfusión sanguínea, integridad del parénquima renal y permeabilidad de las vías excretoras. Cualquier alteración que se produzca en estos niveles va a dar lugar a una pérdida de función renal<sup>22,24</sup>. En base a esto, podemos clasificar el FRA según el origen del daño (**Figura 3**):

**A) Funcional o pre-renal.** Se produce por una disminución de la perfusión renal debido a una reducción de la volemia. Puede ser *preglomerular*, *glomerular* y *postglomerular o tubulointersticial*. Los riñones son muy sensibles a la disminución del flujo sanguíneo, por lo que es muy importante mantener la presión arterial en niveles normales y asegurar que existe una adecuada presión de filtrado. No hay daño en el parénquima pero si se prolonga en el tiempo, puede llevar hacia una necrosis tubular aguda (NTA)<sup>20,23,24</sup>.

**B) Parenquimatoso, renal o intrínseco.** Ocurre cuando se ven afectadas directamente las estructuras renales: los túbulos, glomérulos, intersticio y vasos sanguíneos intrarrenales. Entre las principales causas encontramos factores endotóxicos como en la sepsis y la rabdomiólisis. Aquí hay un daño selectivo en los túbulos dando lugar a NTA<sup>33</sup>.

**C) Post-renal u obstructivo.** Tiene lugar cuando se produce una interrupción del flujo urinario que aumenta la presión intratubular y por tanto disminuye la TFG. Además, puede llevar a un deterioro del flujo sanguíneo y procesos inflamatorios que contribuyen a disminuir la TFG. Puede recuperarse la función renal cuando se eliminan las causas obstructivas<sup>19,22-24,27</sup>.



**Figura 3. Clasificación del Fracaso Renal Agudo según el origen del daño y sus causas.** AINES: antiinflamatorios no esteroideos; ACE: enzima convertidora de angiotensina; GNF: glomerulonefritis; NTIA: necrosis tubular intersticial aguda; TTP: púrpura trombocitopénica trombótica; HUS: microangiopatías; NTA: necrosis tubular aguda.

### 1.3.1.3 Fases del FRA

En la fisiopatología del FRA se diferencian cinco fases (**Figura 4**), que son comunes independientemente del tipo de agresión:

**(1) Agresión pre-renal.** Se mantiene la integridad celular. Ya sea hemodinámica o tóxica, cualquiera que sea la causa lleva a una disminución del flujo sanguíneo y con ello una deficiencia en el transporte, llegada de oxígeno y nutrientes, y a procesos inflamatorios<sup>23</sup>.

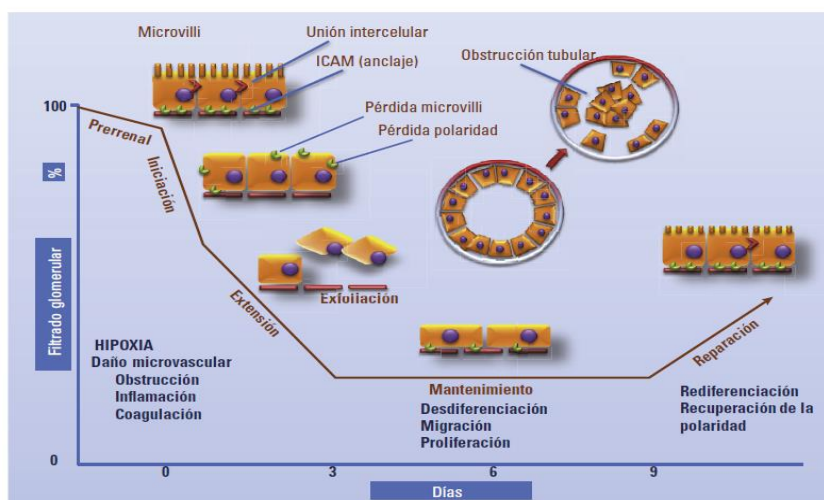
**(2) Fase de iniciación.** Como resultado del descenso del flujo sanguíneo renal, se reduce la producción de ATP intracelular. Cuando la PTEC es agredida de manera irreversible se activa la apoptosis intrínseca, ya sea por daño primario sobre el ADN, la mitocondria o membrana celular<sup>34</sup>.

**(3) Fase de extensión.** Es la más importante y se caracteriza por la persistencia de la hipoxia y la respuesta inflamatoria. En esta fase la disfunción de las células endoteliales y musculares lisas de la microcirculación desempeñan un papel fundamental. Hay una alteración en la regulación de células inflamatorias, con la consiguiente liberación de citoquinas; aumenta

la expresión de moléculas de adhesión que incrementa la migración de leucocitos. Lo que más destaca en la lesión renal es la pérdida del borde en cepillo de la membrana apical de las PTEC. Si se mantiene el daño, las células dejan de ser viables, mueren por necrosis y más comúnmente por apoptosis extrínseca<sup>34</sup>. Aparecen ambas formas de muerte celular, pero se dará una u otra en función de la rapidez, intensidad y duración de la agresión. Debido a la pérdida de las uniones estrechas y adherentes, las células caen al espacio urinario contribuyendo a la dilatación tubular proximal. A esto se suma la formación de cilindros intratubulares compuestos por proteínas, células viables y apoptóticas, y detritus celulares. Debido a la exfoliación y desprendimiento, los túbulos quedan desprovistos de su capa celular y con su luz obstruida aumenta la presión en la cápsula de Bowman reduciendo más el filtrado glomerular. La alteración de los complejos de unión incrementa la permeabilidad y la fuga intersticial de la orina por daño de la membrana basal tubular, produciéndose un cambio en la localización de las proteínas de anclaje, que no solo se expresarán en el polo basal sino también en el apical<sup>23,24,35</sup>. Se ven afectados igualmente las bombas dependientes de ATP, que son incapaces de eliminar el sodio intracelular dando lugar a edema celular, se incrementa el calcio citosólico y mitocondrial interrumpiendo el proceso de respiración celular<sup>24</sup>.

**(4) Fase de mantenimiento.** Las células comienzan a repararse mediante procesos de desdiferenciación, migración, apoptosis y proliferación, para mantener la integridad celular y tubular.

**(5) Fase de recuperación.** Comienza con la desaparición de la agresión que lo ha provocado a partir de las células viables desprendidas, se mantiene la diferenciación celular y se restablece la polaridad epitelial<sup>24,35,36</sup>.



**Figura 4. Las cinco fases evolutivas del Fracaso Renal Agudo.** Caída del filtrado glomerular (%) según los días desde el inicio de la agresión. ICAM-1: Molécula de adhesión celular intercelular 1. Extraída de Rodríguez-Palomares JR<sup>24</sup>.

#### 1.3.1.4 FRA parenquimatoso de origen endotóxico

Actualmente se considera que solo el daño intrínseco representa la verdadera enfermedad renal y la causa más frecuente de FRA, mientras que el pre- y post-renal son la consecuencia de daños extrarrenales que llevan a la disminución de la TFG. Si estas condiciones se mantienen, evolucionarán a enfermedad renal intrínseca<sup>23</sup>. La forma más severa y frecuente de FRA parenquimatoso es la NTA con un 85% de los casos y caracterizada por la lesión de las PTEC<sup>24</sup>. Podemos diferenciar dos grandes grupos de NTA:

ϕ **Por isquemia-reperfusión**, que es la causa más común con un 50%. Cuando hay un daño isquémico, la PTEC es la que más se daña afectando posteriormente al resto del túbulo e intersticio.

ϕ **Nefrotóxica y por pigmentos**, supone el 35%. Al ser un órgano muy vascularizado, el riñón presenta una gran capacidad de concentrar sustancias tóxicas. Es especialmente vulnerable a la acción tóxica directa de numerosos fármacos y pigmentos como la mioglobina, liberada al producirse la destrucción del músculo esquelético en la rabdomiólisis<sup>23,24,35,36</sup>.

La rabdomiólisis y la sepsis son dos síndromes que se incluyen dentro del FRA parenquimatoso endotóxico debido a que el daño es producido por moléculas endógenas derivadas de los mismos al comportarse como endotoxinas. En el primer caso, el daño es ocasionado por la hemoproteína mioglobina y sus productos de degradación, como su grupo hemo y/o el hierro catalítico, al ser liberados por el músculo esquelético dañado. En la sepsis, la endotoxina lipopolisacárido o LPS es un pirógeno liberado tras la desintegración bacteriana. La endotoxemia lleva al FRA por vasoconstricción (VC) renal, liberación de citoquinas y obstrucción tubular dando como resultado disminución de la TFG<sup>33</sup>.

Determinar la causa del daño de forma precoz es fundamental para aplicar el tratamiento adecuado y evitar la progresión y complicación del FRA. En el caso de la sepsis por ejemplo, es de vital importancia el control del foco de la infección usando antibióticos o cirugía de forma temprana<sup>20</sup>. Actualmente no hay un tratamiento farmacológico específico para prevenir el FRA en poblaciones de alto riesgo, ni para tratarla una vez establecida. Por ello, el manejo del FRA va encaminado hacia técnicas de soporte destinadas a eliminar el problema responsable del FRA, como incrementar la volemia. En casos más grave se recurre a la TRR o hemodiálisis<sup>29,37</sup>.

### 1.3.2 FRACASO RENAL CRÓNICO

El FRC es la pérdida gradual y progresiva de la capacidad de los riñones para eliminar desechos, concentrar la orina y conservar los electrolitos. Es una de las causas de muerte que más se está incrementando en estos últimos años y se prevé que en 2040 se convierta en la quinta causa de muerte a nivel mundial. Es uno de los problemas de salud pública más importantes debido a su elevada prevalencia, alta tasa de mortalidad y a la pérdida de la calidad de vida<sup>29,38,39</sup>. Los factores que contribuyen a la progresión del FRC son la pérdida progresiva e irreversible de nefronas, la reducción de la capacidad de regeneración del riñón, el daño microvascular, cambios metabólicos, estrés oxidativo (EO) y la inflamación crónica que dan lugar a fibrosis. Puede conducir a la muerte prematura o a la ERT y posterior diálisis o trasplante de riñón<sup>29,40</sup>. Independientemente de las causas, hay un desenlace común que se caracteriza por una fibrosis tubulointersticial, donde se observa una acumulación de matriz extracelular (MEC), una atrofia tubular, infiltración de células inflamatorias y pérdida de microvasculatura peritubular<sup>37,41</sup>.

Se ha establecido una correlación entre la disminución de la función renal, el daño tubulointersticial y una mala reparación de los túbulos dañados tras un FRA llevando a FRC<sup>42,43</sup>. Existe una estrecha relación entre ambos, ya que el FRA acelera la progresión hacia la cronificación y los pacientes con FRC tienen un mayor riesgo de desarrollar un episodio de FRA, independientemente de la causa<sup>29,40</sup>. Alrededor de un 15-20% progresará a un estado avanzado de FRC en los siguientes dos años<sup>14,16</sup>.

## 2 SEPSIS

### 2.1 DEFINICIONES Y CLASIFICACIÓN

El concepto de sepsis ya se manejaba hace 2.000 años, cuando Hipócrates afirmaba que la sepsis era el proceso por el cual la carne se pudría y las heridas se infectaban. Con el desarrollo de la microbiología moderna y un mejor conocimiento de la sepsis, los investigadores se dieron cuenta de que era causada por una infección microbiana. Actualmente, la sepsis es considerada de manera general como una enfermedad sistémica inducida por una infección que provoca anomalías patológicas, fisiológicas y bioquímicas en el organismo<sup>44</sup>.

En 2016, se desarrolló una nueva definición poniendo el foco en el reconocimiento de la disfunción de órganos en el contexto de la infección. De esta forma, se define **sepsis** como un síndrome clínico potencialmente mortal caracterizado por una disfunción orgánica causada por una respuesta descontrolada del hospedador a una infección<sup>45-48</sup>.

Aunque la sepsis ha sido reconocida como causa de morbi-mortalidad durante siglos, solo hace unas décadas que se estableció un consenso en las definiciones. En 1991, en la *International Sepsis Definitions Conference (Sepsis-1)*, se establecieron las primeras definiciones que se utilizaron en la práctica clínica y traslacional: *El síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS)*, indicaba una respuesta inflamatoria potencialmente dañina; *sepsis* se definió como SIRS con infección; *sepsis severa* cuando se desarrollaba una disfunción orgánica; y *shock séptico* como una sepsis con hipotensión persistente o fallo cardiocirculatorio. Al ser poco específicas, en la **Sepsis-2** de 2001, fueron revisadas y se añadieron indicadores específicos de inflamación, hemodinámica, disfunción de órganos y perfusión tisular<sup>44,47</sup>.

Con ello, en el *Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)* de 2016, las definiciones esenciales fueron actualizadas y modificadas. Se eliminaron los términos SIRS y sepsis severa, ya que el término sepsis se considera suficientemente grave por sí solo, y se establecieron el de infección, sepsis y shock séptico. Mientras que los anteriores, **Sepsis-1 y 2**, se centraban en la detección de la inflamación sistémica como respuesta a la infección, **Sepsis-3** la define como una disfunción orgánica potencialmente mortal resultado de una desregulación de la respuesta del hospedador a la infección. Ya no se centra en los signos y síntomas de inflamación, ya que pueden reflejar una respuesta saludable a una infección sistémica, sino que es más que una inflamación. Se destaca que la respuesta no es fisiológica sino desregulada, dando lugar a una disfunción orgánica tan grave como para poner en peligro la vida del paciente.

El **shock séptico** ahora es definido como una subcategoría dentro de la sepsis, en el que, a pesar de la administración adecuada de líquidos, los pacientes presentan hipotensión y elevada concentración de lactato en sangre, aparecen alteraciones metabólicas, circulatorias y celulares, que son lo suficientemente graves como para incrementar el riesgo de muerte a más de un 40%<sup>46,47,49</sup>.

La disfunción orgánica es medida en base a criterios de Evaluación de Fallo Orgánico relacionado con Sepsis (SOFA o *Sepsis-related Organ Failure Assessment*) y se considera que hay riesgo mortal si la puntuación es  $\geq 2$  puntos. La sepsis se define ahora como la presencia de infección clara o sospechosa combinada con un cambio agudo en el score SOFA  $\geq 2$  puntos. Como esta puntuación no siempre puede aplicarse fuera de la UCI, se estableció el SOFA rápido (q) como herramienta de cribado de la sepsis. El score qSOFA, consta de tres criterios fáciles de evaluar: 1) Alteración del estado mental (escala de coma de Glasgow  $< 15$ ); 2) Frecuencia respiratoria  $\geq 22$  respiraciones/minuto; 3) Presión arterial sistólica  $\leq 100$  mmHg. Los pacientes son considerados de alto riesgo si presentan al menos 2 de los 3 criterios establecidos<sup>46,48,50</sup>.

## 2.2 SITUACIÓN ACTUAL

La verdadera incidencia y la prevalencia de la sepsis es desconocida, ya que depende de la definición específica que se haya utilizado, del organismo infectivo y de los registros empleados. Estos factores provocan que exista una importante diferencia entre las estimaciones realizadas y la localización geográfica ya que por ejemplo, la mayoría de los datos manejados describen la incidencia de sepsis en países desarrollados, dejando fuera a más del 80% de los países con pocos recursos<sup>46,51</sup>. Debido a la sospecha de un elevado número de casos no notificados, la incidencia estimada de la sepsis y su muerte asociada se supone que es aún mayor en todo el mundo y podemos estar infravalorando su impacto<sup>50</sup>. En los últimos 30 años, una gran cantidad de investigaciones y la mejora de los procedimientos clínicos han ayudado a mejorar el reconocimiento y el tratamiento de la sepsis. Actualmente, permanece como una de las principales causas de muerte a nivel mundial, siendo la responsable del 20-50% de las muertes intrahospitalarias. Es un problema importante de salud pública, con un gran impacto económico y coste por día, ya que puede multiplicarse entre 2-11 veces con respecto al de otros pacientes hospitalizados. Además, se añade que la calidad de vida se ve mermada en el siguiente año y medio<sup>45</sup>.

Según los datos publicados a nivel mundial, la sepsis afecta aproximadamente a un 20% de los pacientes de la UCI. Cada año se producen aproximadamente 19 millones de casos nuevos de sepsis<sup>44</sup> y unos 1.400 pacientes mueren al día por algún tipo de enfermedad

relacionada con ella en todo el mundo<sup>50</sup>. Por esta razón, en 2017 la Organización Mundial de la Salud y la Asamblea Mundial de la Salud, hicieron de la sepsis una prioridad de salud global adoptando una resolución que destaca la importancia del diagnóstico, el tratamiento y la prevención. Como trastorno complejo de prioridad mundial, la sepsis ha pasado a estar más en el punto de mira de la medicina y la investigación biomédica<sup>46,50</sup>.

## 2.3 ETIOLOGÍA

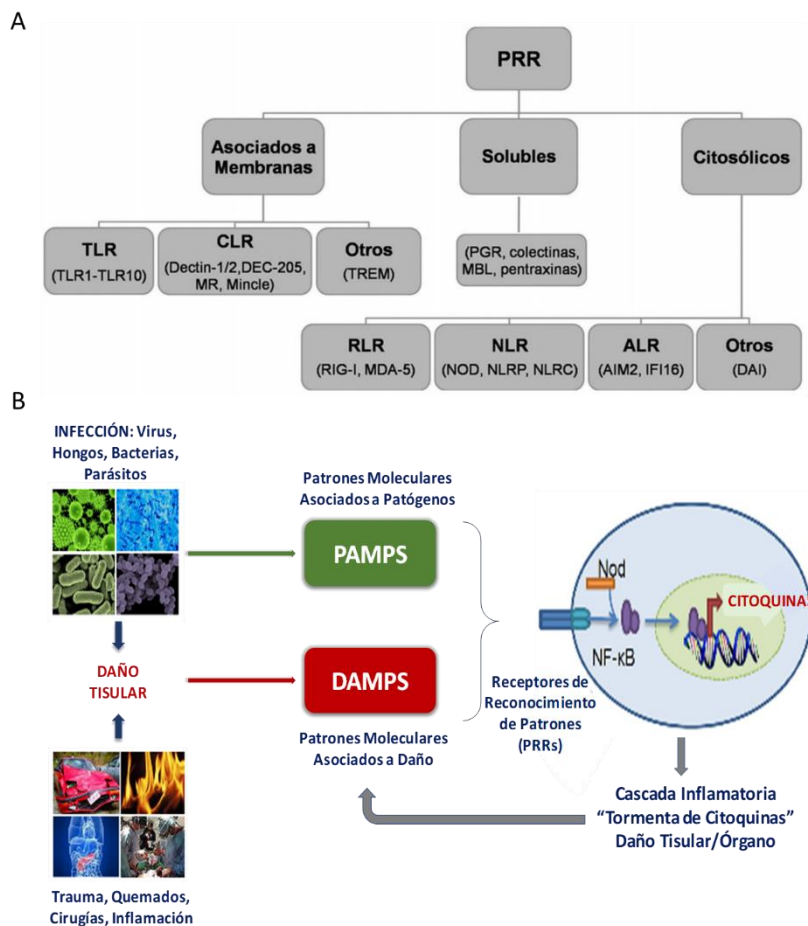
La sepsis puede ser originada por prácticamente cualquier organismo infeccioso. Por esto, el rango de presentación del síndrome es muy amplio y varía considerablemente entre regiones geográficas. Puede ser adquirida durante una estancia hospitalaria o extrahospitalaria, como ocurre en la mayoría de los casos (60-80%). El principal foco de infección que lleva a su desarrollo es el pulmón (64%), seguido del abdomen (20%), la sangre (15%), y el tracto renal y genitourinario (14%). De entre el 30-60% de los casos se obtiene información microbiológica, pero hay estudios contradictorios en cuanto al patógeno causante. Según algunos estudios, parece que hay una prevalencia casi igual de infecciones originadas por Gram-negativos y Gram-positivos. Aunque hay otros en los que sigue siendo mayoritaria la infección por Gram-negativos. Los microorganismos que con más frecuencia aparecen son: *Staphylococcus aureus*, varias especies de *Pseudomonas* y *Escherichia coli*. A veces se presentan de forma inespecífica lo que lleva al retraso en la detección, sobre todo en población frágil<sup>46,51</sup>.

## 2.4 FISIOPATOLOGÍA DE LA SEPSIS

La respuesta inflamatoria secundaria a una infección es un proceso normal y esencial para la supervivencia y la reparación del tejido, ya que localiza y elimina el cuerpo extraño. La clave de la fisiopatología es el desajuste de la respuesta del huésped a la intensidad de los estímulos patógenos y como resultado lleva a la disfunción orgánica. El papel de la inflamación en la fisiopatología de la sepsis parece ser crítico, ya que las interacciones complejas que se dan entre el patógeno y el huésped llevan a una excesiva inflamación y posterior inmunosupresión. Gran parte de esas alteraciones producidas se deben más a esa respuesta exagerada a la invasión que a los efectos directos del propio microorganismo<sup>45,52</sup>.

La fisiopatología de la sepsis tiene una primera fase que implica una ruta de activación inmune bien descrita. Los patógenos infecciosos tienen componentes estructurales denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs o *pathogen-associated molecular patterns*) como la endotoxina LPS, componente de la pared celular de las bacterias Gram-negativas y los peptidoglicanos de las Gram-positivas. Estas moléculas se unen a los

llamados receptores de reconocimiento de patrones (PRR o *patterns recognized receptors*), que incluyen a una familia importante y evolutivamente conservada como son los *Toll like receptors* (TLRs) de superficie, y los citoplasmáticos como los *NOD-Like Receptors* (NLRs) en las células del sistema inmune innato (**Figura 5A**). Como resultado se produce una activación de varias rutas de señalización intracelular que llevan a múltiples respuestas, como la vía del NFκB. Esta respuesta inflamatoria desregulada puede a su vez generar patrones moleculares asociados a daño (DAMPs o *damage-associated molecular patterns*), que también pueden unirse a los PRR amplificando la respuesta inflamatoria. Tiene lugar una producción prolongada de mediadores tanto proinflamatorios como antiinflamatorios, citoquinas como TNFα, IL-1, IL-2, IL-6 e IL-8, y la activación de la respuesta inmune adaptativa<sup>45,46,53,54</sup> (**Figura5B**).



**Figura 5. Mecanismo inflamatorio de la sepsis. A)** Resumen de los tipos de PRR. *Extraído de Hernández López JC<sup>55</sup>. B)* Esquema representativo del mecanismo inflamatorio de la sepsis. Tras el daño, las moléculas generadas se agrupan en PAMPs y/o DAMPs. Su unión a sus receptores da lugar a la activación de vías inflamatorias y síntesis de NFκB que al translocarse al núcleo deriva en la liberación de citoquinas que amplifican el daño. *Modificado de la web Serpin Pharma.*

La hipoxia tisular, la disfunción endotelial y mitocondrial, y la apoptosis parecen ser los principales mediadores de la disfunción orgánica inducida por sepsis. Una característica importante es el desarrollo de un estado procoagulante, ya que las citoquinas inflamatorias activan la cascada de la coagulación e inhiben la fibrinólisis, pudiendo llevar a la generación de microtrombos y al depósito de fibrina en el lecho microvascular. También tiene lugar la activación del complemento y la expresión de moléculas de adhesión<sup>45,46</sup>.

El endotelio tiene un papel fundamental en la patogénesis de la disfunción de órganos en la sepsis. Las células endoteliales vasculares son clave en la regulación de la perfusión tisular a través de la liberación de mediadores vasoactivos<sup>56</sup>. Se produce una disfunción circulatoria ocasionada por la hipovolemia relativa secundaria al edema y a la pérdida del tono vascular, causando un metabolismo anormal del oxígeno. Además, las células endoteliales vasculares ante determinados estímulos, ya sean fisiológicos o patológicos, pueden sufrir apoptosis llevando a disfunción endotelial<sup>45,46,53,56,57</sup>.

Es conocido que los pacientes sépticos entran en un estado inmunosupresor caracterizado por una excesiva apoptosis de las células inmunitarias junto con respuestas celulares deficientes, elevados niveles de citoquinas antiinflamatorias, de células T reguladoras y células supresoras derivadas de mieloides<sup>48</sup>. Pacientes que superan una sepsis temprana son propensos a desarrollar infecciones nosocomiales provocadas por microorganismos que no son patogénicos en hospedadores inmunocompetentes. Parece que un estado hiperinflamatorio inicial evoluciona a una fase hipoinflamatoria con una importante inmunosupresión. La intensidad de la respuesta dependerá de varios factores tanto por parte del hospedador como del patógeno, virulencia y carga, así como si existen comorbilidades<sup>45,46</sup>.

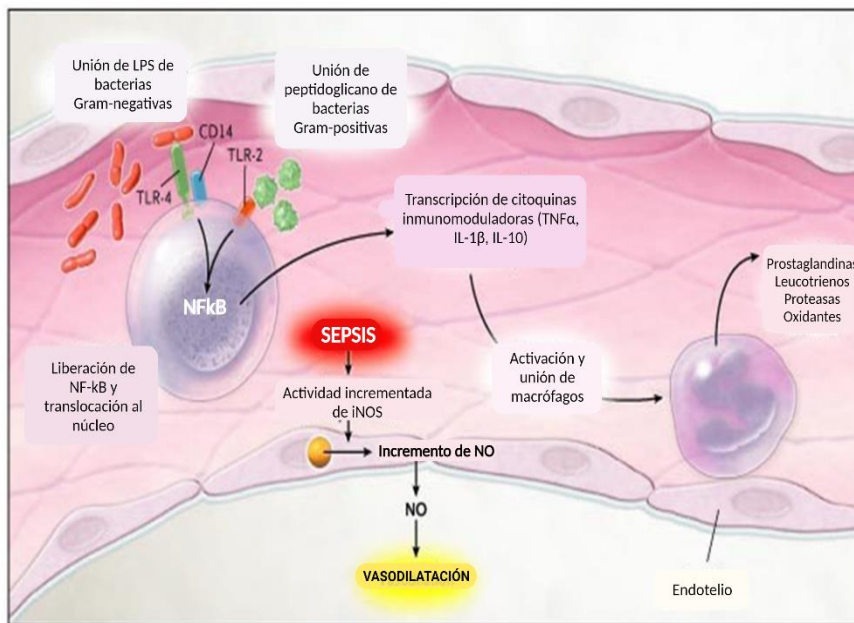
## 2.5 FISIOPATOLOGÍA DEL FRA INDUCIDO POR SEPSIS

Ya se ha visto como una respuesta descontrolada a la infección durante la sepsis generalmente lleva a fallo orgánico. Los riñones son especialmente vulnerables al medio séptico<sup>58,59</sup> por lo que se considera que es un factor importante que contribuye al FRA<sup>44</sup>. Por ello, el FRA es una complicación grave de la sepsis y suele aparecer en las primeras horas de su desarrollo (entre el 30-60% de pacientes desarrollará un FRA). Además, la sepsis es la principal causa del FRA en pacientes críticamente enfermos, con un 40-70%. Ya de por sí, pacientes con FRA tienen un mayor riesgo de muerte que otros pacientes en estado crítico, ya que es un factor de riesgo independiente asociado a mayor mortalidad<sup>60</sup>. Un paciente con sepsis complicada con FRA tiene un incremento significativo de mortalidad relativa (70%) con respecto a otro sin FRA (45%), y es aún más alta que aquellos con FRA de otras causas<sup>47,49,58,61-64</sup>.

Se sabe que la alteración de la función renal es detectable cuando ya se ha lesionado más del 50% del parénquima renal<sup>44</sup>, lo que podría derivar en ERT y promover el daño en otros órganos, llevando al síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO) incrementando la mortalidad<sup>58</sup>. El FRA propio de la sepsis se diagnostica en el paciente que cumple los criterios de sepsis ya comentados anteriormente, y que no tenga otras causas que expliquen ese FRA, como la utilización de nefrotóxicos<sup>60</sup>.

El estudio de la fisiopatología del FRA en sepsis presenta varias limitaciones. Una de las más importantes es la ausencia de información detallada de los cambios histopatológicos renales que ocurren en humanos, ya que las biopsias están contraindicadas y son técnicamente complicadas en UCI. Aparte de las limitaciones clínicas que supone la sepsis, también es difícil recrear completamente el síndrome clínico en condiciones experimentales. Los modelos disponibles no siempre reproducen con precisión el síndrome séptico. Otro problema es la obtención de medidas fiables de parámetros hemodinámicos. Además, se ha observado a la hora de realizar modelos animales, que algunas especies de roedores presentan una resistencia intrínseca a la endotoxina. A esto se añade la corta duración que tienen estos modelos comparados con el a veces, prolongado y complicado curso clínico del paciente séptico que ha sobrevivido<sup>59,62</sup>.

El FRA inducido por sepsis se caracteriza por desarrollar una fisiopatología distinta a las de otras enfermedades. Es muy compleja e incluye una combinación de eventos que hacen que la TFG caiga rápidamente. Inicialmente se creía que la hipoperfusión renal y la isquemia asociada eran la principal causa, pero estudios recientes han mostrado que la inflamación y apoptosis son los principales procesos patológicos en el FRA séptico. Esto se ha comprobado viendo la evolución del daño orgánico incluyendo la disfunción macro y microvascular (hipotensión sistémica y VC renal, no necesariamente en el rango isquémico), la desregulación inmunológica y alteraciones en el suministro de oxígeno ya sea por disminución de flujo o por la limitación en la difusión debido al edema e inflamación. La presencia de productos bacterianos en la circulación sistémica activa las células inflamatorias que infiltran el tejido renal e incrementa la secreción de citoquinas como TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 por las células tubulares, y la actividad leucocitaria. Puede producirse trombosis intraglomerular y obstrucción intratubular, ya que se han observado depósitos de fibrina dentro del lumen de capilares glomerulares. Aparece vacuolización de células tubulares medulares e incremento de expresión de la molécula de daño renal o *Kidney Injury Molecule 1* (KIM-1). También aparece alteración mitocondrial y EO al aumentar la producción de ROS e inducción de óxido nítrico sintasa (NOS) (**Figura 6**), que puede llevar al daño de la barrera endotelial y el glicocálix, ocasionado cambios estructurales y funcionales, provocando la disfunción tubular propia del FRA inducido por sepsis<sup>45,46,48,50,54-58,65</sup>.



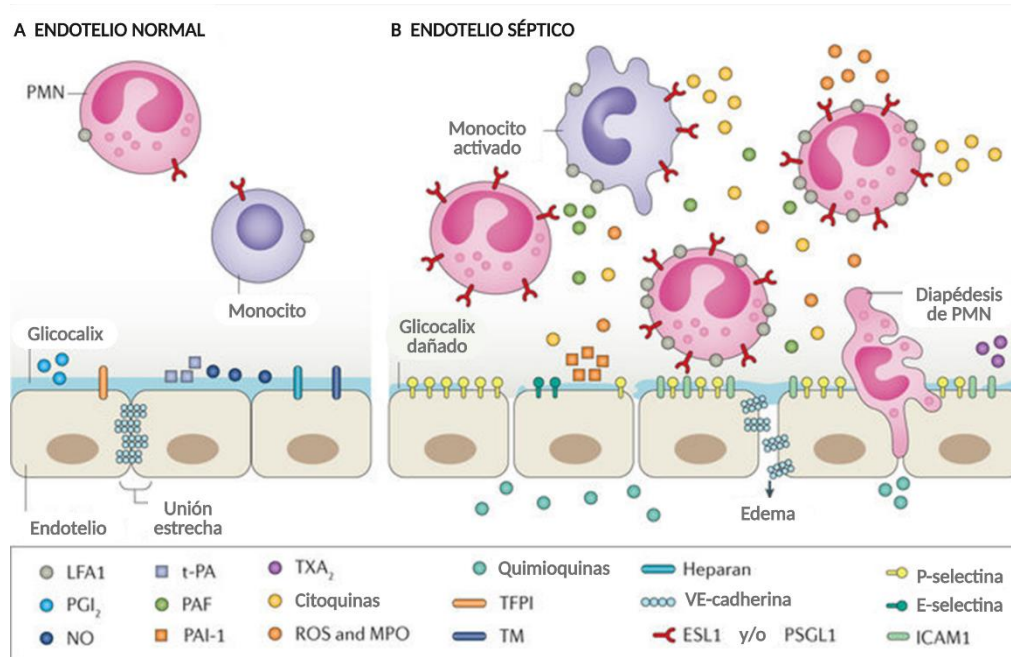
**Figura 6. Respuesta inflamatoria a la sepsis.** Procesos a nivel endotelial tras el daño provocado por la sepsis. Activación y liberación de citoquinas tras la unión de productos bacterianos a sus receptores celulares. Vasodilatación inducida por la liberación de óxido nítrico por las células endoteliales. *Imagen modificada de Russell JA<sup>66</sup> con BioRender.com.*

## 2.5.1 DISFUNCIÓN MICROVASCULAR Y ENDOTELIAL

Tras la producción significativa de citoquinas, los cambios producidos en la permeabilidad vascular son también importantes en la patogénesis del daño orgánico inducido por sepsis, ya que lleva a alteraciones hemodinámicas. Esta alteración de la permeabilidad vascular puede causar en el tejido renal una compresión de los capilares peritubulares, hemoconcentración y disminución del flujo microvascular<sup>67,68</sup>. Este flujo lento hace que los leucocitos activados estén presentes más tiempo y la exposición del endotelio y de las células epiteliales tubulares circundantes a las citoquinas, a los PAMPs y DAMPs sea mayor, provocando la activación endotelial y aumento de la permeabilidad. Esto desencadena más señales inflamatorias, aumenta el EO y contribuye a la disregulación metabólica de las células tubulares renales<sup>61</sup>.

El daño renal implica cambios morfológicos y funcionales en las células endoteliales que activan el infiltrado de neutrófilos, macrófagos, células *Natural Killer* (NK) y linfocitos en el riñón dañado, y se liberan mediadores inflamatorios tanto por las células tubulares como endoteliales, incrementándose la expresión de moléculas de adhesión. La acumulación de células inflamatorias y la obstrucción tubular que lleva a incrementar la presión tubular e intersticial hace disminuir la presión de filtrado que se agrava con el edema. La disminución de la TFG podría actuar como mecanismo protector contra los mediadores generados en la sepsis ya que se filtrarían menos toxinas, como DAMPs y PAMPs, disminuyendo la exposición de las células tubulares a estas moléculas. También es característico del FRA grave inducido por sepsis la reducción de las uniones estrechas y alteración de las uniones adherentes endoteliales. La

lesión y disfunción del endotelio microvascular provoca la liberación del VE-cadherina soluble, que es más grave en pacientes sépticos con FRA<sup>57,62,69,70</sup> (Figura 7).



**Figura 7. Cambios en el endotelio vascular en respuesta al estímulo inflamatorio durante la sepsis. A)** El endotelio vascular en reposo en su estado natural anticoagulante. **B)** La sepsis produce cambios profundos que convierten el endotelio en un estado procoagulante. Este endotelio alterado acelera la pérdida de fluido a través de las uniones estrechas desconectadas y acelera el reclutamiento, la adhesión y la extravasación de células inflamatorias a través del endotelio. La activación de la cascada de coagulación potencia la inflamación. ESL1: ligando de la E-selectina 1; ICAM1: molécula de adhesión intercelular-1; LFA1: antígeno asociado a la función linfocítica 1; MPO: mieloperoxidasa; NO: óxido nítrico; PAF: factor activador de las plaquetas; PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno 1; PGI<sub>2</sub>: prostaglandina I<sub>2</sub>; PMN: leucocito polimorfonuclear; PSGL1: ligando de la P-selectina 1; ROS: especies reactivas del oxígeno; TFPI: inhibidor de la vía del factor tisular; TM: trombosmodulina; t-PA: activador tisular del plasminógeno; TXA<sub>2</sub>: tromboxano A<sub>2</sub>; VE: endotelio vascular. *Modificada de Hotchkiss RS<sup>71</sup> con BioRender.com.*

## 2.5.2 ALTERACIONES EN LA COAGULACIÓN

Ya se ha comentado que la sepsis se caracteriza por presentar un estado procoagulante y antifibrinolítico. Una alteración en la regulación de la coagulación tiene un papel importante en la generación sistémica de trombina y la consecuente formación de microtrombos contribuyendo a la disfunción orgánica. Durante la sepsis, la coagulación es inducida por el daño vascular e inflamación<sup>62</sup> por aumento en la expresión del factor tisular. En el riñón, se han descrito depósitos de fibrina en los capilares glomerulares<sup>60</sup>. La relación existente entre coagulación e inflamación es lo que se conoce como "inmuntrombosis", donde la agregación plaquetaria determina la liberación de citoquinas y quimioquinas que llevan al reclutamiento de leucocitos e inflamación local. Este proceso de formación de coágulos en pequeñas cantidades podría tener un papel beneficioso, ya que las bacterias y los DAMPs quedarían atrapados y se mantendrían alejados de la circulación sanguínea. Además, la coagulación produce factores

implicados en la proliferación y cicatrización celular, como factores de crecimiento, citoquinas como IL-6, IL-17, IL-22 y miARNs activando la proliferación de células epiteliales<sup>62,69</sup>.

### 2.5.3 RESPUESTA INFLAMATORIA

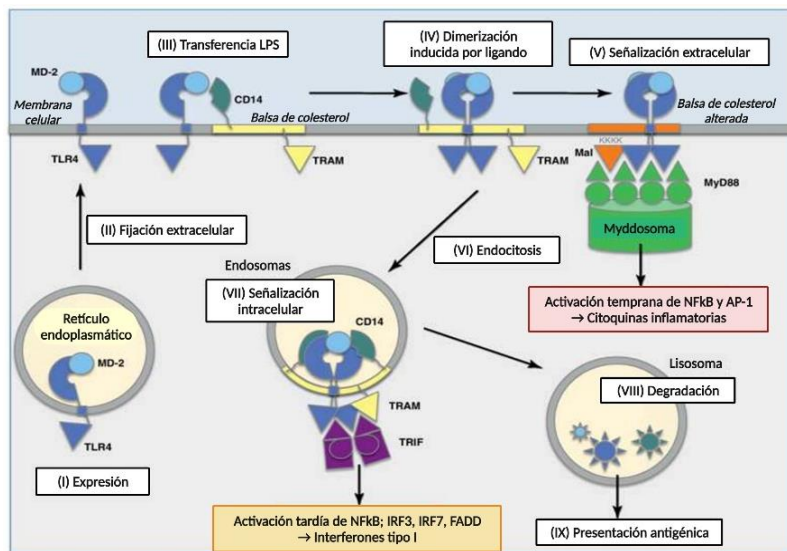
La respuesta inflamatoria propia de la sepsis se ha estudiado como efecto directo del FRA. Las células mesangiales y tubulares son capaces de expresar citoquinas proinflamatorias como la IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$ . Se ha demostrado que ambas son inductoras del FRA séptico ya que provocan una mayor liberación de citoquinas, amplificando la cascada inflamatoria<sup>60,62</sup>.

El daño en el tejido renal es el resultado de varios procesos importantes, comenzando con el reconocimiento por los TLRs de una gran variedad de componentes estructurales microbianos. Muchos estudios han demostrado la importancia de estos receptores y su relación con el FRA. Las PTECs son inmunológicamente activas como células presentadoras de antígeno (APC), siendo potencialmente capaces de reconocer estos patrones a través de sus PRR. Estos TLR reconocen PAMPs (patógenos, LPS), DAMPs (ligandos endógenos, células dañadas) y alarminas (HSP70, HMGB1), que son liberados durante el estrés celular e interaccionan con el sistema inmune en el medio extracelular contribuyendo al proceso inflamatorio en el riñón. El mejor caracterizado es el TLR4 que reconoce PAMPs de bacterias Gram-negativas, principalmente LPS. El reconocimiento de Gram-positivos ocurre a través de lipopéptidos bacterianos y es fuertemente dependiente de TLR2. Ambos, TLR2 y TLR4 se expresan constitutiva y predominantemente en las células epiteliales renales de los túbulos distal y proximal, en el epitelio de la cápsula de Bowman, y células endoteliales y glomerulares. TLR2 es altamente expresado en el riñón, pero su distribución no es homogénea en la nefrona ya que se localiza en la corteza renal y médula exterior, pero no en la interna.

Para que la activación tenga lugar, el receptor tiene que unirse a su correceptor correspondiente. La presencia de LPS o bacterias Gram-negativas induce el acoplamiento entre TLR4 y su correceptor CD14, una glicoproteína localizada en las balsas de colesterol (BDC) al igual que TLR2. TLR4 estaría fuera de las mismas en ausencia de un ligando adecuado, siendo reclutado a dichas balsas bajo estimulación. TLR2 parece ser también responsable del reconocimiento del LPS y en su ausencia, TLR4 es sobreexpresado. El LPS es captado y transportado por la proteína de unión de LPS (LBP o *LPS-Binding Protein*) en suero y transferido a CD14 que tiene un papel clave ya que es capaz de concentrar y enviar el LPS al complejo TLR4/MD2 facilitando la activación del complejo. Ésta tiene lugar primero en membrana y después la endocitosis del receptor, que parece ser gobernada por proteínas asociadas a las BDC

durante la estimulación de las células con LPS o componentes no microbianos activando TLR4 (Figura 8).

La transducción de la señal a través de TLR4 y TLR2 esta mediada inicialmente por una proteína adaptadora llamada MyD88. Ésta encabeza la activación a través de dos vías: la dependiente de MyD88, a partir de PAMPs como LPS, que lleva a la activación de NFκB y la proteína activadora 1 (AP-1 o *Activator Protein 1*, vía MAPK); y la independiente de MyD88, a través de DAMPs como HSP70, que activa la ruta de los IFN (vía TRIF). Esto lleva a un aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas, la expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria como TNFα, IL-6 e IL-1β, y promueven la expresión de moléculas coestimuladoras que activan la respuesta inmune innata y estimula la inmunidad adaptativa. De igual manera, durante el proceso inflamatorio en presencia de IFNγ y TNFα, la expresión de TLR2, TLR4, MyD88, y sus mensajeros se incrementan<sup>54,67,72-76</sup>.



**Figura 8. Ruta de señalización proinflamatoria de TLR4.** El LPS es transferido al complejo CD14/TLR4 activando una respuesta temprana dependiente de MyD88 liberando citoquinas proinflamatorias (I-V). Tras esta activación el complejo es endocitado vía independiente de MyD88 llevando a síntesis de interferones tipo I y a la liberación tardía de NFκB (VI-VII). El complejo es posteriormente degradado (VIII-IX). Modificada de Gangloff M<sup>213</sup> con BioRender.com.

Las citoquinas inflamatorias circulantes hacen aumentar la expresión de moléculas de adhesión como *Intracellular Adhesión Molecule-1* (ICAM-1), selectina, y *Vascular Cell Adhesión Molecule-1* (VCAM-1) en capilares peritubulares, los cuales incrementan la adhesión de células inflamatorias como leucocitos al endotelio. Como los capilares peritubulares están localizados junto a las células epiteliales tubulares, los leucocitos activados pasan a través de ellos causando la liberación de más mediadores proinflamatorios y DAMPs amplificando la respuesta inflamatoria. Tanto los PAMPs como los DAMPs y citoquinas filtradas en el glomérulo, entran en el túbulo proximal y activan directamente a las PTECs, provocando cambios en su estado metabólico y funcional<sup>62,69</sup>.

#### 2.5.4 DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL Y ESTRÉS OXIDATIVO

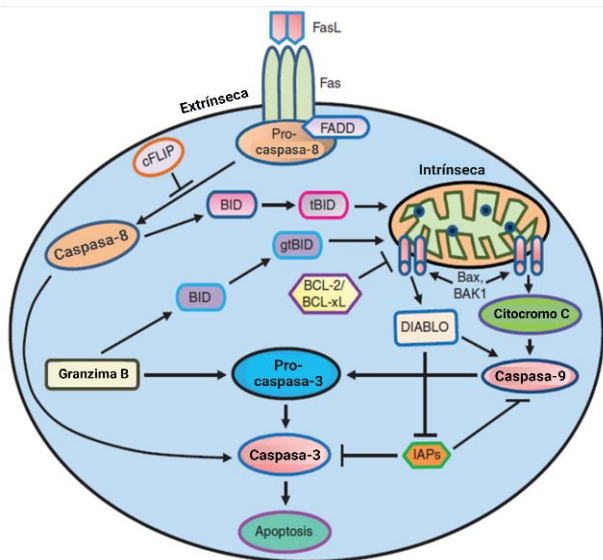
La disfunción mitocondrial es un importante factor patogénico en el fallo multiorgánico asociado a sepsis, incluyendo el FRA séptico. El riñón es el órgano con más mitocondrias y el que más oxígeno consume tras el corazón. Las mitocondrias renales están más densamente concentradas en el túbulo proximal y el asa de Henle, que es donde hay un gran consumo de ATP para el mantenimiento de los gradientes electroquímicos y movimientos de solutos. Es clave en la activación de la apoptosis cuando hay permeabilización de la membrana mitocondrial<sup>70,77,78</sup>. En el tejido séptico se ha observado empeoramiento en la utilización de oxígeno causado principalmente por esa disfunción mitocondrial. Ciertos compuestos como ROS y RNS actúan sobre la respiración mitocondrial resultando en la reducción de la producción de ATP, fallo bioenergético y EO, contribuyendo al empeoramiento de la filtración. Es esencial para el reemplazamiento de proteínas mitocondriales dañadas y para incrementar la capacidad de generar energía. Es un proceso importante durante la recuperación del FRA séptico<sup>59,61</sup>.

El EO está relacionado con el aumento de las ROS a la vez que disminuyen los niveles de antioxidantes (propio de la sepsis), ya sea por consumo o por baja ingesta. La cascada proinflamatoria induce la expresión de NOS inducible (iNOS) en la medula renal, en las células mesangiales glomerulares y endoteliales de la vasculatura renal llevando al aumento del NO. Éste, durante la sepsis, tiene efectos beneficiosos como mantener el flujo sanguíneo renal y la biogénesis mitocondrial, pero es un radical libre que producido en exceso es capaz de alterar la cadena de fosforilación oxidativa y disminuir el consumo de oxígeno. Además, puede reaccionar con otras ROS dando otras moléculas más nocivas, provocando daño a nivel de ADN, proteínas y membranas, aumentando la permeabilidad mitocondrial. Como consecuencia se altera el gradiente electroquímico y la síntesis de ATP, llevando a la apoptosis. El daño oxidativo se asocia con el grado de alteración mitocondrial<sup>60,70</sup>.

#### 2.5.5 APOPTOSIS

La muerte celular es una estrategia efectiva y fundamental para limitar las infecciones intracelulares. La muerte celular como la apoptosis ha sido considerada y descrita desde hace mucho tiempo como "silenciosa inmunológicamente" debido a que mantiene la integridad de la membrana celular. Existen dos rutas de activación de la apoptosis, la vía extrínseca se inicia a partir de receptores de muerte como FAS y se lleva a cabo a través de caspasa-8 y la vía intrínseca o mitocondrial, que puede ser activada por varios tipos de estrés celular (**Figura 9**). Esta vía ocurre a través de la familia de proteínas Bcl-2, que llevan a la liberación de citocromo C desde la mitocondria y a la formación del apoptosoma, resultando en la activación de caspasa-9.

Ambas rutas llevan finalmente a la activación de la caspasa-3 efectora que encabeza la muerte celular<sup>56,79</sup>.



**Figura 9. Vías apoptóticas y sus inhibidores.** Vía extrínseca de la apoptosis mediada por receptores de muerte (Fas), es llevada a cabo a través de caspasa-8 y caspasa-3. La vía intrínseca es mediada por daño mitocondrial. Lleva a la formación del apoptosoma y a la activación de la caspasa-9 y caspasa-3. *Modificada de Anzi M<sup>79</sup> con BioRender.com.*

Actualmente también se tienen en cuenta otros tipos de muerte celular programada, como la necroptosis o la piroptosis<sup>80</sup>. La apoptosis inducida por el daño inflamatorio es uno de los mecanismos causantes del FRA en sepsis. Altas concentraciones de LPS bacteriano y TNF $\alpha$  pueden incrementar mediadores proapoptóticos, como FAS, ARNm y reducir los antiapoptóticos como BCL-XL<sup>62</sup>. Además, el inflamasoma está implicado también en la apoptosis ya que activa la ruta de la caspasa-1<sup>81</sup>. Ésta, por un lado, lleva a una muerte celular programada rápida llamada piroptosis y por otro, es capaz de provocar apoptosis activando directamente la caspasa-8 y caspasa-3. En ausencia de caspasa-1, la formación del inflamasoma todavía podría activar la caspasa-3, una muerte apoptótica más lenta, dependiente de caspasa-8<sup>82</sup>. Otra causa principal de la apoptosis renal en sepsis es la hipoxia mediada por hipotensión<sup>67</sup>.

La consecuencia final de la apoptosis es que la concentración de microvesículas (MV, pequeñas partículas liberadas mediante un proceso de exocitosis a partir de la membrana plasmática), se incrementa durante el FRA inducido por sepsis debido al daño endotelial microvascular. La mayoría de estas MV derivan de plaquetas (85%) y pueden ejercer como antiinflamatorias e inmunosupresoras. Contienen dos importantes factores procoagulantes, fosfolípidos y factor tisular, que promueven la coagulación e inflamación perpetuando daño microvascular<sup>62,69</sup>.

## 2.6 MANEJO Y TRATAMIENTO

El manejo de la sepsis debería considerarse como una emergencia médica. Un cribado en los pacientes para identificar signos y síntomas facilitaría la identificación temprana y una

rápida intervención, llevaría a una reducción significativa de la incidencia y mejoraría los resultados de los pacientes<sup>46</sup>. Un paciente con sepsis presentará los signos y síntomas propios de la infección como: alteraciones de temperatura, fiebre ( $\geq 38^{\circ}\text{C}$ ) o hipotermia ( $\leq 36^{\circ}\text{C}$ ), postración; los específicos del foco que la produce: insuficiencia respiratoria, dolor abdominal, alteraciones en el sistema nervioso central (SNC); y aquellos relacionados con la propia fisiopatología de la sepsis como: hipovolemia, edema, hipoperfusión tisular, taquicardia y alteraciones en el número de leucocitos<sup>45,52</sup>. Puede presentar patrones únicos de biomarcadores en plasma y orina<sup>44</sup>. Los principales indicadores son la oliguria, la elevación de creatinina sérica al igual que el nitrógeno ureico en sangre (BUN) y la alanina aminotransferasa (ALT)<sup>58,49</sup>. Es fundamental realizar un diagnóstico precoz e identificar el proceso séptico. Una vez diagnosticado, es necesario recoger la historia clínica y realizar una analítica específica. Se ha establecido un panel de marcadores importantes a valorar: IL-1 $\alpha$ , IL-6, TNF $\alpha$ , HMGB1, MMP-9, VEGF, ICAM-1, MPO, caspasa-3, PCR, PCT, DD, proteína C, APTT, IL-10, IL-8. Otros parámetros que se valoran son las medidas de perfusión tisular general, como el índice de shock, lactato, saturación venosa y la perfusión regional. También se tienen en cuenta la predisposición genética junto con el score y el formulario del código sepsis<sup>45</sup>.

El FRA asociado a sepsis empeora el pronóstico de los pacientes y según algunos estudios parece que el daño se inicia de forma temprana, pero puede ser tratado por las mismas terapias que las utilizadas para el tratamiento de la sepsis<sup>83</sup>. Éste va encaminado a controlar el foco infeccioso y la recuperación hemodinámica. Dentro de las 6 horas siguientes tiene que llevarse a cabo<sup>45,46</sup>:

- a. Medida de lactato sérico, realizar cultivos y administrar antibióticos. Cada hora sin antibióticos la mortalidad aumenta casi un 8%.
- b. Si hay hipotensión y el lactato es elevado, administración de fluidos.
- c. Si persiste la hipotensión, coger vía central y aplicar medidas de saturación de oxígeno.
- d. Dentro de las 24 horas administración de esteroides, tratamiento de soporte, ventilación y/o TRR.

La mayoría de los pacientes con shock séptico y FRA presentan daño renal en el momento de ser hospitalizados o dentro de las siguientes 24 horas, y a menudo presentan lesión en otros órganos. Estos pacientes además tienen más riesgo de desarrollar FRC, por lo que prevenir la fibrosis y favorecer la regeneración y proliferación de células epiteliales viables, es fundamental<sup>83</sup>.

A pesar del tratamiento de apoyo y de la administración rápida de antibióticos, la sepsis sigue siendo una complicación de la infección<sup>57</sup>. A pesar de las numerosas investigaciones

y ensayos, la limitada comprensión de los mecanismos fisiopatológicos ha impedido el desarrollo de terapias eficaces<sup>52,64</sup>. La mayoría de los tratamientos actuales son de soporte, como la optimización hemodinámica y TRR. A día de hoy no existe ningún tratamiento farmacológico para su prevención, aunque actualmente hay múltiples ensayos potenciales bajo investigación<sup>69</sup>.

Con el objetivo de mejorar la supervivencia de los pacientes con sepsis y shock séptico, se creó la iniciativa "*Surviving Sepsis Campaign (SSC)*". Actualizada en 2016, esta guía recomienda un diagnóstico rápido y el inicio de una terapia estandarizada. Pone el foco en el desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico y de administración de antibióticos, sobre todo de nueva generación. Hasta ahora el *gold standard* en medicina era la eliminación de zonas afectadas y dispositivos infectados, así como la cirugía de control de daños, pero parece que con cierta controversia. Las directrices de la SSC se encaminan a un tratamiento de la sepsis basado en la evidencia, aunque los pacientes de UCI en estado crítico requieren una reevaluación diaria individualizada y continua, así como estrategias terapéuticas flexibles que puedan discutirse mejor entre cirujanos y médicos de cuidados intensivos<sup>46,50</sup>.

## 3 RABDOMIÓLISIS

### 3.1 ANTECEDENTES Y SITUACIÓN ACTUAL

La rabdomiólisis es un síndrome clínico caracterizado por la destrucción y posterior necrosis del músculo esquelético provocando la liberación masiva de sus componentes intracelulares al torrente sanguíneo, como la mioglobina, iones y enzimas, y dando a la orina su característico color marrón<sup>84-86</sup>. La mayoría de las veces encabeza otras complicaciones sistémicas como es el FRA, alteraciones electrolíticas y metabólicas, o coagulación intravascular diseminada (CID)<sup>20,81,87</sup>.

Ya se menciona en la Biblia una descripción similar a un cuadro clínico provocado por rabdomiólisis, en concreto en el libro del Éxodo. Durante la migración del pueblo judío de Egipto, la población se expuso a sustancias tóxicas debido a una intoxicación con codornices alimentadas con hierbas ricas en hierro<sup>84,86</sup>. Entre finales del siglo XIX y principios del XX ya habían sido descritos síndromes clínicos similares a la rabdomiólisis, pero su asociación con el aplastamiento y el FRA se describió por primera vez en 1941 gracias a Bywaters y Beall durante el bombardeo de Londres en la Segunda Guerra Mundial. Las víctimas presentaron un cuadro de shock, inflamación de las extremidades afectadas, orinas oscuras, desarrollo progresivo de FRA y muerte<sup>84,86,87</sup>.

En realidad no hay grandes estudios epidemiológicos o registros actualizados disponibles por lo que es difícil determinar la incidencia<sup>81</sup>. Lo que está claro es que la complicación más grave de la rabdomiólisis es el FRA sobre todo si existe una enfermedad renal previa<sup>84</sup>. Mientras que el 5-15% de casos de FRA son atribuidos a rabdomiólisis<sup>87</sup>, del 10-55% de los pacientes con rabdomiólisis desarrollará un FRA dependiendo de la causa que lo origine<sup>20</sup>. La mortalidad se encuentra entre un 2-46% de los casos, que se incrementa hasta el 80% cuando existe disfunción multiorgánica<sup>81,84,86,88</sup>. En UCI, la tasa de mortalidad es del 22% en los pacientes que no presentan FRA asociado, pero llega hasta el 59% cuando está presente<sup>87</sup>. La necesidad de diálisis ocurre en el 30-85% de los casos con una mortalidad asociada entre el 50-80%. Afortunadamente, en la mayoría de los casos el FRA es completamente reversible y la función renal se recuperan en pocos meses.

### 3.2 MIOGLOBINA

En 1944, Bywaters y Stead identificaron la mioglobina como el pigmento y principal responsable del color oscuro de la orina. Establecieron su importante función en el FRA de

pacientes con traumatismos graves ya que es altamente nefrotóxica, sobre todo si existe hipovolemia<sup>85</sup>.

La mioglobina es una hemoproteína que se encarga del transporte y almacenaje de oxígeno en el músculo en situaciones de alta demanda. Participa en la homeostasis del organismo y en la regulación del pH sanguíneo. Es una proteína pequeña de unos 17.8 KDa, formada por una globina y un grupo hemo con un átomo de hierro en su interior. En condiciones fisiológicas se encuentra en el interior de las células musculares o miocitos. Cuando existe un daño se libera a la sangre y si la concentración es muy alta, la capacidad de unión a proteínas plasmáticas se satura y se filtra acumulándose en el riñón, donde es citotóxica sobre todo en el epitelio tubular proximal<sup>21,87,88</sup>.

### 3.3 ETIOPATOLOGÍA

Las causas pueden ser muy variadas y hay muchos tipos de clasificaciones (**Tabla 2**). Actualmente, las más frecuentes son las que se deben a traumatismos y aplastamientos en desastres naturales como terremotos, accidentes de tráfico y laborales, o conflictos bélicos. Sigue permaneciendo como descripción principal de rabdomiólisis la descrita inicialmente por Bywaters en 1941 de predominio isquémico, aplastamiento prolongado de los miembros y FRA mioglobínúrico<sup>84-87</sup>. Hay causas como la intoxicación alcohólica, sobredosis de drogas, inmovilización prolongada, hipoperfusión localizada y lesión muscular consecuente que derivan en un cuadro muy parecido al de aplastamiento<sup>85</sup>. Las causas genéticas incluyen aquellas con deficiencias enzimáticas y miopatías<sup>86,87</sup>. Puede ocurrir a cualquier edad, pero la causa va a ser distinta en función de si se da en adultos o niños. En el primer caso es más común por trauma y drogas, mientras que en niños se da por infección en 1/3 de los casos<sup>86</sup>.

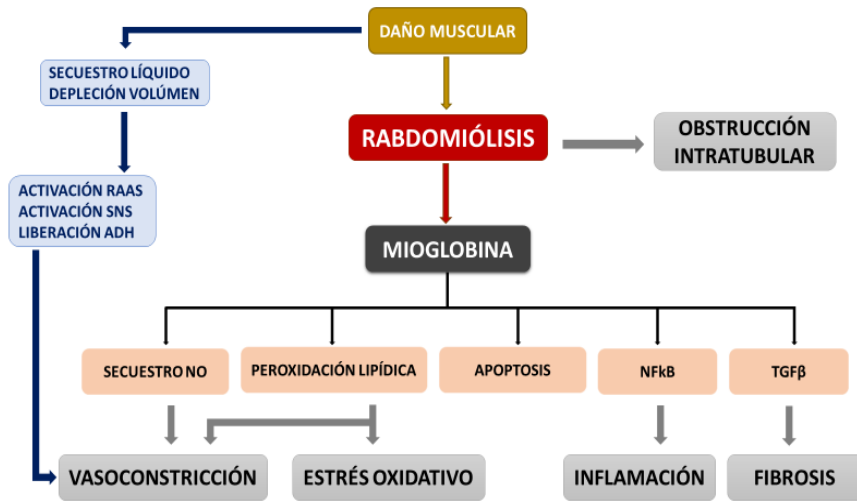
Por Lesión Física	Lesión por Aplastamiento Inmovilización Prolongada Quemaduras Lesión por Corriente Eléctrica	Desastres Naturales Accidentes Antropogénicos Abuso y Tortura
Por Agotamiento Energético	Actividad Física/Ejercicio Intenso Hipoxia/Isquemia Golpe de Calor Hipertermia Maligna Síndrome Neuroléptico Maligno	Agitación Psicomotriz Estatus Epiléptico Estatus Asmático Miopatías Congénitas Desacoplantes Respiratorios
Miotoxicidad Multifactorial	Alcohol Etilico Cocaína Anfetaminas Fenilciclindinas	Hipotiroidismo Cetoacidosis Diabética Coma Hiperosmolar Hiperglicémico Tratormos Hidroelectrolíticos
Miotoxicidad Directa	Estatinas Fibratos Antirretrovirales Colchicina	Infecciones Locales y Sistémicas Miositis Micotoxinas Toxinas Animales

**Tabla 2. Causas de rabdomiólisis.** Las más frecuentes tienen que ver con los aplastamientos, el ejercicio físico y las drogas. *Extraído de Salazar J<sup>89</sup>*.

### 3.4 FISIOPATOLOGÍA DE LA RABDOMIÓLISIS

La base fisiopatológica común independientemente de la causa, es la destrucción muscular ocasionada por distintos mecanismos que alteran la integridad de la membrana de la célula muscular o sarcolema, liberando a la sangre su contenido intracelular<sup>85</sup>. La rabdomiólisis se puede dividir en cuatro fases: 1) Lesión mecánica por aplastamiento o isquemia; 2) Reperusión y activación de neutrófilos; 3) Producción y liberación de radicales libres; 4) Liberación de componentes intracelulares<sup>85</sup>.

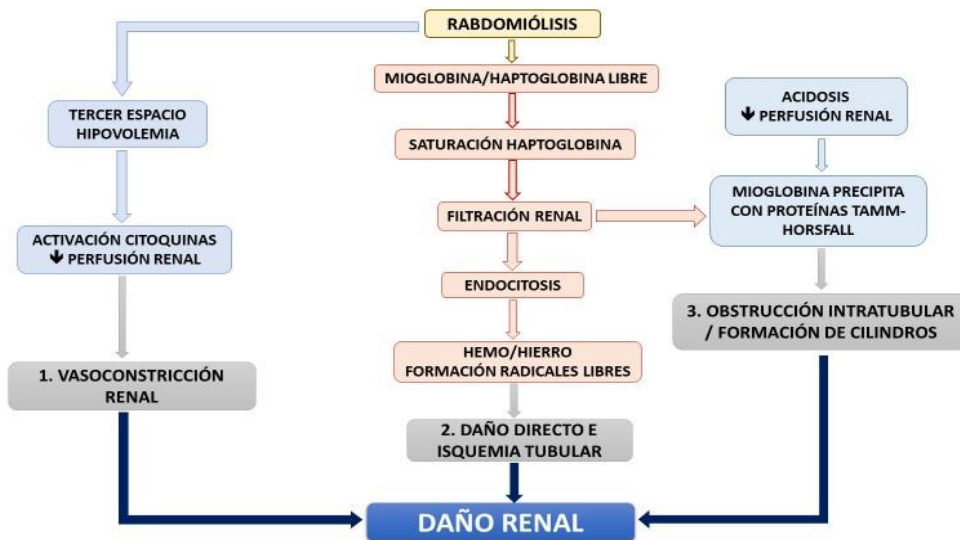
Cuando se produce una lesión o daño muscular, aparece una isquemia debida a la disminución del flujo sanguíneo o a la insuficiente llegada de oxígeno a las células. Esto favorece un metabolismo anaerobio y una reducción en la producción de ATP, lo que deriva en un mal funcionamiento de los transportadores iónicos de las células musculares (que incrementan la concentración de sodio y calcio intracelular) y mitocondriales alterando la homeostasis celular<sup>85-87</sup>. Este es el principal mecanismo implicado en la destrucción muscular en el que se activan varios procesos que provocan estrés de membrana: activación de proteasas citoplasmáticas que degradan las proteínas miofibrilares; activación de fosforilasas dependientes de calcio que degradan la membrana; activación de nucleasas; depleción de ATP; una contracción sostenida y disfunción mitocondrial. Esto lleva a la ruptura del sarcolema y la consiguiente liberación de los componentes celulares a la circulación sistémica como iones, enzimas y mioglobina<sup>84,86,87</sup>, moléculas inmunoestimuladoras que activan células dendríticas, linfocitos T y macrófagos<sup>81</sup>. El principal daño ocurre en la reperusión, cuando al reestablecerse el flujo sanguíneo llegan a la zona neutrófilos activados por el tejido isquémico y elevados niveles de citoquinas. Esos neutrófilos dañan el tejido reperfundido por la liberación de enzimas y formación de ROS altamente reactivos que dañan la membrana mediante peroxidación lipídica<sup>85</sup>. Todo esto provoca que se liberen más citoquinas, que aumentan el edema intersticial amplificando el daño muscular por todo el organismo, siendo responsable de las complicaciones posteriores que aparecen en la rabdomiólisis<sup>84,86</sup> (**Figura 10**).



**Figura 10. Fisiopatología de la rabdomiólisis.** Daño muscular y muerte del miocito. Liberación de mioglobina y procesos en los que desemboca. RAAS: sistema renina angiotensina aldosterona; SNS: sistema nervioso simpático; ADH: hormona antidiurética; NO: óxido nítrico; NFKB: factor nuclear kappa B; TGFβ: factor de crecimiento transformante β. *Modificada de Panizo N<sup>81</sup>.*

### 3.5 FISIOPATOLOGÍA DEL FRA ASOCIADO A RABDOMIÓLISIS

La rabdomiólisis produce varios efectos adversos en los riñones. El FRA mioglobinúrico se puede explicar principalmente mediante tres mecanismos<sup>81,85-87</sup> (Figura 11):



**Figura 11. Mecanismos implicados en el FRA inducido por rabdomiólisis.** Tras la lesión muscular se produce daño renal por vasoconstricción renal, citotoxicidad directa de la mioglobina y obstrucción tubular. *Modificada de Madrazo Delgado M<sup>84</sup>.*

#### 3.5.1 VASOCONSTRICCIÓN RENAL

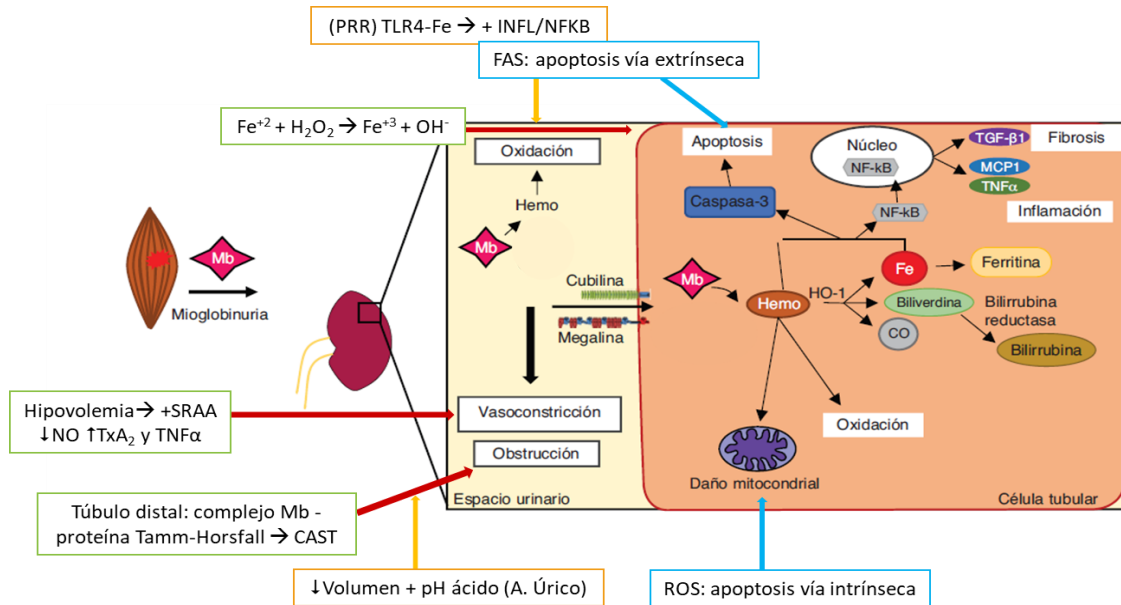
La reducción del flujo sanguíneo renal es multifactorial y va a depender de la causa de la agresión. Cuando hay daño, el músculo pasa a ser un tercer espacio donde se secuestra una gran cantidad de líquido que induce una depleción del volumen intravascular<sup>87</sup>. Como consecuencia se activan mecanismos homeostáticos para mantener el volumen circulante<sup>84</sup> como el Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona, la vasopresina y el sistema nervioso simpático, favoreciendo la VC y la retención de agua y sales. Esto se ve agravado por la presencia

de la mioglobina, que reduce los vasodilatadores<sup>84,86</sup> ya que actúa directamente sobre el NO secuestrándolo<sup>87,90</sup> y provocando alteraciones en el tono vascular, disfunción endotelial y agregación plaquetaria<sup>81,88</sup>.

### 3.5.2 EFECTO TÓXICO DIRECTO DE LA MIOGLOBINA

La citotoxicidad puede darse en cualquier parte de la nefrona, pero afecta principalmente al túbulo proximal<sup>84,86,88</sup>. La mioglobina liberada es captada por la haptoglobina y retirada de la circulación mediante el sistema reticuloendotelial (SRE), pero cuando se ven sobrepasados por la elevada concentración de pigmento, se acumula en la sangre y atraviesa directamente la membrana de filtración glomerular<sup>84,85,88</sup>. La lesión oxidativa se debe a la acumulación tanto de la mioglobina como sus derivados por el daño muscular severo en el lumen del túbulo renal y en las células tubulares<sup>91</sup> (**Figura 12**).

En el túbulo proximal tienen lugar varios procesos. La mioglobina filtrada es captada por el complejo megalina/cubilina de las PTEC. En su interior es degradada liberando el grupo hemo y hierro libre, que tienen efectos deletéreos<sup>88</sup>. El hierro tiene un importante papel en la patogénesis del FRA y se sabe que su concentración se incrementa en los riñones en estos casos. Su exceso es peligroso ya que cataliza la formación de radicales libres que pueden dañar componentes macromoleculares de las células<sup>92</sup>. El grupo hemo dentro de la mioglobina es capaz de pasar por varios estados oxidativos, el ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ) puede oxidarse a hierro catalítico ( $\text{Fe}^{+3}$ ) y éste a ferril ( $\text{Fe}^{+4}$ ), que puede llevar a peroxidación lipídica independientemente de la reacción de Fenton y la liberación del hierro<sup>93</sup>. Por ejemplo, el anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) son capaces de reaccionar con varias formas de hierro, como el unido al grupo hemo, o liberarlo de proteínas que lo contienen como la ferritina generando otras ROS altamente reactivas<sup>18</sup>. Todo esto lleva a la peroxidación lipídica de la membrana y la formación de MDA, provocando la oxidación de proteínas y material genético<sup>84,88</sup>. Se promueve la expresión de moléculas de adhesión como VCAM-1 e ICAM-1 que llevan a la disfunción endotelial, liberación de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas como MCP-1, que a su vez promueve el reclutamiento de macrófagos amplificando así la respuesta inflamatoria<sup>81,94</sup>. En el lumen tubular, el grupo hemo se disocia favorecido por el medio ácido intratubular<sup>85</sup> y el  $\text{Fe}^{+3}$  genera radicales libres que llevan a peroxidación lipídica, daño en las membranas, muerte celular e inflamación<sup>81,87</sup>.



**Figura 12. Citotoxicidad directa de la mioglobina.** El daño renal se produce por la entrada de mioglobina mediante megalina, produciendo EO, apoptosis e inflamación, debido al grupo hemo/Fe. En el exterior de igual manera se produce oxidación y obstrucción tubular por precipitación de la mioglobina. *Modificado de Guerrero-Hue M<sup>88</sup>.*

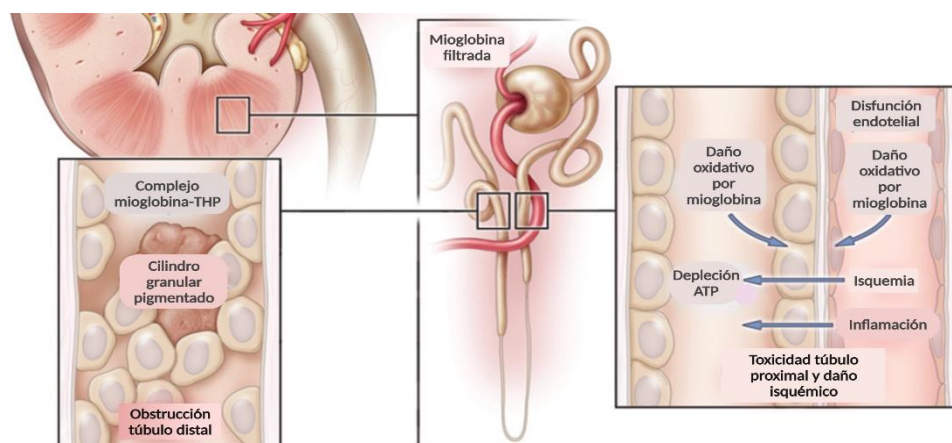
Algunos estudios consideran que el FRA inducido por rabdomiólisis es una enfermedad inflamatoria donde los macrófagos juegan un papel fundamental en la lesión renal<sup>95</sup>. En las fases tempranas del FRA inducido por mioglobina se han observado macrófagos proinflamatorios tipo M1 que se diferencian en etapas posteriores a fenotipo M2 antiinflamatorio, con funciones de reparación tisular<sup>88,97</sup>. El receptor *scavenger* de mioglobina-haptoglobina CD163, es expresado principalmente por los tipo M2 en lugares de inflamación y presenta importantes propiedades inmunoregulatoras por inducción de IL-10 y la síntesis de HO-1<sup>95</sup>. Los leucocitos son capaces de liberar fibras de cromatina llamadas trampas extracelulares (ET) que consisten en ADN, histonas y contenido granular. Se han descrito en neutrófilos y macrófagos, y se considera tanto a un mecanismo de defensa como asociado a desordenes como enfermedades autoinmunes, condiciones inflamatorias y trombosis. La liberación del hemo liberado parece que activa las plaquetas, que a su vez son capaces de inducir la liberación de estas ETs dañando más los túbulos y promoviendo el FRA<sup>96</sup>.

El túbulo proximal es el principal generador de ROS debido a la gran producción de ATP necesaria para realizar el transporte activo y mantener el gradiente electroquímico intra y extracelular que tiene lugar en las células epiteliales. Éstas son muy sensibles al EO debido a la gran actividad de la cadena de transporte de electrones mitocondrial<sup>18</sup>. La mitocondria está muy implicada en el EO ya que, tras la rabdomiólisis, el control de la respiración mitocondrial se ve significativamente disminuida y los niveles de MDA se elevan. Por ello, tanto el EO como la mitocondria tienen un papel clave<sup>91</sup>. Las PTEC utilizan la apoptosis como uno de los reguladores

más importantes de ROS. La peroxidación lipídica provoca una disfunción mitocondrial que lleva a la liberación de citocromo C, aumento de proteínas proapoptóticas y como consecuencia a la activación de la vía intrínseca de la apoptosis (caspasa-9) y proteínas de estrés de retículo endoplasmático (RE). La señalización específica que determina si la célula va a entrar en apoptosis o necrosis no está clara. Parece que cuando hay pocas ROS/RNS se induce apoptosis, pero si el EO continúa y hay fallo en la producción de ATP, las membranas mitocondrial y celular se dañan y se promueve la necrosis<sup>18,98</sup>. La vía extrínseca ocurre mediante activación de caspasa-8 a través de la interacción de TNF $\alpha$  y ligando de Fas (FasL) con sus receptores de membrana. Ambas vías activan la caspasa-3 efectora que tiene como diana varios sustratos tanto citosólicos como nucleares, ejecutando la apoptosis<sup>99</sup>. Otros tipos de muerte celular como la piroptosis, mediada por caspasa-1 tras la activación del inflammasoma, también han sido observados.

### 3.5.3 OBSTRUCCIÓN TUBULAR

La mioglobina cuando se combina con la VC y la deshidratación hace que aumente la reabsorción de agua y se liberen hidrogeniones, acidificando el medio. Esto favorece la precipitación y la interacción con las proteínas de Tamm-Horsfall (mucoproteína secretada por las células tubulares distales)<sup>84</sup> causando la formación de cilindros hialinos intraluminales que provocan esa obstrucción<sup>33,90</sup> (**Figura 13**). La acidez de la orina es indispensable para el depósito y la toxicidad, sobre todo a nivel de túbulo distal<sup>81,85-87</sup>. El miocito dañado libera además adenosina que se transforma en ácido úrico en el hígado y su exceso también puede precipitar en el túbulo renal potenciando la obstrucción<sup>84</sup>.



**Figura 13. Formación de cristales y obstrucción de los tubulos renales.** El ambiente ácido del interior tubular favorece la precipitación de la mioglobina con proteínas de Tamm-Horsfall. La mioglobina produce daño oxidante tanto en la luz tubular como a nivel endotelial, provocando isquemia e inflamación. *Modificada de Bosch X<sup>100</sup> con BioRender.com.*

En esta situación, las células renales pueden desdiferenciarse y adquirir capacidad de proliferación, migración, producir MEC y liberar mediadores profibróticos. Los fibroblastos junto

con las células tubulares potencian la liberación de fibronectina y colágeno I en presencia de mioglobina, por lo que éstas tienen un papel clave en la respuesta fibrogénica. Los macrófagos amplifican esa respuesta profibrótica a partir de mediadores como CTGF y TGFβ, los principales inductores de fibrosis<sup>81,88,95</sup>, resultando en un incremento del riesgo de FRC que previamente se ha observado en otras causas de FRA. La señalización de TGFβ induce la TEM, lo que lleva a las células renales a cambiar su fenotipo funcional a fenotipo mesenquimal. Los miofibroblastos pueden producir excesivas proteínas de MEC, como varios tipos de colágeno, llevando a fibrosis túbulointersticial y empeoramiento de la función renal<sup>18</sup>.

### 3.6 MECANISMOS DE PROTECCIÓN

Ante el daño renal provocado por la rabdomiólisis, el organismo es capaz de utilizar mecanismos moleculares para protegerse. Se pueden clasificar en dos grupos: **los directos**, que promueven el catabolismo de las hemoproteínas y sus derivados; y los **indirectos**, que se centran en la disminución del EO derivado de estas moléculas o en la reparación del daño<sup>101</sup>. Dentro de los **directos**, el agente quizás más importante, es la enzima antioxidante hemoxigenasa-1 (HO-1/HSP32). Esta enzima está implicada en la degradación del grupo hemo y se activa en presencia de IL-6, IL-10, TNFα y ROS. De la degradación del grupo hemo se genera monóxido de carbono (CO), un potente *scavenger* de ROS ya que inhibe la expresión de citoquinas como TNFα o IL-1β y promueve las antiinflamatorias como la IL-10. El hierro libre (Fe<sup>+2</sup>) una vez liberado del grupo hemo, se incorpora a la ferritina disminuyendo sus niveles y protegiendo a la célula del estrés oxidativo. Además, la ferritina *per se* tiene efectos anti apoptóticos y su síntesis es promovida a su vez por la HO-1. Las células tubulares, además expresan el receptor de la transferrina, que juega un papel esencial en el metabolismo a nivel renal. La biliverdina, otro derivado de la degradación, activa la respuesta inflamatoria de macrófagos y se transforma en bilirrubina, también con efecto *scavenger* de ROS<sup>81</sup>. Por lo tanto, estos derivados son potentes antiinflamatorios y antioxidantes que potencian el efecto de la HO-1<sup>88,101,102</sup>.

La haptoglobina es una glicoproteína presente en el plasma, secretada por diferentes órganos, incluido el riñón. Se une a la mioglobina que es captada por el receptor CD163 presente en la superficie de monocitos circulantes y macrófagos para su internalización. Este receptor puede ejercer un papel protector ya que tiene como función el aclaramiento de la mioglobina, y se ha observado que los macrófagos CD163+ tienen una liberación menor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>95,101,103</sup>. Presentan por tanto función antiinflamatoria por la producción de IL-10 y la estimulación de la HO-1. La expresión renal de CD163 está elevada en áreas donde se acumula hierro y marcadores

de EO<sup>88,101</sup>. El sistema CD163/HO-1/ferritina disminuye la exposición de la célula a los productos derivados del grupo hemo<sup>104</sup>.

Entre los **indirectos** se encuentran moléculas y enzimas antioxidantes. Destacan las vitaminas C y E, la melatonina y el glutatión. Una enzima muy importante en este grupo es la superóxido dismutasa (SOD), que se encarga de reducir los niveles de ROS intracelular y protege del daño oxidativo. Tiene la función de eliminar el O<sub>2</sub><sup>-</sup> y evitar el secuestro del NO. La enzima catalasa con actividad peroxidasa, también tiene una función importante ya que elimina el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formando agua y oxígeno<sup>18,88,94,101</sup>.

### 3.7 MANEJO Y TRATAMIENTO

Las **manifestaciones clínicas** varían ampliamente dependiendo de la extensión y severidad del daño muscular, desde un cuadro asintomático o inespecífico hasta complicaciones graves asociadas a disfunción multiorgánica con alteraciones electrolíticas, FRA, síndrome compartimental o CID<sup>84,87</sup>. Los síntomas iniciales que pueden aparecer son mialgias, hinchazón, rigidez y calambres, acortamiento muscular o parálisis<sup>86</sup>. Síntomas sistémicos como malestar, fiebre, dolor abdominal, náuseas y vómitos también son frecuentes. El daño renal puede aparecer a los 5-7 días después de la lesión, y si ocurre es porque el daño muscular es extenso y generalmente están implicados otros órganos y sistemas.

El **diagnóstico** se confirma cuando la creatinina en suero se eleva 5 veces el valor normal y hay un aumento del nivel de urea en un ratio de 5/1<sup>84,86</sup>. En estados iniciales la relación BUN/creatinina es baja por aumento de la creatinina en sangre, pero en una fase tardía, la mioglobina se metaboliza a urea y el ratio aumenta de manera desproporcionada si lo comparamos con otras lesiones renales<sup>87</sup>. La creatinquinasa (CK) sérica es la base del diagnóstico (en concreto la muscular), que es el indicador más sensible de daño muscular esquelético. Se eleva a las 12 horas de producirse daño y su vida media es de unas 48 horas, alcanzando un pico máximo entre las 24-72 horas<sup>84,86,87</sup>. Una elevación de la CK se asocia bien con la extensión del daño muscular o si existe síndrome compartimental, pero menos con el FRA<sup>84</sup>. La mioglobina tiene una vida media de 1-3 horas<sup>84,86</sup> por lo que su valoración en suero y orina es útil en fases tempranas ya que aparece antes que la CK, pero disminuye en 1 a 24 horas<sup>86,87</sup>. Cuando existe FRA debido a la obstrucción tubular, la fracción excretada de sodio inicialmente es menor del 1% en la etapa de VC, pero después por el daño tubular es mayor del 2%<sup>86,87</sup>. Otros parámetros valorados son: la proteinuria, hipercalcemia e hiperfosfatemia, hiperpotasemia, aumento del anión GAP, hiperuricemia, lactato deshidrogenasa (LDH), aldolasa, AST (aspartato aminotransferasa) o troponina T<sup>84,86,87</sup>.

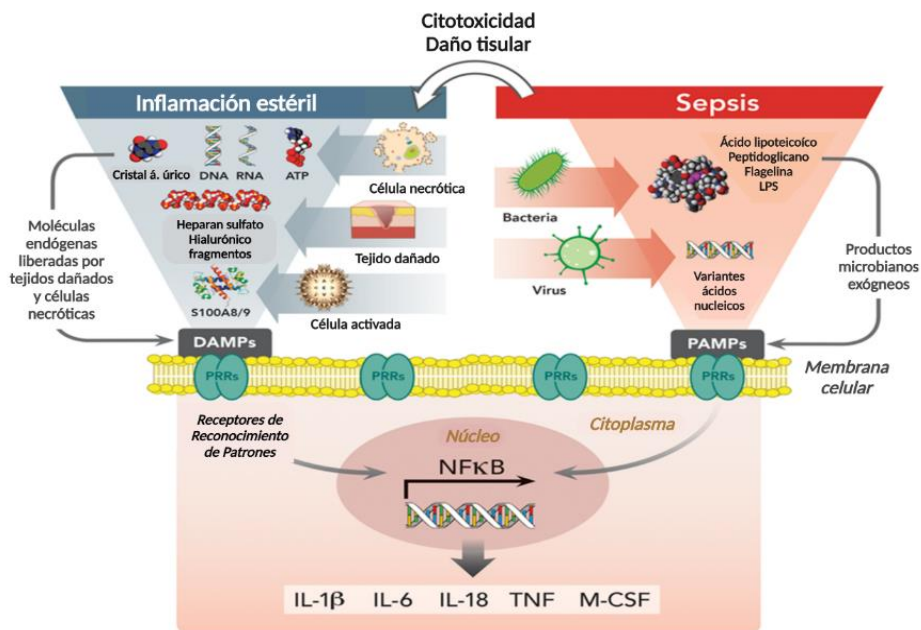
El **tratamiento y prevención** del FRA inducido por rabdomiólisis se basa en cuatro puntos: 1.- Identificación y tratamiento del origen que lo causa para evitar la liberación de mioglobina y la extensión del daño renal. 2.- Hidratación y manejo de las complicaciones electrolíticas y el desequilibrio ácido-base. La reposición de fluidos es fundamental, así como incrementar la volemia, alcalinizar la orina y aumentar la diuresis. 3.- Evitar fármacos nefrotóxicos y ajustar las dosis según la función renal del paciente. 4.- Terapias de soporte renal en casos graves. Hemodiálisis convencional y técnicas continuas de TRR<sup>81,84,86,87</sup>.

Hoy en día, el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos implicados en la rabdomiólisis se debe a estudios experimentales y no hay aplicación clínica. Al igual que ocurre en la sepsis, no existe de momento tratamiento farmacológico frente a la rabdomiólisis, aunque es un campo de investigación clave y de máxima actualidad. Hoy en día, se están estudiando nuevas estrategias terapéuticas basadas en quelantes de hierro y tratamiento con antioxidantes, antiinflamatorios o inhibidores de la VC<sup>81,84,88</sup>.

## 4 INFLAMASOMA Y FIBROSIS EN EL FRA ENDOTÓXICO

### 4.1 INFLAMASOMA

Los receptores TLRs son proteínas muy conservadas, fundamentales para la activación del sistema inmune innato y son expresados en células que forman la primera línea de defensa inmunológica como células dendríticas, neutrófilos, macrófagos, NK, etc. Son capaces de responder a patógenos mediante los PAMPs y a moléculas endógenas liberadas por estrés, células dañadas o DAMPs. Por tanto, la activación de rutas TLR es fundamental en patologías infecciosas y en enfermedades no asociadas con sepsis como la inflamación estéril (**Figura 14**). Como se ha comentado anteriormente, TLR4 es importante para reconocer el LPS, pero también se ha demostrado que es clave en la rabdomiólisis al reconocer DAMPs que provocan su activación. Existe una asociación entre los niveles de ROS y la activación del TLR4 ya que se ha observado un incremento de este receptor desde su localización en el citoplasma hacia las BDC por exocitosis en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y DAMPs. Se ha demostrado que TLR4 aparece no solo en células inmunes, sino también en células no inmunes como las células endoteliales y epiteliales<sup>75</sup>.

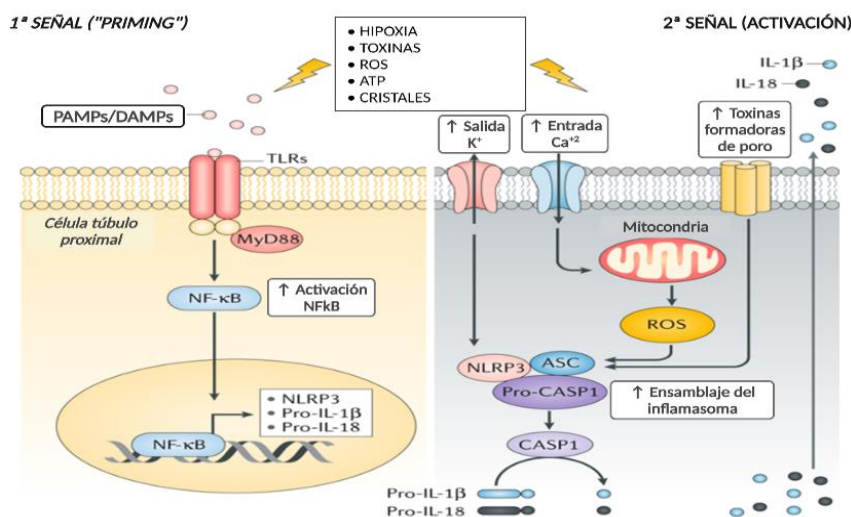


**Figura 14. Esquema resumen de los procesos inflamatorios que existen.** Hay dos tipos de inflamación, la ocasionada por patógenos y sin infección o estéril. En ambas se producen DAMPs y PAMPs que tras su unión a los RRP desencadenando la síntesis de NFκB y la consiguiente liberación de citoquinas. *Imagen extraída de internet y modificada con BioRender.com.*

El daño tubular y disfunción son precedidos por la infiltración leucocitaria renal en la fase temprana, siendo la inflamación clave en estas patologías. Tanto la inflamación estéril como la infecciosa activada por el tejido dañado esta mediada por un complejo multiproteico de

señalización intracelular llamado inflamasoma, que tiene un papel central en la activación de la respuesta inmune innata. El *NOD-Like Receptor Protein 3* (NLRP3) es el mejor conocido y además se ha visto que la expresión de estas proteínas está incrementada en el riñón en el FRA inducido por sepsis y rabdomiólisis. La proteína sensor NLRP3 es un tipo de PRR citosólico que responde a un diverso rango de PAMPs y DAMPs, de hecho, partículas endógenas como el grupo hemo y el hierro libre se han identificado como potentes activadores del NLRP3.

La vía canónica de activación se inicia con la detección de los patrones moleculares por los TLRs, en una primera fase llamada "*priming*" o de preparación<sup>79</sup> (Figura 15). El complejo NFκB se transloca al núcleo donde se promueve la sobrerregulación del NLRP3 y las formas inmaduras de IL-1β y IL-18. Después de esta fase, se necesita una segunda señal que incluiría la interrupción de la fagocitosis, ATP extracelular, alteración en el flujo de K<sup>+</sup> y Ca<sup>+2</sup>, estrés de RE, ROS mitocondrial y/o alteraciones en el potencial de membrana. Una vez activado, las proteínas sensoras NLRP3 oligomerizan formando el núcleo del complejo al que se suman una proteína adaptadora (*Apoptotic-Associated Speck-like Protein* o ASC) y la procaspasa-1. La caspasa-1 efectora una vez activa convierte las citoquinas proinflamatorias pro-IL-1β y pro-IL-18 a sus formas maduras, liberándose y causando respuesta inflamatoria, daño tisular y progresión de la enfermedad renal.



**Figura 15. Activación del inflamasoma.** La unión de los PRR a sus ligandos activa la primera señal del inflamasoma. Diferentes eventos como la formación de ROS, disparan la segunda señal que lleva al ensamblaje del complejo NLRP3. La activación de caspasa-1 lleva a la liberación de citoquinas y a la formación de poros, dando lugar a piroptosis. Modificado de Chilton PM<sup>226</sup> con BioRender.com.

Aparte del inicio de la respuesta inflamatoria se activa también la apoptosis, provocando daño durante las fases tempranas. La liberación local de IL-1β activada por el inflamasoma NLRP3 puede inducir apoptosis vía dependiente de la vía NFκB/FAS y mediante caspasa-1. La apoptosis es fundamental en ambos tipos de FRA, pero el inflamasoma es capaz

de activar otro tipo de muerte celular programada llamada piroptosis. Ésta ocurre por la activación de gasdermina D que se transloca a la membrana celular formando poros y provocando la muerte celular, además de facilitar la rápida liberación de citoquinas. Es altamente inflamatoria ya que presenta fragmentación de ADN, hinchazón y ruptura celular. Esta activación inicial del inflamasoma está implicada en el daño de las células tubulares renales y en la liberación de citoquinas y quimioquinas, que reclutan monocitos y macrófagos que potencian la respuesta inflamatoria. La activación del inflamasoma es clave en la patología del FRA, pero también del FRC<sup>70,79,81,93,105,106</sup>.

## 4.2 TRANSICION EPITELIO-MESÉNQUIMA

La progresión del FRC se considera un proceso irreversible que termina con una insuficiencia renal funcional caracterizada por una fibrosis renal generalizada. Se pensaba que su origen se debía solo a la activación de fibroblastos locales, pero estudios actuales establecen que parte de las células productoras de fibras provienen del túbulo renal. Cuando existe un daño mantenido en el tiempo tiene lugar la TEM, proceso morfogénico por el cual las células con fenotipo epitelial pasan a tener un fenotipo mesenquimal para transformarse en miofibroblastos que producen MEC en situaciones patológicas<sup>107</sup>. La TEM es un mecanismo importante en el desarrollo embrionógico, reparación y enfermedad (**Figura 16**)<sup>108</sup>.

Las células epiteliales y miofibroblastos intersticiales tienen un fenotipo distinto y se localizan en zonas distintas del riñón, por lo que el paso de un tipo a otro implica importantes alteraciones y activación de grupos de genes que lleven al cambio de fenotipo. Las células epiteliales pierden su polaridad y su adherencia con otras células y con la membrana basal, tanto las uniones estrechas como las adherentes adquiriendo capacidades migratorias e invasivas. En cambio, las células mesenquimales no tienen polarización, presentan uniones temporales y remodelan la MEC al producir fibronectina y vimentina. Hay factores que inducen esta TEM como el TGF $\beta$ , NF $\kappa$ B, la vía Notch y la vía Wnt/ $\beta$ -catenina. Uno de los primeros cambios que ocurren es a nivel de adhesión celular, la E-cadherina expresada por las células epiteliales cambia a N-cadherina en estado mesenquimal. La señalización canónica Wnt/ $\beta$ -catenina es una vía central de reparación y fibrosis que se activa de forma temprana. Wnt5 es un factor profibrótico que contribuye a la activación de la señalización de TGF $\beta$ , induce proliferación de células epiteliales, la transición de fibroblastos a miofibroblastos y a la síntesis de colágeno. Su unión a los receptores Frizzled y *Low-density lipoprotein receptor-related Protein* (LRP) da como resultado la acumulación citosólica de  $\beta$ -catenina, que es translocada al núcleo desde la superficie celular y participa en la transcripción de genes. Esta activación estimula muchas de la

citoquinas proinflamatorias que participan en la destrucción mediada por inflamación<sup>107,109,110</sup>. Aunque la TEM es esencial para el desarrollo, puede tener consecuencias perjudiciales en el organismo adulto ya que promueve la progresión de fibrosis y ha sido considerada en el FRA endotóxico<sup>108</sup>.

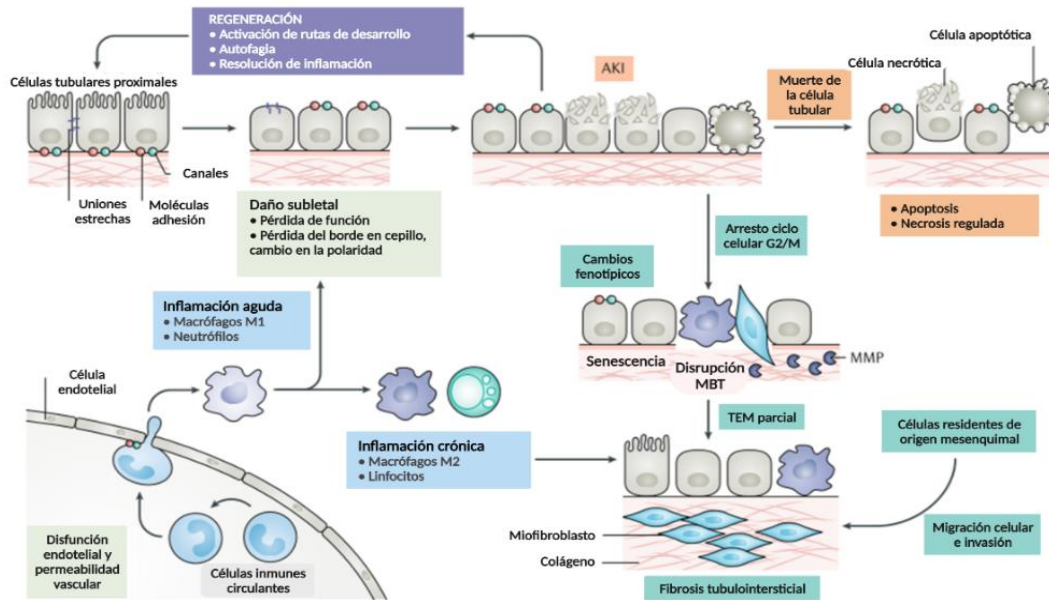


Figura 16. Desarrollo de TEM y fibrosis en el FRA. Transición hacia FRC cuando falla la regeneración celular. *Modificada de Ruiz-Ortega M<sup>40</sup> con BioRender.com.*

### 4.3 FIBROSIS

La fibrosis es la formación excesiva de tejido conectivo como consecuencia de un proceso de reparación. Se produce a partir de un proceso inflamatorio crónico o que desencadene un aumento en la producción de proteínas de MEC, por lo que el mecanismo de progresión a FRC se basa principalmente en un correcto proceso de reparación<sup>111</sup>. Tras un daño en el parénquima renal se activan los miofibroblastos cuyo origen podría estar en varios tipos celulares (pericitos, fibroblastos renales nativos y de la transdiferenciación de monocitos llegados de medula ósea) y la TEM<sup>37,112</sup>. Si la reparación es correcta las PTEC proliferan después de una desdiferenciación, el debris es eliminado, los macrófagos y pericitos no se disocian desde los capilares y se para la proliferación de miofibroblastos. Es probable que una población específica de PTEC como son las células residentes con un fenotipo específico, con alto potencial regenerativo y con gran resistencia a la apoptosis estén implicadas en el proceso de reparación. Una mala reparación lleva a la restauración incompleta del tejido renal con cambios estructurales permanentes adversos, persistente inflamación de bajo grado, activación intersticial de fibroblastos e isquemia del parénquima. Este proceso lleva a daño crónico y

pérdida de función renal. El proceso de reparación falla cuando el daño inicial es más severo, particularmente cuando está involucrado daño en el ADN o existe FRC. Los patrones moleculares alertan al sistema inmune del daño celular y la producción de respuestas proinflamatorias tiene como objetivo la reparación del tejido dañado. Pero, aunque por un lado es beneficioso en el caso de patógenos, la reacción al daño endógeno no microbiano puede contribuir al daño tisular y progresión de la enfermedad. La inflamación estéril es un importante factor de muchas enfermedades renales tanto agudas como crónicas<sup>62,113</sup>.

Por tanto, en respuesta a una lesión las PTEC sufren cambios y funcionan como células inflamatorias y fibrogénicas, produciendo moléculas que impulsan la inflamación intersticial y la fibrosis. Los receptores inmunológicos innatos del epitelio tubular también agravan las respuestas inmunitarias, que junto a la muerte celular conduce a un mayor incremento de la lesión renal. Además, las células tubulares también desempeñan un papel activo en lesión renal progresiva no solo por mecanismos relacionados con la TEM ya comentadas (**Figura 16**), sino también mediante la detención del ciclo celular en los puntos de control G1/S y G2/M, y el desorden metabólico<sup>43,114</sup>. La regulación de la proliferación celular y de la organización de MEC esta mediado por TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ , MMP y NF $\kappa$ B, y la alteración de sus efectores en situaciones patológicas llevaría a un aumento de la síntesis de colágeno y la acumulación de proteínas de la matriz, que son las características distintivas de los estados fibróticos y enfermedades crónicas<sup>37,112</sup>.

Los macrófagos juegan un papel clave en la inflamación y en el desarrollo de fibrosis. Su número en el intersticio se correlaciona con la severidad de la fibrosis intersticial y progresivo daño renal. Se clasifican según su respuesta frente a señales inmunes innatas o adaptativas. Los tipo M1 son los que tienen una activación clásica, denominados efectores o proinflamatorios. Tienen propiedades antimicrobianas, incrementan la producción de ROS/RNS, inducen una respuesta Th1, y expresan iNOS, IL-12, IFN $\gamma$ , entre otros. Los de tipo M2 o de activación alternativa expresan IL-4, IL-13, arginasa-1 (Arg-1), CD206, IL-10 y están implicados en el remodelado del tejido, regulación inmune y fagocitosis, e inducen la deposición de colágeno. Un desequilibrio entre la producción y eliminación de colágeno asociado con efectos prolongados de IL-13 promueve una fibrosis excesiva<sup>97,115</sup>. A su vez, la IL-22 producida por macrófagos tras la interacción de DAMPs/TLR4 y vesículas transportando miARNs derivados de células del estroma mesenquimal, son capaces de inducir reprogramación celular hacia fenotipo prorregenerativo<sup>62</sup>.

Los macrófagos con fenotipo profibrogénico están implicados en la estimulación de fibroblastos y miofibroblastos con deposición de colágeno y fibronectina. Las PTEC pueden además tener un papel activo en la fibrosis renal y progresión a FRC tras un FRA, ya que las

células que expresan KIM-1 secretan MCP-1 incrementando la quimiotaxis de macrófagos. La producción de TGF $\beta$  es incrementada significativamente, por lo que la fibrosis podría representar un evento temprano especialmente en el FRA asociado a sepsis. De hecho, una rápida activación del proceso profibrótico se ha demostrado en modelos experimentales apoyando el concepto de la precocidad del fenómeno de fibrosis parenquimal<sup>62</sup>.

## 5 CILASTATINA

### 5.1 IMIPENEM/CILASTATINA

#### 5.1.1 PERSPECTIVA HISTÓRICA

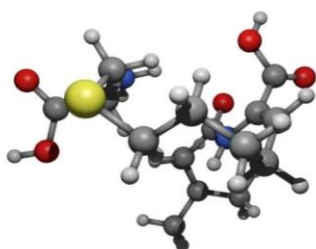
El imipenem (MK0787) fue el primer antibiótico de la familia de los carbapenemes sintetizado en 1985. Es un derivado de la tienamicina cuya estructura química fue modificada para aumentar su estabilidad ya que, a pesar de su gran potencia y espectro antibacteriano, era muy inestable<sup>11,116</sup>. Perteneció a la familia de los  $\beta$ -lactámicos y tiene un amplio espectro de acción, abarca a Gram-negativos, Gram-positivos, aerobios y anaerobios.

El imipenem era rápidamente degradado por lo que se producía una muy baja recuperación en orina<sup>116,117</sup>. Estudios realizados *in vitro* e *in vivo* demostraron que dicho metabolismo ocurría en el riñón mediante una enzima llamada dehidropeptidasa I (DHP-I), localizada en el borde en cepillo de las PTEC<sup>118,119</sup>. Esta enzima que actúa hidrolizando el anillo  $\beta$ -lactámico del imipenem inactivándolo, no afectaba a otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos como la penicilina<sup>120</sup>.

Tiene un espectro antibacteriano inusual, idóneo para tratar patógenos que son resistentes a otros antibióticos, y sobre todo Gram-negativos en sepsis de origen intestinal o renal. Pero la degradación renal del antibiótico provocaba concentraciones subóptimas del fármaco activo en el tracto urinario<sup>11,121</sup> limitando su uso en el tratamiento de infecciones sistémicas. Además, altas concentraciones de imipenem en el túbulo proximal resultaban tóxicas provocando necrosis tubular, lo que llevó a sintetizar un inhibidor de la DHP-I para poder utilizarlo, la cilastatina (MK0791)<sup>122</sup>.

#### 5.1.2 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE CILASTATINA

Cilastatina es la sal monosódica del ácido [R-[R\*, S\*-(Z)]]-7-[(2-amino-2-carboxietil)tio]-2-[[[(2, 2-dimetilciclopropil)carbonil]amino]-2-heptenico (**Figura 17**). Su fórmula empírica es  $C_{16}H_{25}N_2NaO_5S$  y tiene un peso molecular de 280.44 Da. Es un compuesto amorfo, de color blanquecino a blanco amarillento, higroscópico y muy soluble tanto en agua como en metanol<sup>123</sup>.



**Figura 17. Molécula de cilastatina.** Diseño realizado por D. Ruben García, *Arscreativa Studio*. [www.arscreativa.com](http://www.arscreativa.com).

No tiene actividad antibacteriana ni farmacológica, pero es un potente inhibidor competitivo y reversible de la enzima DHP-I, impidiendo que ésta hidrolice enlaces peptídicos y rompa el anillo  $\beta$ -lactámico del imipenem. Esto evita que se metabolice el fármaco a una forma inactiva y que sea reabsorbido por la célula tubular, aumentando así su recuperación urinaria y su eficacia<sup>117,124,125</sup>. Con la combinación imipenem/cilastatina (I/C) se obtiene una tasa de excreción urinaria del antibiótico muy elevada, se pasa de un rango del 7.7-43% a un 72% de la dosis inicial<sup>11</sup>.

Se ha establecido como dosis optima de I/C una relación 1:1 para mantener inhibida la DPH-I durante un intervalo de 8 a 10 horas<sup>122</sup> (**Tabla 3**). El pico en sangre se alcanza inmediatamente después de la administración y durante 4 a 6 horas. La concentración en suero y la biodisponibilidad parecen aumentar con la dosis de manera lineal. Estudios farmacocinéticos con múltiples dosis han demostrado que el fármaco no se acumula en individuos sanos.

Valores farmacocinéticos de cilastatina coadministrada con imipenem 1:1*	
Volumen de distribución en el compartimento central	0.14 $\pm$ 0.03 L/Kg
Concentración plasmática 1h post-infusión i.v.	19.1 $\pm$ 46 $\mu$ g/mL
Vida media de eliminación	0.84 $\pm$ 0.1 L horas
Aclaramiento plasmático	12.4 $\pm$ 1.1 L/hora por 1.73m <sup>2</sup>
Aclaramiento renal	8.0 $\pm$ 1.2 L/hora por 1.73m <sup>2</sup>

**Tabla 3.** Valores farmacocinéticos de cilastatina con imipenem. \*Datos extraídos de Drusano GL<sup>126</sup>.

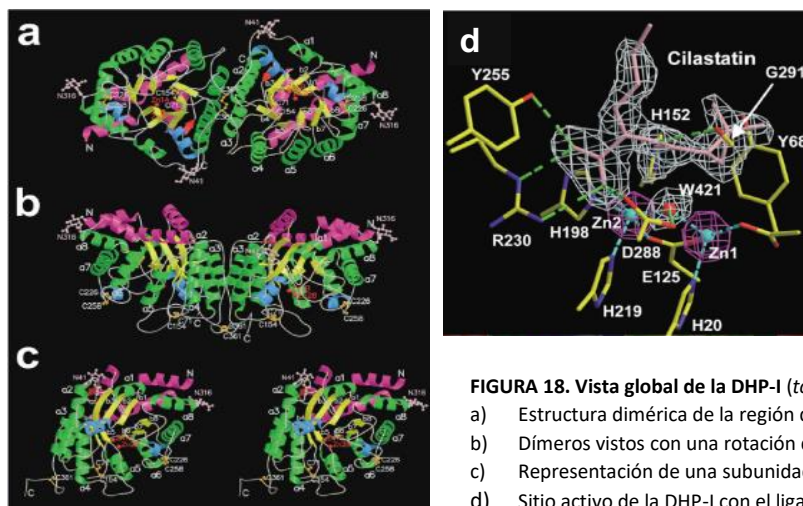
La DPH-I también es capaz de convertir el leukotrieno D4 a leukotrieno E4, por lo que se utilizó esta propiedad para demostrar si había una interacción entre cilastatina y la enzima. Se llevaron a cabo experimentos en los que en presencia de cilastatina esta conversión era inhibida, demostrando así su especificidad por la DHP-I<sup>127,128</sup>.

Cilastatina es capaz de inhibir también de forma selectiva y dosis dependiente a los OATs situados a nivel basolateral de las PTEC<sup>125,129,130</sup>, encargados de la captación activa de fármacos y sustancias endógenas de la sangre, su transporte al interior celular y secreción a la luz tubular<sup>11,131,132</sup>. Esto puede llevar a una acumulación de ciertos componentes tóxicos que eventualmente pueden causar nefrotoxicidad, como el imipenem, que utiliza estos canales para entrar en la célula y provocar nefrotoxicidad<sup>11,125</sup>. Pero este efecto es mínimo a las concentraciones plasmáticas que se alcanzan en la práctica clínica.

## 5.2 DEHIDROPEPTIDASA I

La DHP-I (dipeptidasa microsomal o EC 3.4.13.19) es una glicoproteína encargada de hidrolizar el enlace peptídico en los dipéptidos presentes en el ultrafiltrado glomerular. Actúa después de otras proteasas del borde en cepillo y resulta esencial en la recuperación proximal de aminoácidos<sup>133,134</sup>. Se localiza principalmente en el borde en cepillo de las PTEC<sup>135,136</sup>.

Estructuralmente es un homodímero compuesto por dos subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$ ), cada una formada por un péptido de 369 aminoácidos y de 42 KDa de peso molecular (**Figura 18**). Las subunidades tienen cuatro posibles lugares de glicosilación y puede presentar una forma altamente glicosilada de 63 KDa. El sitio activo de cada una de ellas está compuesto por iones zinc orientados hacia las microvellosidades del túbulo renal<sup>137</sup>. Se ancla a la membrana mediante un enlace covalente con un residuo glicosil-fosfatidil-inositol (GPI)<sup>133,138,139</sup>. Estos residuos se localizan típicamente en dominios transmembrana con características especiales, conocidos como BDC o *lipid rafts*<sup>140</sup>.



**FIGURA 18.** Vista global de la DHP-I (tomada de Nitanaí Y<sup>37</sup>).

- Estructura dimérica de la región de unión a la membrana.
- Dímeros vistos con una rotación de 90° a lo largo del eje largo.
- Representación de una subunidad del monómero.
- Sitio activo de la DHP-I con el ligando cilastatina.

## 5.3 BALSAS DE COLESTEROL

Las BDC son dominios de membrana ricos en colesterol y glicoesfingolípidos, altamente resistentes a su extracción por detergentes no iónicos, que compartimentalizan procesos celulares. Los glicolípidos presentes en estas BDC se asocian por sus largas cadenas aciladas formando agrupaciones compactas estabilizadas por puentes de hidrógeno. El colesterol se intercala entre las cadenas hidrocarbonadas disminuyendo su flexibilidad, compactando la estructura de la bicapa y modificando su fluidez<sup>141</sup>. No son estructuras constantes, sino grupos heterogéneos de distintos dominios que difieren tanto en su composición lipídica y proteica como en su estabilidad temporal<sup>142</sup>.

Están implicadas en procesos de transporte a través de la membrana, endocitosis, señalización y transducción de señales<sup>143</sup>. Debido a su localización y composición contienen numerosas enzimas y receptores de membrana, e interaccionan con numerosas vías de transducción de señales implicadas en distintos procesos como la apoptosis o señalización celular<sup>144,145</sup>.

## 5.4 EVIDENCIAS DE NEFROPROTECCIÓN POR CILASTATINA

Actualmente no hay mecanismos de protección directos que protejan al riñón del daño agudo. El FRA inducido por fármacos tóxicos ha aumentado en nuestro medio de modo exponencial con una mortalidad global del 40,7%, siendo del del 54,4% en la UCI y del 24% fuera de ella<sup>146</sup>. Por este motivo, en muchos casos tiene que limitarse la dosis del fármaco, sustituirlo por otro menos eficaz o suspender el tratamiento debido a su toxicidad. Aunque el objetivo inicial del diseño de la molécula cilastatina era crear un compuesto que inhibiera el efecto de la enzima sobre el imipenem, diversos estudios en la literatura incluyendo los realizados por nuestro grupo, posiblemente pioneros en el campo indican que cilastatina por si sola es capaz de ejercer un efecto protector frente a distintos nefrotóxicos bien conocidos en clínica humana:

➤ **CICLOSPORINA A (CsA)**. Es uno de los fármacos inmunosupresores más potentes y utilizados en trasplante pese a su gran nefrotoxicidad. Afecta tanto al riñón propio como al trasplantado provocando VC renal, caída irreversible de la función renal a largo plazo, daño tubulointersticial, apoptosis, desequilibrio entre VC y vasodilatación, y causa una reducción dosis dependiente de la fluidez de membrana de las PTEC<sup>147,148</sup>. En los años 80, se realizaron estudios en modelos animales para probar la interacción de I/C con la CsA dando como resultado una reducción de la toxicidad renal<sup>149,150</sup>. En los 90, los estudios se enfocaron a humanos sometidos a varios tipos de trasplante que se trataban con CsA y encontraron que los grupos en los que se co-trataba con I/C tenían mejores resultados de función renal<sup>151-153</sup>. Pero estos autores no se ponían de acuerdo en si había relación entre la dosis y los niveles sanguíneos de CsA o derivados<sup>149,150,154</sup>. En 2004, nuestro grupo de investigación mediante experimentos *in vitro* demostró que cilastatina era capaz de proteger a las células renales frente a la agresión por CsA y tacrolimus, aportando nuevas evidencias respecto al mecanismo por el cual ocurre esa protección. Se propuso que ésta se debía a que la unión entre cilastatina y la enzima, daba lugar a cambios estructurales de membrana, que a su vez impedía que el fármaco entrase en el interior celular<sup>148</sup>. En 2006, nuestro grupo también llevó a cabo un metaanálisis con todos los estudios que había hasta ese momento, en los cuales se observó la reducción del daño renal en

presencia de cilastatina o I/C, concluyendo que ésta reducía en un 43% los niveles de creatinina sérica incrementados por CsA, y en un 76% el riesgo de desarrollar un FRA por CsA<sup>155</sup>. En 2019, nuestros estudios de protección de cilastatina frente a tacrolimus fueron corroborados por el grupo de Luo K y *col.*<sup>156</sup>.

➤ **CISPLATINO.** Es un potente quimioterápico cuyos efectos nefrotóxicos son la principal complicación en su aplicación en terapias anticancerígenas. Es capaz de acumularse en las células renales provocando daño celular por aumento del EO, inflamación y muerte celular<sup>157</sup>. En la literatura solo hay un estudio relativo a la interacción I/C y cisplatino, que fue el realizado por Nakamura en 1999 pero no consiguió demostrar protección renal<sup>158</sup>. Nuestro grupo desde el 2010 ha trabajado en modelos tanto *in vitro* como *in vivo* para demostrar la nefroprotección por cilastatina en el daño renal inducido por cisplatino. Hemos sido el primer grupo en demostrar cómo cilastatina administrada sin imipenem es capaz de proteger del daño renal inducido en todos los casos. Demostramos como existe una mejora en la función renal y disminución de los procesos apoptóticos, inflamatorios y de EO, sin modificar la eficacia terapéutica del quimioterápico<sup>159-163</sup>.

➤ **VANCOMICINA (VAN).** Es un glicopéptido y antibiótico bactericida que se ha utilizado normalmente para tratar las infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) y otras bacterias Gram-positivas<sup>164</sup>. La nefrotoxicidad inducida por VAN se produce a través de mecanismos como el EO y la apoptosis, causando alteraciones en la reabsorción renal dependiente de energía de las PTEC y en la función mitocondrial<sup>125,165-169</sup>. En los años 90 se realizaron estudios en modelos animales en los que I/C o cilastatina sola reducía o eliminaba la nefrotoxicidad inducida por VAN, inhibiendo su acumulación en el tejido renal y en plasma<sup>170,171</sup>. Se propuso que la disminución de la toxicidad producida por cilastatina se debía a la interacción competitiva de ésta con VAN por la vía de entrada de las PTEC. Estos estudios se confirmaron por Nakamura, aunque no fue capaz de proponer un mecanismo definitivo<sup>158</sup>. Nuestro grupo confirmó también en 2015 en cultivos primarios de PTEC, los resultados obtenidos por estos autores. La unión de cilastatina a la DHP-I de las BDC bloqueaba la internalización y transporte de vesículas en el borde en cepillo, reduciendo así la entrada a través de la membrana y todos los eventos nefrotóxicos<sup>165</sup>. Se producía un bloqueo de la apoptosis dosis dependiente, recuperación de la viabilidad celular y reducción de la degradación de ADN. En 2017, un estudio demostró que el bloqueo de la vía de entrada de VAN con cilastatina, reducía la nefrotoxicidad provocada por éste y otros fármacos<sup>132</sup>.

➤ **GENTAMICINA.** Es un antibiótico aminoglucósido y produce daño renal al acumularse a nivel de la corteza, concretamente en las PTEC. Entra en el interior celular mediante vesículas de clatrina y tras unirse en el borde en cepillo, se produce la internalización y acumulación lisosomal, donde se activan fosfolipasas lisosomales<sup>172</sup>. Aparece una vacuolización citoplasmática y edema mitocondrial justo antes de la muerte celular<sup>173</sup>. Es útil para tratar infecciones causadas por gérmenes Gram-negativos, a pesar de que su uso se complica frecuentemente por la nefrotoxicidad que produce<sup>174,175</sup>. Nuestro grupo demostró que el tratamiento con cilastatina inhibía la aparición de manera total o parcial de muerte celular, tanto *in vitro* como *in vivo*, así como el daño oxidativo, inflamación y fibrosis. Parece que la entrada a la célula es bloqueada interfiriendo con su receptor, megalina, evitando su acumulación intracelular<sup>176</sup>.

Cilastatina parece ser eficaz contra la nefrotoxicidad inducida por todos estos fármacos, gracias a la reducción del EO por disminución de las ROS, bloqueo de la apoptosis y reducción de la inflamación<sup>125</sup>. El mecanismo protector también implica la reducción del transporte renal y la acumulación intracelular del tóxico<sup>11</sup>.



# **HIPÓTESIS**



El bloqueo transitorio de las balsas de colesterol apicales de las células del túbulo proximal mediante la inhibición de la enzima renal dehidropeptidasa-I con el fármaco cilastatina, es una posible diana terapéutica para el fracaso renal agudo de origen endotóxico, como el inducido por sepsis y rabdomiólisis. La reducción del daño renal puede estar relacionada con la interferencia en las vías de señalización de receptores asociados a las balsas de colesterol, dando lugar a la disminución de la muerte celular, el estrés oxidativo y la inflamación.

Esta hipótesis está basada en observaciones previas de modelos de fracaso renal agudo inducido por fármacos nefrotóxicos de uso común en clínica. En estos modelos la presencia de cilastatina bloqueaba las balsas de colesterol e interfería en la internalización espontánea de las mismas, protegiendo específicamente a las células tubulares proximales de la muerte celular por apoptosis. Esta protección obtenida nos lleva a plantear, por tanto, si otro tipo de fracaso renal agudo como el inducido por sepsis y rabdomiólisis, puede beneficiarse del mismo tipo de inhibición.



# **OBJETIVOS**



## OBJETIVO PRINCIPAL

Demostrar que la inhibición de la enzima renal dehidropeptidasa-I con el fármaco cilastatina, es una alternativa terapéutica segura y eficaz para reducir el daño renal provocado por un fracaso renal agudo (FRA) de tipo endotóxico, como los inducidos en la sepsis y rabdomiólisis. La caracterización de esta nueva estrategia nefroprotectora se subdivide en objetivos más concretos.

## OBJETIVOS CONCRETOS

1.- Determinar los posibles mecanismos de acción a nivel celular y molecular por los que cilastatina puede ejercer su acción nefroprotectora en modelos animales con FRA secundario a sepsis y rabdomiólisis. Es conocido que estos síndromes provocan un aumento de la muerte celular, la inflamación y el estrés oxidativo (EO) a nivel renal. Por ello, nos centraremos específicamente en el análisis de:

1.1.- Morfología tisular. Analizar el efecto de cilastatina en tejido renal de modelos animales.

1.2.- Capacidad antiapoptótica. Evaluar si cilastatina es capaz de reducir los niveles de mediadores apoptóticos, así como su efecto en las principales rutas moleculares de muerte celular programada.

1.3.- Capacidad antioxidante. Estudiar el efecto protector de cilastatina y la prevención del EO.

1.4.- Mecanismos inflamatorios y fibróticos. Analizar la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y el efecto de cilastatina sobre la inflamación generada por ambos tipos de lesión renal. Evaluar el papel de cilastatina sobre la aparición de la transición epitelio-mesenquimal y la fibrosis.

2.- Estudiar el papel de las balsas de colesterol (BDC) en la nefroprotección ejercida por cilastatina:

2.1.- Analizar su efecto sobre las vías de señalización de los receptores de muerte celular que se localizan en las BDC como consecuencia del daño renal: complejo Fas/ligando de Fas (Fas/FasL).

2.2.- Analizar el efecto de cilastatina en la unión de receptores *Toll Like* con sus ligandos, y su interferencia con las cascadas de señalización como posible mecanismo protector.

2.3.- Analizar la interferencia de cilastatina en la activación del inflamasoma y sus vías de señalización.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1 MODELOS EXPERIMENTALES

Los estudios fueron llevados a cabo en las instalaciones del animalario del Instituto de Investigación Sanitaria de Getafe (IIS-Getafe, modelo de FRA inducido por sepsis) y del Instituto de Investigación Sanitaria del Gregorio Marañón (IIS-GM, modelo de FRA inducido por rabdomiólisis), tras su aprobación por los Comités Éticos de Experimentación Animal de ambos Institutos, y las autoridades competentes de la Comunidad de Madrid, bajo la supervisión directa del veterinario responsable y personal técnico cualificado. Toda la manipulación de los animales se llevó a cabo según la normativa legal vigente sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos: RD 118/2021, de 23 de febrero; Ley 32/2007, de 7 de noviembre y orden ECC/566/2015, del 20 de marzo.

Cilastatina, inhibidor de la enzima renal DHP-I de fórmula  $C_{16}H_{26}N_2O_5S$  y peso molecular 358.454 g/mol, fue suministrada por ACS DOBFAR (s.p.a. Tribiano, Milán). Para los estudios *in vivo*, la concentración utilizada fue de 150 mg/Kg disuelta en solución salina 0.9% (Braun Medical S.A., Barcelona, España). La dosis y el régimen de administración de cilastatina, al igual que el tamaño muestral, fueron establecidos por revisión bibliográfica y por la experiencia del grupo en la realización de modelos de FRA inducidos por tóxicos y el uso de cilastatina como protector renal, a pesar de no ser la concentración más alta ensayada con la que hemos tenido máxima protección<sup>160,177,178</sup>.

### 1.1 MODELO DE FRA INDUCIDO POR SEPSIS

Para realizar el modelo experimental de FRA inducido por sepsis, se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley con un peso medio de 350 g criadas y estabuladas en el animalario de IIS-Getafe. Para la inducción de la sepsis se utilizó la técnica de ligadura y punción cecal (*cecal and ligation puncture* o CLP), la cual está bien descrita en la literatura<sup>179</sup>. Antes de la cirugía los animales fueron anestesiados mediante ketamina (90 mg/kg) y diazepam (5 mg/kg). Tras rasurar la zona de intervención, el animal se colocó en el campo quirúrgico sobre una manta térmica a 37°C y en condiciones de esterilidad se realizó una incisión de unos 2 cm y se procedió a abrir la cavidad abdominal. Una vez localizado el ciego se extrajo y se expuso para la localizar las zonas de ligadura. Se realizó una primera ligadura por debajo de la válvula ileocecal con seda trenzada 4-0, evitando la obstrucción intestinal y de forma que no frene del todo el tránsito intestinal. La segunda ligadura se realizó a 1.5 cm de la primera, dejando 0.75 cm a la punta del ciego. Tras hacer las ligaduras, se perforó el ciego tres veces entre las dos con la punta de un catéter del calibre 16G y otra fuera de la ligadura con un catéter de calibre 14G. Después se

presionaron suavemente todas las punciones para exteriorizar el contenido fecal al espacio intraluminal y se volvió a reintroducir el ciego en la cavidad abdominal. Antes de suturar, añadimos a ésta la dosis establecida de cilastatina o su vehículo y se procedió a cerrar por capas. A los animales se les administró solución salina 0.9% (50 mL/kg) por vía subcutánea (s.c.) como medida de soporte hemodinámico y de recuperación de líquidos. También se le suministró buprenorfina (0.05 mg/kg) s.c. cada 12 horas para reducir el dolor. Los animales permanecieron en recuperación postquirúrgica en ambiente tranquilo y temperatura controlada con lámpara médica que emite rayos infrarrojos bajo una luz roja. A partir de la primera dosis de cilastatina administrada a nivel abdominal, ésta se administró intraperitoneal (i.p.) cada 24 horas hasta el día del sacrificio. Un día antes de la eutanasia los animales se reubicaron en jaulas metabólicas para la recogida de la orina de 24 horas.

Para determinar la duración óptima del modelo en cuanto al daño renal se refiere, se realizó un estudio piloto de 24 y 48 horas de duración, basados en datos bibliográficos. De esta forma se estableció que el máximo daño logrado fue a las 48 horas. En total se utilizaron 40 animales, que fueron distribuidos de forma aleatoria en 4 grupos:

➤ **Grupo Control (n=10):** Los animales fueron sometidos a laparotomía sin inducción de sepsis. Se extrajo el ciego y se volvió a reintroducir en la cavidad abdominal. El vehículo de cilastatina (suero salino 0.9%) fue administrado a las ratas de la misma forma y volumen que los grupos tratados con cilastatina.

➤ **Grupo Control + Cilastatina (n=10):** Los animales fueron sometidos a laparotomía sin inducción de sepsis. Tras la reintroducción del ciego en la cavidad abdominal, se administró cilastatina 150 mg/kg antes de proceder a cerrar y cada 24 horas de manera i.p. hasta el momento del sacrificio.

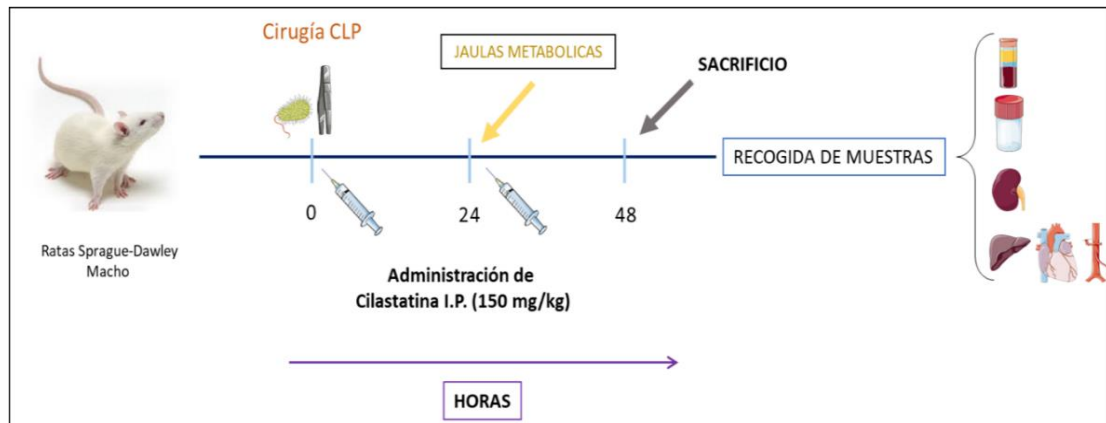
➤ **Grupo CLP (n=10):** Los animales fueron sometidos a inducción de sepsis mediante cirugía CLP. Se administró el vehículo de cilastatina (suero salino 0.9%) de la misma forma y volumen que los grupos tratados con cilastatina.

➤ **Grupo CLP + Cilastatina (n=10):** Los animales fueron sometidos a inducción de sepsis mediante cirugía CLP con administración de cilastatina 150 mg/kg en el momento de la inducción del daño y cada 24 horas de manera i.p. hasta el momento del sacrificio.

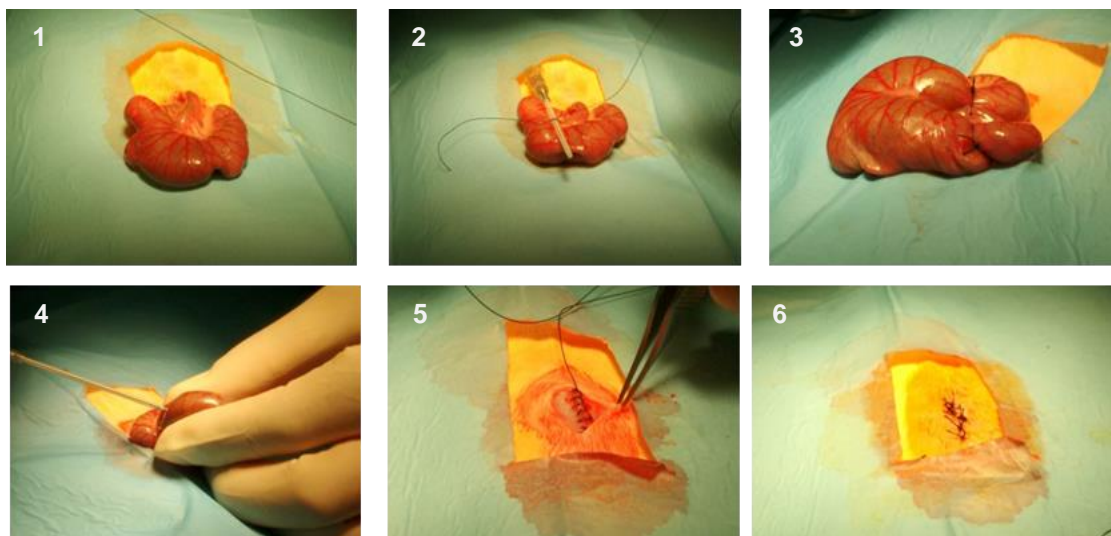
Los animales fueron sometidos a un período de adaptación de 24 horas en jaulas metabólicas antes de comenzar el modelo, que se estableció como se ha comentado en 48 horas. Un esquema del protocolo llevado a cabo y del procedimiento quirúrgico puede verse en la **Figura 19**. Durante el modelo los animales tuvieron libre acceso tanto al agua como a la

comida (dieta estándar), en un ambiente controlado de luz, temperatura y humedad. Un día antes del sacrificio, los animales fueron introducidos en jaulas metabólicas para recoger la orina de 24 horas con la finalidad de cuantificar la diuresis, la concentración de proteínas y establecer otros parámetros bioquímicos. El día del sacrificio los animales se anestesiaron con ketamina (90 mg/kg) y diazepam (5 mg/kg) y se pesaron.

**A**



**B**



**Figura 19. Modelo experimental de nefroprotección por cilastatina frente al fracaso renal agudo endotóxico inducido por sepsis. A) Diseño experimental del modelo a 48 horas en ratas Sprague-Dawley. B) Imágenes del procedimiento quirúrgico de la técnica de ligadura y punción cecal: 1. Laparotomía, extracción del ciego. 2. Primera ligadura. 3. Segunda ligadura. 4. Punción del ciego. 5. Sutura del músculo. 6. Sutura de la piel. I.P.: intraperitoneal; CLP: ligadura y punción cecal.**

### 1.1.1 ESTUDIO DE SUPERVIVENCIA

Para llevar a cabo el estudio de supervivencia se realizó un modelo similar al anteriormente descrito, pero más agresivo. Las punciones se realizaron con los calibres de los

catéteres intercambiados provocando una mayor salida del contenido fecal. Se utilizó una  $n = 5$  en los grupos CLP y CLP + Cilastatina.

## 1.2 MODELO DE FRA INDUCIDO POR RABDOMIÓLISIS

Para realizar el modelo experimental de FRA inducido por rabdomiólisis, se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso medio de 250 g criadas y estabuladas en el animalario del IIS-GM. La rabdomiólisis fue desarrollada en los animales mediante inyecciones intramusculares (i.m.) de glicerol, modelo que se encuentra ampliamente descrito en la literatura. El tamaño muestral de los diferentes grupos, la dosis y regímenes de administración de glicerol (Sigma-Aldrich) para la inducción de rabdomiólisis y de cilastatina como nefroprotector, fueron establecidos por revisión bibliográfica y por la experiencia previa del grupo en la realización de modelos animales en el laboratorio con cilastatina como protector renal<sup>165,176,177</sup>.

Para determinar la duración del modelo en cuanto al daño renal se refiere, se realizó un estudio piloto de 24, 48 y 72 horas de duración tras la inducción de la rabdomiólisis, basados en datos bibliográficos. De esta forma se estableció que el máximo daño logrado fue a las 48 horas principalmente y a las 72 horas en menor medida. En base a estos resultados, se realizaron los dos submodelos con 32 animales en cada uno, que fueron distribuidos de forma aleatoria en 8 grupos:

➤ **Grupos Control 48h (n=6) y Control 72h (n=6):** Administración i.m. de  $H_2O_d$  (vehículo del glicerol) en las patas traseras de los animales en los mismos volúmenes que los animales inyectados con glicerol. Administración i.p. de suero salino (vehículo de cilastatina) en los mismos volúmenes y regímenes que los animales tratados con cilastatina.

➤ **Grupos Control + Cilastatina 48h (n=6) y Control + Cilastatina 72h (n=6):** Administración i.m. de  $H_2O_d$  en las patas traseras de los animales en los mismos volúmenes que los animales inyectados con glicerol. Administración i.p. de cilastatina (150 mg/kg) desde el inicio de la administración del vehículo del glicerol y cada 24 horas hasta el sacrificio.

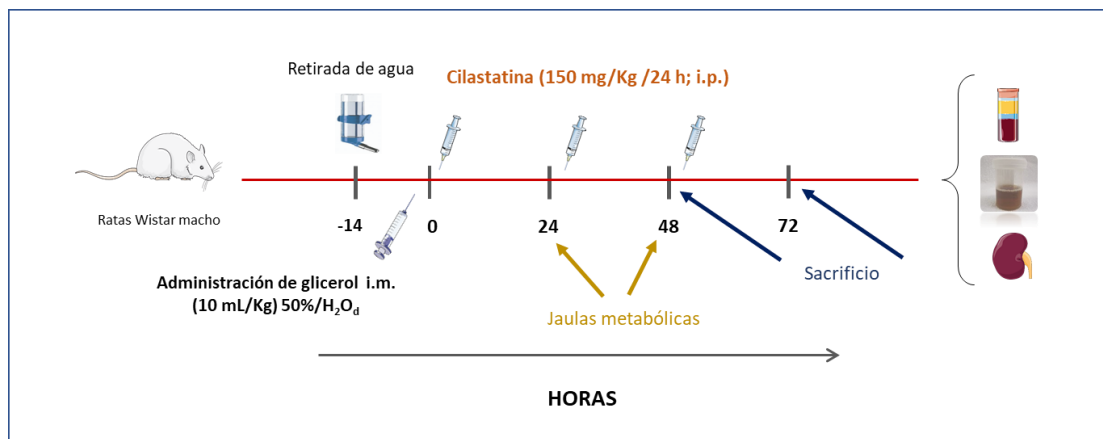
➤ **Grupos Glicerol 48h (n=10) y Glicerol 72h (n=10):** Administración i.m. de glicerol (10 ml/kg) 50% en  $H_2O_d$  en las patas traseras de los animales. Administración i.p. del vehículo de cilastatina (suero salino) en los mismos volúmenes y regímenes que los grupos con cilastatina, desde el inicio de la administración del glicerol y cada 24 horas hasta el sacrificio.

➤ **Grupos Glicerol + Cilastatina 48h (n=10) y Glicerol + Cilastatina 72h (n=10):** Administración i.m. de glicerol (10 ml/kg) 50% en  $H_2O_d$  en las patas traseras de los animales.

Administración i.p. de cilastatina (150 mg/kg) desde la administración del glicerol y cada 24 horas hasta el sacrificio.

Como se muestra en el protocolo representado en la **Figura 20A**, entre 14-16 horas antes de la inducción de rbdomiólisis las ratas fueron privadas del agua de bebida. Los animales fueron anestesiados con sevorane 2% (Abbvie, España) antes de la administración i.m. en las patas traseras de glicerol o su vehículo. Las ratas se mantuvieron con vida durante 48 y 72 horas desde la inyección de glicerol o su vehículo y el tratamiento con o sin cilastatina, teniendo libre acceso tanto al agua como a la comida (dieta estándar), en un ambiente controlado de luz, temperatura y humedad. Un día antes del sacrificio, los animales fueron introducidos en jaulas metabólicas para recoger la orina de 24 horas con la finalidad de cuantificar la diuresis, la concentración de proteínas, y establecer otros parámetros bioquímicos. El día del sacrificio las ratas fueron anestesiadas con sevorane y pesadas.

**A**



**B**



**C**



**Figura 20. Modelo experimental de nefroprotección por cilastatina en el FRA endotóxico inducido por glicerol.** **A)** Diseño experimental en ratas Wistar a 48 y 72 horas. **B)** Aspecto macroscópico de los riñones con rbdomiólisis antes de la extracción. Obsérvese el aspecto blanquecino exterior con el punteado oscuro. **C)** Diferentes cortes del riñón una vez extraído tras la cirugía. Nótese el color oscuro de la médula principalmente debido a los depósitos de mioglobina. i.p.: intraperitoneal; i.m.: intramuscular.

## 2 EXTRACCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

En todos los modelos tras la sedación de los animales, se procedió a abrir la cavidad abdominal y se llevó a cabo la extracción de sangre mediante canulación de la aorta abdominal a la altura de la bifurcación. La sangre obtenida se centrifugó a 2.500 rpm durante 15 minutos a 4°C para conseguir suero sanguíneo, que se congeló a -80°C hasta el momento de su uso. Fue recogido también un tubo de sangre para realizar el estudio del hemograma en el modelo de FRA inducido por sepsis. Tras la exanguinación se clampó la aorta cortando su flujo por encima de los riñones y se perfundieron los órganos con suero salino frío a través de la misma cánula previa perforación la vena cava inferior. Posteriormente los riñones fueron extraídos, decapsulados y mantenidos en suero salino frío durante su manipulación, para minimizar la degradación del tejido. Se pesaron para la posterior determinación de la hipertrofia renal.

Los riñones derechos fueron seccionados e introducidos en paraformaldehído (PFA) al 4% en tampón salino fosfato (PBS) durante 24 horas a 4°C para su fijación. Posteriormente fueron deshidratados con concentraciones crecientes de etanol e incluidos finalmente en parafina (PanReac, Barcelona, España) mediante el procesador de tejidos *STP120* (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA). Las muestras parafinadas fueron cortadas en un microtomo *HM325* (Microm, Thermo Fisher Scientific) en secciones de 4 µm de grosor y recogidas sobre portaobjetos *Superfrost Plus* (Thermo Fisher Scientific). Tras la fijación en estufa a 60°C durante al menos una hora, se almacenaron a temperatura ambiente (RT) hasta su utilización en estudios histopatológicos.

Los riñones izquierdos fueron separados en corteza y médula, congelando ambas muestras en N<sub>2</sub> líquido y almacenándolas a -80°C hasta el momento de su utilización en estudios de biología molecular. Por último, se extrajo el resto de los órganos (corazón, pulmón, bazo, hígado, aorta) para futuros estudios, procediendo de igual manera una parte para PFA y otra parte para congelar.

## 3 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y HEMATOLÓGICOS

Los parámetros bioquímicos fueron medidos en suero y orina mediante un autoanalizador COBAS 711 (Roche Farma, Madrid, España) disponible en el Servicio de Bioquímica del Hospital G.U. Gregorio Marañón (HGUGM). A partir de estos datos, se calcularon los principales parámetros de función renal mediante la aplicación de las siguientes formulas:

- ❖ Carga Urinaria:

$$\text{Carga Urinaria} = ([\text{Na}^+]_{\text{Orina}} + [\text{K}^+]_{\text{Orina}}) - [\text{Cl}^-]_{\text{Orina}}$$

- ❖ Aclaramiento de agua libre ( $\text{ClH}_2\text{O}$ ):

$$\text{ClH}_2\text{O} = V_{\text{Orina}} \times (1 - [\text{Na}^+]_{\text{Orina}}) + ([\text{K}^+]_{\text{Orina}} / [\text{Na}^+]_{\text{Plasma}})$$

- ❖ Excreción fraccional de agua ( $\text{EFH}_2\text{O}$ ):

$$\text{EFH}_2\text{O} = \frac{V_{\text{Orina}}}{\text{TFG}} \times 100$$

- ❖ Excreción fraccional de sodio ( $\text{EFNa}^+$ ):

$$\text{EFNa}^+ = \frac{[\text{Na}^+]_{\text{Orina}} \times [\text{Cr}]_{\text{Plasma}}}{[\text{Na}^+]_{\text{Plasma}} \times [\text{Cr}]_{\text{Orina}}} \times 100$$

- ❖ Tasa de filtración glomerular (TFG):

$$\text{TFG} = \frac{[\text{Cr}]_{\text{Orina}} \times V_{\text{Orina}}}{[\text{Cr}]_{\text{Plasma}}}$$

- ❖ Gradiente transtubular de potasio (GTTK):

$$\text{GTTK} = ([\text{K}^+]_{\text{Orina}} / [\text{K}^+]_{\text{Plasma}}) \times (\text{Osm}_{\text{Plasma}} / \text{Osm}_{\text{Orina}})$$

Na<sup>+</sup>: Ion sodio; Cl<sup>-</sup>: Ion cloro; V: Volumen; K<sup>+</sup>: Ion potasio; Cr: Creatinina; Osm: Osmolalidad

Para el estudio del hemograma, se tomaron muestras de sangre y fueron analizadas mediante un analizador hematológico *Beckman Coulter LH 780* (Madrid, España).

## 4 ESTUDIOS MORFOLÓGICOS E HISTOPATOLÓGICOS

### 4.1 ESTUDIOS MORFOLÓGICOS

La morfología renal se estudió por medio de microscopía óptica convencional (Olympus IX70). Se utilizaron cortes de 4 μm de grosor previamente procesados y que, tras la fijación por calor, fueron desparafinados y rehidratados en concentraciones de alcohol decrecientes. Las secciones de tejido se tiñeron con hematoxilina de Carazzi (PanReac) y eosina

(KRAPE S.A. Madrid, España), siguiendo las instrucciones del fabricante y se fotografiaron mediante el sistema *Control software ACT-1* (Ver 2.7) (Nikon Corporation, Tokyo, Japón).

La valoración del daño fue realizada por un patólogo experto del Servicio de Anatomía Patológica del HGUGM, en ciego y por observación de toda la muestra. Los parámetros estudiados fueron: A) Medida del daño glomerular (proliferación de células mesangiales, esclerosis y expansión de la matriz). B) Daño túbulointersticial (dilatación y/o atrofia tubular, necrosis tubular, *blebbing*, presencia de cilindros proteicos intratubulares, mitosis y vacuolización). C) Fibrosis intersticial e infiltrado de células inflamatorias. D) Daño vascular. Para establecer el daño renal se utilizó el siguiente índice semicuantitativo: (0) = sin cambios; (1) = cambios focales que afectan a menos del 25% de la muestra; (2) = cambios que afectan del 25% al 50% de la muestra; (3) = cambios que afectan al 50-75% de la muestra y (4) = lesiones que afectan a más del 75% de la muestra. La puntuación (*score*) del daño renal para cada corte evaluado fue el sumatorio de todos los valores obtenidos para los parámetros estudiados.

## 4.2 DETERMINACIÓN DE FIBROSIS

Para la determinación de fibrosis en cortes de tejido renal se realizó una tinción de rojo sirio en secciones de tejido de 4  $\mu\text{m}$  de grosor. Tras desparafinar y rehidratar los cortes en concentraciones decrecientes de etanol, se lavaron las muestras en agua destilada durante 10 minutos. Después, se realizó la tinción con rojo sirio (*Sirius Red F3B*, Sigma-Aldrich), 0.5 g en 500 mL de solución acuosa saturada con ácido pícrico (Sigma-Aldrich) durante 60 minutos, lo que da una tinción cercana al equilibrio ya que no aumenta a tiempos más largos. Tras lavar los cortes dos veces con agua acidificada (ácido acético, Sigma-Aldrich) para eliminar el exceso de tinción, se agitaron vigorosamente las muestras para quitar los restos que pudieran quedar. Inmediatamente después, los cortes se deshidrataron mediante concentraciones crecientes de etanol y se montaron con un medio de montaje para sustitutos de xileno (PanReac Química).

La fibrosis renal fue analizada siguiendo la misma escala semicuantitativa descrita anteriormente. En este caso, se observaron seis campos seleccionados al azar en aumento de 20X y el score de daño para cada muestra fue obtenido del sumatorio de todos los valores.

## 4.3 DETERMINACIÓN DE HIERRO

Para la visualización del hierro férrico sobre secciones de tejido renal, se utilizó el kit de reacción de Perls (Bio-Optica, Milán, Italia) y se examinó el resultado por microscopía óptica. Aunque sea específico para el hierro, la tinción no muestra todo el hierro presente en el tejido. No reacciona al hierro asociado a hemoglobina, al pigmento malárico, a la ferritina y al  $\text{Fe}^{+2}$ . Se

basa en la reacción del ferrocianuro de potasio con los iones férricos de la hemosiderina en un ambiente ácido, resultando en una sal coloreada como es el Azul de Prusia:  $4\text{Fe}^{+4} + 3\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 = \text{Fe}_4(\text{Fe}(\text{CN})_6)_3 + 12\text{K}^+$ . El hierro férrico reactivo se observó en color azul y los núcleos celulares en rojo.

Los tejidos renales se cortaron a 4  $\mu\text{m}$  y tras fijar y rehidratar en concentraciones decrecientes de alcoholes, se pasaron por agua destilada. Después de proceder con el protocolo de la tinción según las recomendaciones del fabricante, se lavaron las secciones de nuevo y se deshidrataron a través de la serie ascendente de alcoholes, isoparafina y montaron las secciones con medio de montaje para sustitutos de xileno (PanReac Química). La cuantificación se realizó mediante el análisis de imagen cuantitativo llevado a cabo con el software *Scion Image* (Scion Corporation, Maryland, USA) e imágenes digitalizadas. Para cada muestra, la media del área de tinción fue obtenida por análisis de seis campos seleccionados aleatoriamente a una magnificación de 20X.

## 5 ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS

### 5.1 INMUNOHISTOQUÍMICA

Las tinciones inmunohistoquímicas fueron realizadas en secciones renales de 4  $\mu\text{m}$  de grosor incluidas en parafina, que fueron previamente desparafinadas y rehidratadas en concentraciones decrecientes de etanol. En los casos en los que fue necesario desenmascarar antígeno para facilitar su unión al anticuerpo, los cortes se calentaron en tampón citrato sódico 10 mM (pH 6.0) (Sigma-Aldrich) hasta ebullición. La actividad peroxidasa endógena se inactivó mediante tratamiento con  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3% en metanol (1:1) (Thermo Fisher Scientific) durante 30 minutos a RT. Después de lavar con agua destilada, se permeabilizó con PBS 1X / buffer Tris fosfato o TBS (Thermo Fisher Scientific) 1X con Triton-X100 al 0.1% (Sigma-Aldrich) (PBS-T / TBS-T) para facilitar la entrada del anticuerpo. Después se utilizó una solución de bloqueo durante una hora a RT para evitar las uniones inespecíficas. Esta solución se preparó con albumina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich) al 4% y el suero del huésped en el que se obtuvo el anticuerpo secundario, al 6-10%, en PBS-T / TBS-T en función del anticuerpo.

A continuación, se incubaron los cortes durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda con los siguientes anticuerpos primarios (**Tabla 4**) diluidos en PBS-T / TBS-T, BSA al 4% y suero del huésped en el que se obtuvo el anticuerpo secundario al 1%:

ANTICUERPOS	ESPECIE	DILUCION	CITRATO	REVELADO	CASA COMERCIAL
<b>4-HNE</b>	Ratón	1/50	SI	LSAB System-HRP	JaICA (Shizuoka, Japón)
<b>Caspasa-3 Activa</b>	Conejo	1/50	SI	LSAB System-HRP	Cell Signaling Technology (MA, USA)
<b>Caspasa-8p18 (D-8)</b>	Ratón	1/50	SI	LSAB System-HRP	Santa Cruz Biotechnology (TX, USA)
<b>CD68</b>	Ratón	1/25	SI	LSAB System-HRP	AbD Serotec (Oxford, UK)
<b>CTGF (L-20)</b>	Cabra	1/100	NO	Kit Vectastain	Santa Cruz Biotechnology
<b>Cu/Zn SOD</b>	Conejo	1/1000	NO	LSAB System-HRP	Stressgen (CA, USA)
<b>ICAM-1 (G-5)</b>	Ratón	1/50	SI	LSAB System-HRP	Santa Cruz Biotechnology
<b>KIM-1</b>	Cabra	1/20	SI	Kit Vectastain	R&D Systems (MN, U.S.A.)
<b>MCP-1 (R-17)</b>	Cabra	1/50	NO	Kit Vectastain	Santa Cruz Biotechnology
<b>MyD88</b>	Conejo	1/250	SI	LSAB System-HRP	Novus Biologicals (MN, U.S.A.)
<b>TGFβ1 (V)</b>	Conejo	1/250	NO	LSAB System-HRP	Santa Cruz Biotechnology
<b>VCAM-1 (C-19)</b>	Cabra	1/100	SI	Kit Vectastain	Santa Cruz Biotechnology

Tabla 4. Anticuerpos primarios empleados en la técnica de inmunohistoquímica.

Tras lavar bien los cortes con PBS-T / TBS-T para eliminar el exceso de anticuerpo primario, se incubaron durante 20 minutos a RT con ambas soluciones (streptavidina/biotina) del sistema *LSAB2 System-HRP* (Dako, Glostrup, Dinamarca) para anticuerpos hechos en ratón o conejo. Cuando esto no fue posible se utilizó el *Kit Vectastain Solution* (Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A.) incubando una hora a RT con el anticuerpo secundario correspondiente y posteriormente 30 minutos con el sistema *ABC Complex* incluido en el kit.

Para revelar las inmunolocalizaciones se utilizó el cromógeno 3-3'-diamino-bencidina (DAB, Sigma-Aldrich). Por último, se contrastaron los tejidos con hematoxilina de Carazzi, se deshidrataron las muestras y se montaron con un medio sustituto del xileno. La especificidad de los anticuerpos primarios se comprobó mediante la realización de controles negativos en los que no se utilizaron dichos anticuerpos, obteniéndose como resultado en cada caso, la ausencia de señal.

Las tinciones de inmunohistoquímica fueron valoradas mediante análisis de imagen cuantitativo realizado por el software *Scion Image* (Scion Corporation) e imágenes digitalizadas. Para cada muestra la media del área de tinción fue obtenida por el análisis de seis campos seleccionados al azar a una magnificación 20X.

## 5.2 INMUNOFLUORESCENCIA

Para la realización de las inmunolocalizaciones mediante inmunofluorescencia (IFI), se utilizaron secciones de tejido renal incluidos en parafina de 4 µm de grosor. Tras desparafinar y rehidratar los cortes en concentraciones decrecientes de alcohol, fue necesario desenmascarar

el antígeno en todos los casos. Las muestras se calentaron en tampón citrato sódico 10 mM a pH6 hasta ebullición. Después se permeabilizaron en PBS-T para favorecer la entrada del anticuerpo. A continuación, se utilizó una solución de bloqueo durante una hora a RT para evitar las uniones inespecíficas, compuesta por BSA al 4% y el suero del huésped en el que se obtuvo el anticuerpo secundario al 6-10% en PBS-T.

Después, se incubaron los cortes durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda con los siguientes anticuerpos primarios (**Tabla 5**) diluidos en PBS-T, BSA al 4% y suero del huésped en el que se obtuvo el anticuerpo secundario al 1%:

ANTICUERPOS	ESPECIE	DILUCION	CASA COMERCIAL
<b>RelA/NFκB p65</b>	Ratón	1/100	Novus Biologicals
<b>Fas/Apo1</b>	Conejo	1/50	BioVision (CA, USA)
<b>Fas Ligando (NOK-1)</b>	Ratón	1/50	Santa Cruz Biotechnology
<b>TLR4 (25)</b>	Ratón	1/50	Santa Cruz Biotechnology
<b>MDA</b>	Conejo	1/500	Alpha Diagnostic (TX, USA)
<b>MyD88</b>	Conejo	1/50	Novus Biologicals

Tabla 5. Anticuerpos primarios empleados en la técnica de IFI.

Tras lavar bien los cortes con PBS-T, se incubaron con los anticuerpos secundarios marcados (**Tabla 6**) una hora a RT y en oscuridad. Posteriormente se lavaron las muestras con PBS 1X y se incubaron con una solución de sudan black al 0.3% (Sigma-Aldrich) disuelto en isopropanol (Thermo Fisher Scientific) durante 20 minutos a RT. Después del lavado, se preparó una solución de DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, Sigma-Aldrich) a una concentración de 5 µg/mL en PBS 1X y se incubó durante 5 minutos a RT. Finalmente los cortes se montaron con la solución acuosa *Fluorescence Mounting Medium* (Dako).

ANTICUERPOS	ESPECIE	DILUCION	CASA COMERCIAL
<b>Conejo IgG DyLight® 594</b>	Burro	1/40	Bethyl Laboratories (TX, USA)
<b>Conejo IgG-FITC</b>	Cabra	1/50	Bethyl Laboratories
<b>Raton IgG (H+L)-DyL 488</b>	Burro	1/4000	Novus Biologicals
<b>Conejo IgG(H+L) Cy3</b>	Burro	1/300	Jackson InmunoResearch (Cambridge, UK)

Tabla 6. Anticuerpos secundarios marcados empleados en la técnica de IFI.

El análisis de las imágenes se llevó a cabo en la Unidad de Microscopia Confocal del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) del IIS-GM. Se utilizó un microscopio de fluorescencia confocal modelo *LEICA-SPE* (Leica Microsystems).

## 6 ANÁLISIS PROTEICOS

### 6.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

Las muestras de corteza renal se sometieron a un protocolo de extracción basado en el sistema TissueLyser LT (Qiagen, Hilden, Alemania). La ruptura y homogeneización simultáneas de tejido, se logra mediante la agitación a alta velocidad de las muestras en tubos de microcentrífuga de 2 mL con bolitas de acero inoxidable. Siguiendo las indicaciones del proveedor, se colocaron el rack y los tubos con una bola de acero de 7 mm a -80°C al menos media hora antes de la extracción. El tejido renal se pasó a su tubo con la bolita previamente enfriado y a cada muestra se le añadió 1 mL de buffer de lisis BR20X frío [Tris 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, Tritón X-100 0.2%, NP40 0.3%, NaF 25 mM (10 µL/mL), CIP (10 µL/mL) y PMSF 0.1 mM (1 µL/mL)]. El TissueLyser se programó a 50 Hz 10 minutos y se comprobó que las muestras estuvieran bien digeridas. Posteriormente el contenido se pasó a tubos limpios, se mantuvieron en hielo durante 20 minutos y se colocaron a 4°C en agitación durante 30 minutos más. Después, se centrifugaron a 4°C durante 15 minutos a 12.000 rpm, recogiendo los sobrenadantes que contienen los extractos proteicos. La concentración de proteínas totales se determinó por el método colorimétrico del ácido bicinonínico, *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific). El complejo formado es soluble en agua y tiene fuerte absorbancia a 562 nm, casi lineal con el aumento de proteínas. Tras la medición se almacenaron a -80°C hasta el momento de su uso.

### 6.2 WESTERN BLOT

Los extractos proteicos se analizaron mediante electroforesis utilizando 50 µg de proteína por muestra, cargadas junto con loading buffer 4X (Bio-Rad, California, USA) y separadas en geles comerciales *Precast TGX* (Bio-Rad) de entre 10% - 15% bajo condiciones reductoras, con *running buffer* comercial (Lonza). Posteriormente, fueron transferidas mediante *Transfer Pack, Midi Format, 0.2 µm nitrocelulose* (Bio-Rad) en buffer de transferencia [Tris 48 mM pH 8.8, glicina 39 mM, SDS 0.037% y metanol 20% (vol/vol)] utilizando el *Trans-Blot® Turbo™, Transfer System* (Bio-Rad). Estas membranas fueron bloqueadas con leche desnatada en polvo/BSA al 4% en PBS-T/TBS-T 0.1% 1 hora e incubadas toda la noche a 4°C con el anticuerpo correspondiente (**Tabla 7**):

ANTICUERPO	ESPECIE	PM (KDa)	DILUCION	CASA COMERCIAL
<b>ARG-2</b>	Conejo	39	1/1000	Abcam®
<b>Bax (6A7)</b>	Ratón	23	1/200	Santa Cruz Biotechnology
<b>Bcl-2 (C-2)</b>	Ratón	26	1/200	Santa Cruz Biotechnology
<b>Caspasa-1</b>	Conejo	45 (31)	1/3000	Abcam®
<b>Caspasa-3 Activa</b>	Conejo	17-19	1/1000	Cell Signaling Technology
<b>Caspasa-8 Activa</b>	Conejo	18-43	1/1000	Cell Signaling Technology
<b>Caspasa-9</b>	Conejo	17-38-40-51	1/1000	Cell Signaling Technology
<b>Catalasa (H-9)</b>	Ratón	64	1/3000	Santa Cruz Biotechnology
<b>CD14</b>	Conejo	40	1/400	Abcam®
<b>CD163</b>	Conejo	121-150	1/1000	Abcam®
<b>CTGF (L-20)</b>	Cabra	38	1/200	Santa Cruz Biotechnology
<b>SOD-1 (24)</b>	Ratón	23	1/30000	Santa Cruz Biotechnology
<b>Wnt5a</b>	Conejo	42	1/200	Abcam®
<b>Fas/Apo1</b>	Conejo	55-35-29	1/300	BioVision
<b>FasL(C-20)</b>	Conejo	26-40	1/200	Santa Cruz Biotechnology
<b>Ferritina</b>	Conejo	19-21	1/1000	Abcam®
<b>Vimentina (V9)</b>	Ratón	54	1/125	Anticuerpos On Line
<b>HO-1 / HSP32</b>	Ratón	32	1/500	Abcam®
<b>HSP27 (F-4)</b>	Ratón	27	1/200	Santa Cruz Biotechnology
<b>HSP70 (K-20)</b>	Cabra	70	1/200	Santa Cruz Biotechnology
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Conejo	17-35	1/300	Abcam®
<b>KIM-1</b>	Cabra	50/80	1/1000	R&D Systems
<b>MyD88</b>	Conejo	35	1/500	Novus Biologicals
<b>NLRP3</b>	Conejo	114	1/300	Abcam®
<b>RelA/NFkB p65</b>	Ratón	65	1/2000	Novus Biologicals
<b>TJP1/ZO-1</b>	Conejo	195/220	1/1250	Anticuerpos On Line
<b>TLR2</b>	Conejo	89	1/500	Abcam®
<b>TLR4 (25)</b>	Ratón	95/120	1/200	Santa Cruz Biotechnology
<b><math>\beta</math>-Actina</b>	Ratón	42	1/60000	Sigma-Aldrich

Tabla 7. Anticuerpos primarios empleados en la técnica de Western Blot.

Después de lavar para eliminar el exceso de anticuerpo primario, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa (Tabla 8). Como marcador de pesos moleculares se utilizó el *WesternC Kit* (Bio-Rad) que incorpora un reactivo, el Streptactin HRP para permitir revelar las bandas del patrón junto con la banda de interés:

ANTICUERPOS	ESPECIE	DILUCION	CASA COMERCIAL
<b>Anti cabra-HRP</b>	Ratón	1/5000	Santa Cruz Biotechnology
<b>Anti ratón IgG-HRP</b>	Oveja	1/3000	Amersham (Buckinghamshire, UK)
<b>Anti conejo IgG-HRP</b>	Burro	1/5000	Amersham

Tabla 8. Anticuerpos secundarios empleados en la técnica de Western Blot.

Después de lavar para eliminar el exceso de anticuerpo secundario, se identificaron las proteínas mediante quimioluminiscencia con el *Amersham™ ECL™ Prime Kit* (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), con la ayuda del revelador Alliance 4.7 (Uvitec, Cambridge, Reino Unido).

Las cuantificaciones de las señales se llevaron a cabo con el programa de análisis de imágenes *ImageJ* (Image Processing and Analysis in Java). Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias de densitometrado (u.a.d).

### 6.3 TÉCNICAS DE ELISA

En los sueros obtenidos de los animales se determinó la concentración de una serie de proteínas utilizando kits específicos para cada una de ellas:

- ⇒ Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ): *Rat TNF $\alpha$  ELISA Kit* (CUSABIO, Houston, TX, USA)
- ⇒ Proteína de unión al LPS (LBP): *Rat LBP ELISA Kit* (CUSABIO)
- ⇒ Factor Nuclear kB (NF $\kappa$ B): *Rat NF $\kappa$ B ELISA Kit* (CUSABIO)
- ⇒ Calcio: *Rat Ca ELISA Kit* (Abcam®)

Siguiendo las instrucciones del fabricante, la concentración de cada muestra fue cuantificada por interpolación de la lectura de absorbancia en una curva patrón generada con los estándares proporcionados por el kit expresada en pg/mL.

## 7 MEDIDA DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La medida de la capacidad antioxidante se realizó en orina de 24 horas mediante el empleo del *Antioxidant Assay Kit* (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Tras diluir las muestras 1/15, se mezclaron 10  $\mu$ L de la misma con 10  $\mu$ L de metamioglobina y 150  $\mu$ L de cromógeno. A continuación, se añadieron a todos los pocillos 40  $\mu$ L de solución de trabajo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y se incubó la placa en agitación durante 5 minutos a RT. Por

último, se determinó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 750 nm con la ayuda de un lector de placas (Synergy HT).

Para hallar el resultado final del experimento, las medidas de absorbancia de las muestras se interpolaron en una recta patrón generada con concentraciones crecientes del reactivo Trolox, tratadas de la misma forma que las muestras con metamioglobina y el cromógeno. Los resultados se expresaron como capacidad antioxidante (mM).

## 8 QUANTIBODY RAT CYTOKINE ARRAY 67

Los sueros obtenidos de los animales sometidos a FRA inducido por rabdomiólisis, se mandaron a la central de Raybiotech donde se realizó una medida cuantitativa de la concentración de citoquinas mediante el *Quantibody® Rat Cytokine Array 67*. Este panel consta de dos plataformas independientes como se muestra en la **Tabla 9**.

Al igual que un ELISA tradicional basado en el modelo sándwich, este método utiliza un par de anticuerpos específicos de citoquinas para la detección. Un anticuerpo de captura se une primero a la superficie de vidrio y tras la incubación con la muestra, la citoquina objetivo queda atrapada en la superficie sólida. A continuación, se añade un segundo anticuerpo de detección marcado con biotina, que puede reconocer un epítipo diferente de la citoquina objetivo. El complejo formado citoquina-anticuerpo-biotina puede entonces ser visualizado utilizando un escáner láser, mediante la adición del colorante equivalente a Cy3 conjugado con streptavidina. A diferencia del ELISA tradicional, los productos *Quantibody®* utilizan un formato de matriz. Mediante esta plataforma es posible la detección cuantitativa y de múltiples citoquinas en un solo experimento. Cada anticuerpo junto con los controles positivos se realiza por cuadruplicado. Tiene la alta sensibilidad y especificidad del ELISA tradicional y el alto rendimiento de los arrays.

	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
A	POS1				POS2				NEG			
B	CD86 (B7-2)				β-NGF				CINC-1 (CXCL1)			
C	CINC-2				CINC-3				CNTF			
D	Fractalkine				GM-CSF				ICAM-1 (CD54)			
E	IFN-γ				IL-1α				IL-1β			
F	IL-2				IL-4				IL-6			
G	IL-10				IL-13				LIX			
H	L-Selectin				MCP-1				PDGF-AA			
I	Prolactin R				RAGE				TCK-1 (CXCL7)			
J	TIMP-1				TNF-α				VEGF-A			

**Tabla 9.** Determinación de 67 citoquinas mediante Arrays en muestras de suero. Se lleva a cabo en dos plataformas independientes y se realiza por cuadruplicado, en horizontal. POS: positivo; NEG: negativo.

	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
A	POS1				POS2				4-1BB (CD137)			
B	Activin A				Adiponectin				CD80 (B7-1)			
C	CD48 (SLAMF2)				CTACK (CCL27)				Decorin			
D	Eotaxin-1				EphA5				Erythropoietin			
E	FGF-BP				Flt-3 Ligand				Galectin-1			
F	Galectin-3				Gas 1				GFR α-1			
G	gp130				HGF				IL-1 R6			
H	IL-1 ra (IL-1F3)				IL-2 Rα				IL-3			
I	IL-7				IL-17F				IL-22			
J	JAM-A				MIP-1α				Neuropilin-1			
K	Neruropilin-2				Nope				Notch-1			
L	Notch-2				P-Cadherin				Prolactin			
M	RANTES (CCL5)				SCF				TIM-1 (KIM-1)			
N	TIMP-2				TREM-1				TWEAK R			

Una vez realizado el estudio, los resultados analizados se entregaron en varios formatos para su interpretación. La concentración de cada citoquina vino expresada en pg/mL. La normalización se realizó utilizando la señal de los controles internos de cada matriz de proteínas. Todas las muestras se realizaron por triplicado y la prueba de significación que llevo a cabo la casa comercial, se realizó mediante la prueba *t*. El límite inferior de detección para cada marcador se determinó a partir de la media de los datos brutos de dos conjuntos de curvas estándar y a partir de la media de cuatro controles negativos y desviación estándar (DS) (calculando la media + 2× DS).

## 9 ANÁLISIS GENÉTICOS

### 9.1 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL

Para la extracción de ARN total se utilizó un método de disgregación mecánica mediante el TissueLyser (Qiagen). Un trozo de corteza renal se colocó en un tubo con una bola de acero de 7 mm, previamente enfriado a -80°C junto con el rotor del TissueLyser. A cada muestra se le añadió 1 mL del reactivo comercial *Trizol™ Reagent* (Life Technologies, Invitrogen, Paisley, Reino Unido). El programa utilizado fue 40 Hz durante 2 minutos, descanso de 15 segundos y 2 minutos más. En el caso de que la disgregación no fuera completa, se repitió el proceso. Una vez terminado el mismo, los sobrenadantes fueron traspasados a tubos limpios donde se incubaron 5 minutos a RT. Tras esto se añadió a cada tubo 400 µL de cloroformo (Thermo Fisher Scientific) y se vorteoó 15 segundos, para incubar después 15 minutos a RT. Después de la incubación, se centrifugaron las muestras 15 minutos a 12.000 rpm y 4°C. De las tres fases que se forman, se recogió a tubos definitivos la fase superior, que es la que contiene el ARN. A esta fase se le añadieron 800 µL de isopropanol y se agitó por inversión varias veces. Se realizó una incubación de 15 minutos a RT dejando que precipite el ARN y se centrifugó otros 15 minutos a 12.000 rpm y 4°C. Se retiró el sobrenadante y el pellet se lavó con etanoles fríos seriados al 70% y 100% con centrifugaciones de 15 minutos a 12.000 rpm y 4°C. El pellet se secó durante una hora y se resuspendió en 20 µL de H<sub>2</sub>O libre de RNAsas (Bio-Rad).

La cuantificación de la concentración de ARN de las muestras se realizó por medida de la absorbancia a 260 nm con la ayuda del NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific), teniendo en cuenta que 1 unidad de absorbancia corresponde a 40 µg/mL de ARN. El grado de pureza de los extractos nos lo dio la relación entre las absorbancias a 260 y 280 nm, observando que en todos los casos fue cercana a 2, lo que indicó ausencia de contaminación por proteínas en las

muestras. Una vez realizada la extracción se procedió a hacer una solución stock 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ .

## 9.2 PCR EN TIEMPO REAL

Para realizar la PCR en tiempo real primero fue necesario convertir el ARN obtenido a ADNc (transcripción inversa). Para ello se utilizó un kit comercial *iScript cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad) y 2  $\mu\text{g}$  de ARN. Siguiendo las indicaciones del fabricante, primero se hizo una dilución de 2  $\mu\text{L}$  de ARN (stock 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) en 98  $\mu\text{L}$  de agua libre de RNAsas (Bio-Rad) dando una concentración de 20  $\text{ng}/\mu\text{L}$ . De aquí cargamos 5  $\mu\text{L}$  para una concentración final de 100  $\text{ng}$  de ARN junto con 15  $\mu\text{L}$  de máster mix del kit, para un volumen final de reacción de 20  $\mu\text{L}$ . Una vez hecha la mezcla, se dio un spin a los tubos y se colocaron en el termociclador *iCycler* (Bio-Rad). Tras la retrotranscripción, se hizo una dilución del ADNc añadiendo 80  $\mu\text{L}$  de agua libre de RNAsas.

Para la PCR en tiempo real se utilizó el sistema de detección *KAPA SYBR® FAST qPCR Kits* (Roche), siguiendo las indicaciones del proveedor y se realizó mediante el sistema de detección secuencial *iQ5 Multicolor Real Time PCR Detection System* (Bio-Rad). Se llevó a cabo la amplificación del ADNc por duplicado de los genes de interés y en paralelo con la de las enzimas gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) o *18S ribosomal RNA*, que se utilizaron como *house-keeping* o control interno. Todos los cebadores empleados fueron obtenidos por revisión bibliográfica y mediante el programa *PRIME3R*, y suministrados por Invitrogen. Los genes ensayados y los cebadores empleados en su análisis se recogen en la **tabla 10**:

GEN	SECUENCIA (SENTIDO)	SECUENCIA (ANTISENTIDO)
<b>IL-6</b>	GTCAACTCCATCTGCCCTTC	ACTGGTCTGTTGTGGGTGGT
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	ACAACCCACAGATCCAGCAC	GAATCAGCACCGACTCCTTT
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	CAAACCACCAAGCAGAGGAG	TGTGGGTGAGGAGCACATAG
<b>ICAM-1</b>	TCAAACGGGAGATGAATGGT	TCCTCTGGCGGTAATAGGTG
<b>IL-10</b>	CCTGGGAGAGAAGCTGAAGA	TGGCCTGTAGACACCTTTG
<b>GAPDH</b>	CGGCCGAGGGCCCACTAAAG	TGCTCAGTGTGGGGGCTGAGT
<b>18S</b>	GACTCAACACGGGAAACCTC	AGACAAATCGCTCCACCAAC
<b>Cu/Zn SOD</b>	GCAGAAGGCAAGCGGTGAAC	TAGCAGGACAGCAGATGAGT
<b>Caspasa-1</b>	CCGTGGAGAGAAACAAGGAG	GGTGTTGAAGAGCAGAAAGCA
<b>NFkB</b>	TCCCTGAAGTGGAGCTAGGA	GCTAGAAGCTGGAGGATGGA
<b>MyD88</b>	GCCTTGTTAGACCGTGAGGA	CCCAGTTCCTTGTCTGTGG
<b>TNFR1</b>	GAACCAATTCAGCGCTACCT	GGTGCACTCATTTCCGCTTAG
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	CACCTCTCAAGCAGAGCACAG	GGTTCCATGGTGAAGTCAAC

Tabla 10. Genes analizados y la secuencia de los cebadores empleados en la técnica de PCR en tiempo real.

## 10 ENSAYO DE TUNEL

El ensayo de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated DUTP nick end labelling*) se realizó en tejido incluido en parafina mediante el empleo del kit *Fluorescein FragEL™ DNA fragmentation* (Calbiochem, Darmstadt, Alemania), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Tras desparafinar y rehidratar, secciones renales de 4  $\mu\text{m}$  de grosor fueron tratadas con proteinasa K 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 20 minutos, y lavadas posteriormente con TBS 1X. Los cortes fueron sumergidos en tampón de equilibrado y después incubados con la mezcla de reacción conteniendo la enzima durante 1 hora y media a 37°C. Tras los correspondientes lavados para eliminar el exceso de señal, los cortes fueron teñidos con DAPI y montados en portaobjetos con ayuda del medio de montaje proporcionado por el kit. Para generar los controles negativos se sustituyó la enzima por agua destilada en la mezcla de reacción.

Para la visualización y análisis de las imágenes, se empleó un microscopio de fluorescencia confocal modelo LEICA-SPE (Leica Microsystems), con un microscopio invertido motorizado DMI8 del SAI de Microscopia Confocal del IIS-GM. Se utilizó software LAS-X con herramientas de cuantificación. Ésta, se realizó en ciego contando células TUNEL-positivas en seis campos tomados al azar de cada preparación. El resultado final se expresó como células TUNEL-positivas/ $\text{mm}^2$ .

## 11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

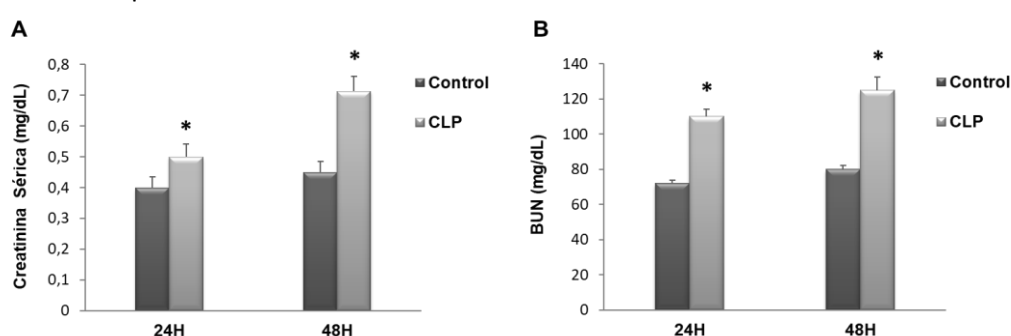
Para calcular la igualdad de varianza entre los grupos se utilizó el Test de Levene. Aquellas variables continuas que presentaban igualdad de varianza y una distribución que se ajustaba a la normal se analizaron mediante la prueba de análisis de la varianza (ANOVA). Como prueba *post-hoc* para determinar las diferencias específicas entre grupos se utilizó la LSD de Fisher (*Low Significant Difference*). En caso contrario, para el análisis de los datos no paramétricos se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis. Los resultados son expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (EEM) y valores de  $p \leq 0.05$  se consideraron significativos. Todos los test estadísticos utilizados se realizaron con el programa informático GraphPad Prism 9.1.0.

# **RESULTADOS**



# 1 EFECTO DE CILASTATINA EN EL FRA INDUCIDO POR SEPSIS

Para llevar a cabo este modelo como ya se comentó en el apartado de *Materiales y Métodos*, se realizó previamente un estudio piloto de 24 y 48 horas para establecer la duración óptima del mismo, ya que más tiempo aumentó enormemente la mortalidad de los animales. Con respecto al daño renal, como se muestra en la **Figura 21**, los valores de creatinina y BUN en los animales sépticos tras 48 horas presentaron valores mayores de daño renal. Por este motivo se determinó que la duración del modelo fuera de 48 horas.



**Figura 21. Valores de función renal del estudio piloto a 24 y 48 horas.** Determinación de **A)** Creatinina sérica y **B)** BUN del estudio preliminar para valorar la duración óptima del modelo. Los animales sépticos presentan más daño sobre todo a las 48 horas. BUN: nitrógeno ureico en sangre. Los resultados están expresados como media  $\pm$  EEM,  $n = 3$  animales por grupo. \* $p \leq 0.05$  vs. Control para cada tiempo. Cil: cilastatina; CLP: ligadura y punción cecal.

## 1.1 EFECTO DE CILASTATINA SOBRE EL PESO CORPORAL

Durante todo el modelo se obtuvieron los pesos de los animales y se calculó la diferencia de peso al inicio y final del estudio. Todos los grupos presentaron pérdida de peso, siendo estadísticamente significativa la del grupo CLP respecto al control (**Tabla 11**):

GRUPO	PESO INICIAL (g)	PESO FINAL (g)	$\Delta$ PESO (g)
CONTROL	347 $\pm$ 6.60	326 $\pm$ 6.70	-16.5 $\pm$ 2.67
CONTROL + CIL	351 $\pm$ 4.24	326 $\pm$ 4.82	-19.4 $\pm$ 2.06
CLP	363 $\pm$ 6.10	343 $\pm$ 7.03	-23.2 $\pm$ 2.13*
CLP + CIL	346 $\pm$ 4.86	322 $\pm$ 5.66	-21.2 $\pm$ 2.15

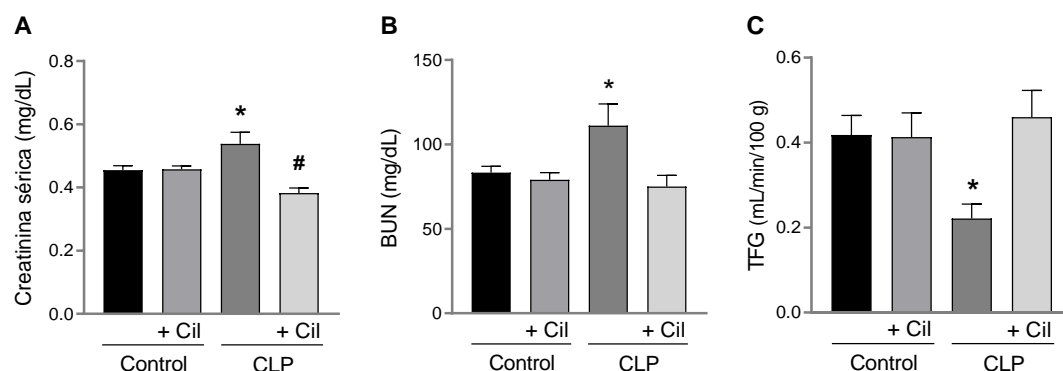
**Tabla 11. Pérdida de peso corporal.** Se calculó la diferencia de pesos entre el inicial y el final, y se estableció el delta de peso para cada grupo. Se puede observar cómo durante el modelo todos los grupos perdieron peso, siendo el grupo CLP el que tiene la mayor pérdida de peso corporal. Los resultados están expresados como media  $\pm$  EEM,  $n = 10$  animales por grupo. \* $p \leq 0.04$  vs. Control. Cil: cilastatina.

## 1.2 CILASTATINA RESTAURA LA FUNCIÓN RENAL

### 1.2.1 PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN SUERO

La sepsis induce FRA y para valorar la pérdida de función renal y como afecta el tratamiento con cilastatina, se estudiaron los indicadores principales de función renal como son

la creatinina, el BUN y la TFG, parámetro calculado a partir de los datos de creatinina. Como se observa en la **Figura 22**, el grupo CLP tuvo un aumento estadísticamente significativo de creatinina y BUN con respecto al control. El grupo CLP más cilastatina mantuvo los parámetros en los mismos niveles observados en el grupo control. El grupo CLP, además presenta una drástica disminución en la TFG que es restaurado significativamente por el tratamiento con cilastatina (**Figura 22C**).



**Figura 22. Parámetros bioquímicos y de función renal.** A) Creatinina sérica, B) BUN, C) TFG. El grupo CLP presenta una pérdida significativa de función renal, que se recupera al nivel del grupo control con cilastatina. Los resultados están expresados como media  $\pm$  EEM.  $n = 10$  animales por grupo. \* $p \leq 0.02$  vs. todos los grupos; # $p \leq 0.04$  vs. Control + Cil. BUN: nitrógeno ureico en sangre; TFG: tasa de filtrado glomerular; Cil: cilastatina.

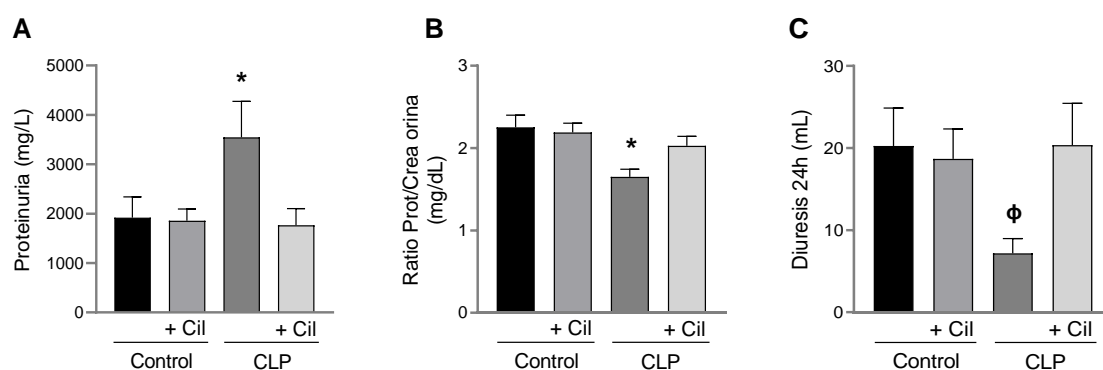
Otros parámetros que se han valorado a nivel bioquímico se presentan en la **Tabla 12**, destacando la alteración significativa de la mayoría de ellos en el grupo CLP. Cilastatina mejora parcialmente los valores.

PARÁMETRO	CONTROL	CONTROL + CIL	CLP	CLP + CIL
UREA (mg/dL)	38.88 $\pm$ 1.72	36.89 $\pm$ 1.97	51.88 $\pm$ 5.99*	35.00 $\pm$ 3.10
ALBÚMINA (g/dL)	1.03 $\pm$ 0.02	1.00 $\pm$ 0.02	0.88 $\pm$ 0.02*	0.96 $\pm$ 0.02
COLESTEROL (mg/dL)	102.80 $\pm$ 2.41	101.20 $\pm$ 4.07	89.75 $\pm$ 4.65**	93.13 $\pm$ 4.18
MAGNESIO (mg/dL)	2.25 $\pm$ 0.12	2.31 $\pm$ 0.16	1.81 $\pm$ 0.08**	2.17 $\pm$ 0.14
SODIO (mEq/L)	148.50 $\pm$ 1.37	149.60 $\pm$ 1.45	148.50 $\pm$ 1.44	149.60 $\pm$ 1.55
POTASIO (mEq/L)	3.91 $\pm$ 0.09	3.89 $\pm$ 0.13	4.31 $\pm$ 0.13**	4.27 $\pm$ 0.13 <sup>&amp;</sup>
CALCIO (mg/dL)	7.73 $\pm$ 0.49	7.07 $\pm$ 0.85	9.54 $\pm$ 0.15**	8.57 $\pm$ 0.38 <sup>&amp;</sup>
ALT (U/L)	41.10 $\pm$ 3.06	43.50 $\pm$ 4.30	41.82 $\pm$ 3.47	41.73 $\pm$ 3.88
AST (U/L)	92.22 $\pm$ 5.22	93.27 $\pm$ 4.94	123.00 $\pm$ 7.41*	102.70 $\pm$ 6.19
FÓSFORO (mg/dL)	8.01 $\pm$ 0.20	8.29 $\pm$ 0.15	6.90 $\pm$ 0.29*	8.26 $\pm$ 0.12
GLUCOSA (mg/dL)	191.10 $\pm$ 7.48	196.20 $\pm$ 17.16	191.30 $\pm$ 13.80	173.10 $\pm$ 10.50
ÁC. ÚRICO (mg/dL)	0.72 $\pm$ 0.05	0.77 $\pm$ 0.04	0.78 $\pm$ 0.08	0.95 $\pm$ 0.11 <sup>%</sup>
BILIRRUBINA (mg/dL)	0.16 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.01	0.17 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.02 <sup>&amp;</sup>

**Tabla 12. Parámetros bioquímicos en suero.** Los animales CLP sufrieron una alteración en la mayoría de los parámetros medidos. El tratamiento con cilastatina mejoró esos valores parcialmente con respecto al grupo control. Los resultados están expresados como media  $\pm$  EEM.  $n = 10$  animales por grupo. \* $p \leq 0.03$  vs. todos los grupos; \*\* $p \leq 0.04$  vs. Control  $\pm$  Cil; & $p \leq 0.05$  vs. Control + Cil; % $p \leq 0.04$  vs. Control. ALT: alanina aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa; Cil: cilastatina.

## 1.2.2 PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN ORINA

En la **Figura 23** se muestra como en los animales sépticos existe un incremento en la excreción de proteínas, característica del daño renal y una reducción de la diuresis. Otro índice que valora el grado de daño renal es el ratio de proteína respecto a la creatinina, que como se muestra en la **Figura 23B**, disminuye significativamente con respecto al control. Todos los parámetros mejoran con el tratamiento con cilastatina volviendo a niveles casi del grupo control.



**Figura 23. Parámetros bioquímicos de función renal en orina.** A) Proteinuria, B) Ratio proteína/creatinina, C) Diuresis. El grupo CLP presenta una disminución de los valores relacionados con el daño renal. El grupo tratado con cilastatina mejora significativamente los parámetros hasta el nivel del grupo control. Los resultados están expresados como media  $\pm$  EEM, n = 10 animales por grupo. \*p  $\leq$  0.02 vs. todos los grupos;  $\phi$  p  $\leq$  0.04 vs. Control y CLP + Cil. Cil: cilastatina.

Otros parámetros determinados en orina se recogen en la **Tabla 13**. Destaca el aumento del ácido úrico y un menor ratio de albúmina/creatinina de manera significativa con respecto al grupo control. Aunque el tratamiento con cilastatina mejoró estos valores, solo el ácido úrico, la creatinina y el potasio se restablecieron significativamente. El resto de los valores no presentaron relevancia clínica.

PARÁMETRO	CONTROL	CONTROL + CIL	CLP	CLP + CIL
CREATININA (mg/dL)	166.70 $\pm$ 30.04	136.10 $\pm$ 19.16	<b>74.39 <math>\pm</math> 8.74*</b>	143.80 $\pm$ 22.28
UREA (mg/dL)	3114 $\pm$ 518.20	2864 $\pm$ 180.40	2423 $\pm$ 212.90	2681 $\pm$ 224.90
ALBÚMINA (g/dL)	34.06 $\pm$ 11.20	43.70 $\pm$ 13.15	24.26 $\pm$ 6.09	43.84 $\pm$ 10.45
AC. URICO (mg/dL)	22.83 $\pm$ 6.00	24.63 $\pm$ 6.12	<b>58.09 <math>\pm</math> 12.77*</b>	23.87 $\pm$ 4.05
Ind. ALB/CREA (mg/dL)	60.93 $\pm$ 5.52	43.83 $\pm$ 11.60	<b>22.12 <math>\pm</math> 4.09**</b>	65.48 $\pm$ 15.02
SODIO (mEq/L)	105.50 $\pm$ 20.36	113.30 $\pm$ 14.58	113.80 $\pm$ 24.38	103.60 $\pm$ 19.63
POTASIO (mEq/L)	80.97 $\pm$ 10.87	87.41 $\pm$ 14.58	<b>33.76 <math>\pm</math> 5.94*</b>	71.60 $\pm$ 9.66
GLUCOSA (mg/dL)	31.00 $\pm$ 12.61	34.33 $\pm$ 18.94	26.40 $\pm$ 10.58	10.20 $\pm$ 1.74
Ind. ÚRICO/CREA	0.28 $\pm$ 0.03	0.29 $\pm$ 0.01	0.30 $\pm$ 0.02	0.29 $\pm$ 0.01

**Tabla 13. Parámetros bioquímicos en orina.** El grupo CLP presenta una alteración de los valores respecto al control. El grupo tratado con cilastatina mejora parcialmente estos niveles, siendo significativamente la recuperación de la creatinina, ácido úrico y el potasio. Los resultados están expresados como media  $\pm$  EEM, n = 10 animales por grupo. \*p  $\leq$  0.05 vs. todos los grupos; \*\*p  $\leq$  0.01 vs. Control y CLP + Cil. Índ.: Índice; ALB: albúmina; CREA: creatinina; Cil: cilastatina.

### 1.2.3 PARÁMETROS ESTIMADOS DE FUNCIÓN RENAL

A partir de los datos bioquímicos anteriores en sangre y orina, se estimaron otros parámetros de función renal mediante ecuaciones descritas en el apartado *Material y Métodos* (Tabla 14). El grupo CLP presentó una disminución en la EFNa<sup>+</sup> y un aumento en el CIH<sub>2</sub>O. Estos resultados podrían indicar lesión tanto en el túbulo proximal como en el distal, ya que el GTTK (índice de actividad secretora de potasio en el túbulo distal) se ve reducido, aunque no significativamente. Los animales tratados con cilastatina mejoraron estos parámetros alterados.

PARÁMETRO	CONTROL	CONTROL + CIL	CLP	CLP + CIL
EFNa <sup>+</sup> (%)	0.57 ± 0.13	0.57 ± 0.06	<b>0.28 ± 0.05*</b>	0.51 ± 0.05
EFH <sub>2</sub> O (%)	0.76 ± 0.22	1.06 ± 0.27	0.94 ± 0.25	0.98 ± 0.21
CIH <sub>2</sub> O (mL/min H <sub>2</sub> O)	-28.22 ± 2.10	-30.02 ± 1.27	<b>-20.48 ± 2.06*</b>	-27.78 ± 3.10
CARGA URINARIA (mEq/L)	39.85 ± 10.35	48.70 ± 8.00	59.73 ± 13.21	84.08 ± 17.33
Cl-Cl (mEq/L)	30.15 ± 3.45	20.50 ± 0.10	<b>6.82 ± 1.10*</b>	<b>17.23 ± 4.20**</b>
GTTK	5.78 ± 0.54	6.61 ± 1.44	4.01 ± 0.23	5.96 ± 1.42

Tabla 14. **Parámetros estimados de función renal.** Los animales del grupo CLP presentaron una alteración en algunos parámetros estimados, siendo revertidos con el tratamiento con cilastatina. Los resultados están expresados como media ± EEM, n = 10 animales por grupo. \*p ≤ 0.03 vs. todos los grupos; \*\*p ≤ 0.03 vs. Control. Cil: cilastatina.

### 1.3 CILASTATINA MEJORA LOS PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS

El estudio hematológico realizado muestra que el grupo CLP presenta una reducción significativa de leucocitos junto con el nivel de plaquetas (Tabla 15). El porcentaje de neutrófilos aumentó tres veces el valor normal de los valores control junto con el de monocitos, que supuso el doble del valor control. Asimismo, el porcentaje de linfocitos se redujo significativamente al igual que el de los eosinófilos. En la sepsis grave tiene lugar una muerte acelerada por apoptosis de los linfocitos, lo que lleva a una depleción de éstos con pérdida de su función reguladora.

Hay que destacar el incremento de las células LUC, de las siglas en inglés "*Large Unstained Cells*" (células grandes no teñidas). Cuando se hace la tinción para el recuento hay un pequeño porcentaje de células que no se tiñen (< 6%), que corresponden a leucocitos grandes hiperactivos, blastos, linfocitos grandes atípicos, plasmocitos y células patológicas. Este aumento puede indicar que el organismo necesita más leucocitos en sangre periférica debido a la existencia de una infección o por una inflamación. Si es superior al 6% en el recuento diferencial de leucocitos, junto con concentraciones elevadas de transaminasas son indicativos de una infección. Todos los parámetros mejoraron en el grupo tratado con cilastatina de manera significativa. Parece que es capaz de reducir la infiltración de neutrófilos y macrófagos, a la vez

que mejora los niveles de linfocitos. Los valores de la serie roja no se vieron alterados en ninguno de los grupos.

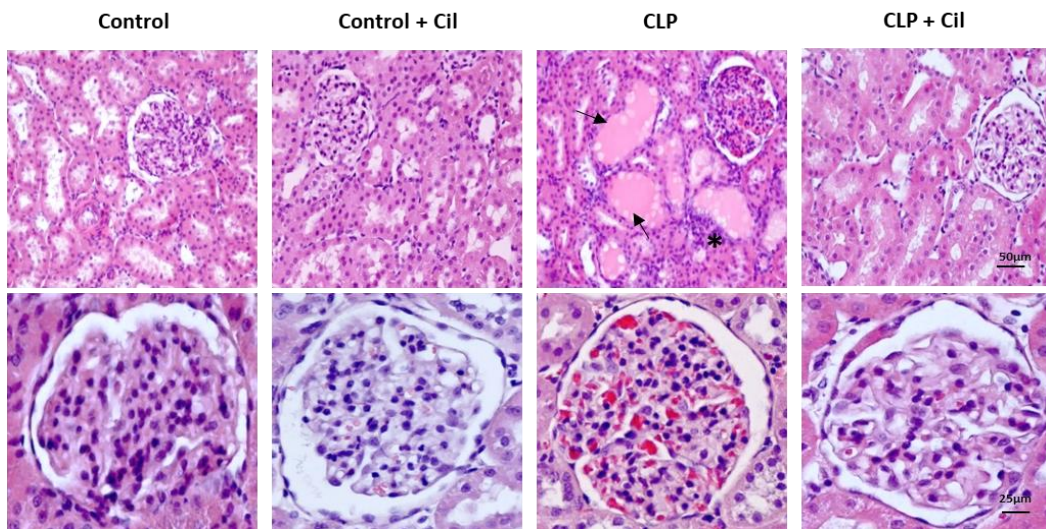
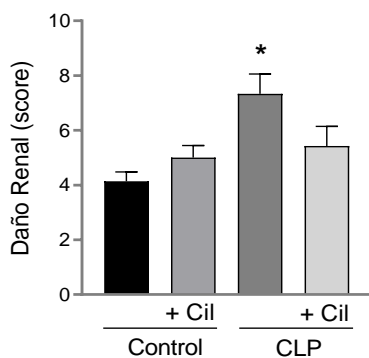
Cilastatina por sí sola no tuvo ningún efecto sobre todos los parámetros estudiados.

PARÁMETRO	CONTROL	CONTROL + CIL	CLP	CLP + CIL
LEUCOCITOS ( $10^3 / \mu\text{l}$ )	4.08 ± 0.71	4.60 ± 0.454	<b>2.51 ± 0.27*</b>	3.45 ± 0.44
PLAQUETAS ( $10^3 / \mu\text{l}$ )	773 ± 69.96	799.30 ± 55.53	<b>577.60 ± 37.74*</b>	697.00 ± 54.52
NEUTROFILOS (%)	4.78 ± 1.00	4.00 ± 0.750	<b>12.10 ± 1.59**</b>	<b>7.56 ± 1.31<sup>#</sup></b>
LINFOCITOS (%)	68.02 ± 2.16	72.55 ± 1.354	<b>46.54 ± 4.96**</b>	<b>57.33 ± 1.69%</b>
MONOCITOS (%)	15.86 ± 1.32	14.65 ± 0.83	<b>30.00 ± 3.62**</b>	<b>23.16 ± 1.74%</b>
EOSINOFILOS ( $10^3 / \mu\text{l}$ )	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	<b>0.02 ± 0.01**</b>	0.05 ± 0.01
CÉLULAS LUC (%)	6.84 ± 0.66	7.28 ± 0.49	<b>13.08 ± 0.75**</b>	<b>10.68 ± 0.83%</b>
HEMATÍES ( $10^6 / \mu\text{l}$ )	7.02 ± 0.15	7.09 ± 0.15	7.01 ± 0.14	6.86 ± 0.15
HEMOGLOBINA (g/dL)	13.84 ± 0.32	13.87 ± 0.34	14.00 ± 0.33	13.36 ± 0.23
HEMATOCRITO (fL)	41.18 ± 1.00	41.40 ± 0.92	41.08 ± 0.98	39.66 ± 0.94

**Tabla 15. Determinación de parámetros hematológicos.** Se valoró el hemograma mediante Coulter, y los animales CLP presentaron una alteración en los niveles de la serie blanca, que fueron mejorados significativamente con el tratamiento con cilastatina. La serie roja no se vio alterada en ningún grupo. Los resultados están expresados como media ± EEM, n = 10 animales por grupo. \*p ≤ 0.04 vs. Control ± Cilastatina; \*\*p ≤ 0.04 vs. todos los grupos; <sup>#</sup>p ≤ 0.04 vs. Control + Cil; %p ≤ 0.03 vs. Control ± Cil. Cil: cilastatina.

## 1.4 ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA RENAL

Se realizó el estudio de la morfología en secciones de tejido renal incluidas en parafina y teñidas con hematoxilina/eosina. El FRA inducido por sepsis daña las células del túbulo proximal provocando dilatación tubular, vacuolización, *blebbing*, formación de cilindros proteicos que obstruyen los túbulos, etc. En la **Figura 24A**, se puede observar cómo los animales del grupo CLP presentan estas características mencionadas, junto con infiltración leucocitaria, descamación epitelial y pérdida del borde en cepillo. A un mayor aumento se puede observar con más detalle el glomérulo, que presenta congestión capilar, hemorragia glomerular y dilatación del espacio urinario. El grupo tratado con cilastatina presenta una estructura tubular conservada, con disminución en la formación de cilindros proteicos, infiltrado celular y conservación del borde en cepillo, así como reducción del daño glomerular. En la **Figura 24B**, puede observarse el score de puntuación del daño renal realizada por un patólogo experto. Como puede observarse, en sepsis aumenta el daño que principalmente es debido al daño tubular y glomerular, mientras que el grupo tratado con cilastatina presenta una mejoría significativa en el daño renal con una reducción de todos los signos valorados.

**A****B**

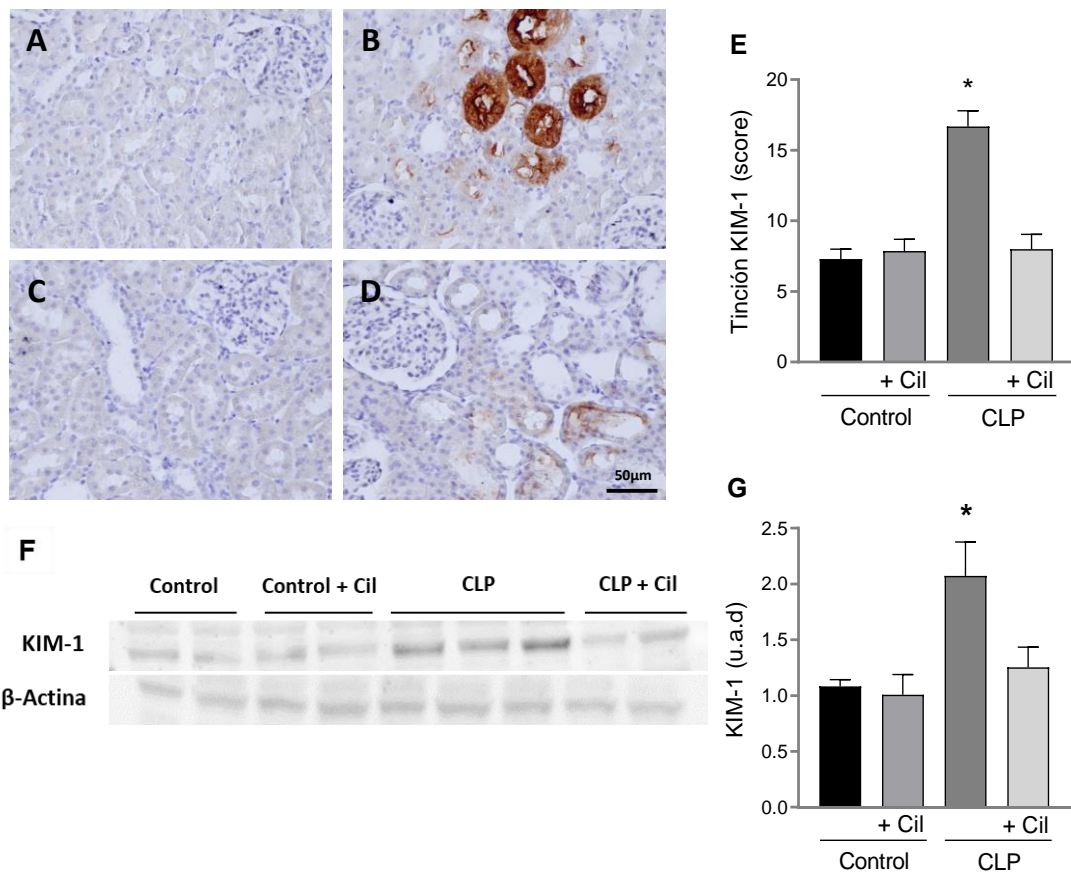
**Figura 24. Estudio histopatológico y score de daño renal.** A) Morfología de tejido renal. Imágenes que representan los grupos de estudio. Tinción de hematoxilina/eosina, magnificación 20X en imágenes superiores y ampliación del glomérulo en imágenes inferiores. Las flechas indican los cilindros proteicos en la luz del túbulo proximal en el grupo CLP y los asteriscos indican infiltración leucocitaria. El grupo CLP + Cil, muestra una morfología restaurada a nivel tubular y glomerular. B) Score de daño renal. Se cuantificó mediante signos histológicos establecidos. El grupo CLP presenta un incremento significativo de los signos valorados, que se reducen con el tratamiento con cilastatina. Los resultados están expresados como media  $\pm$  EEM, n = 10 animales por grupo. \* $p \leq 0.03$  vs. todos los grupos. Cil: cilastatina.

## 1.5 CILASTATINA REDUCE LA EXPRESIÓN DE KIM-1

Como ya se ha demostrado, la sepsis produce una alteración a nivel bioquímico disminuyendo la función renal y produciendo daño histológico a varios niveles. Para confirmarlo, se estudió el biomarcador específico de daño renal KIM-1. Aparece de forma precoz cuando existe una agresión y el túbulo proximal se ve afectado. Los niveles se determinaron mediante inmunohistoquímica y Western blot en tejido renal (**Figura 25**).

En la **Figura 25E** y **G** se puede observar que el grupo CLP presenta un score de tinción de biomarcador incrementado significativamente. Los grupos tratados con cilastatina presentan un menor score de daño y una reducción de proteína que se aproxima a valores de los grupos control.

Se ha podido comprobar como cilastatina *per se* no afecta a ninguno de los estudios realizados.



**Figura 25. Determinación del biomarcador KIM-1.** Inmunohistoquímica de KIM-1: **A)** Control, **B)** CLP, **C)** Control + Cil, **D)** CLP + Cil. Magnificación 20x. **E)** Score de la tinción KIM-1. **F)** Western blot de KIM-1 de corteza renal y  $\beta$ -Actina como control de carga. **G)** Cuantificación de proteína KIM-1. El grupo CLP presenta un incremento del biomarcador con respecto al grupo control. Se puede observar como la tinción es específica de túbulo proximal. El tratamiento con cilastatina mantiene los valores a nivel del control. Los resultados están expresados como media  $\pm$  EEM, n = 10 animales por grupo. \* $p \leq 0.01$  vs. todos los grupos. u.a.d: unidad arbitraria de densitometrado; Cil: cilastatina.

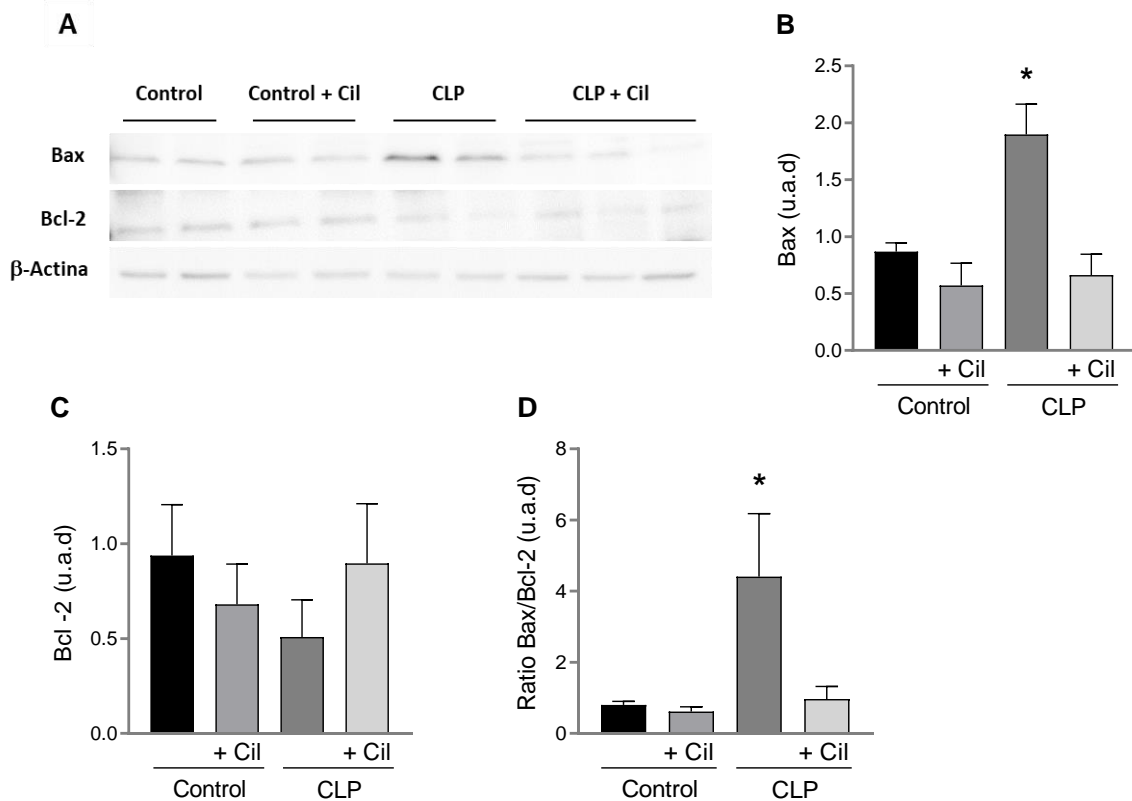
## 1.6 EFECTO DE CILASTATINA SOBRE LA APOPTOSIS

### 1.6.1 CILASTATINA BLOQUEA LA VÍA INTRÍNSECA

#### 1.6.1.1 Efecto de cilastatina sobre proteínas de la familia Bcl-2

Esta familia de proteínas juega un papel central en la regulación de la apoptosis. Existen elementos proapoptóticos como Bax y antiapoptóticos como Bcl-2. La caspasa-9 que además es activada por el daño mitocondrial actúa también sobre Bax y Bcl-2. Como se puede observar en la **Figura 26B**, los animales del grupo CLP presentan un aumento de Bax que es bloqueado significativamente con el tratamiento de cilastatina, permaneciendo sus niveles como los observados en el grupo control. En el caso de Bcl-2 muestra, asimismo, una reducción de los niveles en los animales sépticos y una recuperación con el tratamiento con cilastatina, pero los resultados no son estadísticamente significativos.

Para valorar el daño aparte de la determinación individual de ambas proteínas, se establece el ratio Bax/Bcl-2 (**Figura 26D**). Este valor nos indica la tendencia hacia la apoptosis de las células o hacia un estado antiapoptótico. Un ratio elevado indica una baja resistencia celular a estímulos apoptóticos. En este caso la sepsis aumenta la susceptibilidad de las células de forma significativa a la apoptosis, mientras que el tratamiento con cilastatina lo disminuye de manera significativa.

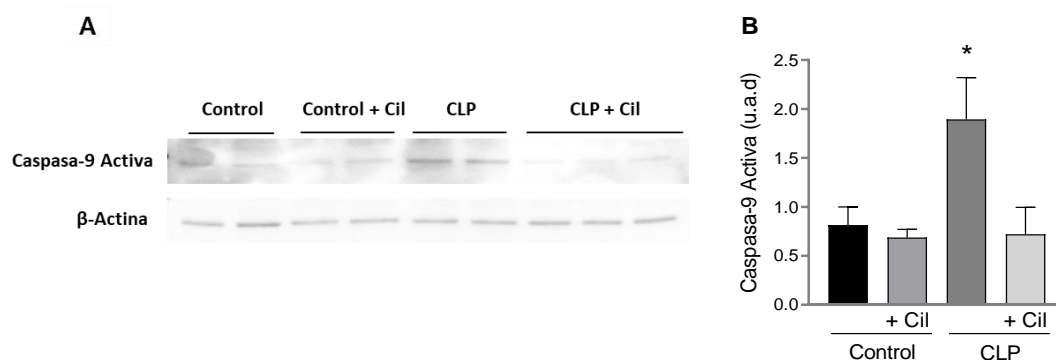


**Figura 26. Efecto de cilastatina sobre proteínas de la familia Bcl-2 en tejido renal.** A) Imagen representativa de Western blot de Bax, Bcl-2 y  $\beta$ -Actina como control de carga, en corteza renal. B) y C) Cuantificación del densitometrado del Western blot corregido por el control de carga. D) Ratio Bax/Bcl-2. Se observa un aumento en la expresión de proteína Bax en el grupo CLP respecto al control, mientras que Bcl-2 presenta un descenso no estadísticamente significativo. Los animales tratados con cilastatina mostraron una síntesis semejante al grupo control. Los resultados están expresados como media  $\pm$  EEM,  $n = 10$  animales por grupo. \* $p \leq 0.03$  vs. todos los grupos. u.a.d: unidad arbitraria de densitometrado; Cil: cilastatina.

### 1.6.1.2 Efecto de cilastatina sobre caspasa-9

Continuando el análisis de la vía intrínseca de la apoptosis, se estudió la activación de la caspasa-9 implicada en el proceso. Las caspasas son proteínas fundamentales para el desarrollo y progresión de la apoptosis. El análisis se realizó sobre muestras de corteza renal mediante técnicas de Western blot. La caspasa-9 activa es la proteasa iniciadora de esa ruta tras el daño mitocondrial. En la **Figura 27** se observa como los animales CLP presentan una mayor síntesis de esta proteína con respecto a los grupos control. Los animales tratados con cilastatina redujeron su activación de manera significativa, como se pudo confirmar mediante

densitometría. Parece que cilastatina es capaz de bloquear la activación de la ruta intrínseca de la apoptosis.



**Figura 27. Efecto de cilastatina sobre caspasa-9 activa en tejido renal.** A) Imagen representativa de Western blot de caspasa-9 activa y  $\beta$ -Actina como control de carga. B) Cuantificación del densitometrado del Western blot corregido por el control de carga. Se observa un aumento significativo de la síntesis de proteína en los riñones de los animales CLP respecto al grupo control. Los animales tratados con cilastatina mostraron una menor síntesis de proteína semejante al control. Los resultados están expresados como media  $\pm$  EEM, n = 10 animales por grupo. \*p  $\leq$  0.02 vs. todos los grupos. u.a.d: unidad arbitraria de densitometrado; Cil: cilastatina.

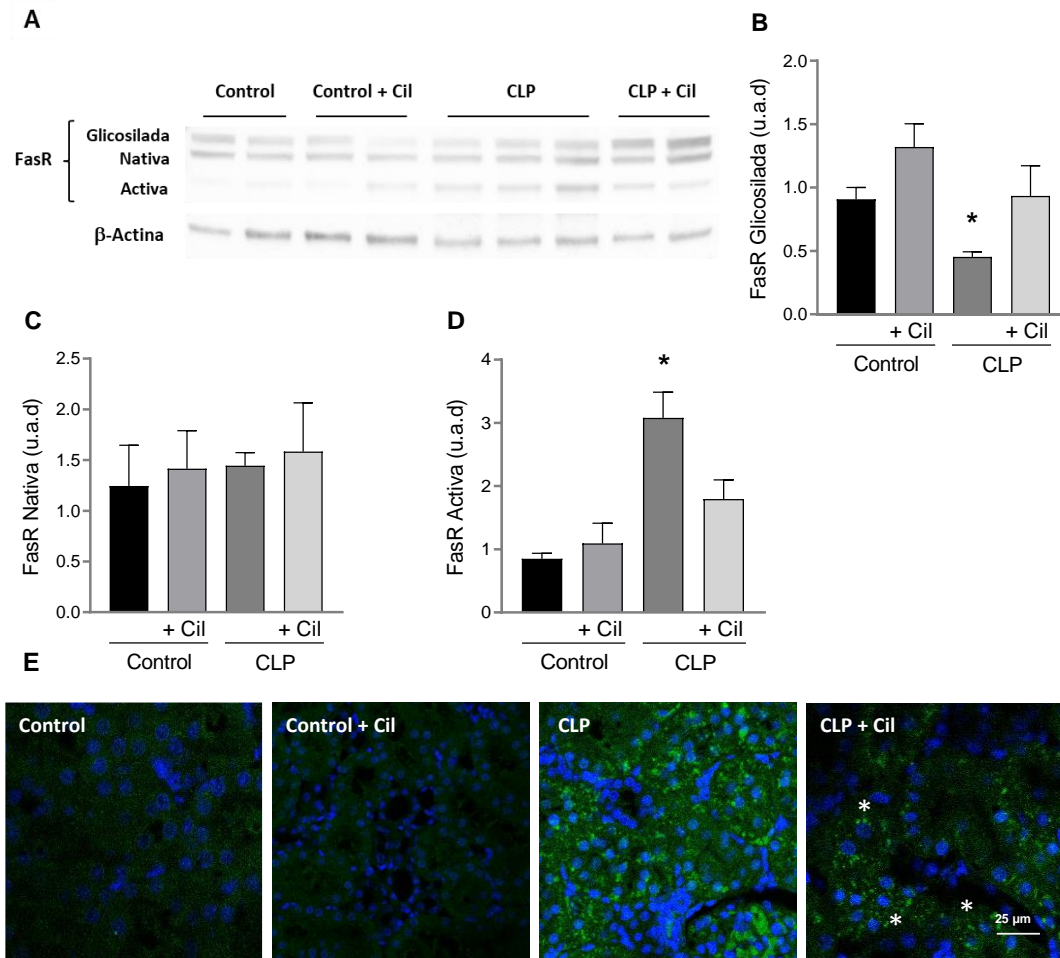
## 1.6.2 CILASTATINA BLOQUEA LA VÍA EXTRÍNSECA

### 1.6.2.1 Efecto de cilastatina sobre el complejo Fas/FasL

El receptor de muerte Fas y su ligando son elementos esenciales de la ruta extrínseca de la apoptosis. Fas se encuentra en las BDC y se expresa en la mayoría de los tejidos (abundantemente en el riñón), pudiéndose encontrar unido a la membrana plasmática o en forma soluble. Su ligando tiene dos formas también, de membrana mFasL y una forma soluble sFasL. Tras la unión Fas/FasL se reclutan niveles suficientes de caspasa-8 para llevar a la activación enzimática, se forman complejos mayores asociados a las BDC que inducen su internalización y la iniciación de la ruta de muerte.

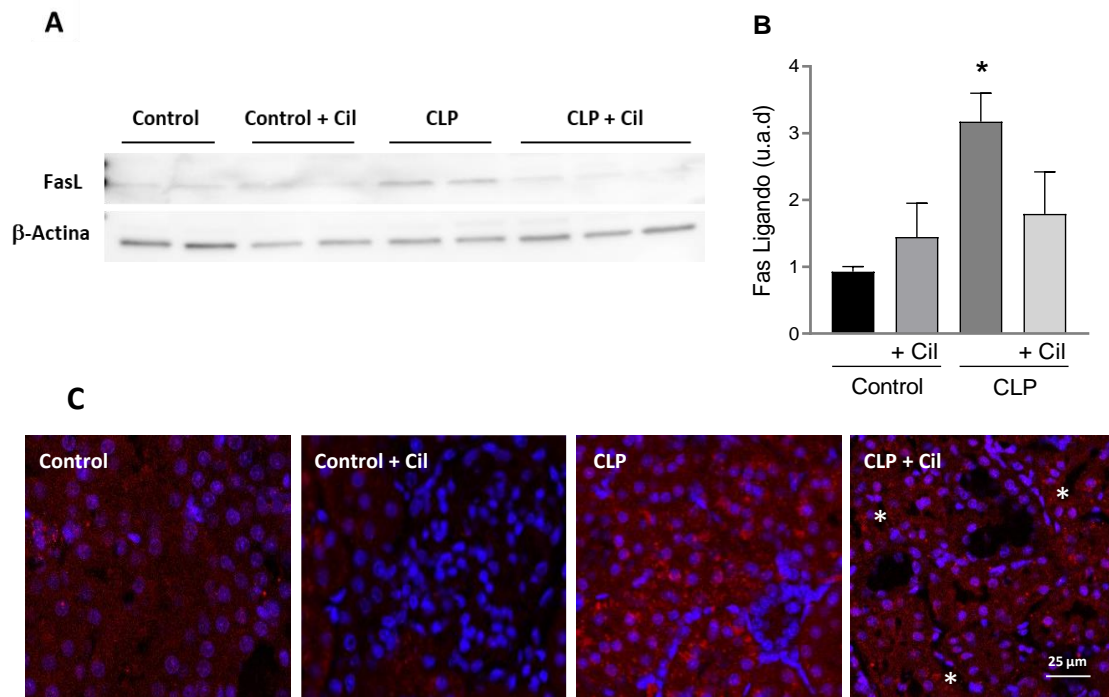
En extractos de tejido de corteza renal cuantificamos Fas mediante Western blot y como se puede observar en la **Figura 28A**, el receptor presenta tres formas de expresión que se comportan de distinta forma. En los animales sépticos la forma glicosilada aparece reducida, mientras que la activa presentan un aumento significativo con respecto al grupo control. La forma nativa permanece sin cambios en todos los grupos. El tratamiento con cilastatina restauró los niveles previamente alterados.

Para observar el patrón de expresión del receptor Fas, se realizó además una inmunolocalización mediante IFI que confirma los resultados anteriores, apareciendo a nivel citoplasmático (**Figura 28E**).



**Figura 28. Efecto de cilastatina sobre receptor Fas en tejido renal.** A) Imagen representativa de Western blot de Fas, con sus formas glicosilada, nativa, activa y  $\beta$ -Actina como control de carga. B) C) y D) Cuantificación del densitometrado del Western blot corregido por el control de carga de las tres formas. Se observa un aumento en la expresión de la fracción activa, mientras que disminuye la glicosilada en el grupo CLP respecto al grupo control. La forma nativa no se ve influida por la inducción de sepsis y el tratamiento con cilastatina. Las otras dos formas con el tratamiento volvieron parcialmente a valores del grupo control. E) Inmunolocalización mediante IFI de Fas. Tinción se ve reducida con cilastatina (asteriscos). Los resultados están expresados como media  $\pm$  EEM, n = 10 animales por grupo. \* $p \leq 0,05$  vs. todos los grupos. u.a.d: unidad arbitraria de densitometrado; Cil: cilastatina.

En el caso de FasL se puede observar en la **Figura 29B** como existe un aumento significativo de la expresión en animales CLP. El tratamiento con cilastatina redujo significativamente la síntesis de proteína. Se quiso mostrar el patrón de expresión de FasL por lo que se realizó una IFI para inmunolocalizarla apareciendo a nivel citoplasmático y de retículo en animales sépticos, mientras en los tratados con cilastatina se observó principalmente a nivel de retículo. (**Figura 29C**).

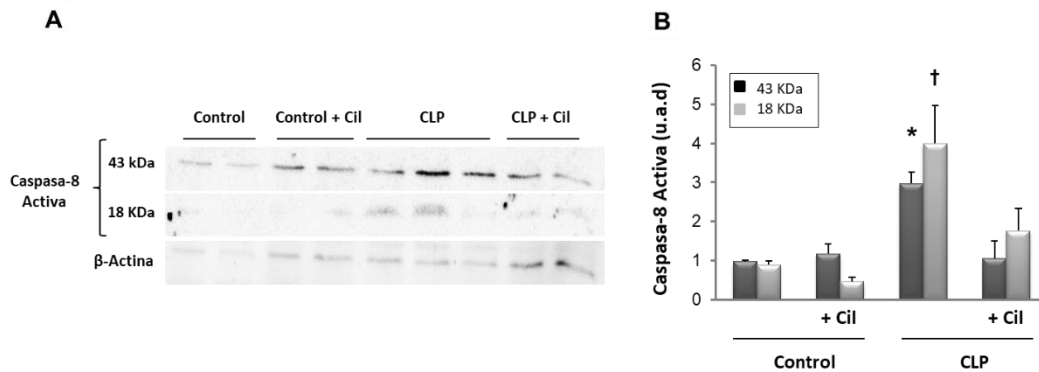


**Figura 29. Efecto de cilastatina sobre FasL en tejido renal.** A) Imagen representativa de Western blot de FasL y  $\beta$ -Actina como control de carga en corteza renal. B) Cuantificación del densitometrado del Western blot corregido por el control de carga. Se puede observar un aumento significativo en la expresión de los riñones de los animales con CLP respecto al control. Con la administración de cilastatina esos niveles se redujeron casi a valores del grupo control. C) Inmunolocalización de FasL mediante IFI. En animales CLP + Cil la tinción es mucho menor (asteriscos) que en el grupo CLP. Los resultados están expresados como media  $\pm$  EEM,  $n = 10$  animales por grupo. \* $p \leq 0,04$  vs. todos los grupos. u.a.d: unidad arbitraria de densitometrado; Cil: cilastatina.

### 1.6.2.2 Efecto de cilastatina sobre caspasa-8

La caspasa-8 actúa como iniciadora en la ruta extrínseca activando la vía de receptores de muerte como Fas al unirse su ligando. Mediante Western blot se determinaron los niveles de proteína activa en los extractos de corteza renal. Como se observa en la **Figura 30**, la caspasa-8 activa presenta dos fragmentos activos, uno a 43 KDa y otro a 18 KDa. Ambos fragmentos se incrementan significativamente con respecto al grupo control en los animales CLP, mientras que el grupo tratado con cilastatina presenta una menor síntesis de proteínas. Los resultados se confirmaron mediante la cuantificación de los densitometrados, expresados con relación al control de carga.

Cilastatina parece bloquear la ruta extrínseca de la apoptosis impidiendo la aparición de la caspasa iniciadora.

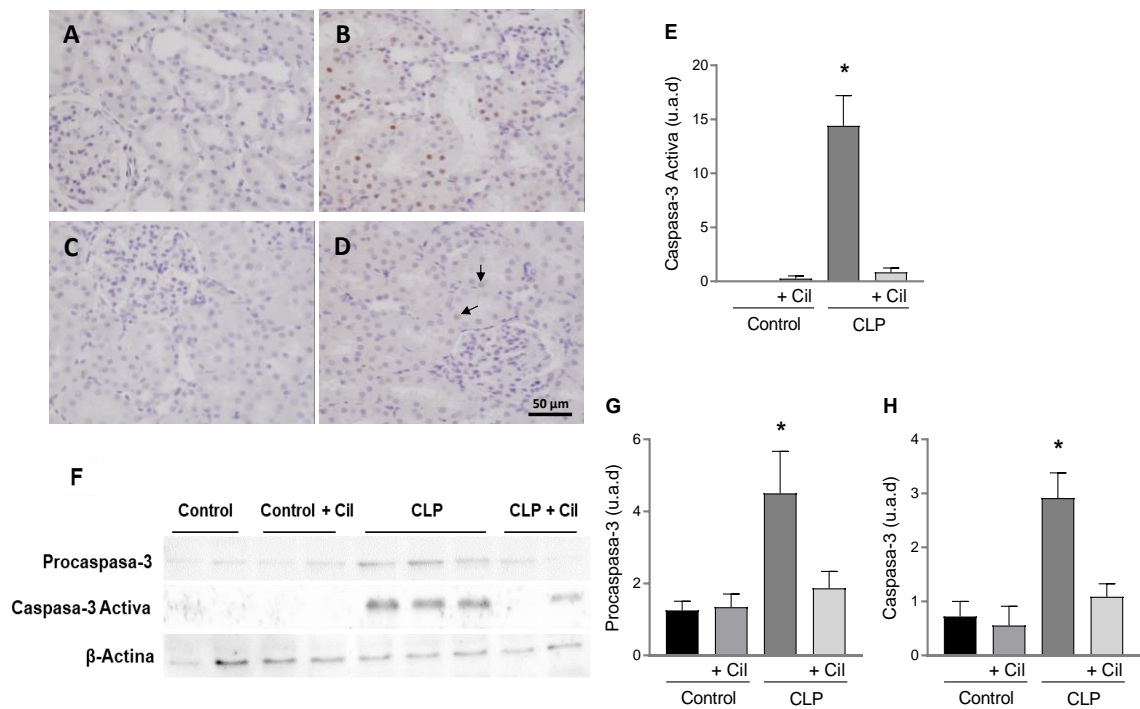


**Figura 30. Efecto de cilastatina sobre caspasa-8 activa en tejido renal.** A) Imagen representativa de Western blot de caspasa-8 activa (fragmentos 43 kDa y 18 kDa) y  $\beta$ -Actina como control de carga. B) Cuantificación del densitometrado del Western blot corregido por el control de carga. Se observa un aumento significativo de la síntesis de ambos fragmentos de proteína en animales del grupo CLP respecto al control. Los animales tratados con cilastatina mostraron una menor síntesis de proteínas, semejante al grupo control. Los resultados están expresados como media  $\pm$  EEM, n = 10 animales por grupo. \* $p \leq 0.002$ , † $p \leq 0.04$  vs. todos los grupos. u.a.d: unidad arbitraria de densitometrado; Cil: cilastatina.

### 1.6.3 EFECTO DE CILASTATINA SOBRE CASPASA-3

La caspasa-3 es la caspasa efectora final de la apoptosis, común de las dos vías tanto la intrínseca como la extrínseca. Como se ha visto hasta ahora, cilastatina es capaz de actuar impidiendo la activación de la ruta intrínseca reduciendo el ratio Bax/Bcl-2 y bloqueando caspasa-9, y la ruta extrínseca tanto a nivel del complejo Fas/FasL como de caspasa-8. Por lo tanto, quedaba determinar el nivel de síntesis y expresión de la caspasa efectora final de ambas vías. Mediante tinción en secciones de tejido renal se inmunolocalizó la proteína para ver su patrón de expresión. Como refleja la **Figura 31A-E**, caspasa-3 activa aparece de forma generalizada en los núcleos de las células del túbulo proximal de los animales sépticos. Los grupos control tienen ausencia de expresión, mientras que los animales sépticos tratados con cilastatina presentan una reducción significativa de su expresión localizada de forma discreta en núcleos aislados. En ninguno de los grupos se observa tinción glomerular.

Estudiamos también la presencia de procaspasa-3 y caspasa-3 activa mediante Western blot. En la **Figura 31F** se observa como ambas exhiben un gran incremento en los animales sépticos mientras que, tras la administración de cilastatina, esta expresión se ve reducida significativamente.

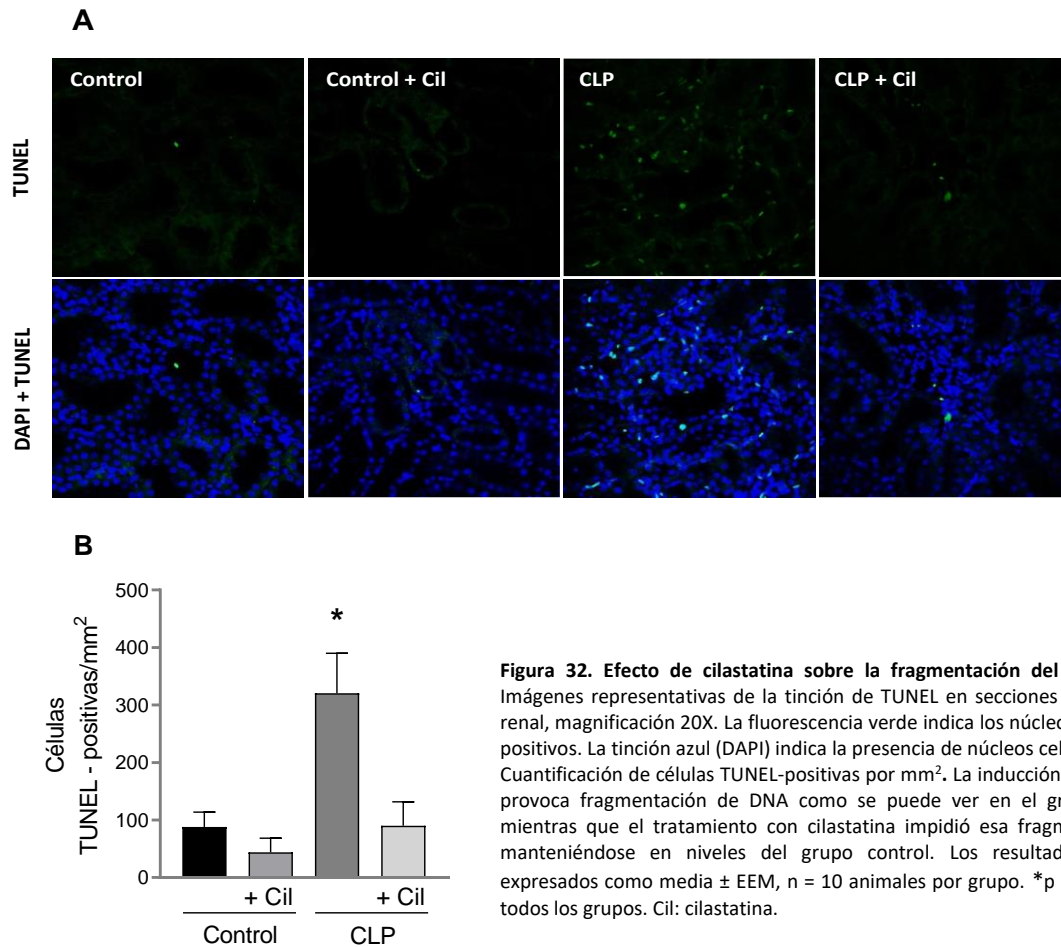


Los resultados confirman lo mostrado hasta ahora, con el bloqueo de ambas rutas apoptóticas se impide la activación de la caspasa efectora final. Por otra parte, la administración de cilastatina sola no tuvo ningún efecto sobre todos los estudios realizados.

## 1.7 CILASTATINA IMPIDE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN

Cuando se activa la caspasa-3, ésta se traslada al núcleo donde activa nucleasas que fragmentan el ADN siguiendo el proceso apoptótico. Se determinó el número de células que presentaban un ADN fragmentado mediante la técnica de TUNEL en secciones de tejido renal. En la **Figura 32** se puede observar como la inducción de sepsis provoca una gran fragmentación de ADN en las células renales. El tratamiento con cilastatina redujo significativamente esa fragmentación hasta niveles similares a los encontrados en el grupo control.

Cilastatina *per se* no afectó en modo alguno en la aparición de células TUNEL - positivas.



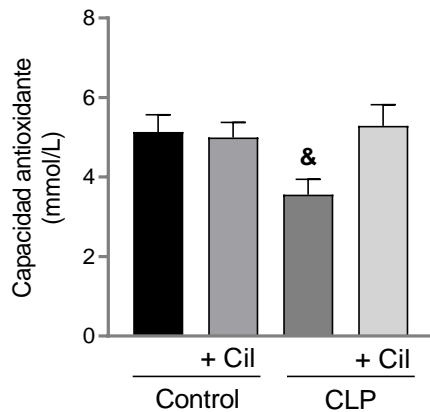
## 1.8 EFECTO DE CILASTATINA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO

Durante el proceso séptico aumenta la producción de radicales libres, tanto ROS como RNS debido a las alteraciones mitocondriales que tienen lugar. Aunque la apoptosis es un regulador de ROS, es fundamental el balance entre estos y los sistemas antioxidantes, al igual que el equilibrio entre la biosíntesis de mitocondrias y su destrucción. El riñón es el segundo órgano con más mitocondrias concentradas fundamentalmente en las células de túbulo proximal, por lo que cualquier alteración en ellas va a tener consecuencias importantes.

### 1.8.1 CILASTATINA MEJORA LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Cuando se produce una gran cantidad de radicales libres y de agentes oxidantes, el tejido renal sufre una disminución importante de la capacidad antioxidante, lo que lleva a un desajuste redox celular. Se determinó la capacidad antioxidante total en muestras de orina de

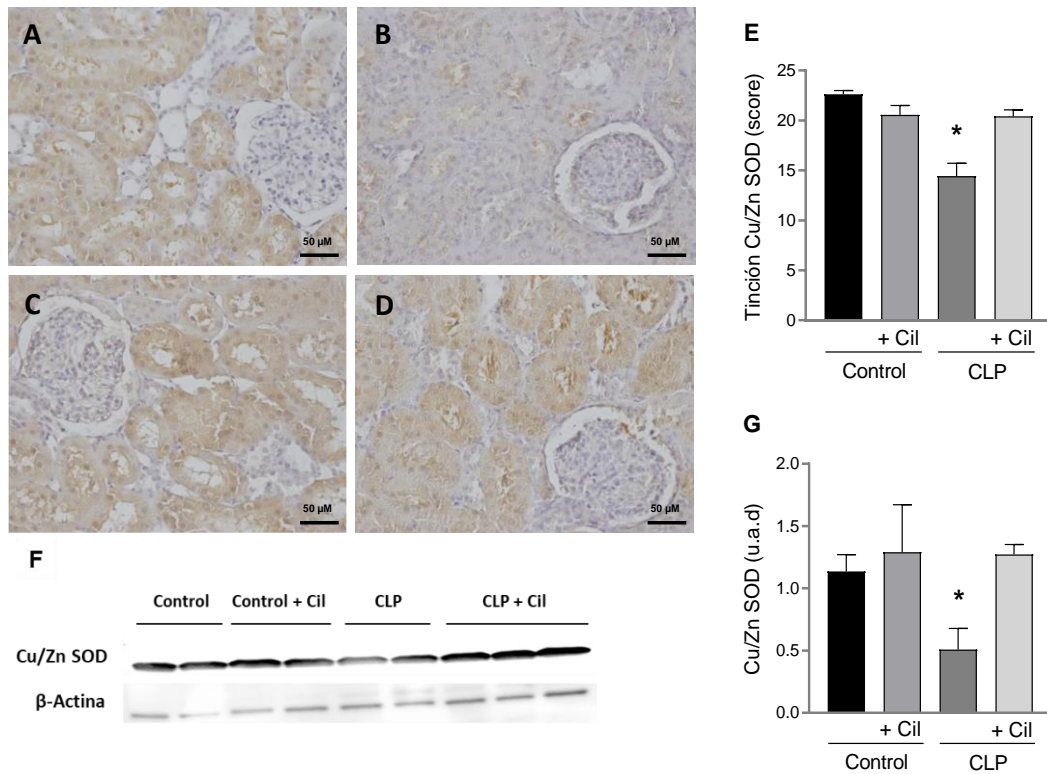
todos los animales. En la **Figura 33** se puede observar cómo los animales sépticos presentan una disminución de esa capacidad antioxidante, mientras que el grupo tratado con cilastatina recupera los niveles de manera significativa.



**Figura 33. Medida de la capacidad antioxidante.** Esta valoración se realizó en muestras de orina. Se observa como los animales del grupo CLP presentan una reducción significativa de la capacidad antioxidante, que se recupera cuando se administra el tratamiento con cilastatina. Los resultados están expresados como media  $\pm$  EEM, n = 10 animales por grupo. &p  $\leq$  0.02 vs. todos los grupos. Cil: cilastatina.

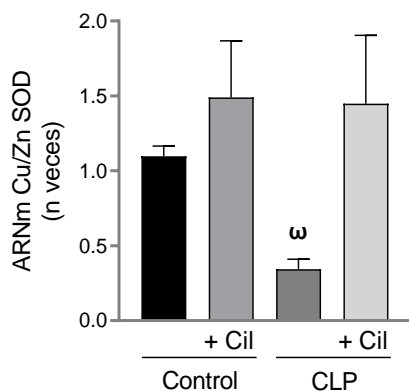
### 1.8.2 CILASTATINA IMPIDE LA DISMINUCIÓN DE LA ENZIMA Cu/Zn SOD

La enzima Cu/Zn SOD es quizás la enzima más importante del sistema antioxidante del organismo. Se encarga de transformar el  $O_2^-$  en oxígeno y  $H_2O_2$ . Valoramos su expresión a varios niveles mediante tinción inmunohistoquímica y en extractos de corteza renal mediante Western blot. Como se puede ver en la **Figura 34**, en los animales sépticos hay una reducción drástica de la enzima con respecto al grupo control, tal y como habíamos observado anteriormente en la capacidad antioxidante. La expresión parece ser predominante del túbulo proximal y apenas aparece en el glomérulo (**A-E**). El grupo CLP más cilastatina presenta una recuperación significativa de los niveles de la enzima. Esto fue corroborado mediante Western blot donde también existe una reducción en la síntesis con respecto al control, que se recupera totalmente con el tratamiento con cilastatina (**F-G**).



**Figura 34. Determinación de la enzima Cu/Zn SOD en tejido renal.** Imágenes representativas de inmunolocalización de la enzima Cu/Zn SOD: **A)** Control, **B)** CLP, **C)** Control + Cil y **D)** CLP +Cil. Magnificación 20X. **E)** Cuantificación de la inmunolocalización. **F)** Imagen representativa del Western blot de Cu/Zn SOD y  $\beta$ -Actina como control de carga. **G)** Cuantificación del densitometrado del Western blot corregido por su control de carga. Se observa como los animales del grupo CLP presentan una reducción significativa en la síntesis de proteína, que se recupera hasta niveles encontrados en el grupo control cuando se administra el tratamiento con cilastatina. Los resultados están expresados como media  $\pm$  EEM, n = 10 animales por grupo. \* $p \leq 0.04$  vs. todos los grupos. u.a.d: unidad arbitraria de densitometrado; Cil: cilastatina.

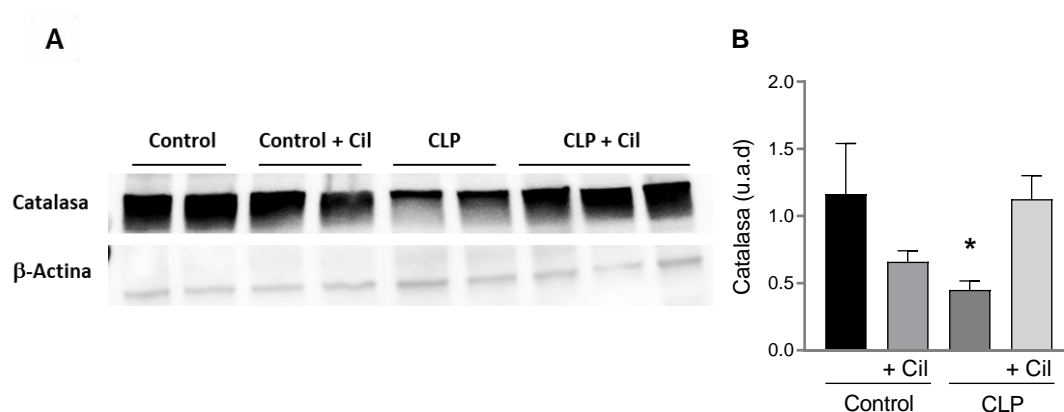
Para determinar si había modificaciones a nivel de ARN mensajero, se realizó una RT-PCR y se comprobó que había una disminución con respecto al control y una recuperación en los animales tratados con cilastatina (**Figura 35**).



**Figura 35. Determinación del ARNm de la enzima Cu/Zn SOD en tejido renal.** Determinación del ARNm mediante RT-PCR. Se observa como los animales del grupo CLP presentan una reducción significativa en la síntesis de ARNm, que se recupera cuando se administra el tratamiento con cilastatina. Los resultados están expresados como media  $\pm$  EEM, n = 10 animales por grupo. \* $p \leq 0.04$  vs. todos los grupos (ANOVA). Cil: cilastatina

### 1.8.3 CILASTATINA MEJORA LA SÍNTESIS DE CATALASA

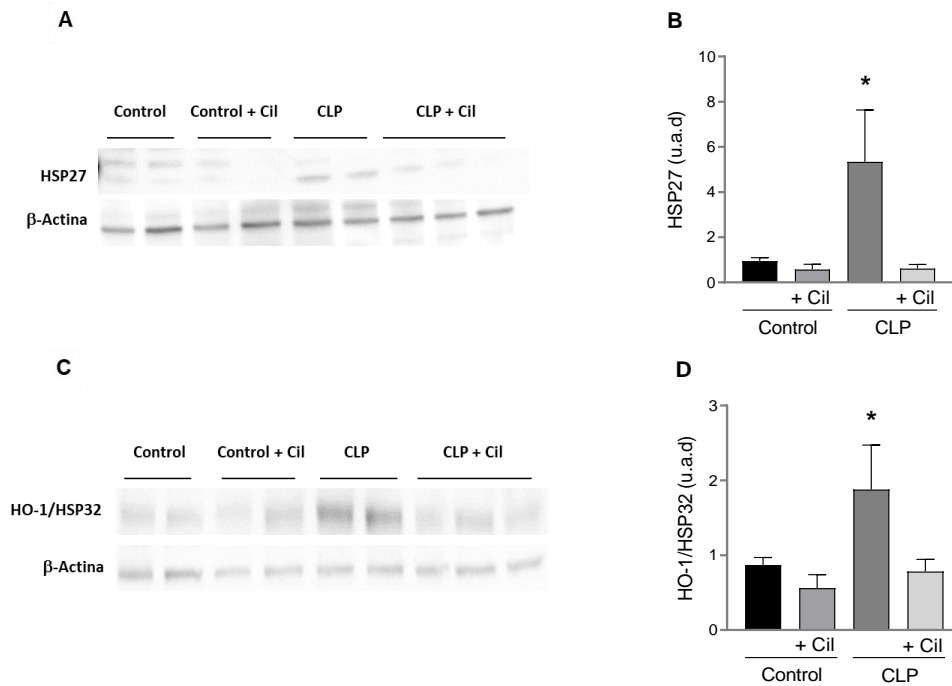
La catalasa junto con la Cu/Zn SOD es una de las proteínas antioxidantes más importantes. Tiene como función catalizar la conversión del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (producto obtenido a través de la SOD) en agua y oxígeno. Para determinar su comportamiento se cuantificaron los niveles de proteína en extractos de corteza renal mediante Western blot. En la **Figura 36** se muestra como en el grupo CLP los animales presentan una reducción significativa de la síntesis de proteína. Los animales tratados con cilastatina recuperan totalmente los niveles de catalasa de forma similar a los encontrados en el grupo control. Estos resultados confirman que cilastatina es capaz de proteger las células renales frente a la oxidación.



**Figura 36. Determinación de catalasa en tejido renal.** A) Imagen representativa de Western blot de catalasa y  $\beta$ -Actina como control de carga. B) Cuantificación del densitometrado del Western blot de catalasa corregido por su control de carga. Se observa como los animales del grupo CLP presentan una reducción en la síntesis de proteína, que se recupera significativamente cuando se administra el tratamiento con cilastatina. Los resultados están expresados como media  $\pm$  EEM, n = 10 animales por grupo. \* $p \leq 0.02$  vs. Control y CLP + Cil. u.a.d: unidad arbitraria de densitometrado; Cil: cilastatina.

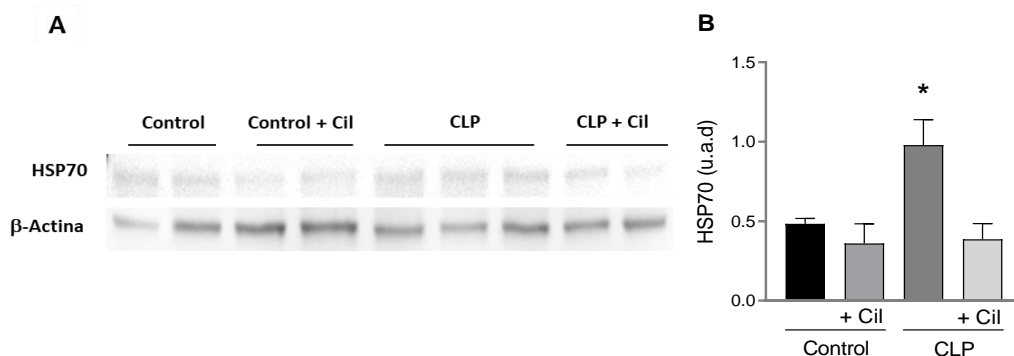
### 1.8.4 EFECTO DE CILASTATINA EN LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO

La síntesis de las proteínas de choque térmico o HSPs se induce en situaciones de estrés y protegen las estructuras celulares de cambios irreversibles que afectan a su funcionamiento. Se sabe que un aumento en la expresión de estas proteínas como la HSP27 o HSP32/HO-1, están relacionadas con el daño endotóxico y tienden a prevenir el EO. Además, la HSP32/HO-1 es una enzima antioxidante clave en la degradación del grupo hemo que es un fuerte inductor de ROS. Mediante Western blot observamos que los animales del grupo CLP sufren un aumento del nivel de ambas proteínas con respecto al grupo control (**Figura 37**). El tratamiento con cilastatina disminuyó significativamente la expresión de ambas hasta valores similares a los encontrados en el grupo control.



**Figura 37. Efecto de cilastatina sobre las proteínas de choque térmico en tejido renal.** **A)** y **C)** Imágenes representativas de Western blot de HSP27 y HSP32 respectivamente, con  $\beta$ -Actina como control de carga. **B)** y **D)** Cuantificaciones del densitometrado del Western blot de HSP27 y HSP32 corregido por su control de carga. Se observa como los animales del grupo CLP presentan un gran incremento en la síntesis de ambas proteínas que se recuperan significativamente cuando se administra el tratamiento con cilastatina. Los resultados están expresados como media  $\pm$  EEM,  $n = 10$  animales por grupo. \* $p \leq 0.03$  vs. todos los grupos. u.a.d: unidad arbitraria de densitometrado; Cil: cilastatina.

Otra HSP importante implicada es la HSP70. Durante la sepsis esta proteína es transportada hacia la membrana plasmática y actúa como ligando o alarmina de TLR4, activando otras vías de señalización implicadas en la eliminación de patógenos y la activación de la inflamación. Se valoró su expresión a nivel de proteína mediante Western blot en corteza renal. En la **Figura 38** se observa un incremento significativo en los animales sépticos con respecto al grupo control. El tratamiento con cilastatina fue capaz de revertir esta situación de manera significativa.



**Figura 38. Efecto de cilastatina sobre HSP70 en tejido renal.** **A)** Imagen representativa de Western blot de HSP70 y  $\beta$ -Actina como control de carga. **B)** Cuantificación del densitometrado del Western blot de HSP70 corregido por su control de carga. Se observa como los animales del grupo CLP presentan un incremento significativo en la síntesis de proteína que se recupera a nivel del grupo control cuando se administra cilastatina. Los resultados están expresados como media  $\pm$  EEM,  $n = 10$  animales por grupo. \* $p \leq 0.03$  vs. todos los grupos. u.a.d: unidad arbitraria de densitometrado; Cil: cilastatina.

### 1.8.5 CILASTATINA REDUCE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

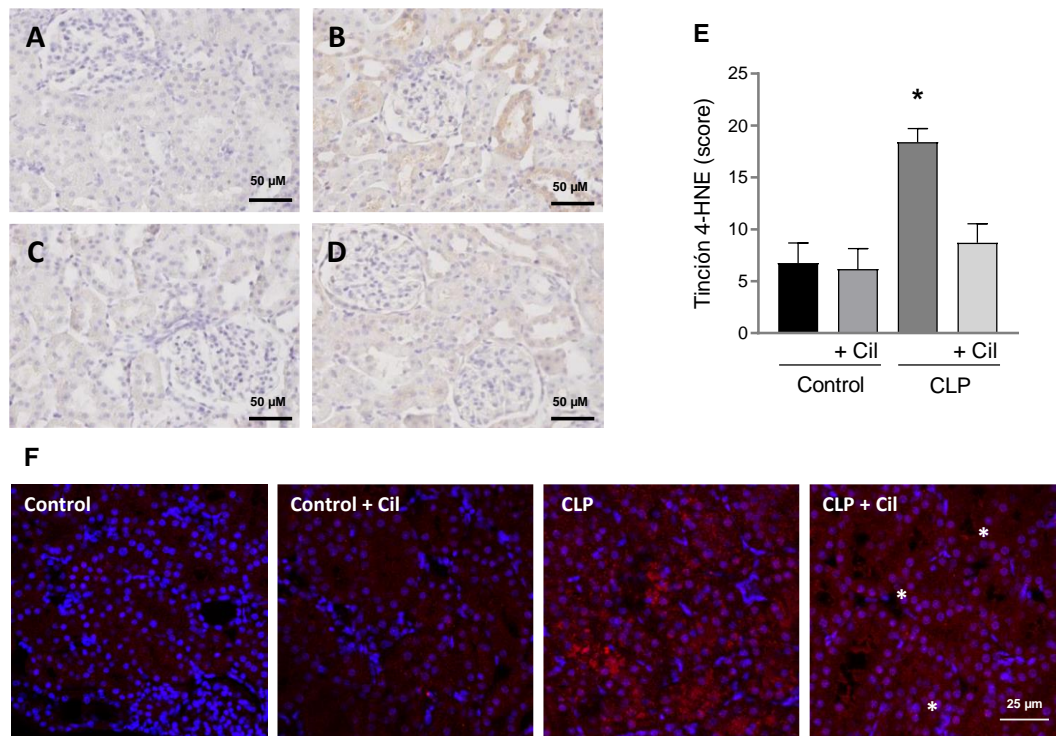
La degradación oxidativa de los lípidos es el proceso por el cual un radical libre captura electrones de los lípidos de la membrana plasmática, dando lugar a un ácido graso radical que reacciona a su vez con otro lípido de la membrana desencadenando una reacción en cadena. Este proceso ocurre como consecuencia del EO que tiene lugar, y sus productos finales generan un daño en la membrana celular pudiendo ser potencialmente mutagénico y carcinogénico.

#### 1.8.5.1 Cilastatina reduce la aparición de 4-HNE y MDA

El 4-HNE es un producto que resulta de la descomposición de peróxidos derivados de ácidos grasos poliinsaturados y ésteres, siendo un buen indicador de la existencia de peroxidación lipídica. Al igual que el 4-HNE, el MDA es un metabolito secundario del proceso de peroxidación por lo que se utiliza también para establecer la existencia de EO en el tejido.

Para determinar la presencia de 4-HNE y MDA en secciones de tejido renal, utilizamos las técnicas de inmunohistoquímica e IFI respectivamente. Como se puede observar en la **Figura 39A-E**, el grupo CLP presenta un aumento significativo en la expresión de 4-HNE con respecto al control. Parece tener un patrón citoplasmático y no se observa tinción glomerular. El tratamiento con cilastatina reduce la aparición de este metabolito de manera significativa. Igualmente, la expresión de MDA también se incrementa en los animales sépticos (**Figura 39F**) y parece concentrarse a nivel de citoplasmático. Su aparición también se ve reducida con el tratamiento con cilastatina.

Cilastatina sola no influyó en ninguno de los parámetros estudiados hasta ahora, tanto a nivel de EO como de peroxidación lipídica



**Figura 39. Efecto de cilastatina en la peroxidación lipídica.** Imagen representativa de la inmunolocalización de 4-HNE: **A)** Control, **B)** CLP, **C)** Control + Cil y **D)** CLP + Cil, magnificación 20X. **E)** Cuantificación de la expresión de 4-HNE. **F)** Inmunofluorescencia de MDA. Se observa como los animales del grupo CLP presentan un incremento significativo en la síntesis de 4-HNE, que se reduce totalmente con el tratamiento con cilastatina. La expresión de MDA también aumenta en el grupo CLP que disminuye en el grupo CLP + Cil (asteriscos). Los resultados están expresados como media  $\pm$  EEM, n = 10 animales por grupo). \* $p < 0.0002$  vs. todos los grupos. Cil: cilastatina.

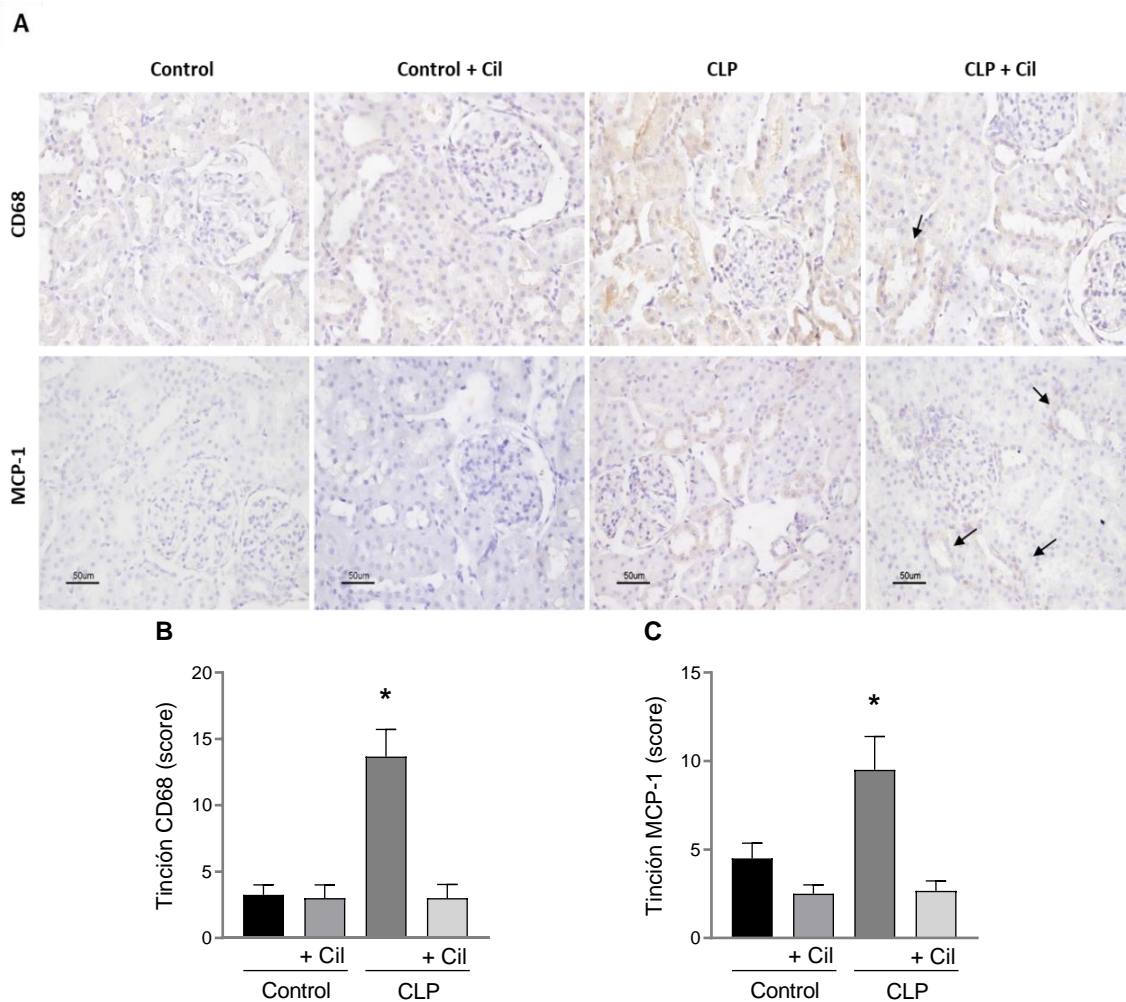
## 1.9 EFECTO DE CILASTATINA SOBRE LA INFLAMACIÓN

### 1.9.1 CILASTATINA DISMINUYE LA INFILTRACIÓN DE MACRÓFAGOS

La inflamación es un proceso clave en la sepsis. El tejido renal se ve afectado por una infiltración leucocitaria, concretamente por monocitos que se diferencian a macrófagos cuando llegan al tejido. Se encargan de destruir microorganismos y células muertas que se forman en el proceso inflamatorio, además de estimular la acción de otras células inmunes. Es el principal productor de citoquinas y al activarse ya sea por patógenos u otras citoquinas, libera otras como la IL-1 y TNF $\alpha$ . Se caracterizan por presentar un marcador de superficie, el CD68. Para comprobar cómo afecta el proceso séptico a la inflamación renal y el efecto que tiene cilastatina sobre ella, se realizó una inmunolocalización de CD68 sobre secciones de tejido renal. Como se observa en la **Figura 40A y B**, existe un incremento de la infiltración celular en el grupo CLP si lo comparamos con el grupo control. El grupo tratado con cilastatina sufre una reducción significativa de esa infiltración.

También se determinaron los niveles de expresión de la proteína MCP-1, que está implicada en la migración y reclutamiento de leucocitos (sobre todo de monocitos) al foco de la

respuesta inflamatoria. En la **Figura 40A y C** observamos como existe un aumento en la expresión de esta citoquina en el grupo CLP y una disminución importante en el grupo tratado con cilastatina.

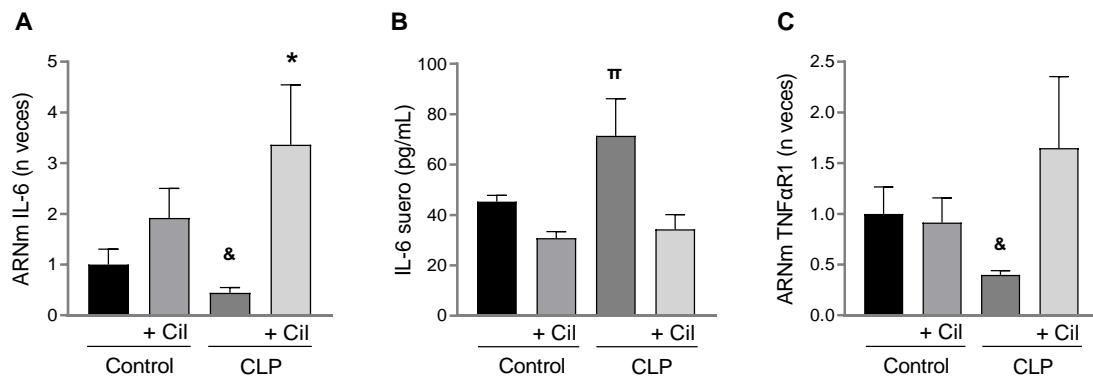


**Figura 40. Efecto de cilastatina en el infiltrado leucocitario. A)** Imágenes representativas de las inmunolocalizaciones de CD68 y MCP-1. **B)** Score de cuantificación de CD68 y **C)** Score de cuantificación de MCP-1, magnificación 20X. Se observa que el grupo CLP presenta un incremento de la infiltración celular, que se reduce cuando se administra el tratamiento con cilastatina (flechas). Los resultados están expresados como media  $\pm$  EEM, n = 10 animales por grupo. \* $p \leq 0.02$  vs. todos los grupos. Cil: cilastatina.

### 1.9.2 EFECTO DE CILASTATINA SOBRE CITOQUINAS INFLAMATORIAS

Como se ha comentado anteriormente, durante el proceso inflamatorio las células inmunes liberan a la circulación una serie de citoquinas como  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6 o IL-1, entre otras muchas. Determinamos los niveles de dos de las más importantes como son la IL-6 y el receptor  $\text{TNF}\alpha\text{R1}$ , mediante técnicas de RT-PCR y kit comercial de medida en suero de animales. Como se muestra en la **Figura 41**, la IL-6 a nivel de ARN mensajero presenta una reducción en los niveles de expresión que contrasta con el aumento de proteína en suero en el grupo de animales CLP,

mientras que en el grupo tratado con cilastatina se revierten de manera significativa. El receptor a nivel de ARNm experimenta una reducción en su expresión, que se recupera con el tratamiento (Figura 41C).

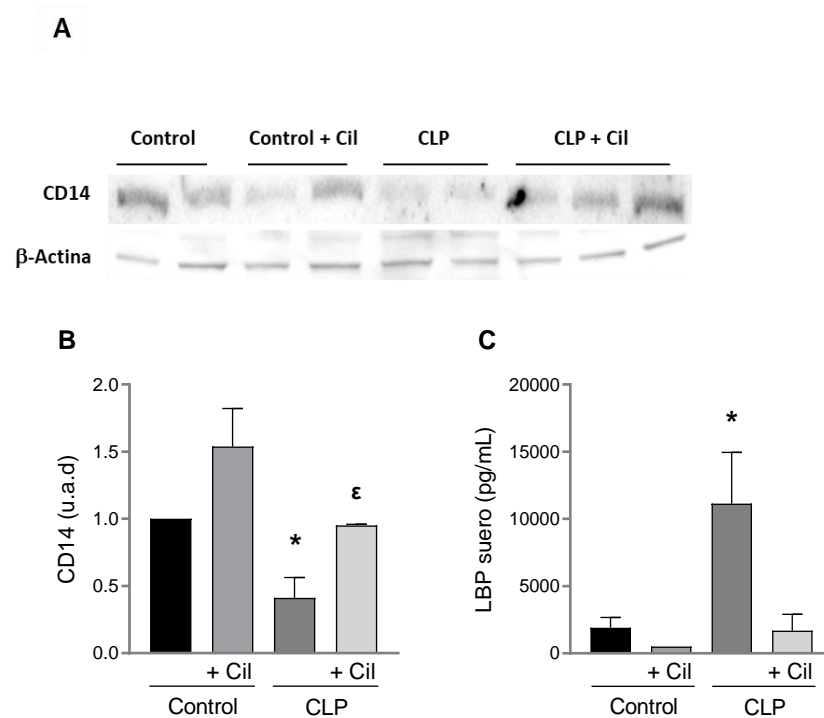


**Figura 41. Efecto de cilastatina sobre citoquinas inflamatorias. A)** ARNm de IL-6 determinado mediante RT-PCR. **B)** Medida en suero de IL-6. **C)** ARNm de TNFαR1 determinado mediante RT-PCR. El grupo CLP reduce la síntesis de mensajero de IL-6 y experimenta un aumento significativo de la proteína en suero. Asimismo, el mensajero del receptor también reduce su síntesis. El tratamiento con cilastatina revierte totalmente los valores alterados de ambas moléculas. Los resultados están expresados como media ± EEM, n = 10 animales por grupo. &p ≤ 0.004 vs. CLP + Cil; \*p ≤ 0.03 vs. Control; πp ≤ 0.02 vs. todos los grupos. Cil: cilastatina.

### 1.9.3 EFECTO DE CILASTATINA SOBRE EL EJE TLR/MyD88

#### 1.9.3.1 Cilastatina bloquea la unión LBP-LPS/CD14

Durante la sepsis se producen PAMPs como el LPS y DAMPs como el HSP70, que al unirse a sus PRR activan la cascada de señalización que va a dar lugar a la síntesis de una serie de factores que van a amplificar el daño inflamatorio. Para que tenga lugar la unión del LPS a su receptor son fundamentales dos proteínas: el LBP o proteína de unión al LPS y el CD14 (correceptor del TLR4), que se encarga de presentarlo al TLR4 y aumenta la afinidad de la unión. Para determinar cómo se comportan dichas proteínas durante la sepsis, se estudiaron los niveles en suero del LBP y se cuantificó el nivel de proteína en extractos de corteza renal. En la Figura 42, se puede observar cómo el nivel de CD14 disminuye en el grupo CLP. El tratamiento con cilastatina aumentó sus niveles a valores similares a los observados en el grupo control. El LBP también sufrió un gran incremento que se redujo significativamente con el tratamiento con cilastatina (Figura 42C).

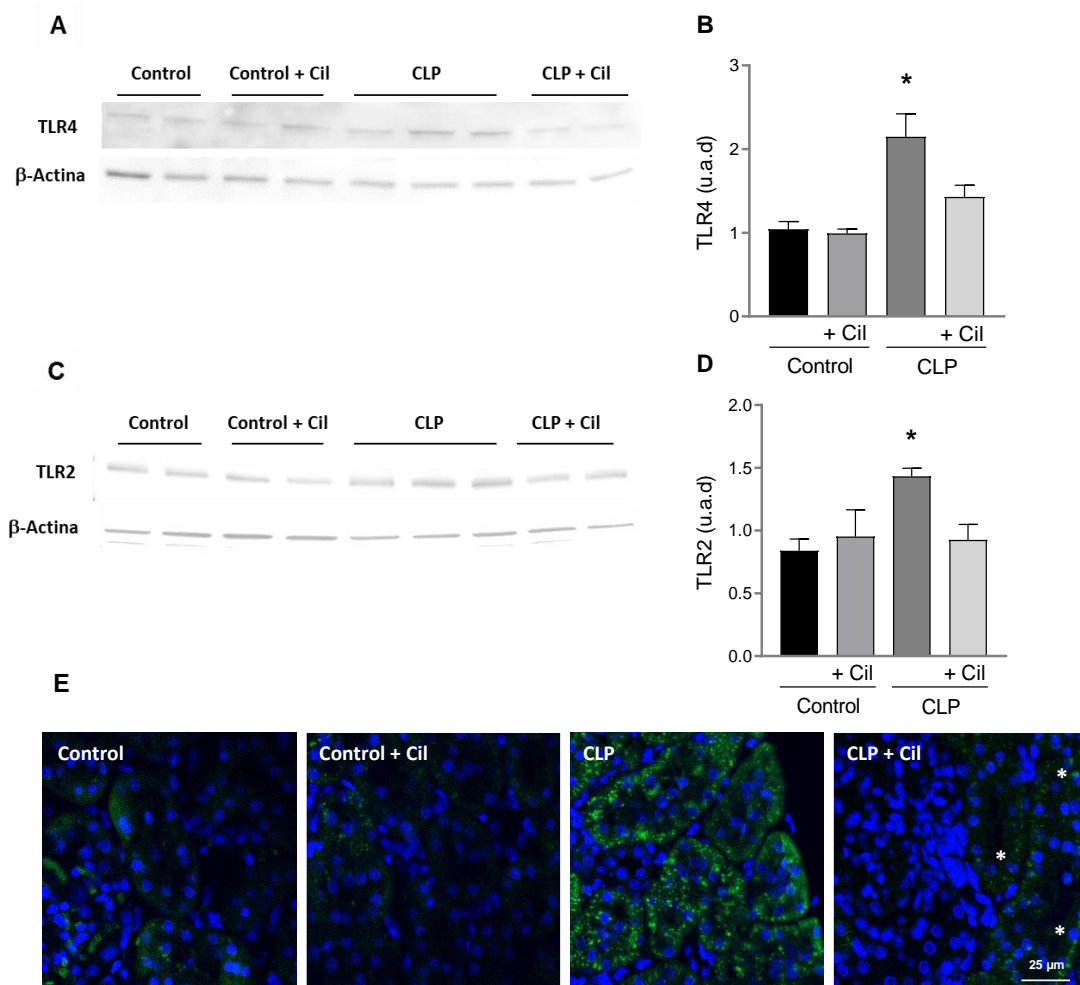


**Figura 42. Determinación de CD14 y LBP.** **A)** Imagen representativa de Western blot de CD14 y  $\beta$ -Actina como control de carga. **B)** Cuantificación del densitometrado del Western blot de CD14 corregido por su control de carga. **C)** Medida en suero de LBP. Se observa como los animales del grupo CLP presentan un incremento significativo de LBP y una disminución del CD14, que son totalmente revertidos a nivel del grupo control cuando se administra cilastatina. Los resultados están expresados como media  $\pm$  EEM,  $n = 10$  animales por grupo. \* $p \leq 0.03$  vs. todos los grupos;  $\epsilon p \leq 0.04$  vs. Control + Cil. u.a.d: unidad arbitraria de densitometrado; Cil: cilastatina.

### 1.9.3.2 Cilastatina bloquea la activación de TLR4 Y TLR2

Ambos receptores tipo *Toll-like receptor*, son PRR de membrana que son activados cuando se unen a sus respectivos ligandos. Se expresan en PTEC y tienen un papel clave en la sepsis polimicrobiana. Por este motivo, se determinó su expresión cuantificando los niveles de ambas proteínas en corteza renal mediante Western blot. Los dos receptores mostraron un aumento significativo en los grupos sépticos en comparación con el grupo control (**Figura 43**). Todos los cambios inducidos por la sepsis fueron restaurados de manera significativa con el tratamiento con cilastatina.

En la **Figura 43E** observamos la localización mediante IFI del receptor TLR4. Los animales sépticos presentan un incremento de la tinción con respecto al grupo control, presentando un patrón de expresión citoplasmático, corroborando los resultados obtenidos por Western blot. Cilastatina es capaz de disminuir esa expresión de forma evidente.

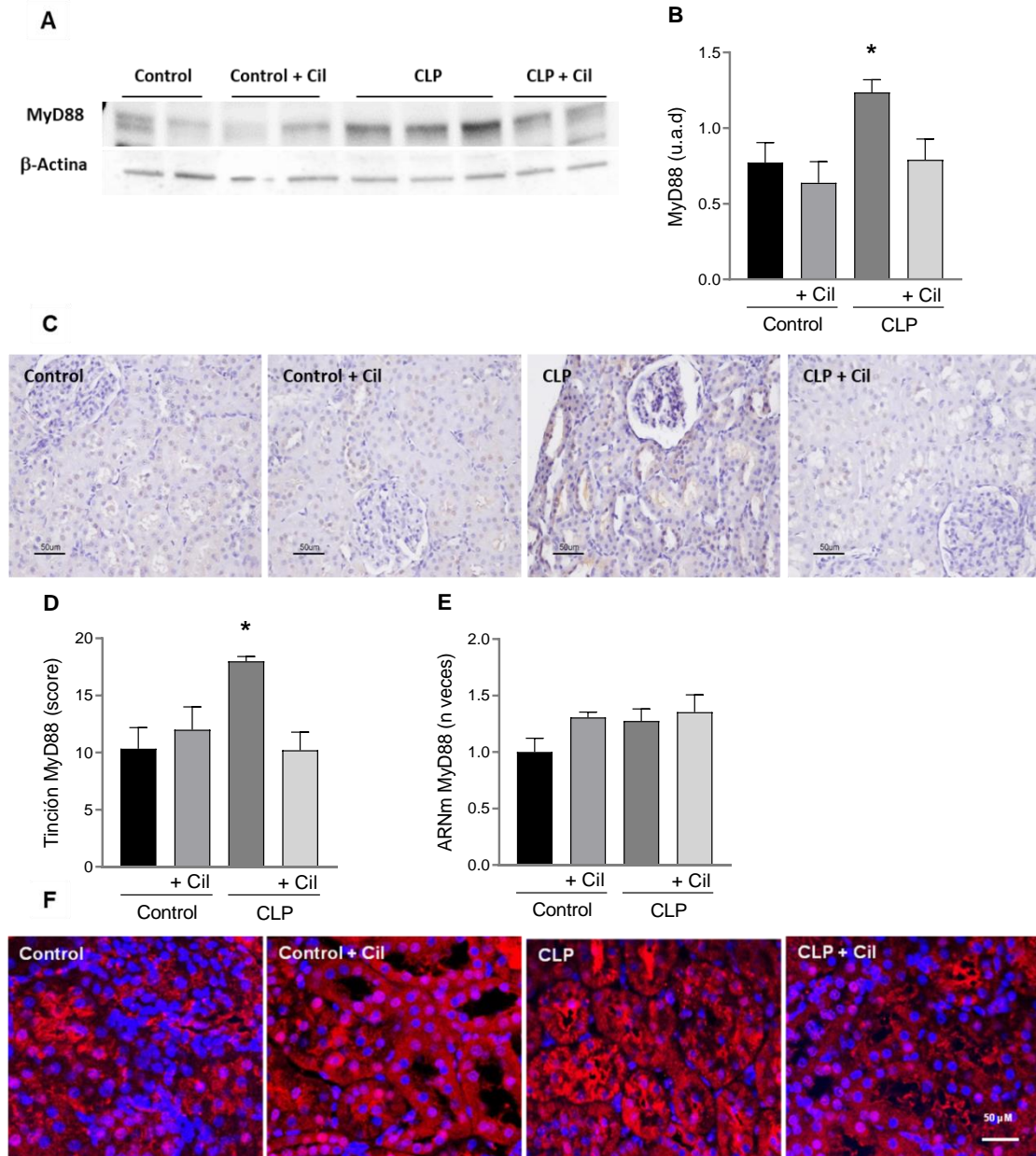


**Figura 43. Determinación de la expresión de TLR4 y TLR2.** A) Imagen representativa de Western blot de TLR4 y C) TLR2. B) Cuantificación del densitometrado del Western blot de TLR4 y D) TLR2, corregidos por su control de carga β-Actina. E) Immunolocalización de TLR4 mediante IFI. Se observa como el grupo CLP presenta un incremento significativo de ambos TLRs, que se recuperan cuando se administra el tratamiento con cilastatina. La tinción es reducida con la administración de cilastatina (asteriscos). Los resultados están expresados como media ± EEM, n = 10 animales por grupo. \*p ≤ 0.04 vs. todos los grupos. u.a.d: unidad arbitraria de densitometrado; Cil: cilastatina.

### 1.9.3.3 Efecto de cilastatina sobre MyD88

La proteína acopladora MyD88 es la pieza central de la activación de la ruta dependiente de los TLRs. Aparece junto a todos los receptores (salvo TLR3) por lo que si hay alguna alteración en un receptor la activación podría darse por otras vías. Además, a través de TLR4 hay dos rutas de activación una dependiente de MyD88 y otra independiente. Si es mediante TLR2, es dependiente de MyD88. Se determinó la expresión de esta proteína acopladora mediante inmunolocalización en secciones de tejido renal y la cuantificación tanto a nivel de proteína como de ARNm (Figura 44). Además, se realizó una IFI para observar su patrón de expresión y parece que en el grupo control es mayoritariamente nuclear, mientras que en sepsis pasa a ser citoplasmático. (Figura 44F). En el grupo CLP se observó un aumento de

proteína con respecto a los demás grupos, pero a nivel de ARNm parece que se mantiene sin cambios, por lo que su incremento parece ser postranscripcional tras la inducción de la sepsis.

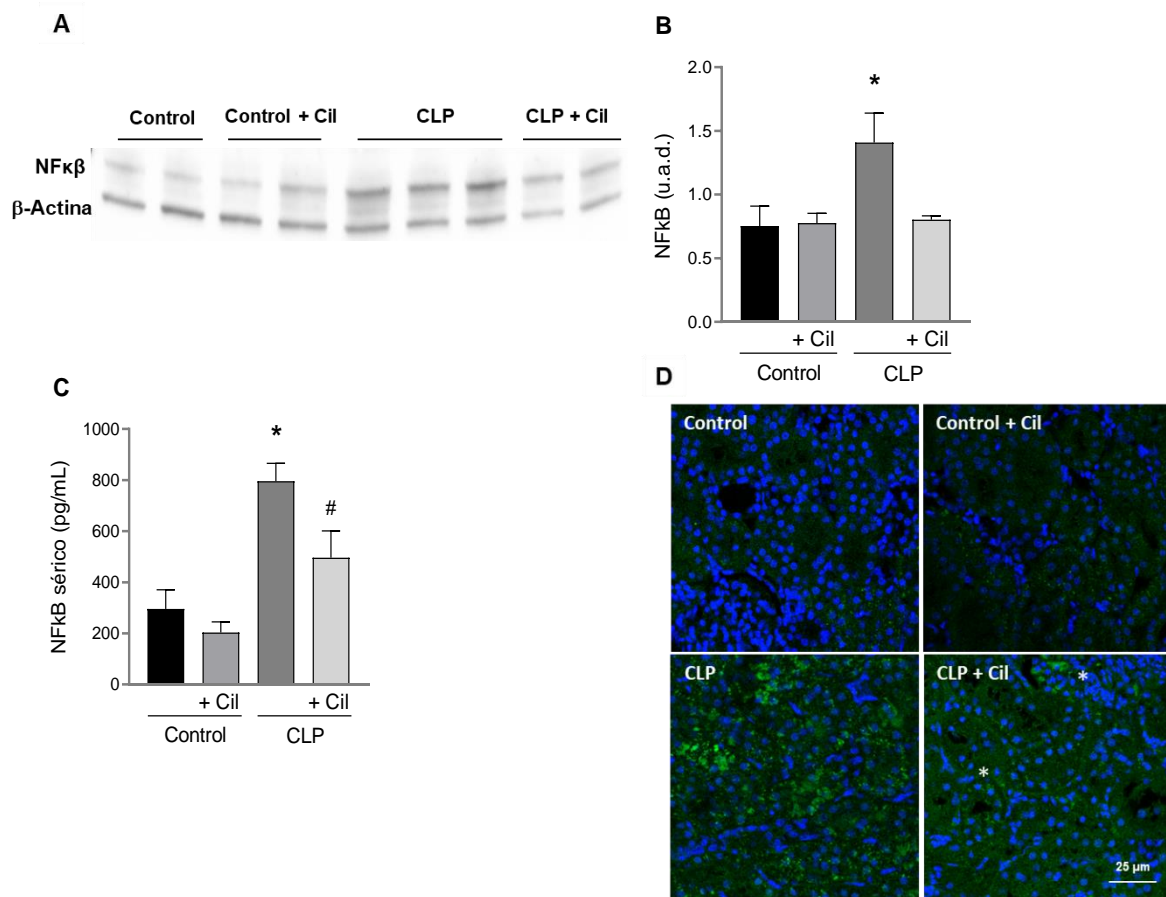


**Figura 44. Efecto de cilastatina en la activación de MyD88.** **A)** Imagen representativa de Western blot de MyD88. **B)** Cuantificación del densitometrado del Western blot de MyD88 corregido por su control de carga,  $\beta$ -Actina. **C)** Imágenes representativas de la inmunohistoquímica de MyD88, magnificación 20X y **D)** Score de cuantificación de su tinción inmunohistoquímica. **E)** Determinación del ARNm de MyD88 mediante RT-PCR. **E)** Inmunolocalización mediante IFI de MyD88. Se observa como el grupo CLP presenta un incremento significativo del nivel de proteína mientras que a nivel de mensajero no existe cambio en ningún grupo. El tratamiento con cilastatina revierte los parámetros hasta niveles del grupo control. Los resultados están expresados como media  $\pm$  EEM, n = 10 animales por grupo. \* $p \leq 0.03$  vs. todos los grupos. u.a.d: unidad arbitraria de densitometrado; Cil: cilastatina.

### 1.9.4 CILASTATINA REDUCE LA EXPRESIÓN DE NFκB

El factor de transcripción NFκB participa activamente en el desarrollo de numerosas patologías, fundamentalmente las que cursan con un componente inflamatorio<sup>180,181</sup>. Una vez activadas las vías de señalización a través de los TLRs, este factor de transcripción es sintetizado y liberado siendo clave para la activación de otros procesos que potencian el daño inflamatorio. Para determinar sus niveles de activación cuantificamos el nivel de proteína en corteza renal mediante Western blot y en suero mediante kit comercial. Como se muestra en la **Figura 45**, tanto a nivel proteico como sérico, en el grupo CLP se incrementan ambos valores. La administración de cilastatina reduce sus niveles de manera significativa.

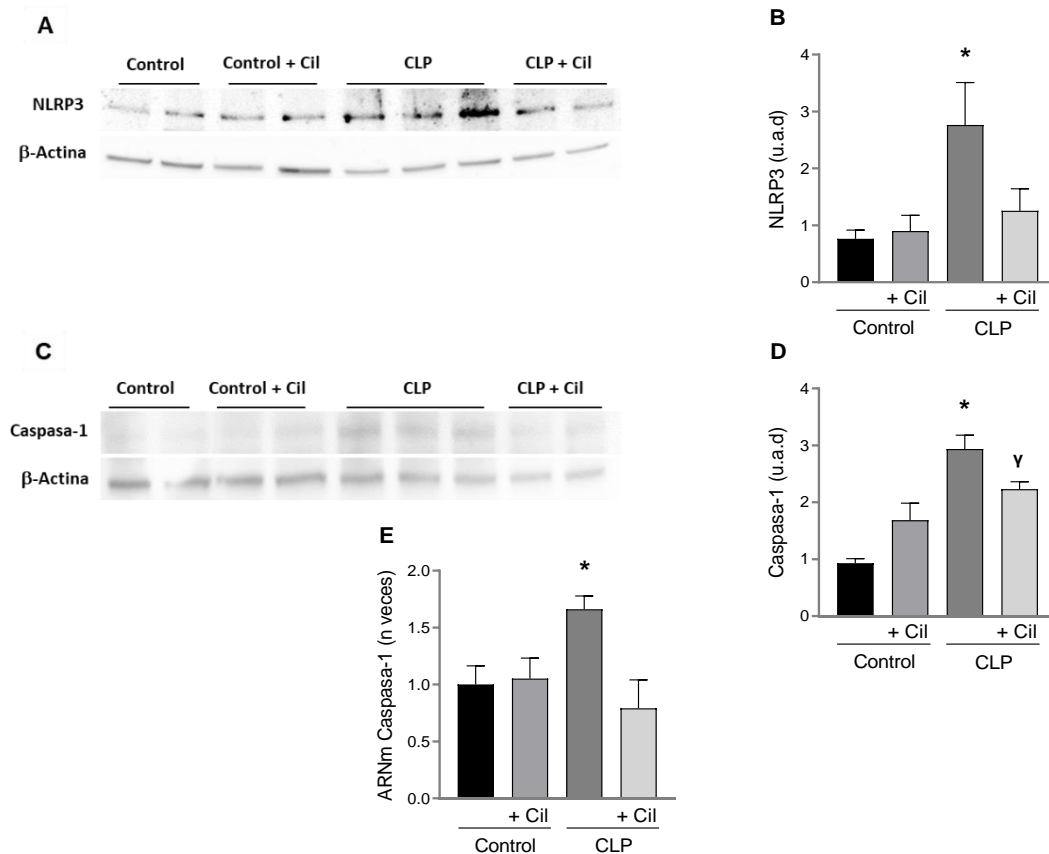
Para ver su patrón de expresión durante la sepsis, se realizó una IFI (**Figura 45D**). Los animales sépticos presentan un claro aumento de tinción y cilastatina lo reduce corroborando los resultados anteriores.



**Figura 45. Efecto de cilastatina en la activación de NFκB.** **A)** Imagen representativa de Western blot de NFκB. **B)** Cuantificación del densitometrado del Western blot de NFκB corregido por su control de carga, β-Actina. **C)** Medida en suero de NFκB. Se observa como el grupo CLP presenta un incremento significativo de NFκB. Los valores se recuperan casi a valores del grupo control cuando se administra el tratamiento con cilastatina. **D)** Inmunolocalización mediante IFI de NFκB. Los animales sépticos presentan un incremento de tinción, mientras que los tratados con cilastatina muestran una disminución significativa (asteriscos). Los resultados están expresados como media ± EEM, n = 10 animales por grupo. \*p ≤ 0.03 vs. todos los grupos; #p ≤ 0.01 vs. Control + Cil. u.a.d: unidad arbitraria de densitometrado; Cil: cilastatina.

### 1.9.5 CILASTATINA BLOQUEA LA ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA NLRP3

El NLRP3 es un PRR citosólico. Necesita una primera señal de activación que tiene lugar cuando se unen los PAMPs/DAMPs a sus receptores, junto con otras señales como influjo de  $K^+$  y formación de ROS. Esto activa la síntesis de NF $\kappa$ B y provoca que se ensamble el complejo multiproteico del inflamasoma. Para valorar el grado de activación se estudiaron dos proteínas importantes, el sensor NLRP3 y la caspasa-1 efectora, tanto a nivel de cuantificación de proteínas a partir del extracto de corteza renal como a nivel de ARNm (**Figura 46**). Los animales sépticos mostraron un aumento de estas proteínas con respecto al grupo control, mientras que en los tratados con cilastatina se vieron reducidas de manera significativa.

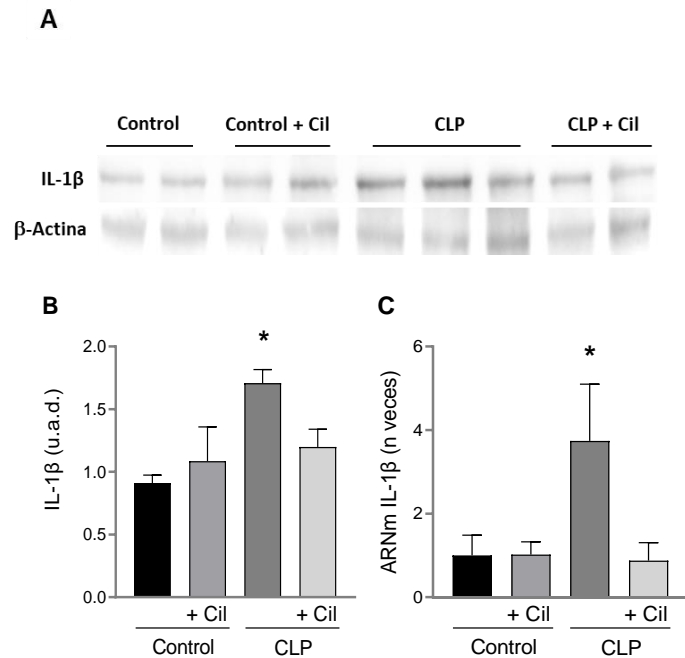


**Figura 46. Efecto de cilastatina sobre el inflamasoma NLRP3.** **A)** Imagen representativa de Western blot de NLRP3 y **C)** Caspasa-1. **B)** Cuantificación del densitometrado del Western blot de NLRP3 y **D)** Caspasa-1, corregidos por su control de carga  $\beta$ -Actina. **E)** Medida de ARNm de Caspasa-1 mediante RT-PCR. Se observa como el grupo CLP presenta un incremento del nivel de proteína tanto de NLRP3 como de casapasa-1, aumentándose ésta también a nivel de ARNm. Se recuperan todos los parámetros valorados significativamente cuando se administra cilastatina. Los resultados están expresados como media  $\pm$  EEM,  $n = 10$  animales por grupo. \* $p \leq 0.03$  vs. todos los grupos;  $Yp \leq 0.0005$  vs. Control. u.a.d: unidad arbitraria de densitometrado; Cil: cilastatina.

Una de las consecuencias de la activación de caspasa-1 es la transformación de la pro-IL-1 $\beta$  a su forma madura provocando su liberación. Estudiamos su expresión mediante Western

blot y RT-PCR observando que existe un incremento en su expresión en los animales sépticos con respecto a los animales del grupo control, disminuyendo sus niveles de forma significativa al administrarles cilastatina (**Figura 47**).

En todos los parámetros determinados hasta ahora, cilastatina *per se* no ha demostrado tener ningún efecto.

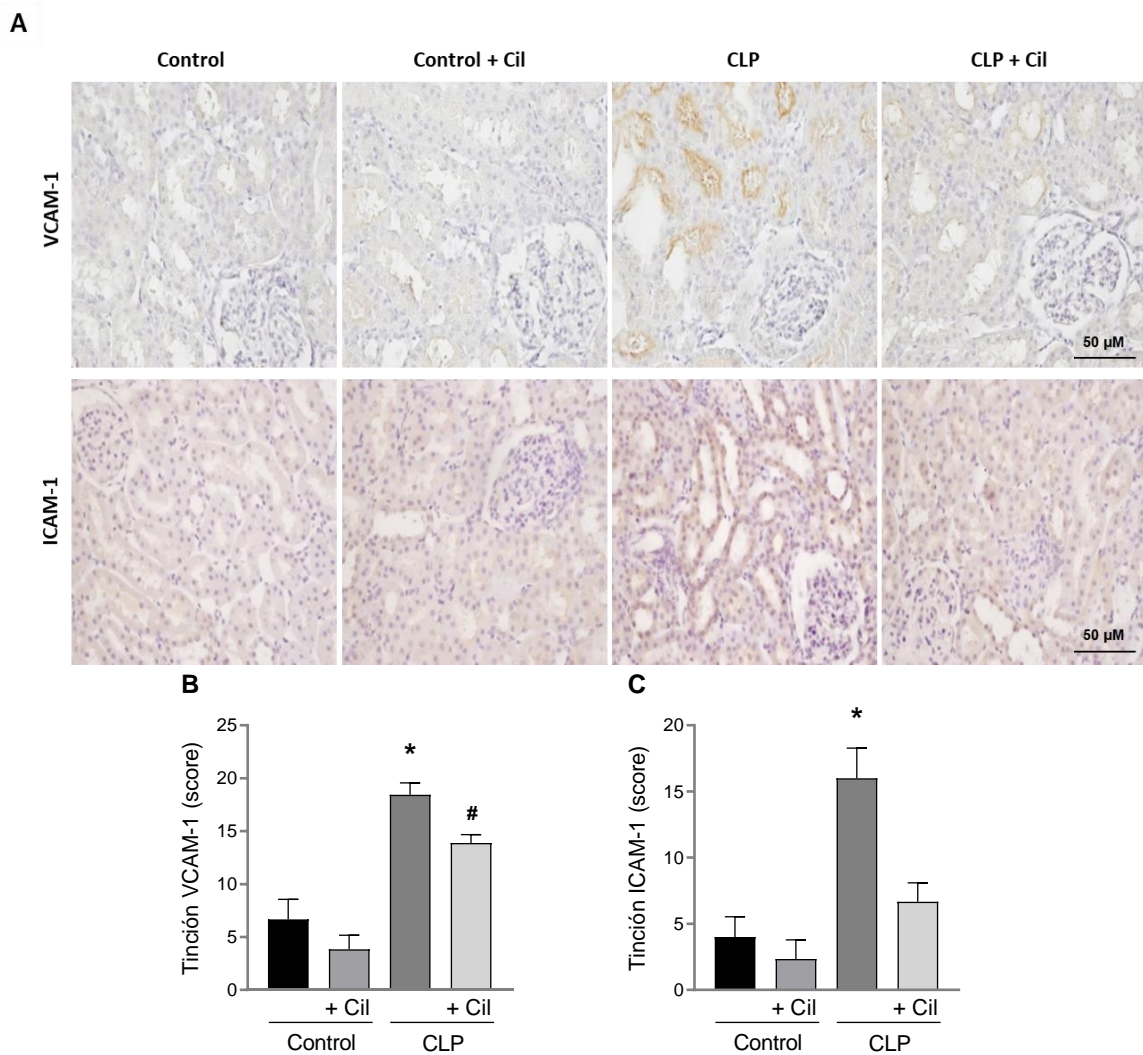


**Figura 47. Determinación de IL-1 $\beta$ .** **A)** Imagen representativa de Western blot de IL-1 $\beta$ , **B)** Cuantificación del densitometrado del Western blot de IL-1 $\beta$  corregido por su control de carga  $\beta$ -Actina. **C)** Medida de ARNm de IL-1 $\beta$  mediante RT-PCR. Se observa como el grupo CLP presenta un incremento del nivel de proteína y a nivel de ARNm. Los valores se reducen significativamente cuando se administra el tratamiento con cilastatina. Los resultados están expresados como media  $\pm$  EEM, n = 10 animales por grupo. \* $p \leq 0.03$  vs. todos los grupos. u.a.d: unidad arbitraria de densitometrado; Cil: cilastatina.

## 1.10 EFECTO DE CILASTATINA SOBRE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

Durante el proceso séptico, la activación del endotelio y de las PTEC provocan la liberación de citoquinas y quimioquinas, que actúan aumentando la expresión de moléculas de adhesión para facilitar la extravasación y la llegada de leucocitos al foco inflamatorio. Se estudiaron dos moléculas importantes como son VCAM-1 e ICAM-1 mediante inmunolocalización en secciones de tejido renal. En la **Figura 48** se muestra cómo en el grupo CLP se produce un incremento en la expresión de ambas moléculas en comparación con el grupo control, mientras que, administrando cilastatina, esos valores disminuyeron de forma significativa.

La administración de cilastatina por sí sola no tuvo ningún efecto sobre el nivel de expresión de las moléculas de adhesión.



**Figura 48. Determinación de moléculas de adhesión. A)** Imágenes representativas de inmunolocalización de VCAM-1 (imágenes superiores) e ICAM-1 (imágenes inferiores), magnificación 20X. **B)** Cuantificación de VCAM-1 y **C)** ICAM-1. El grupo CLP presenta un incremento significativo en la expresión de ambas moléculas de adhesión que se recupera cuando se administra el tratamiento con cilastatina. Los resultados están expresados como media  $\pm$  EEM, n = 10 animales por grupo. \* $p \leq 0.01$ ; vs. todos los grupos; # $p \leq 0.001$  vs. Control  $\pm$  Cil. Cil: cilastatina.

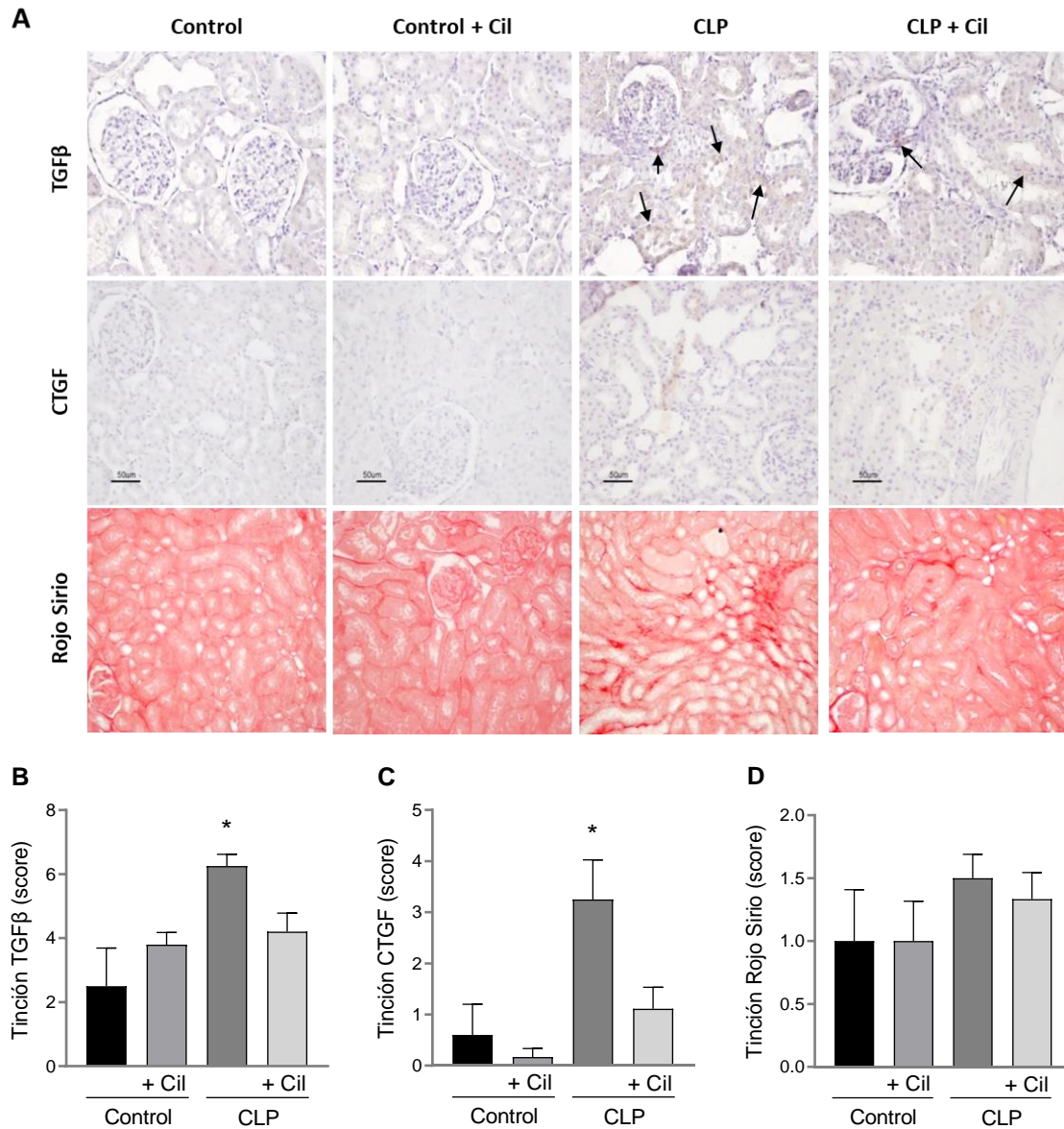
## 1.11 EFECTO DE CILASTATINA SOBRE LA APARICIÓN DE FIBROSIS

### 1.11.1 CILASTATINA DISMINUYE LA EXPRESIÓN DE TGF $\beta$ Y CTGF

Una de las fases del FRA es la reparación de los tejidos dañados. Una mala reparación de tejidos da lugar a la aparición de fibrosis. Dos de las moléculas más importantes implicadas en la aparición y progresión de fibrosis son el TGF $\beta$  y CTGF. Como se observa en la **Figura 49**, el grupo CLP ya presenta de forma precoz un incremento de estas moléculas en comparación con

el grupo control, aun siendo un modelo de corta duración. La administración de cilastatina redujo los niveles de manera significativa.

También se estudió la aparición de fibras de colágeno mediante la tinción de Rojo Sirio. Aunque la duración del modelo es solo de 48 horas y la cuantificación no es significativa, sí que se observa que ya el grupo CLP presenta un aumento de fibrosis y sus vías moleculares están por tanto activadas. El tratamiento con cilastatina tiende a rebajar estos niveles (**Figura 49**).

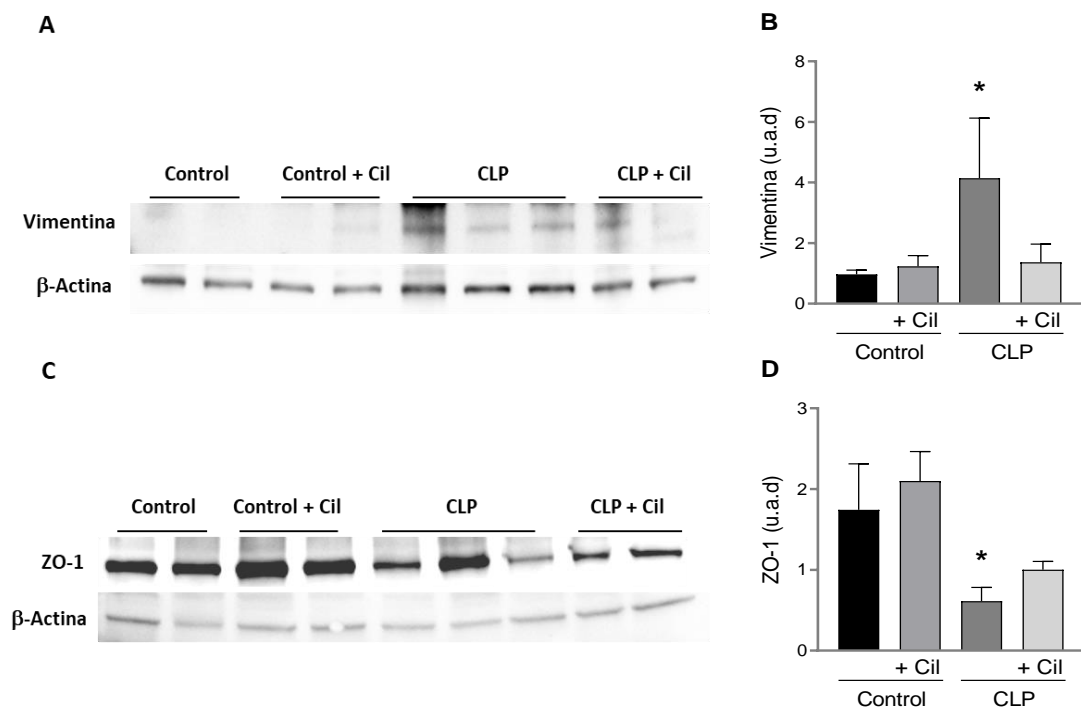


**Figura 49. Efecto de cilastatina en la aparición de fibrosis. A)** Imágenes representativas de inmunolocalización de TGFβ (superior), CTGF (medio) y Rojo Sirio (inferior), magnificación 20X. **B)** Cuantificación del TGFβ, **C)** CTGF y **D)** Rojo Sirio. El grupo CLP presenta un aumento precoz de moléculas implicadas en la aparición de fibrosis (flechas) y de colágeno. La administración de cilastatina redujo estos niveles de manera significativa. Los resultados están expresados como media ± EEM, n = 10 animales por grupo. \* $p \leq 0.01$  vs. todos los grupos. Cil: cilastatina.

### 1.11.2 CILASTATINA BLOQUEA LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA

Cuando existe un daño mantenido en el tiempo, tiene lugar un cambio de fenotipo desde el perfil epitelial al mesenquimal. Se realizó un estudio de moléculas que se ven implicadas en este proceso como el marcador mesenquimal vimentina y la proteína ZO-1, ocludina perteneciente a las uniones estrechas. El grupo CLP tuvo un aumento de vimentina y una pérdida de ZO-1 (**Figura 50**), que junto con el incremento del TGF $\beta$  y CTGF confirman la expresión precoz de moléculas asociadas a la aparición de fibrosis y TEM. El tratamiento con cilastatina mejoró esos niveles de forma significativa.

Cilastatina administrada sola no influyó en los estudios realizados sobre moléculas fibróticas y de TEM.

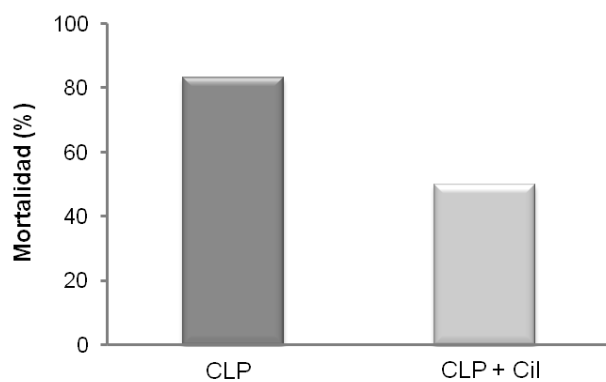


**Figura 50. Efecto de cilastatina en la aparición de TEM.** A) Imágenes representativas de Western blot de vimentina y C) ZO-1. B) y D) Cuantificación del densitometrado de vimentina y ZO-1, respectivamente, corregido por su control de carga  $\beta$ -Actina. El grupo CLP presenta un aumento temprano de vimentina y pérdida de uniones estrechas. El tratamiento con cilastatina revirtió total o parcialmente los niveles de forma significativa. Los resultados están expresados como media  $\pm$  EEM, n = 10 animales por grupo. \*p  $\leq$  0.04 vs. todos los grupos. u.a.d: unidad arbitraria de densitometrado; Cil: cilastatina.

### 1.12 CILASTATINA AUMENTA LA SUPERVIVENCIA

Todos los resultados obtenidos hasta ahora indican un papel protector de cilastatina frente al FRA inducido por sepsis. Para demostrar si la reducción del FRA podría estar relacionada con la disminución de la muerte de los animales, se realizó un estudio de supervivencia. Como

se puede observar en la **Figura 51**, la mayoría de los animales sépticos murieron (en un tiempo de 48 horas) mientras que los que los tratados con cilastatina sobrevivieron más, reduciéndose la mortalidad en un 33%.



**Figura 51. Efecto de cilastatina sobre supervivencia.** Mortalidad de ratas sometidas a un modelo agresivo de CLP en presencia/ausencia de cilastatina (150 mg/kg). El tratamiento con cilastatina mejoró el ratio de supervivencia de ratas con sepsis, reduciendo en un 33% la mortalidad. n = 5 animales por grupo. Cil: cilastatina.

## 2 EFECTO DE CILASTATINA EN EL FRA INDUCIDO POR RABDOMIÓLISIS

El FRA producido por rabdomiólisis presenta una compleja fisiopatología que implica una serie de fenómenos vasculares, inflamatorios y oxidativos. Por este motivo es necesaria la realización de modelos animales más allá de los estudios *in vitro* para conocer en profundidad cómo actúa cilastatina en la protección renal. Se eligió un modelo de FRA inducido por glicerol, que es el más utilizado y el mejor conocido para inducir rabdomiólisis.

Al igual que en el modelo de sepsis, realizamos un estudio piloto a 24, 48 y 72 horas para determinar la duración óptima del modelo. El mayor daño se produjo a 48 horas seguido por el de 72 horas, por lo que en la presentación de los resultados nos centramos sobre todo en el modelo de 48 horas, aunque en algunos aspectos se presentan también datos del modelo de 72 horas por su especial relevancia para mostrar la evolución temporal del daño y el efecto nefroprotector de cilastatina.

### 2.1 EFECTO DE CILASTATINA EN LA PÉRDIDA DE PESO CORPORAL E HIPERTROFIA RENAL

Durante el transcurso del modelo se pesó a los animales para poder establecer el cambio de peso que experimentaban desde el comienzo y hasta el día del sacrificio, donde también se pesaron los riñones para poder establecer el posible grado de hipertrofia renal producido. En la **Figura 52A** se muestra el aspecto macroscópico de los riñones sometidos a rabdomiólisis el día de la extracción. Se puede observar una coloración blanquecina exterior y un punteado oscuro en la corteza renal. En el corte transversal del riñón (**Figura 52B**), se puede ver la coloración más clara de la corteza debida a la falta de riego sanguíneo y marrón/rojo del interior, debida a la acumulación de mioglobina.

A

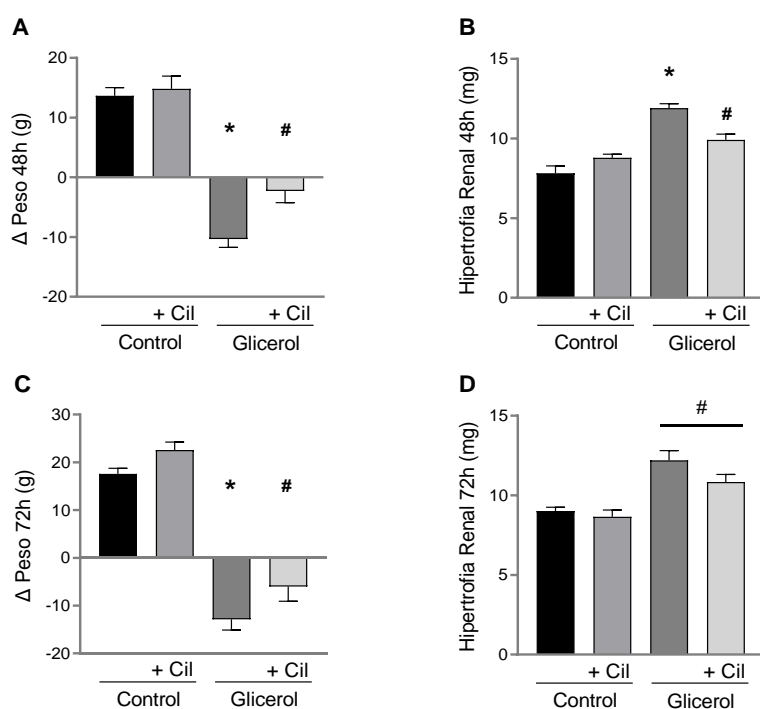


B



**Figura 52. Aspecto macroscópico de los riñones sometidos a rabdomiólisis inducida por glicerol. A)** Aspecto de los riñones antes de su extracción el día del sacrificio. Destaca el color blanquecino de la corteza y marrón del interior debida a la acumulación de mioglobina. **B)** Corte transversal de un riñón.

En la **Figura 53** se muestra el delta de peso que presentan los animales tras el estudio y la hipertrofia renal. Como se puede ver, los grupos control en ambos modelos ganan peso mientras que el grupo glicerol sufre una pérdida significativa. El grupo tratado con cilastatina sufre una menor pérdida de peso y parece que la recuperación es mayor en el modelo de 48 horas (**Figura 53A-C**). Ambos modelos sufren una mayor hipertrofia renal en el grupo glicerol que se mantiene casi en los mismos valores. La administración de cilastatina reduce esa hipertrofia de manera significativa (**Figura 53B-D**).



**Figura 53. Efecto de cilastatina sobre el peso corporal y la hipertrofia renal en rabdomiólisis inducida por glicerol. A)** Delta de pesos a 48h. **B)** Hipertrofia renal a 48h. **C)** Delta de pesos a 72h. **D)** Hipertrofia renal a 72h. En ambos modelos se observa cómo tiene lugar una pérdida de peso e hipertrofia significativa en los grupos glicerol. El tratamiento con cilastatina recupera parcialmente los valores. Los datos están expresados como media  $\pm$  EEM,  $n = 6-10$  animales por grupo. \* $p \leq 0.04$  vs. todos los grupos; # $p \leq 0.03$  vs. Control  $\pm$  Cil. Cil: cilastatina.

## 2.2 CILASTATINA RESTAURA LA FUNCIÓN RENAL

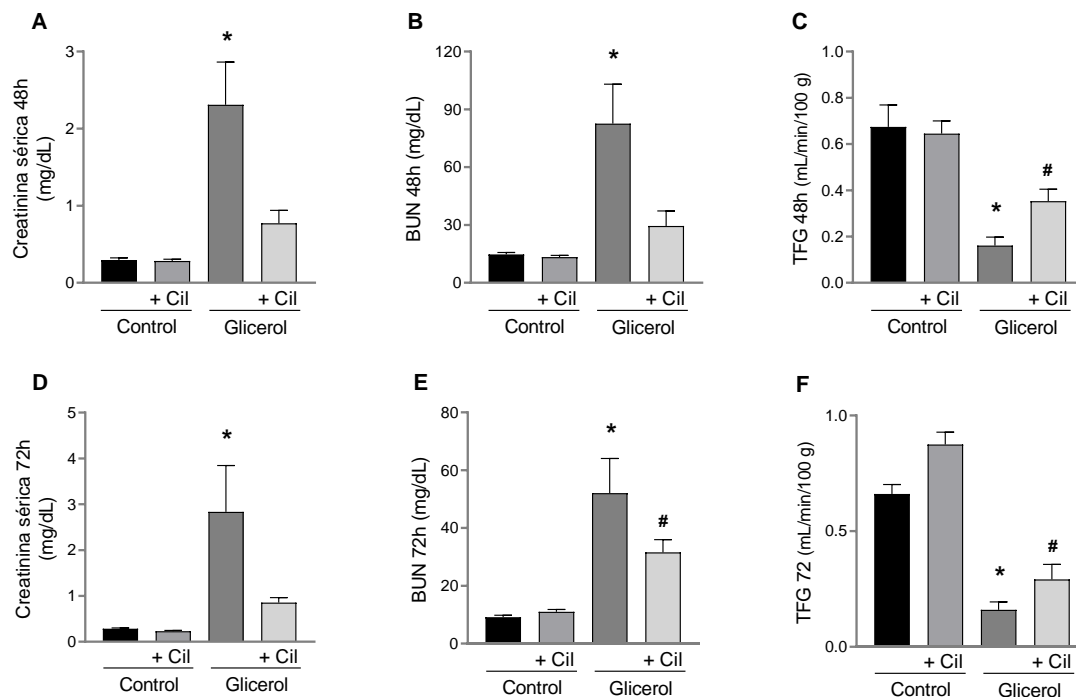
La rabdomiólisis produce FRA y para determinar la pérdida de función renal se estudiaron los valores bioquímicos en suero y orina. Además, se calcularon los parámetros estimados de función renal a partir de los datos bioquímicos.

### 2.2.1 PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN SUERO

Se realizó un amplio estudio en muestras de suero donde se determinaron una gran cantidad de parámetros para conocer en profundidad el estado de los animales. En la **Figura 54** se muestran los indicadores más importantes de función renal para ambos tiempos. Destaca el gran incremento de creatinina que experimentan los grupos glicerol de ambos modelos, al igual que el BUN, siendo mayor el daño a 48 horas. Ambos parámetros se recuperan con la

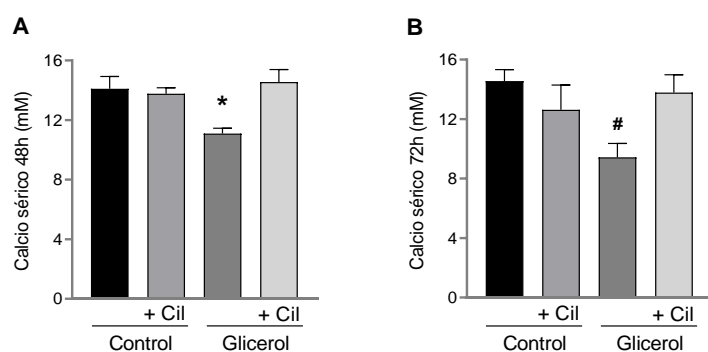
administración de cilastatina volviendo a niveles similares a los encontrados en los grupos control.

La TFG cae drásticamente en los grupos glicerol de ambos modelos a casi el mismo valor, y se recuperan significativamente con el tratamiento con cilastatina.



**Figura 54. Parámetros de función renal a 48h y 72h.** A) Creatinina sérica a 48h, B) BUN a 48h, C) TFG a 48h, D) Creatinina sérica a 72h, E) BUN a 72 y F) TFG a 72h. En ambos modelos se observa cómo tiene lugar una pérdida de función renal en los grupos glicerol. El tratamiento con cilastatina recupera los valores de manera significativa total o parcialmente con respecto a los grupos control. Los datos están expresados como media ± EEM, n = 6-10 animales por grupo. \*p ≤ 0.01 vs. todos los grupos; #p ≤ 0.04 vs. Control ± Cil. Cil: cilastatina; BUN: nitrógeno ureico en sangre; TFG: tasa de filtrado glomerular.

Un parámetro importante a conocer durante la rabdomiólisis es la medida de calcio sérico ya que se produce una acumulación intracelular en una fase inicial del síndrome y por tanto una disminución en suero. Como se muestra en la **Figura 55**, los grupos glicerol de ambos modelos presentan una disminución significativa de sus niveles séricos, siendo mayor a 72 horas. Con la administración de cilastatina los niveles vuelven a la normalidad.



**Figura 55. Determinación del calcio sérico a 48h y 72h.** A) Calcio en suero a 48h. B) Calcio en suero a 72h. En ambos modelos se observa cómo tiene lugar una reducción del calcio en los grupos glicerol. El tratamiento con cilastatina aumenta significativamente los valores a niveles parecidos a los encontrados en los grupos control. Los datos están expresados como media ± EEM, n = 6-10 animales por grupo. \*p ≤ 0.004 vs. todos los grupos; #p ≤ 0.005 vs. Control y Glicerol + Cil. Cil: cilastatina.

El resto de los parámetros bioquímicos medidos en suero se muestran en las **Tablas 16** y **17**. El grupo glicerol a las 48 horas tiene la mayoría de los valores alterados con respecto a los grupos control. En la **Tabla 16**, se observa cómo los niveles de transaminasas sufren un gran aumento por el daño hepático inicial, al igual que la LDH y el potasio por su liberación al medio tras la rotura del miocito. El sodio al igual que el calcio, disminuye a nivel sérico por su acumulación intracelular. El tratamiento con cilastatina restaura total o parcialmente los valores bioquímicos de manera significativa.

PARÁMETRO	CONTROL	CONTROL + CIL	GLICEROL	GLICEROL + CIL
UREA (mg/dL)	31.50 ± 2.17	28.57 ± 1.97	<b>208.10 ± 49.05*</b>	47.57 ± 7.42
ALBÚMINA (g/dL)	3.48 ± 0.05	3.63 ± 0.03	3.53 ± 0.04	<b>3.38 ± 0.11#</b>
AST (U/L)	112.50 ± 11.33	105.30 ± 5.97	<b>320.90 ± 78.49*</b>	175.10 ± 23.09
ALT (U/L)	28.00 ± 1.75	28.43 ± 1.15	<b>109.00 ± 36.07*</b>	51.75 ± 5.88
SODIO (mmol/L)	143.30 ± 0.42	144.10 ± 0.34	<b>140.20 ± 1.09*</b>	143.30 ± 0.56
POTASIO (mmol/L)	3.97 ± 0.13	4.35 ± 0.12	<b>4.90 ± 0.29*</b>	4.08 ± 0.09
PROTEINAS (g/dL)	5.23 ± 0.04	5.13 ± 0.08	5.12 ± 0.08	5.01 ± 0.1
GLUCOSA (mg/dL)	222.0 ± 11.86	215.40 ± 2.92	<b>176.40 ± 8.44*</b>	212.90 ± 11.45
LDH (U/L)	821.40 ± 227.60	841.20 ± 68.05	<b>1459.00 ± 241.70*</b>	845.60 ± 197.90

**Tabla 16. Parámetros bioquímicos en suero a 48h.** La mayoría de los valores se encuentran significativamente alterados en el grupo glicerol con respecto a los grupos control. El tratamiento con cilastatina recupera los valores a los observados en el grupo control. Los datos están expresados como media ± EEM, n = 6-10 animales por grupo. \*p ≤ 0.05 vs. todos los grupos; #p ≤ 0.01 vs. Control + Cil. Cil: cilastatina; AST: aspartato aminotransferasa; ALT: alanina aminotransferasa; LDH: lactato deshidrogenasa.

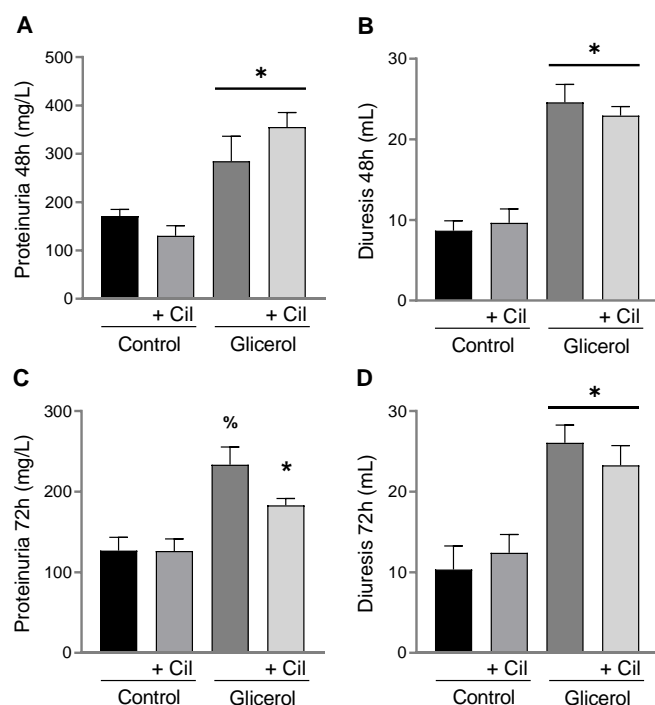
A 72 horas (**Tabla 17**) destaca que la mayoría de los valores parecen normalizarse y salvo la urea, que se ve incrementada ligeramente con respecto a las 48 horas en el grupo glicerol, el resto de los parámetros se reducen hasta valores casi normales. La LDH también reduce sus niveles siendo significativa respecto al control. Cilastatina tiende a revertir total o parcialmente los cambios inducidos por la rabdomiólisis.

PARÁMETRO	CONTROL	CONTROL + CIL	GLICEROL	GLICEROL + CIL
UREA (mg/dL)	19.67 ± 1.36	23.67 ± 1.61	<b>216.80 ± 76.77*</b>	67.71 ± 9.39
ALBÚMINA (g/dL)	3.78 ± 0.11	3.75 ± 0.09	3.57 ± 0.09	3.63 ± 0.07
AST (U/L)	78.00 ± 5.22	80.60 ± 2.80	<b>108.80 ± 10.90*</b>	84.57 ± 4.37
ALT (U/L)	27.67 ± 1.67	28.33 ± 2.20	34.50 ± 5.44	28.63 ± 1.89
SODIO (mmol/L)	143.80 ± 1.66	145.00 ± 1.88	142.10 ± 0.78	143.80 ± 0.79
POTASIO (mmol/L)	4.18 ± 0.12	4.48 ± 0.12	4.60 ± 0.53	4.07 ± 0.17
PROTEINAS (g/dL)	5.37 ± 0.07	5.27 ± 0.12	5.24 ± 0.08	5.38 ± 0.10
GLUCOSA (mg/dL)	216.00 ± 7.53	221.20 ± 5.4	<b>191.30 ± 3.61*</b>	207.70 ± 4.73
LDH (U/L)	836.00 ± 50.54	954.50 ± 95.12	<b>600.10 ± 68.26#</b>	<b>478.90 ± 49.82#</b>

**Tabla 17. Parámetros bioquímicos en suero a 72h.** Los valores tienden a normalizarse y se acercan a niveles del grupo control. El tratamiento con cilastatina mejora significativamente los valores que permanecen alterados en el grupo glicerol. Los datos están expresados como media ± EEM, n = 6-10 animales por grupo. \*p ≤ 0.03 vs. todos los grupos; #p ≤ 0.02 vs. Control ± Cil. Cil: cilastatina; AST: aspartato aminotransferasa; ALT: alanina aminotransferasa; LDH: lactato deshidrogenasa.

## 2.2.2 PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN ORINA

La medida de proteínas en orina es también un indicador fundamental del daño renal. Como se observa en la **Figura 56A**, a 48 horas la pérdida de proteínas se incrementa radicalmente y no se recupera con cilastatina. Esto es debido a la gran cantidad de mioglobina liberada durante la rabdomiólisis. Si observamos a 72 horas (**Figura 56C**), la pérdida de proteínas ya es menor y además se nota el efecto protector de cilastatina ya que se produce un descenso significativo. Como también se muestra en la **Figura 56**, la diuresis se incrementa en los animales con rabdomiólisis con respecto a los grupos control, pero en este caso cilastatina no es capaz de reducir estos valores.



**Figura 56. Determinación de proteínas y diuresis en orina a 48h y 72h.** Medida de proteinuria: **A)** 48h y **C)** 72h. Medida de diuresis: **B)** 48h y **D)** 72h. Destaca el aumento de proteinuria a 48h por la excesiva pérdida de mioglobina inicial, que se reduce a 72h. Cilastatina parece que empieza a recuperar los valores a partir de las 72h. Asimismo, se produce un incremento de la diuresis en los animales enfermos que cilastatina no reduce. Los datos están expresados como media  $\pm$  EEM,  $n = 6-10$  animales por grupo. \* $p \leq 0.04$  vs. Control  $\pm$  Cil; % $p \leq 0.04$  vs. todos los grupos. Cil: cilastatina.

Otros parámetros que se determinaron se presentan en las siguientes tablas. A 48 horas todos los valores en el grupo glicerol se ven drásticamente alterados, confirmando los resultados de daño renal vistos hasta ahora (**Tabla 18**). El tratamiento con cilastatina no es capaz de restaurar las alteraciones observadas en los niveles, a excepción de potasio, aunque sí que parece haber una tendencia a la mejora. La glucosa y el índice de proteína/creatinina permanecen elevados debido a la alta concentración de la mioglobina liberada.

PARÁMETRO	CONTROL	CONTROL + CIL	GLICEROL	GLICEROL + CIL
UREA (mg/dL)	4183 ± 323.30	3530 ± 362.10	<b>1355 ± 11.00*</b>	<b>1851 ± 105.20*</b>
CREATININA (mg/dL)	91.22 ± 7.80	82.20 ± 9.02	<b>28.93 ± 3.01*</b>	<b>33.78 ± 1.67*</b>
SODIO (mmol/L)	210.30 ± 21.19	199.90 ± 27.01	<b>45.00 ± 3.90*</b>	<b>58.63 ± 5.80*</b>
POTASIO (mmol/L)	100 ± 0.0	100 ± 0.0	<b>60.32 ± 5.05#</b>	<b>78.77 ± 7.37*</b>
CALCIO (mg/dL)	25.05 ± 9.50	24.29 ± 5.70	<b>5.34 ± 1.56*</b>	17.52 ± 3.17
GLUCOSA (mg/dL)	51.20 ± 9.94	74.40 ± 19.34	<b>1067 ± 321.90*</b>	<b>1232 ± 180.40*</b>
Índ. PROT/CREA (mg/mg)	1.91 ± 0.14	1.71 ± 0.12	<b>8.59 ± 0.88#</b>	<b>10.47 ± 0.59*</b>

**Tabla 18. Parámetros bioquímicos en orina a 48h.** Los niveles del grupo glicerol se ven significativamente alterados. El tratamiento con cilastatina solo mejora el nivel de potasio significativamente. Los datos están expresados como media ± EEM, n = 6-10 animales por grupo. \*p ≤ 0.004 vs. Control ± Cil; #p ≤ 0.03 vs. todos los grupos. Cil: cilastatina; Índ.: índice.

En la **Tabla 19** se muestran los valores analizados en orina a las 72 horas. La mayoría de los parámetros siguen alterados en el grupo glicerol. Destaca el menor aumento en la glucosa y el índice de proteínas con respecto a las 48 horas, que sí se ven reducidos parcialmente de manera significativa con cilastatina al igual que el potasio.

PARÁMETRO	CONTROL	CONTROL + CIL	GLICEROL	GLICEROL + CIL
UREA (mg/dL)	2985 ± 501.40	2843 ± 363.90	<b>1315 ± 52.73*</b>	<b>1517 ± 207.90*</b>
CREATININA (mg/dL)	83.83 ± 11.99	74.23 ± 11.42	<b>29.90 ± 2.14*</b>	<b>35.19 ± 6.26*</b>
SODIO (mmol/L)	206 ± 35.90	179.80 ± 26.19	<b>61.20 ± 6.74*</b>	<b>83.88 ± 13.08*</b>
POTASIO (mmol/L)	100 ± 0.0	100 ± 0.0	<b>75.61 ± 3.86#</b>	<b>86.17 ± 2.74*</b>
CALCIO (mg/dL)	19.75 ± 3.20	18.35 ± 3.07	11.16 ± 2.30	16.11 ± 4.01
GLUCOSA (mg/dL)	38.33 ± 22.43	38 ± 23.35	<b>751.1 ± 112.40*</b>	<b>636 ± 164.20*</b>
Índ. PROT/CREA (mg/mg)	1.54 ± 0.12	1.78 ± 0.18	<b>7.46 ± 0.66#</b>	<b>5.65 ± 0.73*</b>

**Tabla 19. Parámetros bioquímicos en orina a 72h.** Los valores del grupo glicerol se ven significativamente alterados. El tratamiento con cilastatina solo mejora significativamente los niveles de potasio y el índice de proteínas. Los datos están expresados como media ± EEM, n = 6-10 animales por grupo. \*p ≤ 0.002 vs. Control ± Cil; #p ≤ 0.02 vs. todos los grupos. Cil: cilastatina; Índ.: índice.

### 2.2.3 PARÁMETROS BIOQUÍMICOS ESTIMADOS DE FUNCIÓN RENAL

A partir de los datos bioquímicos en suero y orina se determinaron otros parámetros que nos dan una idea también de cómo funciona el riñón. En la **Tabla 20** se muestran estos parámetros donde puede observarse como el grupo glicerol aumentó significativamente el  $\text{ClH}_2\text{Oe}$ , la  $\text{EFNa}^+$  y la  $\text{EFH}_2\text{O}$  respecto al control. El GTTK se ve reducido parcialmente, aunque no significativamente en comparación con el grupo control. Los parámetros alterados se ven recuperados significativamente con la administración de cilastatina.

PARÁMETRO	CONTROL	CONTROL + CIL	GLICEROL	GLICEROL + CIL
EFN <sub>a</sub> <sup>+</sup> (%)	0.47 ± 0.04	0.47 ± 0.05	<b>2.84 ± 0.93*</b>	0.86 ± 0.12
EFH <sub>2</sub> O (%)	0.33 ± 0.02	0.39 ± 0.08	<b>9.85 ± 3.16*</b>	2.37 ± 0.56
CIH <sub>2</sub> Oe (mL H <sub>2</sub> O/ día)	-9.38 ± 1.04	-8.75 ± 0.93	<b>8.14 ± 1.74*</b>	<b>1.85 ± 1.94<sup>#</sup></b>
GTTK	5.78 ± 0.54	6.61 ± 1.44	4.01 ± 0.23	5.96 ± 1.42

**Tabla 20. Parámetros bioquímicos estimados a 48h.** Los valores del grupo glicerol se ven alterados salvo el GTTK. El tratamiento con cilastatina mejora los niveles significativamente. Los datos están expresados como media ± EEM, n = 6-10 animales por grupo. \*p ≤ 0.02 vs. todos los grupos; #p < 0.0001 vs. Control ± Cil. Cil: cilastatina.

En el modelo de 72 horas, los parámetros siguen alterados significativamente con respecto al grupo control, aunque su aumento es menor en comparación a las 48 horas. El tratamiento con cilastatina mejora los datos parcialmente disminuyendo los valores de manera significativa (**Tabla 21**).

Cilastatina *per se* no tuvo influencia significativa en ninguno de los parámetros en estudio.

	CONTROL	CONTROL + CIL	GLICEROL	GLICEROL + CIL
EFN <sub>a</sub> <sup>+</sup> (%)	0.49 ± 0.06	0.38 ± 0.01	<b>2.58 ± 0.67*</b>	<b>1.53 ± 0.22<sup>#</sup></b>
EFH <sub>2</sub> O (%)	0.40 ± 0.11	0.35 ± 0.06	<b>4.83 ± 1.02*</b>	<b>2.99 ± 0.51<sup>&amp;</sup></b>
CIH <sub>2</sub> Oe (mL H <sub>2</sub> O/ día)	-6.21 ± 0.63	-9.96 ± 1.10	<b>1.63 ± 2.14*</b>	<b>-2.96 ± 1.74<sup>#</sup></b>
GTTK	5.78 ± 0.54	6.61 ± 1.44	4.01 ± 0.23	5.96 ± 1.42

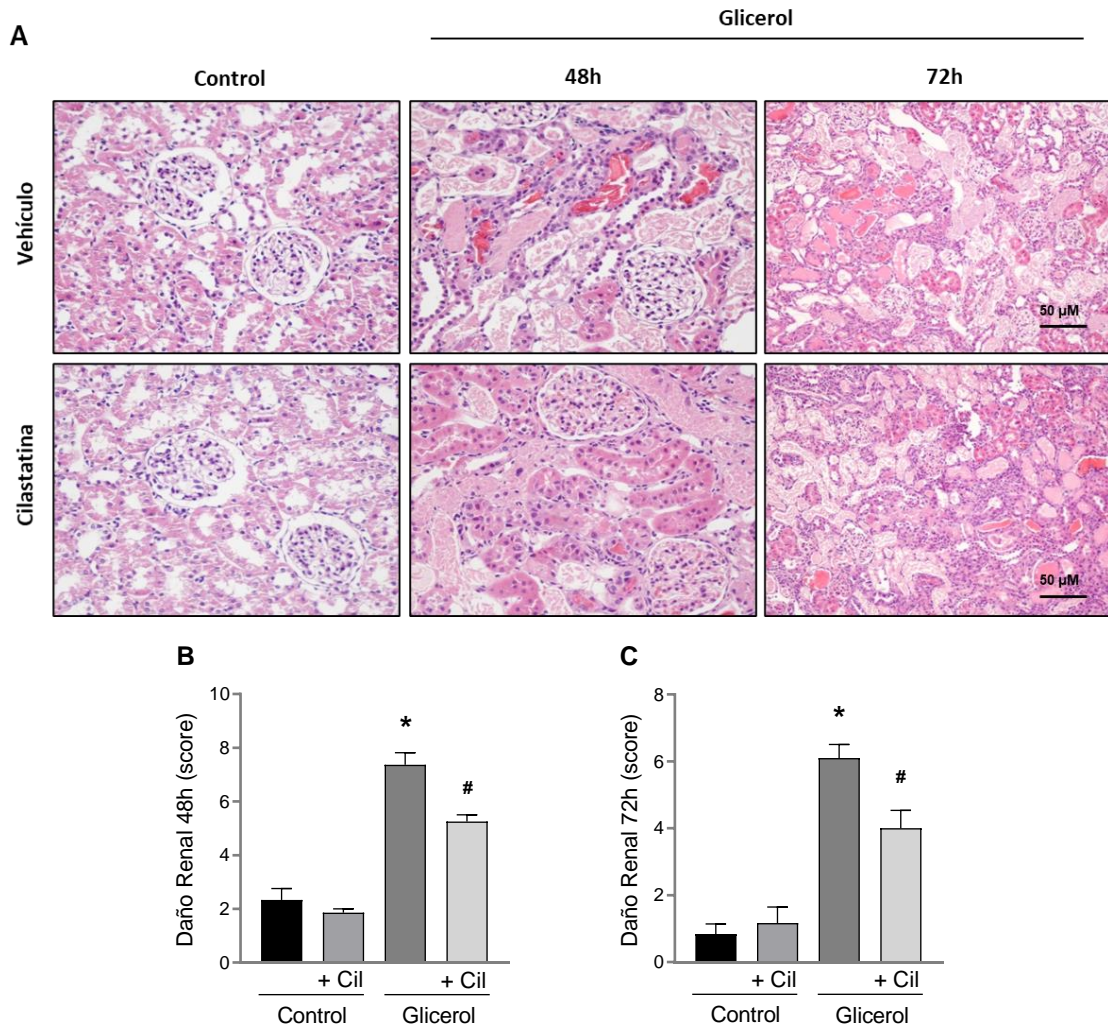
**Tabla 21. Parámetros bioquímicos estimados a 72h.** Los valores del grupo glicerol se ven significativamente alterados y el tratamiento con cilastatina mejora parcialmente esos niveles. Los datos están expresados como media ± EEM, n = 6-10 animales por grupo. \*p ≤ 0.05 vs. todos los grupos; #p ≤ 0.04 vs. Control + Cil; &p ≤ 0.007 vs. Control ± Cil. Cil: cilastatina.

## 2.3 ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA RENAL

El FRA mioglobínúrico se caracteriza por la formación de cilindros proteicos que obstruyen la luz del túbulo. También se produce infiltración leucocitaria y muerte celular. Para estudiar el daño renal inducido por rabdomiólisis se realizó una tinción de hematoxilina/eosina. En la **Figura 57** se presentan secciones de los modelos en estudio. Se puede observar cómo los grupos glicerol presentan una gran alteración estructural, con gran cantidad de cilindros proteicos taponando los túbulos que aumentan con el tiempo. Aparece infiltrado celular y zonas hemorrágicas. El tratamiento con cilastatina revierte parcialmente los daños, aunque sigue permaneciendo la obstrucción tubular sobre todo a nivel distal (**Figura 57A**).

La cuantificación del daño por un patólogo especializado mostró que el grupo glicerol presenta mayoritariamente formación de *cast* o cilindros proteicos, necrosis tubular y en menor medida vacuolización, *blebbing* y mitosis. La observación de mitosis es mayor a 48 horas que a 72 horas, lo que podría implicar la activación temprana de los procesos de reparación y por ello

el tratamiento con cilastatina mejora significativamente todos los signos de daño (**Figura 57B-C**).

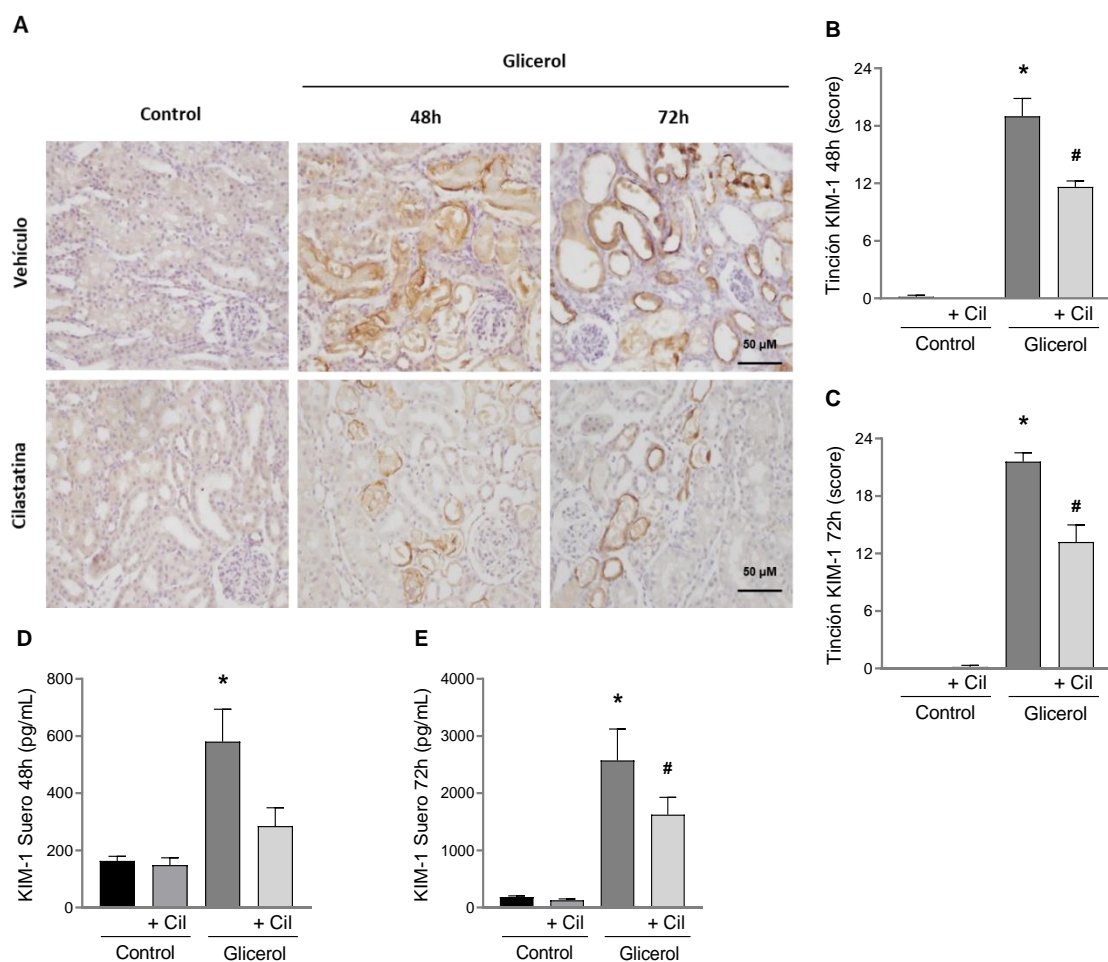


**Figura 57. Estudio histopatológico y score de daño renal.** A) Morfología de tejido renal. Imágenes que representan los grupos de estudio. Tinción hematoxilina/eosina, magnificación 20X. Score de daño renal B) 48 horas y C) 72 horas. Los grupos glicerol ven aumentado de manera significativa el daño renal respecto a los grupos control, mientras que el tratamiento con cilastatina reduce parcialmente ese daño. Los datos están expresados como media  $\pm$  EEM, n = 6-10 animales por grupo. \* $p \leq 0.001$  vs. todos los grupos; # $p \leq 0.0003$  vs. Control  $\pm$  Cil. Cil: cilastatina

## 2.4 CILASTATINA REDUCE LA EXPRESIÓN DE KIM-1

De igual manera que en el modelo de sepsis, estudiamos la síntesis y expresión de este biomarcador de daño renal mediante inmunolocalización en secciones de tejido renal y su cuantificación. Como se puede ver en la **Figura 58**, tanto a 48 como a 72 horas se produce un gran aumento de expresión en los grupos glicerol, que son revertidos de manera significativa por cilastatina, confirmando los resultados obtenidos a nivel de función renal.

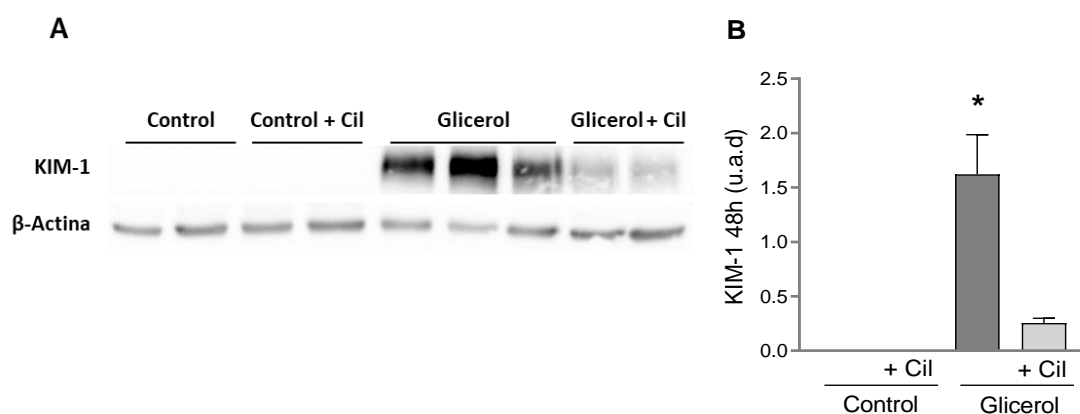
Estos datos fueron corroborados también a nivel sistémico mediante array, para ambos tiempos obteniendo resultados similares de reducción significativa tras el tratamiento con cilastatina (**Figura 58D-E**).



**Figura 58. Determinación de la expresión del biomarcador KIM-1 en secciones de tejido renal. A)** Imágenes representativas de inmunolocalización de KIM-1. Magnificación 20X. Score de cuantificación de daño: **B)** 48 horas y **C)** 72 horas. Medida en suero de KIM-1: **D)** 48 horas y **E)** 72 horas. Los grupos glicerol ven aumentado de manera significativa la expresión de KIM-1 respecto a los grupos control, mientras que el tratamiento con cilastatina reduce el daño. Los datos están expresados como media  $\pm$  EEM,  $n = 6-10$  animales por grupo. \* $p \leq 0.04$  vs. todos los grupos; # $p < 0.006$  vs. Control  $\pm$  Cil. Cil: cilastatina

Por último, se realizó también un Western blot en los riñones sometidos a rabdomiólisis durante 48h, con idéntico resultado a lo obtenido anteriormente (**Figura 59**).

Cilastatina por sí sola no tuvo ningún efecto sobre todos los parámetros analizados hasta ahora.



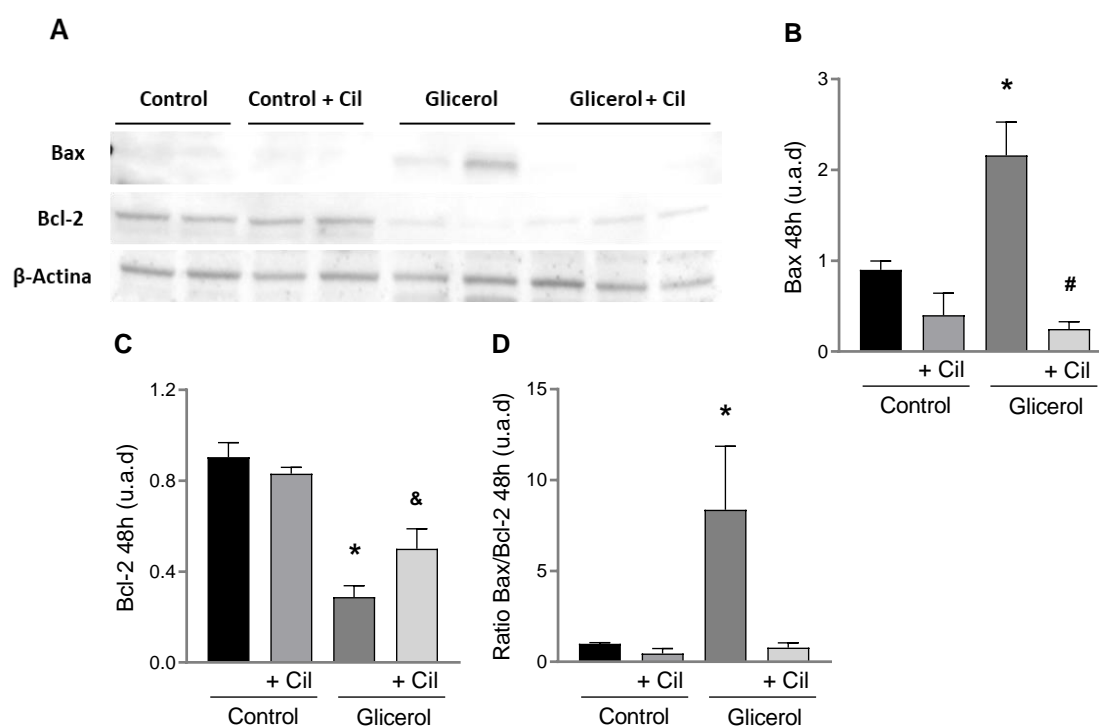
**Figura 59. Determinación de la expresión del biomarcador KIM-1.** A) Imágenes representativas de Western blot de corteza renal a 48h de KIM-1 y β-Actina como control de carga. B) Cuantificación del densitometrado corregido por el control de carga. \* $p \leq 0.0002$  vs. todos los grupos. Cil: cilastatina; u.a.d.: unidad arbitraria de densitometrado.

## 2.5 EFECTO DE CILASTATINA SOBRE LA APOPTOSIS

### 2.5.1 CILASTATINA BLOQUEA LA VÍA INTRÍNSECA

#### 2.5.1.1 Efecto de cilastatina sobre proteínas de la familia Bcl-2

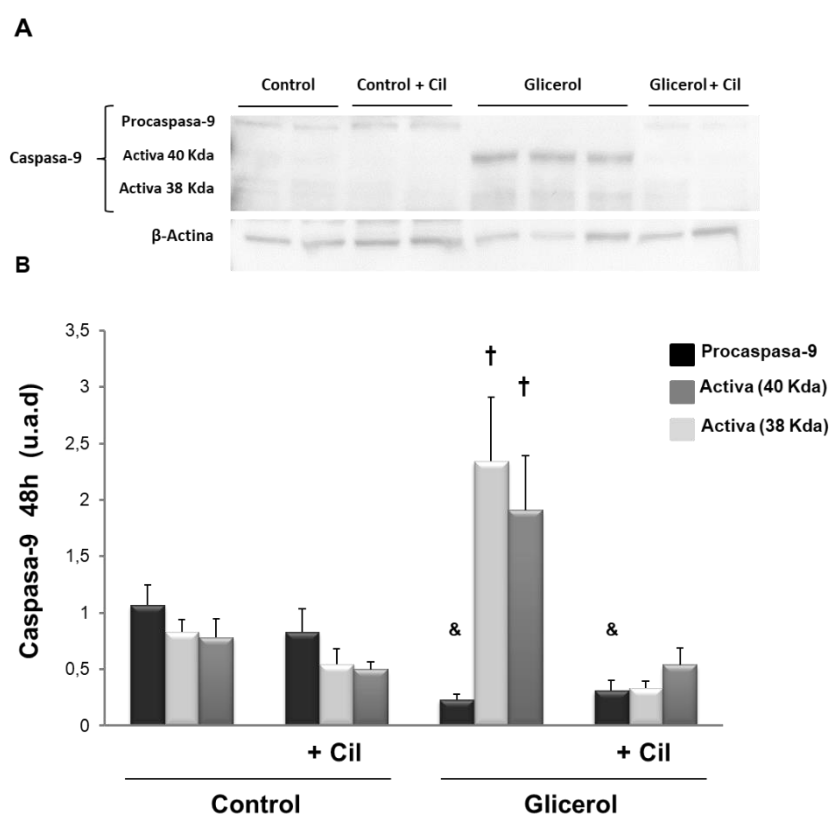
Se estudiaron tanto la proteína antiapoptótica Bcl-2 como la apoptótica Bax en corteza renal tras 48 horas de daño mediante Western blot, y así determinar el balance apoptótico y la susceptibilidad hacia la apoptosis. Como se muestra en la **Figura 60A**, el grupo glicerol mostró un aumento significativo de Bax, mientras que Bcl-2 se redujo visiblemente. Al realizar el ratio, el balance se inclinó drásticamente a favor de la apoptosis indicando una baja resistencia celular a estímulos apoptóticos (**Figura 60D**). El tratamiento con cilastatina bloqueó totalmente la síntesis de Bax y recuperó parcialmente los valores de Bcl-2 previamente disminuidos por el tratamiento con glicerol.



**Figura 60. Determinación de proteínas de la familia Bcl-2 en tejido renal.** A) Imágenes representativas de Western blot de Bax y Bcl-2 con  $\beta$ -Actina como control de carga. Cuantificación del densitometrado corregido por el control de carga de B) Bax y C) Bcl-2. D) Ratio Bax/Bcl-2. El grupo glicerol presenta un aumento significativo respecto a los controles en la síntesis de Bax y una disminución de Bcl-2. El ratio se inclina a favor de la apoptosis. El tratamiento con cilastatina recupera significativamente todos los valores. Los datos están expresados como media  $\pm$  EEM, n = 6-10 animales por grupo. \* $p \leq 0.02$  vs. todos los grupos; # $p \leq 0.04$  vs. control; & $p \leq 0.002$  vs. Control  $\pm$  Cil. Cil: cilastatina; u.a.d.: unidad arbitraria de densitometrado.

### 2.5.1.2 Efecto de cilastatina sobre caspasa-9

La apoptosis es un proceso clave en el FRA inducido por rabdomiólisis, por lo que se estudió qué grado de implicación presentaban las caspasas en el desarrollo del daño renal. Mediante Western blot se analizó a las 48 horas la expresión de caspasa-9 en corteza renal, tanto la procaspasa-9 como sus fragmentos activos de 40 KDa y 38 KDa. En la **Figura 61** se observa como en el grupo glicerol la procaspasa se reduce, aumentando los fragmentos activos significativamente respecto a los grupos control. La administración de cilastatina restaura totalmente los valores previamente aumentados tras la inyección de glicerol.

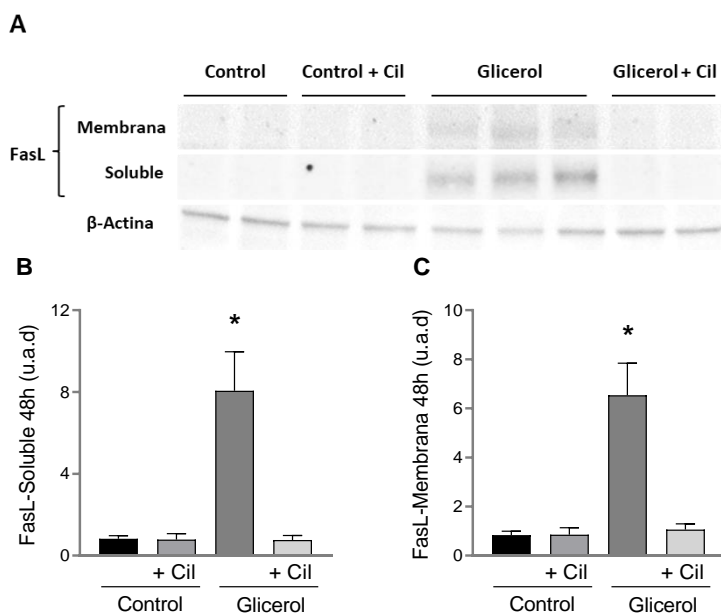


**Figura 61. Determinación de caspasa-9 en tejido renal. A)** Imágenes representativas del Western blot de procaspasa-9, fragmentos activos de caspasa-9 y  $\beta$ -Actina como control de carga. **B)** Cuantificación del densitometrado corregido por el control de carga. El grupo glicerol presenta un aumento de sus formas activas mientras reduce la proteína completa de manera significativa respecto al control. El tratamiento con cilastatina reduce la activación de caspasa-9. Los datos están expresados como media  $\pm$  EEM, n = 6-10 animales por grupo. &p  $\leq$  0.04 vs. Control  $\pm$  Cil; †p  $\leq$  0.06 vs. todos los grupos dentro de su forma activa. Cil: cilastatina; u.a.d.: unidad arbitraria de densitometrado.

## 2.5.2 CILASTATINA BLOQUEA LA VÍA EXTRÍNSECA

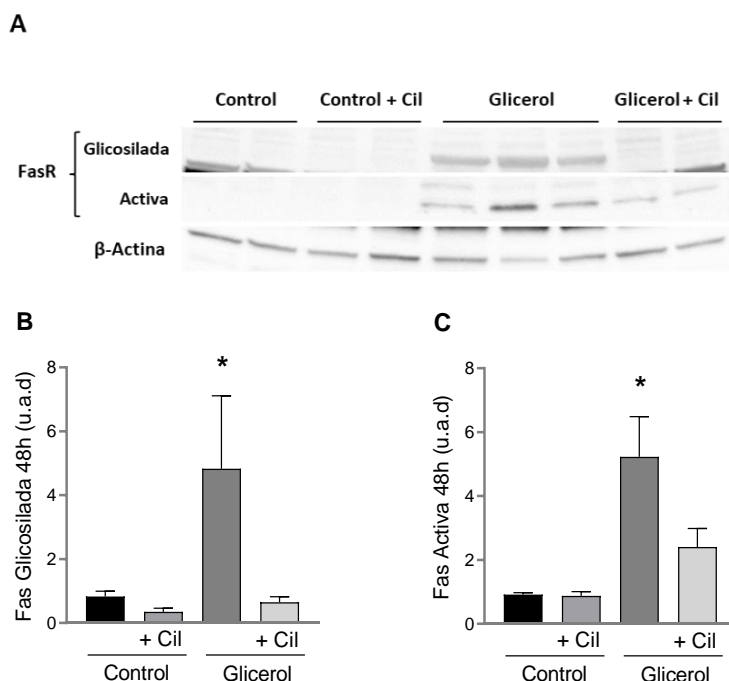
### 2.5.2.1 Efecto de cilastatina sobre el complejo Fas/FasL

Se ha demostrado como la rabdomiólisis produce la activación de la ruta extrínseca de la apoptosis que esta mediada por receptores de muerte. Para comprobar la expresión de Fas y en qué grado se sintetiza y libera su ligando, realizamos un estudio mediante Western blot para cuantificar la síntesis en corteza renal. FasL presenta dos formas de expresión, una de membrana y otra soluble (**Figura 62**). Ambas muestran un incremento significativo en el grupo glicerol comparándolo con el grupo control, y la administración de cilastatina reduce completamente los niveles hasta valores cercanos a los encontrados en el grupo control.



**Figura 62. Determinación del complejo FasL en tejido renal.** **A)** Imágenes representativas de Western blot de las dos fracciones de FasL con β-Actina como control de carga. Cuantificación del densitometrado corregido por el control de carga de FasL: **B)** Fracción soluble y **C)** Fracción de membrana. El grupo glicerol presenta un aumento significativo respecto al grupo control de ambas formas analizadas. El tratamiento con cilastatina recupera completamente los valores. Los datos están expresados como media ± EEM, n = 6-10 animales por grupo. \*p ≤ 0.0004 vs. todos los grupos. Cil: cilastatina; u.a.d.: unidad arbitraria de densitometrado.

Fas muestra una forma glicosilada y otra activa (**Figura 63**). Ambas fracciones se incrementan en los animales con rabdomiólisis respecto al grupo control mientras que, con el tratamiento con cilastatina, estos valores disminuyen de forma significativa.

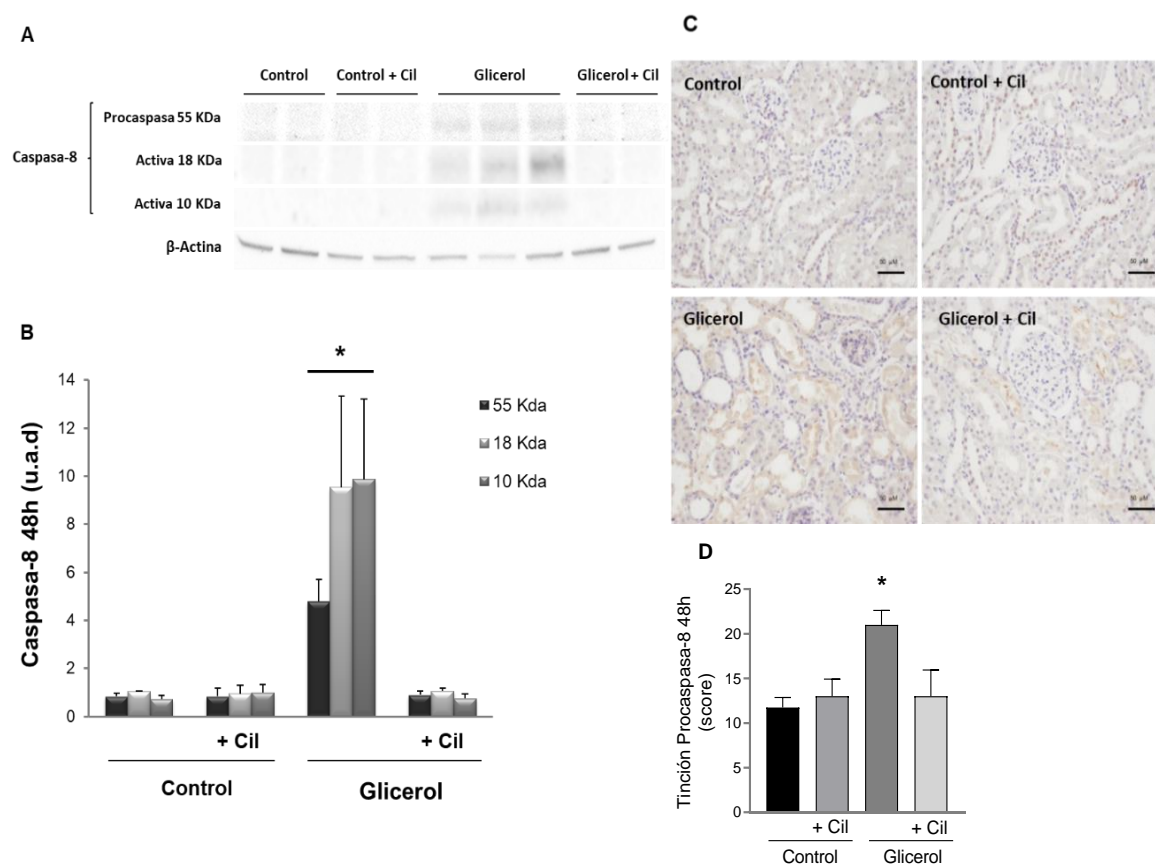


**Figura 63. Determinación del complejo Fas en tejido renal.** **A)** Imágenes representativas de Western blot de las dos fracciones de Fas con β-Actina como control de carga. Cuantificación del densitometrado corregido por el control de carga de Fas: **B)** Fracción glicosilada y **C)** Fracción activa. El grupo glicerol presenta un aumento significativo respecto al grupo control de ambas formas analizadas. El tratamiento con cilastatina recupera completamente los valores. Los datos están expresados como media ± EEM, n = 6-10 animales por grupo. \*p ≤ 0.04 vs. todos los grupos. Cil: cilastatina; u.a.d.: unidad arbitraria de densitometrado.

Esto confirma que la activación de la ruta extrínseca está mediada por el complejo Fas/FasL, que trimerizará y se internalizará activando posteriormente la caspasa-8 llevando a la muerte celular.

### 2.5.2.2 Efecto de cilastatina sobre caspasa-8

Para analizar por tanto si esto es lo que estaba ocurriendo, determinamos la expresión de caspasa-8 y analizamos en qué medida se encuentra implicada esta ruta de señalización en el daño renal por rabdomiólisis tras 48 horas. Se realizó mediante Western blot e inmunolocalización en muestras de corteza renal. La **Figura 64A-B** muestra como el grupo glicerol experimenta un aumento significativo tanto en su forma inmadura (procaspasa-8), como sus fragmentos activos (18 KDa y 10 KDa) en comparación con el grupo control. Cilastatina al ser administrada, reduce drásticamente esos niveles normalizando su expresión. La inmunolocalización corroboró asimismo estos resultados (**Figura 64C-D**).

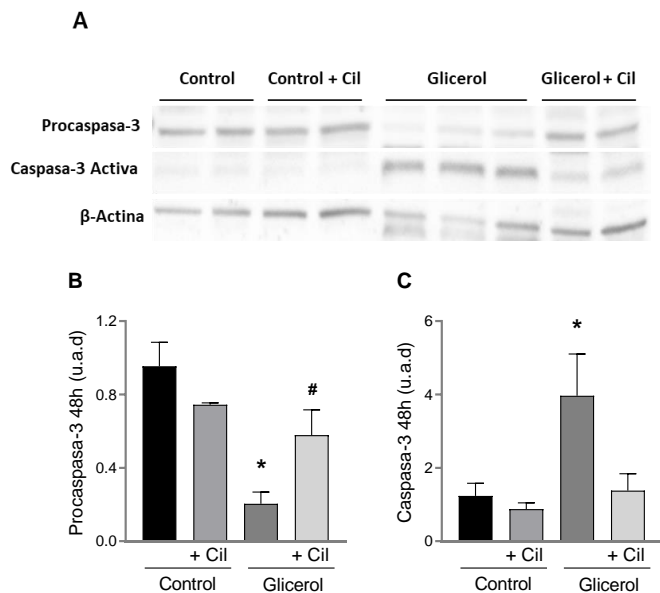


**Figura 64. Determinación de caspasa-8 en tejido renal.** **A)** Imágenes representativas de Western blot de fragmentos de caspasa-8 y  $\beta$ -Actina como control de carga, **B)** Cuantificación del densitometrado corregido por el control de carga, **C)** Imágenes representativas de la inmunolocalización de procaspasa-8, **D)** Cuantificación de la tinción. Magnificación 20X. El grupo glicerol presenta un aumento de todas sus formas de manera significativa respecto a los controles. El tratamiento con cilastatina reduce la activación de caspasa-8. Los datos están expresados como media  $\pm$  EEM,  $n = 6-10$  animales por grupo. \* $p \leq 0.01$  vs. todos los grupos. Cil: cilastatina; u.a.d.: unidad arbitraria de densitometrado.

### 2.5.3 EFECTO DE CILASTATINA SOBRE CASPASA-3

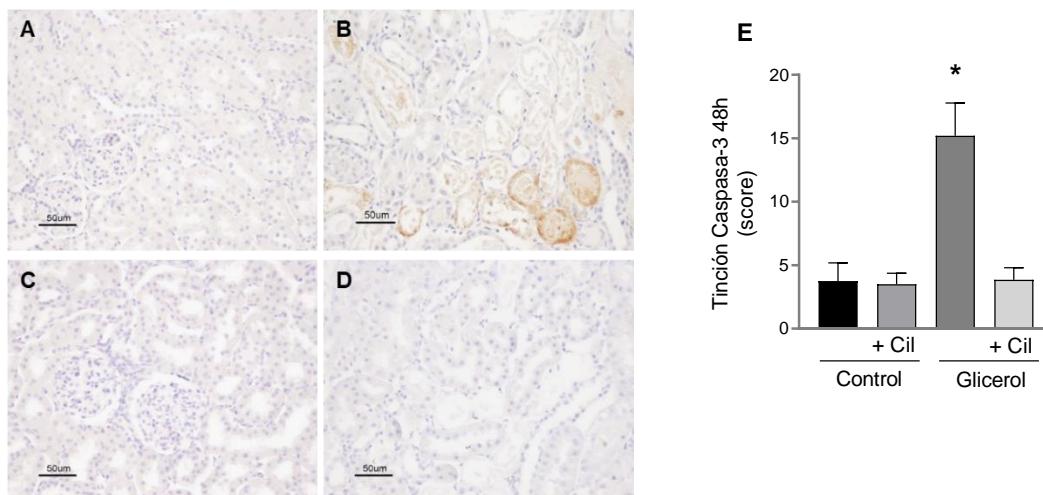
Como se ha comentado anteriormente, la caspasa-3 es la caspasa ejecutora en las dos vías apoptóticas activándose en último lugar. Por ello, tras la activación de la caspasa-9 y la caspasa-8 decidimos analizar el precursor de la caspasa-3 y su forma activa a las 48 horas del

daño. Mediante Western blot se cuantificó el nivel de proteína y como se muestra en la **Figura 65**, la procaspasa-3 en el grupo glicerol sufre una reducción significativa con respecto al control, mientras que la forma activa se incrementa. El tratamiento con cilastatina muestra como ésta es capaz de revertir los niveles aumentando el precursor y disminuyendo la forma activa de manera significativa.



**Figura 65. Determinación de caspasa-3 en tejido renal.** A) Imágenes representativas de Western blot de procaspasa-3 y caspasa-3 activa con  $\beta$ -Actina como control de carga. Cuantificación del densitometrado corregido por el control de carga: B) Procaspasa-3 y C) Caspasa-3 activa. El grupo glicerol presenta un aumento significativo en la forma activa mientras se reduce su precursor, en comparación a los controles. El tratamiento con cilastatina recupera los valores acercándolos a la normalidad. Los datos están expresados como media  $\pm$  EEM, n = 6-10 animales por grupo. \* $p \leq 0.02$ . vs todos los grupos; # $p \leq 0.02$  vs. Control. Cil: cilastatina; u.a.d.: unidad arbitraria de densitometrado.

Para conocer su patrón de expresión y confirmar los resultados anteriores, se realizó una inmunolocalización de caspasa-3. El grupo glicerol presenta una elevada expresión de proteína a nivel citoplasmático mayoritariamente y en menor medida nuclear (**Figura 66**). Cilastatina reduce completa y significativamente su expresión.

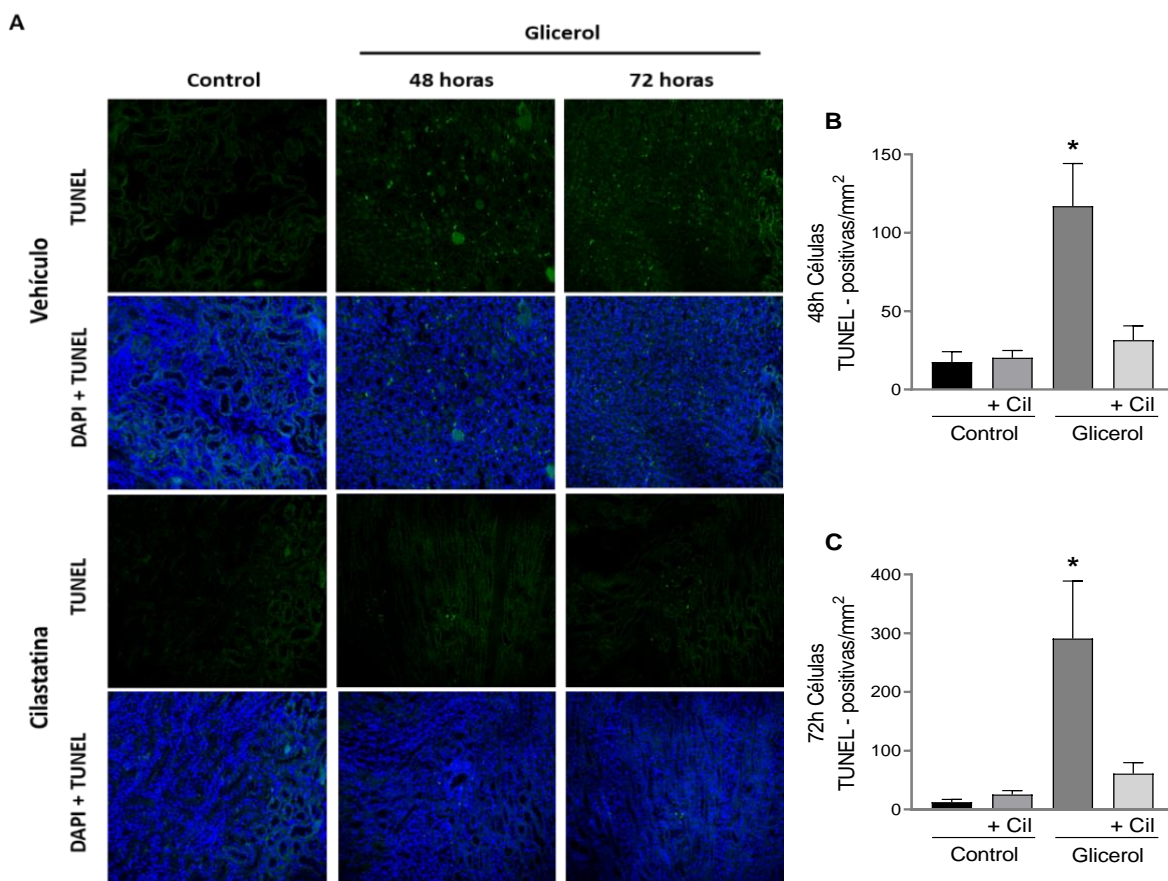


**Figura 66. Inmunolocalización de caspasa-3 en tejido renal.** Imágenes representativas de la inmunohistoquímica de caspasa-3, A) Control, B) Glicerol, C) Control + Cil y D) Glicerol + Cil. Magnificación 20X E) Cuantificación de la tinción de caspasa-3. El grupo glicerol presenta un aumento significativo en la expresión de proteína respecto al control. El tratamiento con cilastatina recupera los valores completamente hasta el nivel de los grupos control. Los datos están expresados como media  $\pm$  EEM, n = 6-10 animales por grupo. # $p \leq 0.0002$  vs. todos los grupos. Cil: cilastatina; u.a.d.: unidad arbitraria de densitometrado.

En todos los estudios realizados, la administración de cilastatina por sí sola no tuvo ningún efecto significativo.

## 2.6 CILASTATINA BLOQUEA LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN

Durante la apoptosis la caspasa-3 activa se transloca al núcleo donde activa una serie de nucleasas que fragmentan el ADN. Mediante la tinción de TUNEL sobre secciones de tejido renal, se estudió el número de células que presentan ADN fragmentado. En la **Figura 67A** se muestra como el grupo glicerol tanto a 48 horas como a 72 horas, presenta una elevada fragmentación nuclear en las células renales, que es más evidente a 72 horas. El tratamiento con cilastatina reduce esa fragmentación completamente alcanzando niveles similares a los encontrados en los grupos control.



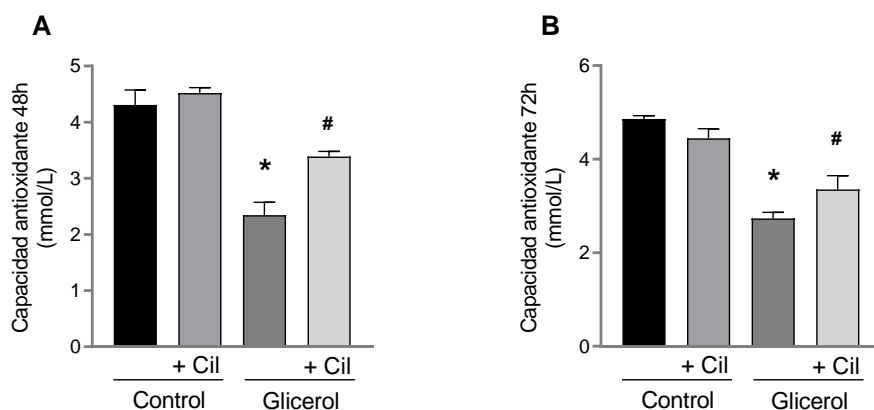
**Figura 67. Efecto de cilastatina sobre la fragmentación del ADN en tejido renal. A)** Imágenes representativas de la tinción de TUNEL, magnificación 20X. La fluorescencia verde pertenece a los núcleos TUNEL-positivos y la tinción azul (DAPI) indica núcleos celulares. Cuantificación de células TUNEL positivas por mm<sup>2</sup>: **B)** 48 horas y **C)** 72 horas. La rabdomiólisis induce una fuerte fragmentación de ADN como se observa en los grupos glicerol. El tratamiento con cilastatina reduce los valores significativamente. Los datos están expresados como media ± EEM, n = 6-10 animales por grupo. \*p ≤ 0.001 vs. todos los grupos. Cil: cilastatina.

## 2.7 EFECTO DE CILASTATINA EN LA APARICIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO

Como se ha comentado anteriormente, una característica del daño por mioglobina es la inducción importante de EO y la formación de ROS/RNS. Aunque es fundamental el equilibrio entre la formación de radicales libres y los antioxidantes que se encargan de reducirlos, en este síndrome se ven sobrepasados por la gran cantidad de mioglobina y derivados que se producen.

### 2.7.1 CILASTATINA RECUPERA LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La presencia de especies reactivas provoca un aumento de radicales libres provocando en el organismo un descenso de la capacidad antioxidante. Para estudiar cómo afecta la rabdomiólisis a este nivel, se realizó una determinación en orina de la capacidad antioxidante cuyos resultados se muestran en la **Figura 68**. En ambos tiempos se produce una disminución significativa en los grupos glicerol, recuperándose parcialmente con el tratamiento de cilastatina.



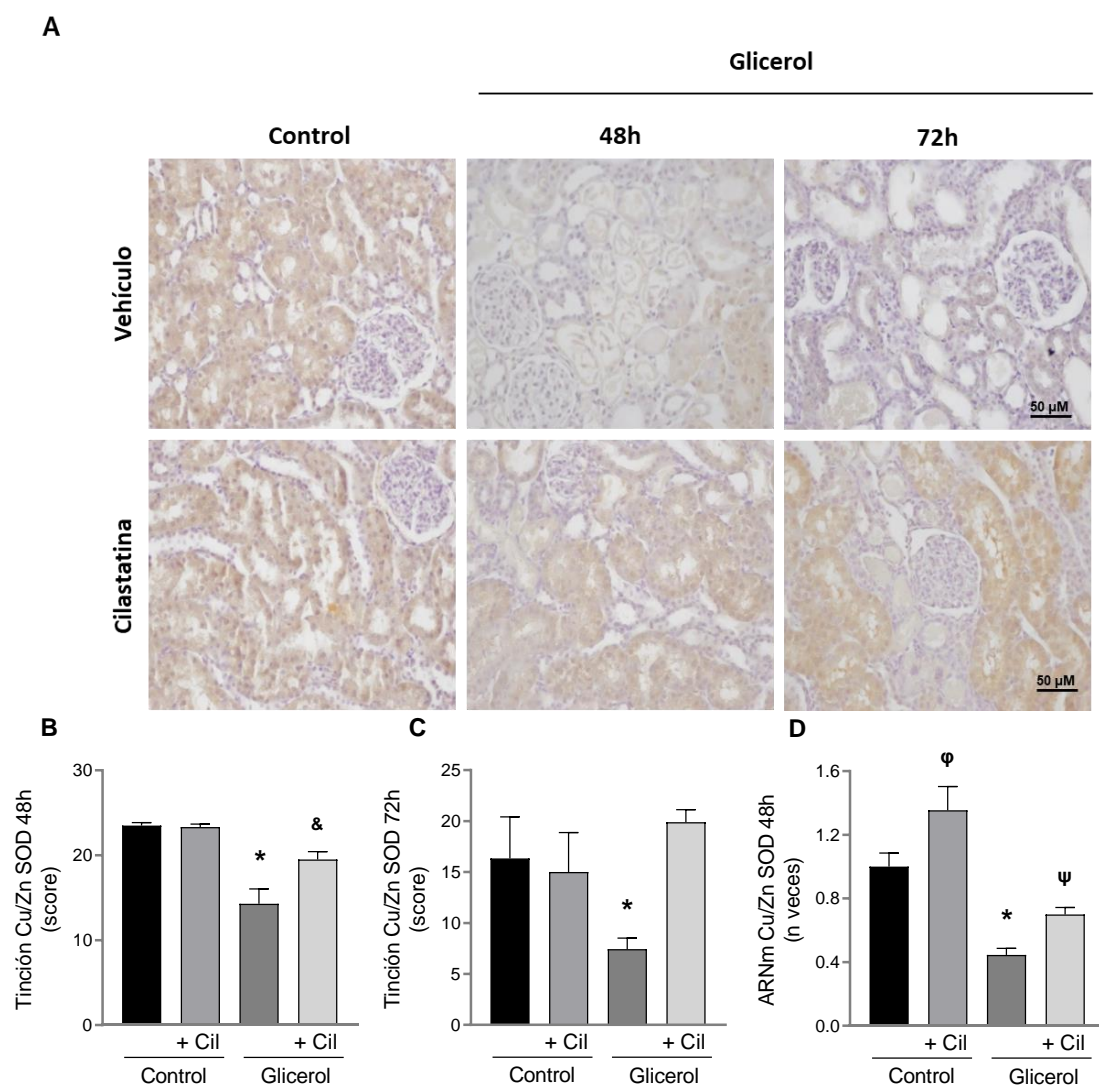
**Figura 68. Medida de la capacidad antioxidante a 48h y 72h.** Determinación en muestras de orina: **A)** 48 horas y **B)** 72 horas. La rabdomiólisis induce una fuerte reducción de la capacidad antioxidante total como se observa en los grupos glicerol. El tratamiento con cilastatina recupera significativamente los valores casi hasta el nivel de los grupos control. Los datos están expresados como media  $\pm$  EEM,  $n = 6-10$  animales por grupo. \* $p \leq 0.04$  vs. todos los grupos; # $p \leq 0.003$  vs. Control  $\pm$  Cil. Cil: cilastatina.

### 2.7.2 CILASTATINA IMPIDE LA DISMINUCIÓN DE LA Cu/Zn SOD

Como se ha demostrado, la capacidad antioxidante total está disminuida en la rabdomiólisis a la par que aumenta el EO. Para estudiar de manera más específica estos sistemas se analizó en profundidad uno de los más importantes que se encargan de procesar especies reactivas, la Cu/Zn SOD. Algunos estudios han mostrado que cantidades insuficientes de esta enzima da lugar a la producción de ROS, por lo que su actividad antioxidante es fundamental para prevenir el EO. Primero se realizó una inmunolocalización a 48 horas y 72 horas para ver el

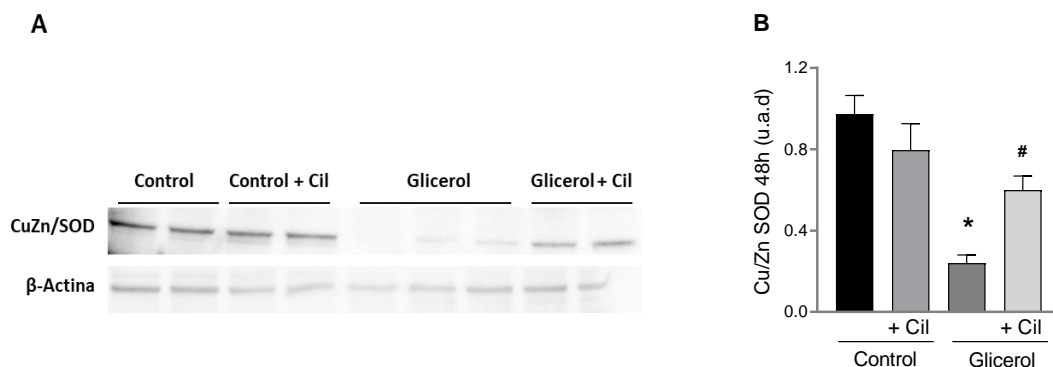
patrón de expresión. Como se observa en la **Figura 69A**, los grupos glicerol presentan una reducción muy importante de expresión, que es más drástica a 72 horas y que se recupera de manera significativa cuando se administra cilastatina.

Para ver su comportamiento a nivel transcripcional, se realizó una RT-PCR a 48 horas y se observó como el ARNm del grupo glicerol sufrió un descenso significativo en comparación con el grupo control (**Figura 69D**). La administración de cilastatina recupera parcialmente la síntesis de manera significativa. Es posible que cuando exista un gran daño la célula reduzca su síntesis para provocar la muerte celular y acotar la lesión.



**Figura 69. Efecto de cilastatina sobre la Cu/Zn SOD en tejido renal.** **A)** Inmunolocalización de la enzima a 48 horas y 72 horas. Magnificación 20X. Cuantificación de las tinciones: **B)** 48 horas y **C)** 72 horas. **D)** ARNm de la enzima a 48 horas. La rabdomiólisis induce una reducción de la Cu/Zn SOD en los grupos glicerol respecto a los grupos control, tanto a nivel de proteína como de mensajero. El tratamiento con cilastatina recupera de forma significativa los valores. Los datos están expresados como media  $\pm$  EEM,  $n = 6-10$  animales por grupo. \* $p \leq 0.04$ . vs todos los grupos; & $p \leq 0.04$  vs. Control;  $\phi p \leq 0.01$  vs. Control + Cil;  $\Psi p \leq 0.02$  vs. Control  $\pm$  Cil. Cil: cilastatina.

Para comprobar estos resultados se realizó además una cuantificación mediante Western blot. Como se puede ver en la **Figura 70**, también tiene lugar una disminución de la expresión de la Cu/Zn SOD en el grupo glicerol a 48 horas. Cuando se administra cilastatina, la síntesis tiende a recuperarse.

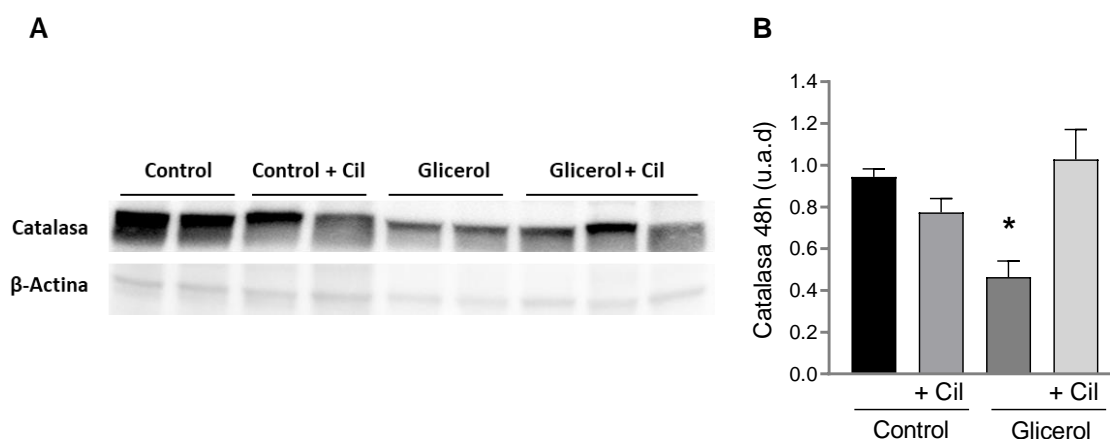


**Figura 70. Western blot de la Cu/Zn SOD en tejido renal.** **A)** Imagen representativa del Western blot a 48h de la Cu/Zn SOD y  $\beta$ -Actina como control de carga. **B)** Cuantificación del densitometrado de la enzima corregida por su control de carga. La rabdomiólisis induce una reducción de la Cu/Zn SOD en el grupo glicerol respecto al control. El tratamiento con cilastatina recupera la síntesis de proteína significativamente. Los datos están expresados como media  $\pm$  EEM,  $n = 6-10$  animales por grupo. \* $p \leq 0.01$  vs. todos los grupos; # $p \leq 0.01$  vs. Control. Cil: cilastatina.

### 2.7.3 CILASTATINA MEJORA LA SÍNTESIS DE CATALASA

La **Figura 71** muestra cómo la síntesis de proteína cuantificada mediante Western blot, se reduce significativamente en el grupo glicerol tras 48 horas del daño mientras que, al tratar con cilastatina la expresión de la enzima se recupera.

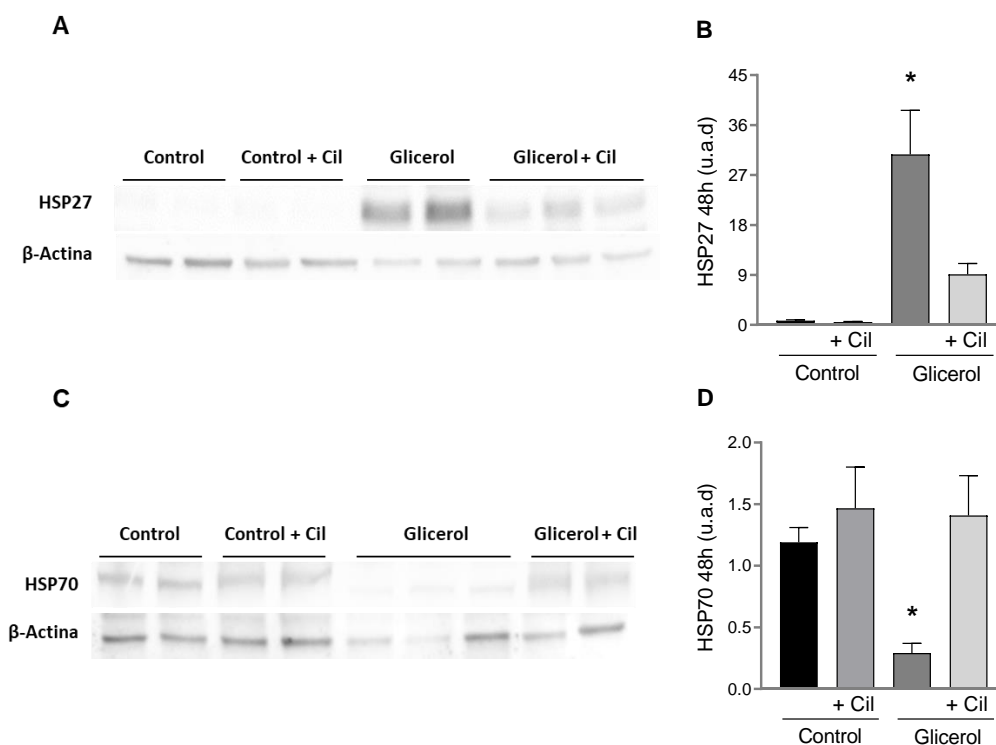
Por lo tanto, cilastatina es capaz de aumentar específicamente las enzimas y los sistemas antioxidantes celulares.



**Figura 71. Determinación de catalasa en tejido renal.** **A)** Imagen representativa del Western blot a 48h de la catalasa y  $\beta$ -Actina como control de carga. **B)** Cuantificación del densitometrado de la enzima corregida por su control de carga. La rabdomiólisis induce una reducción de la catalasa del grupo glicerol respecto al control. El tratamiento con cilastatina recupera de forma significativa la síntesis de proteína. Los datos están expresados como media  $\pm$  EEM,  $n = 6-10$  animales por grupo. \* $p \leq 0.03$  vs. todos los grupos. Cil: cilastatina.

## 2.7.4 EFECTO DE CILASTATINA EN LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO

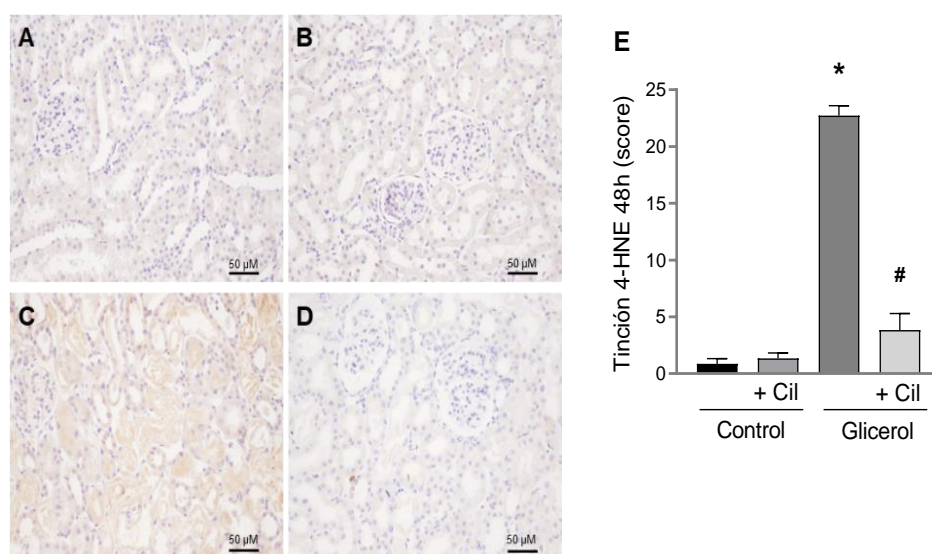
Como hemos visto en sepsis, cuando existe daño endotóxico se produce un incremento de estas proteínas que están presentes en pequeñas cantidades para reducir el daño oxidativo. Se estudiaron la HSP27 y HSP70 para comprobar qué ocurre con estas proteínas durante el FRA mioglobinúrico. Un aumento en su expresión está directamente relacionado con la protección de la célula frente el EO o apoptosis. Se realizaron Western blots para cuantificar los niveles de las proteínas a 48 horas en corteza renal. En la **Figura 72A-B**, se observa cómo HSP27 sufre un incremento significativo en el grupo glicerol respecto al control, que apenas presenta expresión. Por otro lado, HSP70 se reduce drásticamente (**Figura 72C-D**). Esto podría deberse a que cuando aparece el insulto se comporta como una alarmina, se sintetiza y es movilizada a la membrana actuando como ligando de TLR4, que posteriormente se internaliza. La administración de cilastatina recupera de manera significativa los valores de ambas proteínas.



**Figura 72. Determinación de proteínas de choque térmico en tejido renal.** A) y C) Imágenes representativas del Western blot a 48h de HSP27, HSP70 y β-Actina como control de carga. B) y D) Cuantificación del densitometrado de ambas proteínas corregidas por su control de carga. La rabdomiólisis induce la síntesis de HSP27 y la reducción de HSP70 en el grupo glicerol respecto a los grupos control. El tratamiento con cilastatina recupera los niveles de manera significativa. Los datos están expresados como media ± EEM, n = 6-10 animales por grupo. \*p ≤ 0.02 vs. todos los grupos. Cil: cilastatina.

## 2.8 CILASTATINA REDUCE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Tras comprobar la presencia de EO mediado por rabdomiólisis, decidimos estudiar el 4-HNE, un metabolito marcador de peroxidación lipídica mediante inmunohistoquímica y el efecto de cilastatina. En la **Figura 73** se muestra un incremento muy significativo en el grupo glicerol tras 48 horas de daño respecto al control, que apenas tienen tinción, en correlación a la disminución de los sistemas antioxidantes anteriormente analizados. El patrón que muestra es citoplasmático o nuclear, y también glomerular. La administración de cilastatina reduce su expresión radicalmente.



**Figura 73. Determinación de 4-HNE en tejido renal.** Imágenes representativas de la inmunolocalización a 48h de 4-HNE. Magnificación 20X. **A)** Control, **B)** Control + Cil, **C)** Glicerol y **D)** Glicerol + Cil. **E)** Cuantificación de la tinción de 4-HNE. La rabdomiólisis induce la síntesis de 4-HNE en el grupo glicerol y el tratamiento con cilastatina es capaz de reducir esos niveles de manera significativa. Los datos están expresados como media ± EEM, n = 6-10 animales por grupo. \*p < 0.0001 vs. todos los grupos; #p ≤ 0.02 vs. Control. Cil: cilastatina.

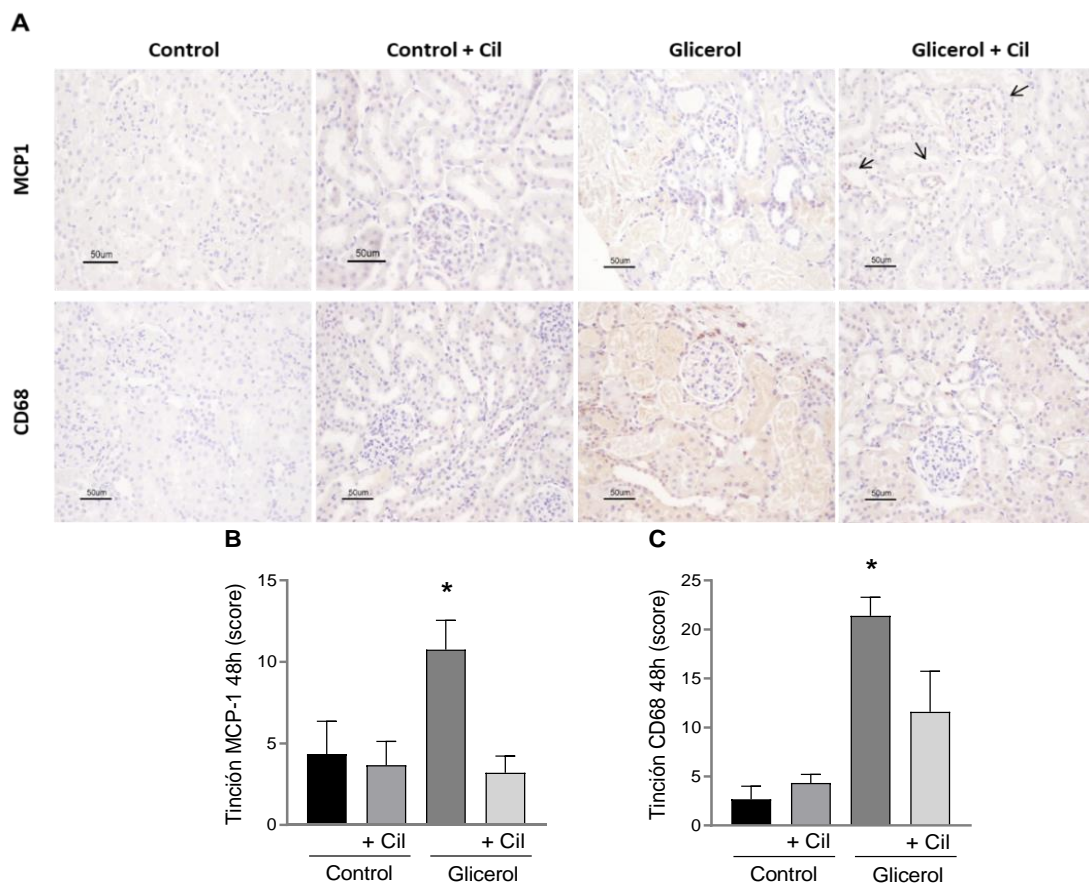
Todos estos resultados muestran la gran formación de radicales libres y de EO que se produce en el FRA inducido por mioglobina y que cilastatina es capaz de revertir significativamente este daño. Cilastatina por sí sola no tuvo ningún efecto en todos los parámetros estudiados, tanto a nivel de EO como en la peroxidación lipídica.

## 2.9 EFECTO DE CILASTATINA SOBRE LA INFLAMACIÓN

La inflamación es una respuesta específica frente a agresiones del medio como consecuencia de agentes inflamatorios y es una de las vías principales del daño renal durante la rabdomiólisis. Quisimos por tanto ver, si cilastatina era capaz de frenar esta vía de amplificación del daño renal.

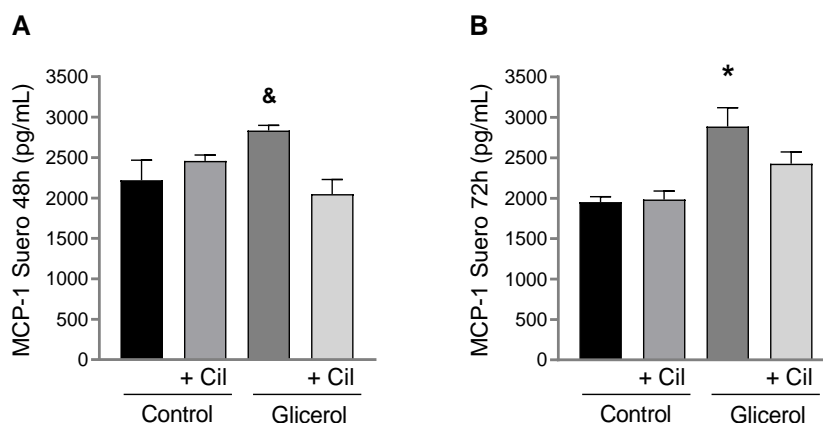
### 2.9.1 CILASTATINA DISMINUYE LA INFILTRACIÓN DE MACRÓFAGOS

Para el estudio de la inflamación en el FRA inducido por mioglobina, se analizaron los marcadores de macrófagos CD68 y MCP-1, una de las quimioquinas más importantes ya que regula la migración e infiltración de monocitos y macrófagos. Tiene un papel fundamental en la adhesión selectiva de monocitos, neutrófilos y linfocitos. Como se observa en la **Figura 74**, mediante inmunolocalización a 48 horas el grupo glicerol experimenta un gran aumento en la expresión de la quimioquina y del marcador específico, que tiene un patrón de tinción tanto nuclear como citosólico, además de aparecer en el glomérulo. Cilastatina reduce drásticamente los niveles aumentados de MCP-1 y menos, pero de forma significativa, CD68.



**Figura 74. Determinación de MCP-1 y CD68 en tejido renal. A)** Imágenes representativas de la inmunolocalización a 48h de MCP-1 (superior) y CD68 (inferior). Magnificación 20X. Control, **B)** y **C)** Cuantificaciones de la tinción de ambas proteínas. La rabdomiólisis induce la síntesis de ambas proteínas en el grupo glicerol, mientras que el tratamiento con cilastatina es capaz de reducirlo significativamente (flechas). Los datos están expresados como media  $\pm$  EEM, n = 6-10 animales por grupo. \*p  $\leq$  0.02 vs. todos los grupos. Cil: cilastatina.

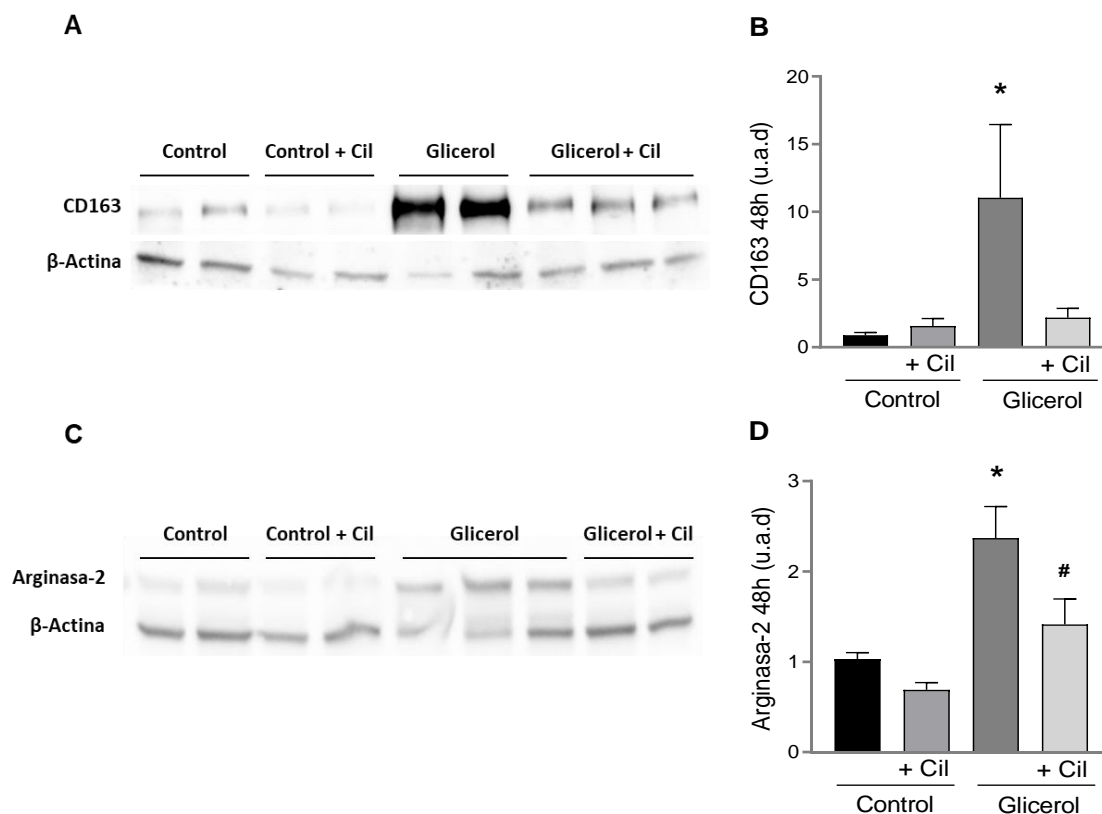
También se analizó en suero los niveles de MCP-1 tanto a las 48 horas como a las 72 (Figura 75), mostrando un incremento de los niveles tras la inducción del daño. El tratamiento con cilastatina es capaz de reducir esos niveles de forma significativa.



**Figura 75. Determinación sistémica de MCP-1 a 48h y 72h.** Medida en suero mediante arrays de los niveles de MCP1: A) 48h y B) 72h. Se incrementa en los grupos glicerol respecto a los grupos control, mientras que los animales tratados con cilastatina presentan una disminución significativa de esos niveles. Los datos están expresados como media  $\pm$  EEM, n = 6-10 animales por grupo. &p  $\leq$  0.02 vs. Control y Glicerol + Cil; \*p  $\leq$  0.05 vs. todos los grupos. Cil: cilastatina.

## 2.9.2 EFECTO DE CILASTATINA SOBRE MACRÓFAGOS M1/M2

Los macrófagos presentan distintos fenotipos: los *naive*, los proinflamatorios o M1 y los antiinflamatorios o M2. Durante el desarrollo del daño y según los estímulos, va a predominar uno u otro. Se ha demostrado que con el tiempo el perfil inflamatorio pasa a ser antiinflamatorio<sup>95,182</sup>. Como se ha observado anteriormente, CD68 está altamente expresado y para analizar la expresión específica de la polarización de macrófagos, se realizó una cuantificación de marcadores específicos de cada tipo. Para el estudio del fenotipo M2, se determinó la expresión de CD163, receptor *scavenger* de grupos hemo y la Arg-2 específica de fenotipo M1. En la Figura 76 se muestra la aparición de ambas proteínas medidas en corteza renal mediante Western blot. Se puede ver cómo ambas ven aumentada su expresión en grupos glicerol a 48 horas. El aumento del fenotipo M2 parece ser predominante frente al M1, lo que sugiere que durante el FRA mioglobinúrico este tipo de macrófagos ve aumentado sus niveles, posiblemente para tratar de reducir el gran daño provocado por mioglobina. El tratamiento con cilastatina reduce la síntesis de ambos marcadores de forma significativa.

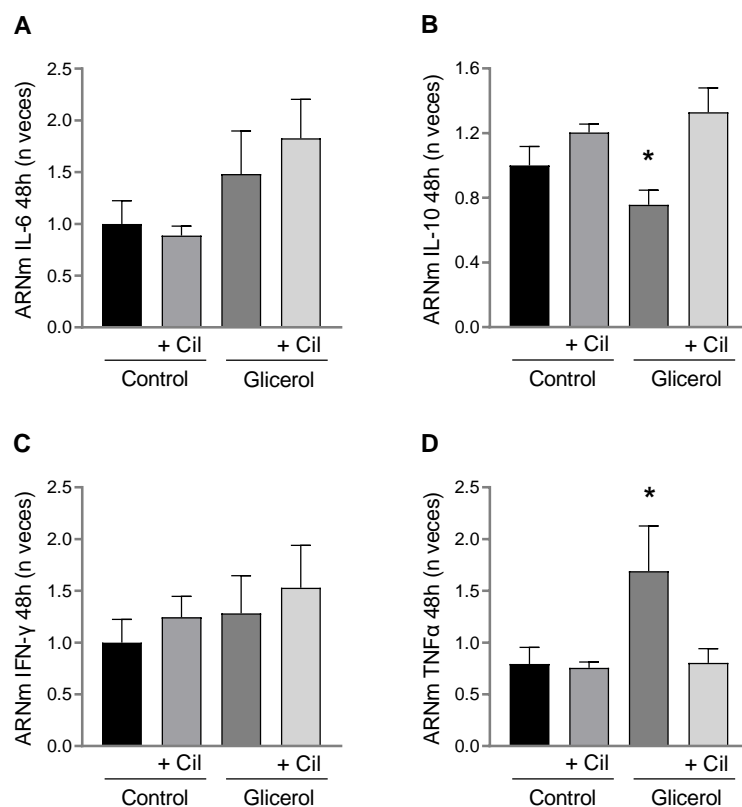


**Figura 76. Determinación fenotípica de macrófagos en tejido renal a 48h.** **A)** y **C)** Imágenes representativas de Western blot de CD163 (M2), Arg-2 (M1) y  $\beta$ -Actina como control de carga. **B)** y **D)** Cuantificación del densitometrado de ambas proteínas corregidas por su control de carga. Se incrementa la expresión de ambos fenotipos en los grupos glicerol respecto a los grupos control, siendo predominante el fenotipo M2 sobre M1. El tratamiento con cilastatina es capaz de reducir significativamente los niveles de ambos marcadores. Los datos están expresados como media  $\pm$  EEM,  $n = 6-10$  animales por grupo. \* $p \leq 0.04$  vs. todos los grupos; # $p \leq 0.04$  vs. Control + Cil. Cil: cilastatina.

### 2.9.3 EFECTO DE CILASTATINA SOBRE CITOQUINAS INFLAMATORIAS

Se estudió a nivel transcripcional la síntesis de algunas de las citoquinas más importantes que intervienen en el proceso inflamatorio inducido por mioglobina. Específicamente la IL-6 (citoquina proinflamatoria segregada por los macrófagos para estimular el crecimiento y diferenciación de linfocitos),  $TNF\alpha$  (segregada por células inmunes cuando existe un proceso inflamatorio), el  $INF-\gamma$  (muy importante en la regulación inmunitaria que participa en múltiples procesos y en distintos puntos de la activación del sistema inmune, siendo imprescindible en la respuesta ante patógenos) y la IL-10 (liberada por macrófagos activados y algunos linfocitos T, que tiende a reducir la inflamación al impedir que las células inmunitarias elaboren otras citoquinas). Como se puede ver en la **Figura 77**, la síntesis de IL-6 e  $INF-\gamma$  presenta un aumento en el grupo glicerol a las 48 horas, pero sin ser significativo, que no se reduce con cilastatina. Los niveles de IL-10 sí que presentan una reducción significativa en su síntesis de ARNm, mientras que  $TNF\alpha$  aumenta de manera muy importante. El tratamiento con

cilastatina devuelve los niveles alterados a valores cercanos a los encontrados en el grupo control.

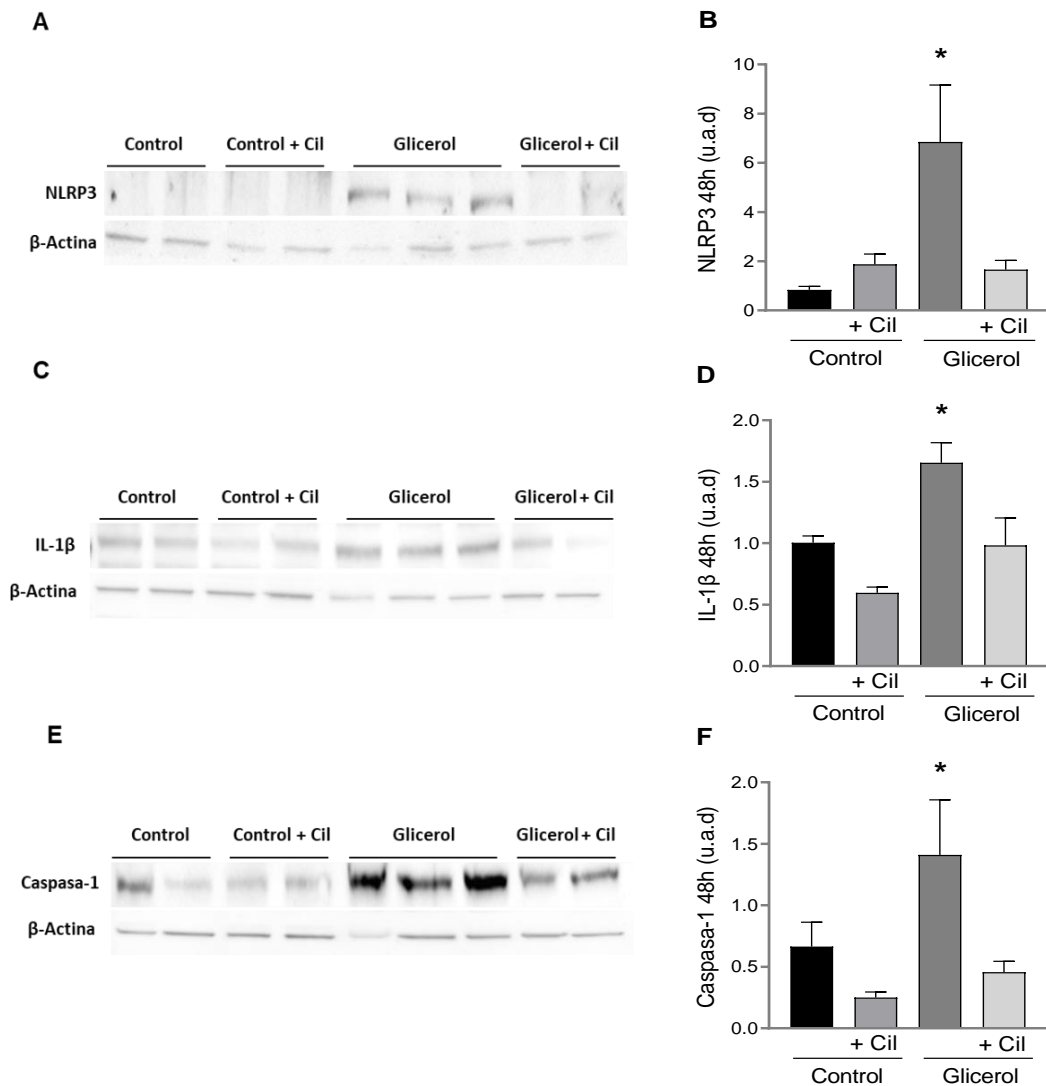


**Figura 77 Determinación de citoquinas inflamatorias en tejido renal a 48h.** En muestras de corteza renal mediante RT-PCR se analizó el ARNm de: **A)** IL-6, **B)** IL-10, **C)** IFN- $\gamma$  y **D)** TNF $\alpha$ . El grupo glicerol presenta un aumento en la síntesis de TNF $\alpha$  y una reducción de IL-10, que se recuperan significativamente con cilastatina. La IL-6 y el IFN- $\gamma$  parecen aumentar con el daño, pero no de manera significativa. Los datos están expresados como media  $\pm$  EEM, n = 6-10 animales por grupo. \* $p \leq 0.02$  vs. todos los grupos. Cil: cilastatina.

Así mismo, se midieron muchas otras citoquinas mediante arrays, pudiéndose consultar el perfil completo analizado en el **Anexo A**.

## 2.9.4 EFECTO DE CILASTATINA EN LA ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA

Ya se ha comentado la importancia de la activación del complejo multiproteico llamado inflammasoma en el resultado final de la síntesis y liberación de citoquinas como son la IL-1 $\beta$  y la IL-18, y la aparición de muerte celular por piroptosis por la acción de la caspasa-1. Para conocer su implicación en el FRA inducido por mioglobina, se estudiaron proteínas implicadas mediante Western blot en corteza renal. En la **Figura 78** se muestra la cuantificación de NLRP3, IL-1 $\beta$  y caspasa-1 a 48 horas. Como se puede ver, el grupo glicerol presenta un incremento significativo de todas las proteínas sobre todo el sensor citosólico NLRP3 (**Figura 78A**), que da lugar al ensamblaje del complejo del inflammasoma. El tratamiento con cilastatina reduce de manera significativa la expresión de todas las proteínas.

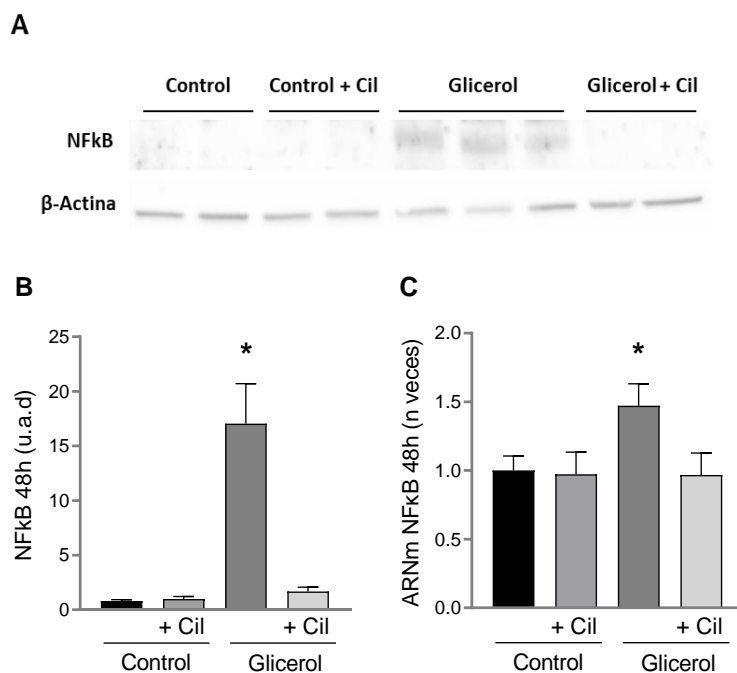


**Figura 78. Determinación de proteínas del inflammasoma en tejido renal a 48h.** Imágenes representativas de Western blot de las proteínas **A)** NLRP3, **C)** IL-1β, **E)** Caspasa-1 y β-Actina como control de carga. **B)** **D)** y **F)** Cuantificación del densitometrado respectivamente, corregido por su control de carga. Se observa un aumento en la expresión de todas las proteínas implicadas y una reducción significativa con el tratamiento con cilastatina. Los datos están expresados como media ± EEM, n = 6-10 animales por grupo. \*p ≤ 0.04 vs. todos los grupos. Cil: cilastatina.

### 2.9.5 CILASTATINA REDUCE LA EXPRESIÓN DE NFκB

Para comprobar si se producía la síntesis de NFκB mediada por la activación del inflammasoma y de los PRR, analizamos su expresión a nivel proteico mediante Western blot y a nivel transcripcional mediante RT-PCR en muestras de corteza renal a 48 horas. Como se muestra en la **Figura 79**, hay un incremento significativo en el grupo glicerol de la proteína, al

igual que su ARNm. La administración de cilastatina reduce completamente los valores a niveles similares a los presentados por el grupo control.



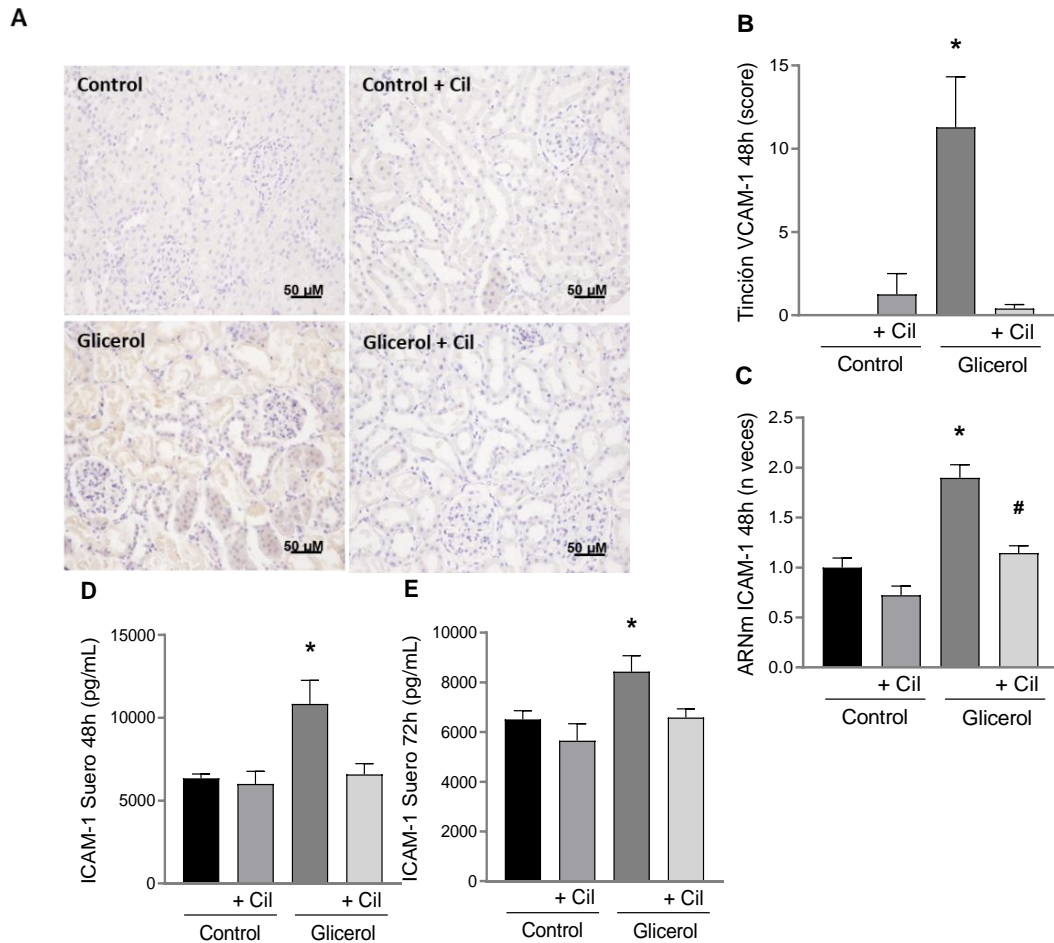
**Figura 79. Determinación NFκB en tejido renal a 48h.** A) Imágenes representativas de Western blot de NFκB y β-Actina como control de carga. B) Cuantificación del densitometrado corregido por su control de carga. C) ARNm de NFκB. Se observa un aumento en la síntesis de proteína y de mensajero en el grupo glicerol, y una reducción significativa con el tratamiento con cilastatina. Los datos están expresados como media ± EEM, n = 6-10 animales por grupo. \*p ≤ 0.04 vs. todos los grupos. Cil: cilastatina.

Con estos resultados, parece que cilastatina bloquea la activación del inflammasoma y reduce la síntesis de NFκB, disminuyendo la inflamación. Además, por sí misma no ejerce ningún efecto sobre los parámetros valorados.

## 2.10 EFECTO DE CILASTATINA SOBRE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

La adhesión de leucocitos se incrementa cuando un tejido sufre un proceso inflamatorio, por lo que el estudio de estas moléculas es clave para conocer qué efecto tiene cilastatina sobre la inflamación en este aspecto. Al igual que en el modelo de sepsis, se estudiaron dos moléculas importantes en proceso de adhesión celular, VCAM-1 e ICAM-1. Se realizó una inmunolocalización de VCAM-1, y se midieron los niveles transcripcionales y séricos para ICAM-1 (**Figura 80**). En todas las medidas hubo un aumento de las moléculas de adhesión que fueron reducidas significativamente con el tratamiento con cilastatina.

Cilastatina *per se* no ejerció ningún efecto sobre las determinaciones realizadas.

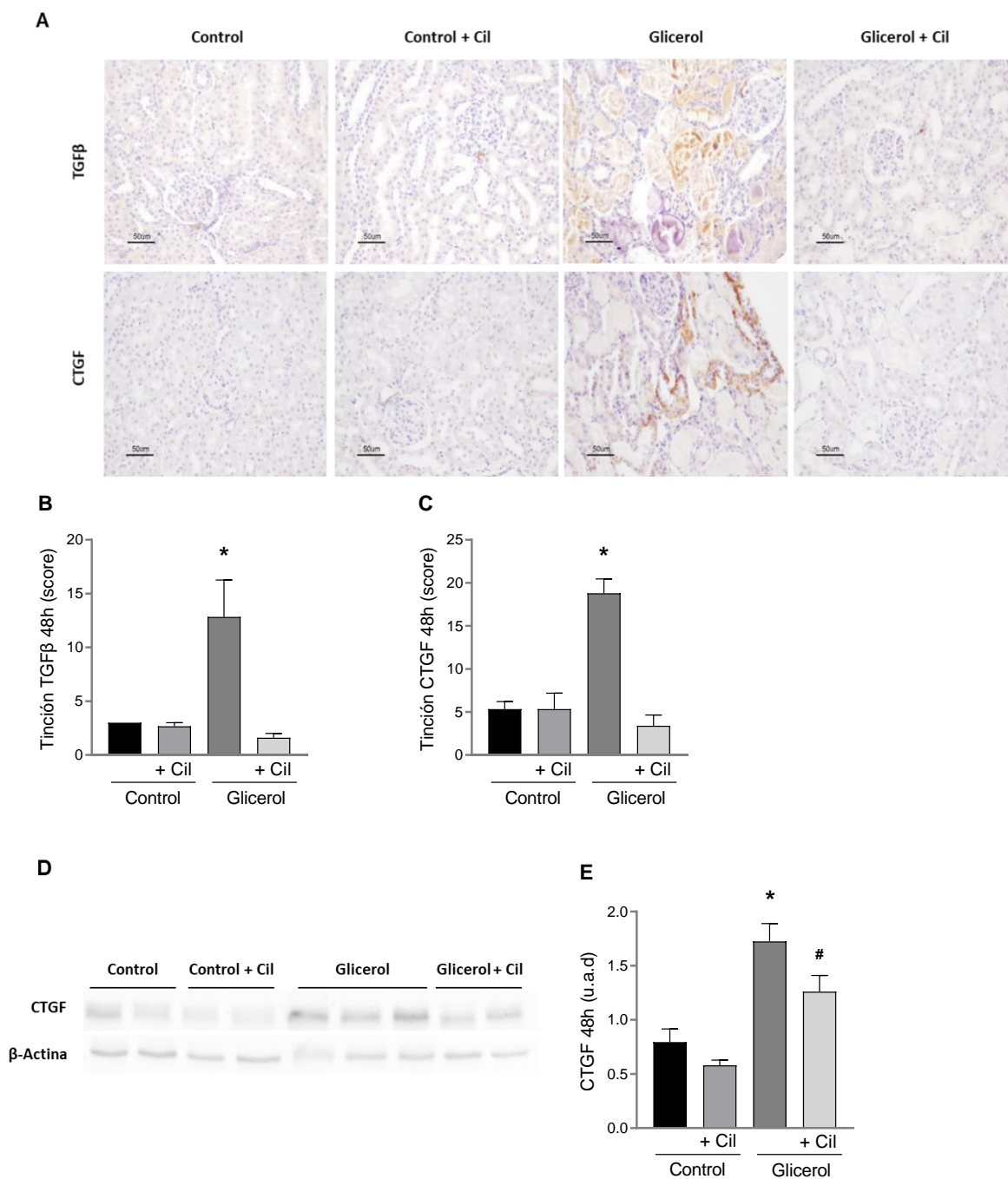


**Figura 80. Determinación de moléculas de adhesión en tejido renal. A)** Imágenes representativas de inmunolocalización de VCAM-1 a 48h. Magnificación 20X. **B)** Cuantificación de la tinción de VCAM-1. **C)** ARNm de ICAM-1 a 48h. **D)** y **E)** Medida en suero de ICAM-1 a 48h y 72h respectivamente. Se observa un aumento en la síntesis de ambas proteínas a todos los niveles estudiados en el grupo glicerol y una reducción significativa con el tratamiento de cilastatina. Los datos están expresados como media  $\pm$  EEM, n = 6-10 animales por grupo. \* $p \leq 0.03$  vs. todos los grupos; # $p \leq 0.01$  vs. Control  $\pm$  Cil. Cil: cilastatina.

## 2.11 EFECTO DE CILASTATINA SOBRE LA TEM Y FIBROSIS

### 2.11.1 CILASTATINA DISMINUYE LA EXPRESIÓN DE TGF $\beta$ Y CTFG

Para analizar la aparición de estas dos moléculas profibróticas, se realizó una inmunolocalización en secciones de tejido renal a 48 horas y se cuantificaron (**Figura 81**). La expresión de estas moléculas presenta un gran incremento en el grupo glicerol, mientras que el tratamiento con cilastatina lo reduce de manera significativa.



**Figura 81. Determinación de TGFβ y CTGF a 48h en tejido renal.** A) Imágenes representativas de inmunolocalización de TGFβ (superior) y CTGF (inferior) a 48h. Magnificación 20X. Cuantificación de las tinciones B) TGFβ y C) CTGF. D) Imagen representativa de Western blot de CTGF y β-Actina como control de carga. E) Cuantificación del densitometrado corregido por el control de carga. Se observa un aumento muy importante de ambas proteínas en el grupo glicerol y una reducción significativa con el tratamiento con cilastatina. Los datos están expresados como media ± EEM, n = 6-10 animales por grupo. \*p ≤ 0.02 vs. todos los grupos; #p ≤ 0.03 vs. Control ± Cil. Cil: cilastatina.

Se realizó un estudio mediante la tinción de Rojo Sirio para ver si existía un aumento en la formación de fibras de colágeno que pudieran evidenciar la presencia de fibrosis. Los resultados mostraron que no existían diferencias significativas entre los grupos (Figura 82), pero sí que parece existir una tendencia en la formación de fibrosis en los animales del grupo glicerol

superior a los grupos control. Al administrar cilastatina parece que esa tinción de fibras se reduce. Esto hace suponer que el corto tiempo empleado en el modelo, solo son 48 horas, no permitió el desarrollo de fibrosis, aunque sí indicios que sugieren que, a tiempos mayores, la rabdomiólisis podría provocar fibrosis, activación temprana de TGF $\beta$  y CTGF y quizás cilastatina fuera capaz de bloquear dichos procesos.

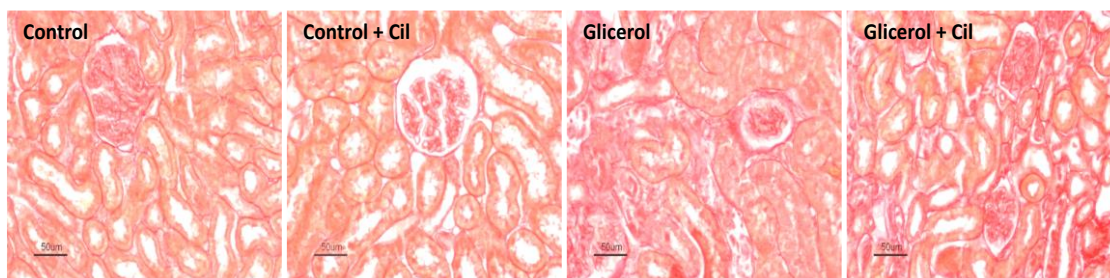


Figura 82. Tinción de Rojo Sirio a 48h. Imágenes representativas de colágeno. Magnificación 20X. Cil: cilastatina.

### 2.11.2 CILASTATINA BLOQUEA LA TRANSICION EPITELIO-MESÉNQUIMA

Dados los resultados anteriores en los cuales estaban incrementados los factores inductores de TEM, se estudiaron otras moléculas más específicas implicadas en el proceso como Wnt5 (Figura 83). Se cuantificó su expresión mediante Western blot en corteza renal y como se puede observar existe un incremento significativo con respecto al grupo control, que cilastatina fue capaz de revertir.

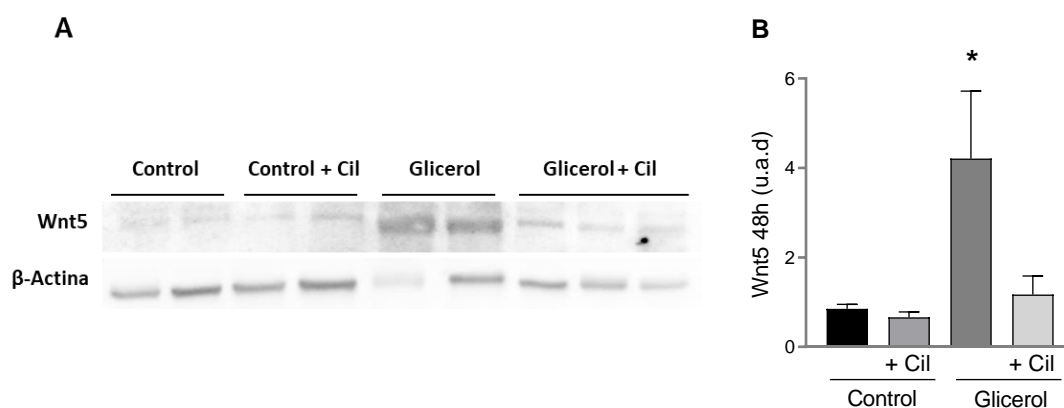
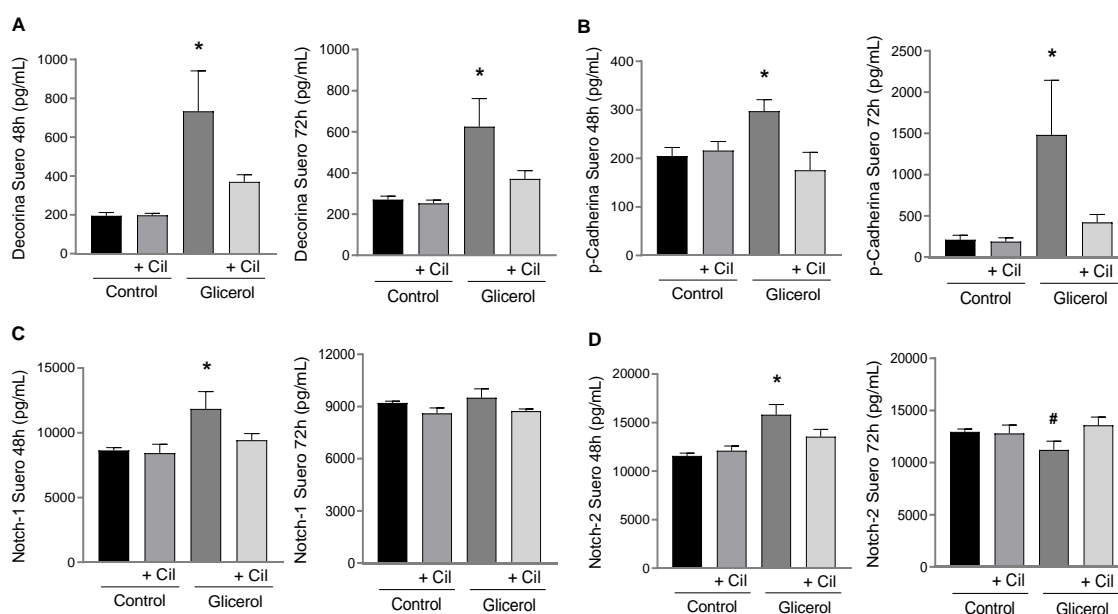


Figura 83. Determinación de Wnt5 a 48h en tejido renal. A) Imagen representativa de Western blot de Wnt5 y  $\beta$ -Actina como control de carga. B) Cuantificación del densitometrado corregido por el control de carga. Se observa un aumento muy importante en el grupo glicerol y una reducción significativa con el tratamiento con cilastatina. Los datos están expresados como media  $\pm$  EEM, n = 6-10 animales por grupo. \*p  $\leq$  0.02 vs. todos los grupos. Cil: cilastatina.

Además, se estudiaron los niveles séricos mediante arrays de proteínas implicadas en la activación de la vía, la adhesión y la producción de MEC (Figura 84) como la decorina (A), la p-cadherina (B), Notch-1 (C) y Notch-2 (D) en los dos modelos de daño.

Como se puede comprobar, en los animales con rabdomiólisis existe un incremento significativo de proteínas de MEC como la decorina para ambos tiempos, al igual que de adhesión celular como la p-cadherina. También la vía Notch parece incrementada de manera significativa a las 48 horas. La administración de cilastatina reduce significativamente los niveles total o parcialmente exceptuando la vía Notch a 72 horas.

El tratamiento con cilastatina *per se*, no tuvo ningún efecto sobre los parámetros estudiados.



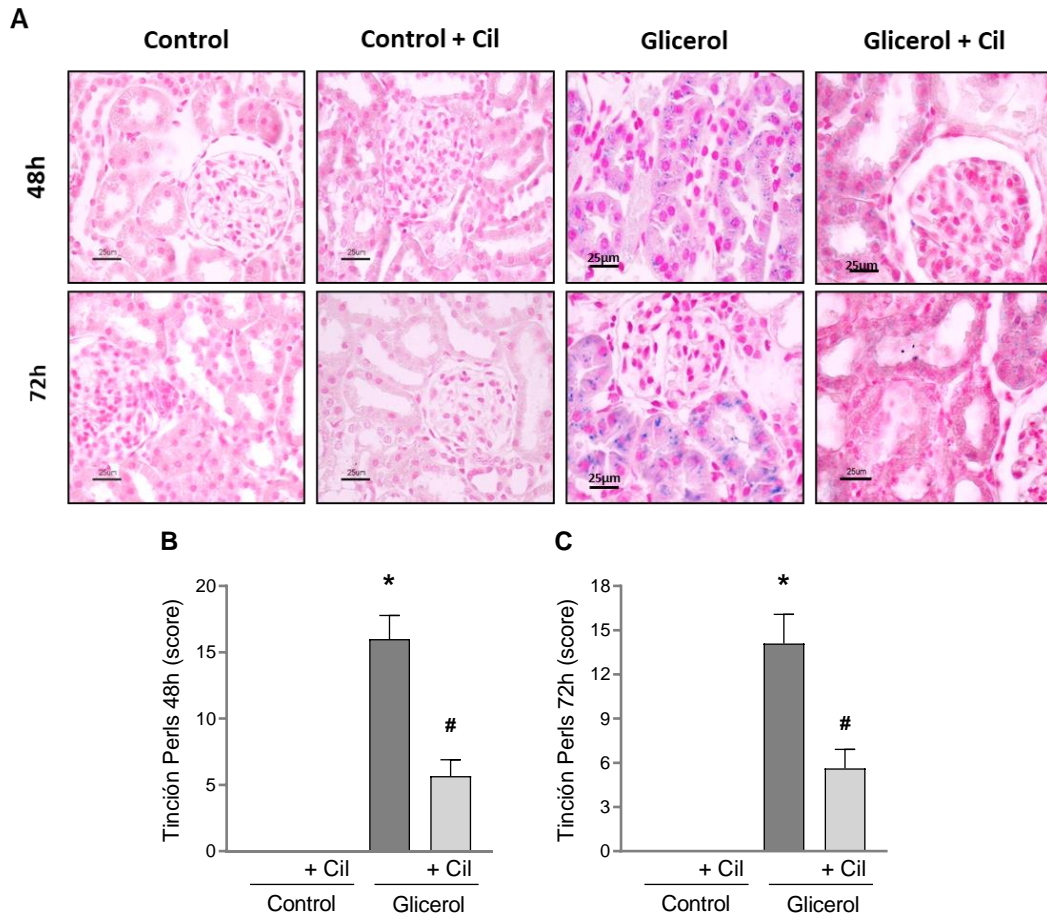
**Figura 84. Determinación de proteínas implicadas en la TEM en suero. A)** Decorina a 48h y 72h. **B)** p-Cadherina a 48h y 72h. **C)** Notch-1 a 48h y 72h. **D)** Notch-2 a 48h y 72h. Los grupos glicerol presentan un incremento de proteínas de MEC y de moléculas de adhesión, así como de la vía de activación de Notch. El tratamiento con cilastatina recupera los niveles significativamente salvo Notch-1 a 72 horas. Los datos están expresados como media  $\pm$  EEM, n = 6-10 animales por grupo. \* $p \leq 0.03$  vs. todos los grupos; # $p \leq 0.02$  vs. Glicerol + Cil. Cil: cilastatina.

## 2.12 EFECTO DE CILASTATINA SOBRE LA ACUMULACIÓN DE HIERRO

### 2.12.1 CILASTATINA REDUCE LA ACUMULACIÓN DE HIERRO

Una característica importante de la rabdomiólisis es la acumulación de hierro en las PTEC. Para estudiar el hierro férrico en el tejido renal se realizó una tinción de Perls a 48 y 72 horas (**Figura 85**). Como se puede observar, los grupos control no muestran acumulación de hierro mientras que en los animales con rabdomiólisis el incremento es significativo (tinción azul). En esta tinción el hierro que aparece teñido corresponde a aquel que no se encuentra

asociado a proteínas. El tratamiento con cilastatina reduce drásticamente esa acumulación de hierro férrico.

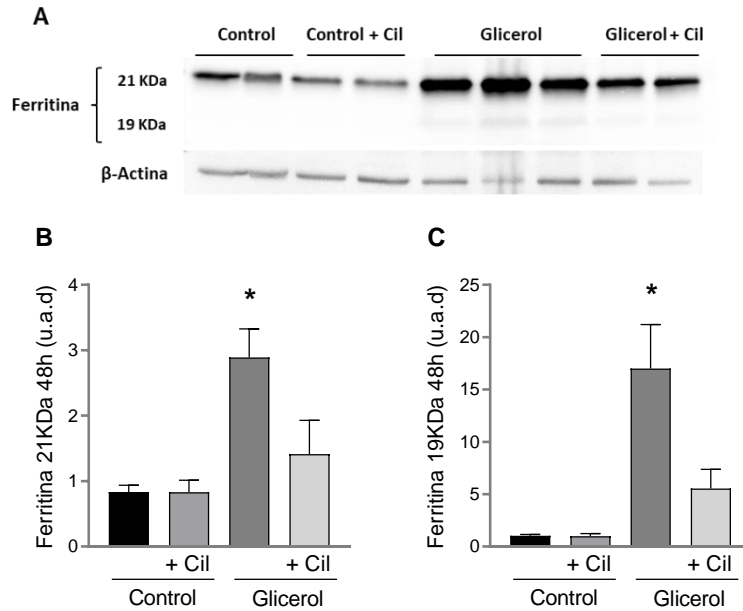


**Figura 85. Determinación de hierro férrico en tejido renal. A)** Inmunolocalización del hierro férrico mediante tinción de Perls (azul) a 48 y 72 horas. Magnificación 40X. Cuantificación del hierro a **B)** 48h y **C)** 72h. Se observa un aumento drástico en los grupos glicerol, y una reducción significativa con el tratamiento de cilastatina. Los datos están expresados como media  $\pm$  EEM,  $n = 6-10$  animales por grupo. \* $p \leq 0.0006$  vs. todos los grupos; # $p \leq 0.05$  vs. Control  $\pm$  Cil. Cil: cilastatina.

### 2.12.2 CILASTATINA REDUCE LA EXPRESIÓN DE FERRITINA

En la rabdomiólisis se produce una gran concentración de mioglobina y sus derivados, como el hierro, producto del metabolismo de su grupo hemo y que es almacenado en depósitos de ferritina. Por este motivo se analizó si durante el FRA inducido por mioglobina se producía algún cambio y si cilastatina tenía algún efecto sobre su expresión. Se determinó la cuantificación de las dos formas de la proteína (21 y 19 KDa) mediante Western blot de extractos de corteza renal. En la **Figura 86** se observa el gran incremento que se produce en animales del grupo glicerol respecto a los controles y como cilastatina es capaz de reducirlo

significativamente. Además, ésta por sí sola no tuvo efecto ninguno sobre la acumulación o almacenamiento de hierro.



**Figura 86. Determinación de ferritina en tejido renal.** **A)** Imagen representativa de Western blot de ferritina (21 KDa y 19 KDa) y  $\beta$ -Actina como control de carga. **B)** Cuantificación del densitometrado corregido por el control de carga. Se observa un aumento muy importante en el grupo glicerol, y una reducción significativa con el tratamiento con cilastatina. Los datos están expresados como media  $\pm$  EEM, n = 6-10 animales por grupo. \* $p \leq 0.01$  vs. todos los grupos. Cil: cilastatina.



# DISCUSIÓN



El FRA se define como un síndrome clínico secundario a múltiples causas y que se caracteriza por un rápido deterioro de la función renal y un descenso brusco de la TFG, alterando la homeostasis del organismo y la composición del medio interno<sup>17,25</sup>. Durante mucho tiempo, la falta de criterios diagnósticos o clínicos uniformes ha dificultado el estudio de la incidencia, prevalencia e importancia clínica del FRA<sup>183</sup>. Es más frecuente en el paciente crítico, siendo la incidencia más alta en UCI donde hasta el 67% de los pacientes se verán afectados por un FRA. La mortalidad en estos casos pasa de un 27% a un 60% si existen patologías previas y hasta el 80% si existe SDMO<sup>19,23,24,26-28</sup>. Los asociados a sepsis, postoperatorios o toxicidad directa por fármacos nefrotóxicos son los más frecuentes<sup>184</sup>.

A pesar de que cada vez se tiene más conocimiento sobre el FRA, el tratamiento apenas se ha modificado<sup>34</sup>. Actualmente no hay tratamiento farmacológico específico para prevenir y tratar el FRA, por lo que su manejo va encaminado hacia técnicas de soporte y a eliminar la causa que lo origina<sup>30,38</sup>. Afecta a más de 13 millones de personas y es responsable de 2 millones de muertes en todo el mundo cada año<sup>30,34</sup>, por lo que la búsqueda de nuevas estrategias de nefroprotección se hace imprescindible.

Para prevenir el FRA endotóxico en los modelos realizados en esta tesis, utilizamos cilastatina como novedosa alternativa terapéutica. Cilastatina se sintetizó inicialmente para inhibir de manera competitiva a la DHP-I localizada en el borde en cepillo de las PTEC e impedir la degradación del anillo  $\beta$ -lactámico del imipenem. De esta forma, el antibiótico aumenta así su eficacia terapéutica y se inhibe su toxicidad al reducir su entrada en la célula<sup>117,185,187</sup>. Cilastatina tiene como ventaja que lleva utilizándose en la clínica humana combinada con el imipenem desde hace más de 30 años, sin presentar efectos secundarios<sup>122,126</sup>.

Nuestro laboratorio lleva años trabajando en la búsqueda de dianas terapéuticas frente a la toxicidad producida por fármacos nefrotóxicos utilizados comúnmente en clínica, con las limitaciones que eso conlleva como la no interferencia en su actividad terapéutica, razón por la que a día de hoy todavía no hay ningún fármaco que proteja el riñón a nivel clínico. El problema que presentan la mayoría de estos fármacos es que dañan el riñón, por lo que su administración se ve limitada a reducir su dosis o suspender el tratamiento. Evidencias previas de nuestro grupo confirman que cilastatina, tanto a nivel *in vitro* como *in vivo*, es capaz de proteger el riñón frente a agresiones de tóxicos que no son sustrato de la DHP-I, como la CsA, vancomicina, gentamicina o cisplatino<sup>148,160,161,165,176</sup>. Un metaanálisis también realizado por nuestro laboratorio con todos los datos que había sobre cilastatina o I/C y su interacción con CsA, mostró que I/C reducía un 43% los niveles de creatinina en suero y un 76% el riesgo de FRA causado por CsA<sup>155</sup>. Esto nos llevó a pensar que esa acción nefroprotectora no era debida a su

papel inhibidor de la enzima sino más bien a su interacción con ella y con la región de la membrana a la que se encuentra anclada, las BDC. La DHP-I está unida de manera covalente a un residuo GPI localizado en ellas, que son dominios ricos en colesterol e implicados en numerosos procesos de señalización y transducción de señales<sup>133,137-140</sup>.

Experimentos previos del grupo demostraron que parte de la acción protectora de cilastatina era debido a la menor entrada de los nefrotóxicos al interior celular<sup>148,159,165,176,177,186</sup>. Ello es debido al bloqueo de la internalización de las BDC que afectaba así mismo a la señalización de la vía extrínseca de la apoptosis, donde para que se produzca es necesaria la internalización del complejo Fas/FasL. Cilastatina impide la entrada de los nefrotóxicos y de la señalización de muerte. Ante estos resultados planteamos la hipótesis que se ha desarrollado en esta tesis, ¿es cilastatina un protector universal o simplemente es un protector frente a FRA inducido por tóxicos? Por ello, en esta tesis hemos estudiado si el bloqueo de las BDC y la interferencia con receptores localizados en las mismas mediante cilastatina podría ser útil en el tratamiento de otros FRA no producidos por fármacos tóxicos protegiendo a las PTEC de la muerte celular, la inflamación y el EO.

El FRA parenquimatoso de origen endotóxico incluye a la sepsis y la rabiomíolisis debido a que en estas patologías el daño renal se produce a través de moléculas derivadas de los mismos y que se comportan como endotoxinas, como el LPS y la mioglobina. Son síndromes complejos, con una fisiopatología que cada vez es más conocida donde la VC renal, el incremento de la respuesta inflamatoria, la obstrucción tubular, la citotoxicidad directa y la apoptosis están directamente implicados como mecanismos de daño renal.

Durante mucho tiempo se pensó que cada agresión renal daba lugar a un tipo de FRA, pero tras la eliminación del insulto el daño permanecía. Estudios posteriores determinaron que independientemente del tipo de agresión, las fases del FRA son comunes y que las diferentes causas que activan los mecanismos fisiopatológicos comparten una vía final común<sup>184</sup>. En nuestro caso, ambos síndromes parecen compartir un mismo desencadenante como es la activación de vías de señalización ligadas a receptores localizados en las BDC que llevan en última instancia a la muerte celular. El túbulo proximal al reabsorber casi el 80% de todo lo filtrado se encuentra en contacto continuo con cualquier tóxico presente en la sangre<sup>34</sup>, además, las características inmunológicas propias de las PTEC y la posibilidad de comportarse como APC, las hace más susceptibles al daño siendo las primeras afectadas ante la llegada del insulto<sup>7</sup>.

## A. FRA INDUCIDO POR SEPSIS

La sepsis actualmente es definida como un síndrome clínico potencialmente mortal caracterizado por una disfunción orgánica causada por una respuesta descontrolada del hospedador a una infección<sup>45-48</sup>. La incidencia real es desconocida ya que depende de los distintos criterios utilizados en cada situación, pero se sospecha que su impacto es mucho mayor<sup>50</sup>. Aunque durante estas dos últimas décadas se ha avanzado en los procedimientos clínicos ayudando a mejorar el reconocimiento y tratamiento de la sepsis, sigue permaneciendo como una de las principales causas de muerte a nivel global<sup>45</sup>. El FRA es una de las complicaciones más graves de la sepsis desarrollándose de forma precoz una vez que aparece. Hasta un 60% de pacientes con sepsis desarrollará un FRA<sup>60</sup>, con una mortalidad que puede llegar al 70% si se dan ambas circunstancias. Por este motivo se ha hecho de la sepsis una prioridad de salud global, pasando a estar en el punto de mira de la investigación biomédica<sup>46,50,64</sup>. La fisiopatología del FRA séptico es muy compleja e implica inflamación, EO, disfunción microvascular y amplificación del daño a través de la liberación de citoquinas por las células tubulares.

Para estudiar y entender mejor el síndrome séptico en sus distintos niveles, es importante contar con un modelo animal adecuado y completo que reproduzca el curso clínico de la enfermedad para poder obtener resultados fiables y reproducibles. Por ello, para el estudio de la sepsis se eligió el modelo CLP en rata que provoca una alteración de la barrera protectora endógena del animal. Es un modelo ampliamente utilizado para el estudio de la fisiopatología de la sepsis y está perfectamente descrito en la literatura, siendo el que mejor mimetiza la complejidad de la enfermedad en humanos e induce un escenario más agresivo. Es un proceso sencillo y de naturaleza polimicrobiana, con un foco infeccioso localizado capaz de producir una respuesta inmune exacerbada e inducir perfiles de secreción de citoquinas similares a la sepsis humana. Otro de los modelos más utilizados en investigación es la inducción de sepsis mediante la administración de LPS, pero se descartó debido a que éste no reproduce la intensidad y progresión del shock séptico, aunque tiene la ventaja de una alta reproducibilidad, sobre todo en la respuesta inflamatoria provocada ya que se puede lograr en pocas horas<sup>58,179</sup>. Además, la administración de LPS en ratas lleva a la acumulación de endotoxina en los túbulos proximales sin captación en los distales<sup>183</sup>.

## A.1 CILASTATINA MEJORA LA FUNCIÓN RENAL Y EL DAÑO TISULAR

Tras la inducción de la sepsis los animales sufrieron una pérdida de peso significativa, así como una pérdida de la función renal con aumento de los niveles séricos de creatinina, BUN y una reducción en la TFG. La mayoría de los parámetros bioquímicos sanguíneos se ven alterados, destacando un aumento de la AST, urea, calcio y potasio, y una disminución del fosforo, colesterol y albumina. Características también del daño renal se observan por el incremento en la proteinuria y la reducción de la diuresis, así como de los niveles de potasio en orina. Otros parámetros alterados que nos dan idea de la caída de función renal son la disminución en la  $EFNa^+$  y el aumento en el  $ClH_2O$ . Estos resultados confirman lo obtenido en otros estudios utilizando el mismo modelo de sepsis. La sepsis se caracteriza por una alteración en los parámetros hematológicos y como pudimos comprobar, los animales sépticos presentaban una reducción de leucocitos y plaquetas, propias del estado inmunosupresor que tiene lugar en fases posteriores a la fase inflamatoria inicial<sup>187-189</sup>. En la sepsis grave, tiene lugar un aumento de la apoptosis de leucocitos llevando a una depleción con la pérdida de función reguladora. Debido a la demanda de leucocitos se produce un aumento en el número de células LUC, que junto con el aumento de las transaminasas confirman la existencia de infección<sup>190</sup>.

A nivel histológico se observaron alteraciones como dilatación tubular, vacuolización, *bebbling*, congestión y hemorragia glomerular, y formación de depósitos proteicos que obstruyen la luz tubular. También hubo un aumento en la infiltración leucocitaria y pérdida del borde en cepillo típico de las PTEC. La sepsis provoca principalmente daño en el túbulo proximal como se pudo comprobar con el incremento en la expresión del biomarcador de daño renal, KIM-1, que aparece de forma precoz cuando existe una agresión, corroborando así los datos bioquímicos y morfológicos obtenidos y que apoyan los estudios realizados por otros autores<sup>191</sup>.

Cilastatina fue capaz de recuperar los parámetros de función renal, así como el resto de los parámetros bioquímicos y hematológicos. A nivel histológico se mostró una reducción del daño renal, se mantuvo una estructura tisular conservada con una reducción de la infiltración celular y de la expresión del biomarcador de daño renal KIM-1 hasta valores normales. Otros estudios han mostrado resultados parecidos en la protección del daño renal endotoxémico. Específicamente el ácido telúrico, un potente oxidante, fue capaz de mejorar la función renal corroborándolo a nivel histológico, manteniendo la morfología renal y con la reducción de KIM-1 como muestran los hallazgos de *Mohamed AF y col.*<sup>192</sup>.

## A.2 CILASTATINA REDUCE LA MUERTE CELULAR

Aunque las vías apoptóticas confluyen en un resultado común, cuentan con mediadores diferentes y pueden activarse a la vez o de manera independiente. Mientras que la vía intrínseca es dependiente de fenómenos que tienen lugar en la mitocondria y que llevan a activar la caspasa-9 y la caspasa-3, la extrínseca depende de la activación de receptores de muerte como Fas, presentes en la membrana plasmática que llevan a la activación de caspasa-8 y finalmente caspasa-3.

Si por algo se caracteriza la sepsis es por el daño mitocondrial que se produce llevando a la apoptosis. Se sabe que se produce una hipovolemia que ocasiona una menor llegada de oxígeno al tejido renal provocando un fallo en la utilización del ATP y como consecuencia un daño mitocondrial y elevación de ROS. Para corroborar los datos obtenidos por varios autores<sup>53,193-195</sup>, estudiamos estos mediadores y como resultado obtuvimos un aumento del ratio Bax/Bcl-2, indicando una baja resistencia de las células a estímulos apoptóticos, al igual que se produjo un incremento en la caspasa-9 iniciadora del proceso. Esta activación potencia la generación de moléculas que llevan a la vía extrínseca de apoptosis, mediada por receptores de muerte y sus ligandos, como el complejo Fas/FasL en las BDC. Hemos podido comprobar cómo se produce un incremento en estas proteínas tanto del receptor Fas como de su ligando y de la caspasa-8 iniciadora de esta vía. La caspasa-3 es la ejecutora final de la apoptosis y común a las dos rutas, y se ha comprobado que también presenta un incremento en su expresión. Cuando esta se traslada al núcleo activa nucleasas que rompen el ADN siguiendo con el proceso apoptótico, aumentando el número de células TUNEL-positivas. Todos estos resultados corroboran lo obtenido por otros autores sobre modelos de FRA inducido por sepsis<sup>195-197</sup>. *Hotchkiss RS y col.* demostraron en sueros de pacientes un alto grado de depleción de linfocitos por muerte celular, que ratificaba el incremento de apoptosis en tejido durante la sepsis<sup>198</sup>.

Cilastatina fue capaz de bloquear la activación de la apoptosis tanto a nivel mitocondrial como a través del complejo Fas/FasL, impidiendo la activación de la caspasa-9 y 8 y la ejecutora final caspasa-3, reduciendo así la fragmentación del ADN. Todos los mediadores estudiados redujeron sus niveles de forma significativa hacia valores similares a los control. Estudios similares de inducción de sepsis sobre roedores utilizando moléculas bloqueantes de caspasas, apoyan nuestros resultados ya que producían una mejora y aumento de la supervivencia. *Matsuda N. y col.* utilizaron siARN de caspasa-8 y 3 obteniendo una protección frente a sepsis polimicrobiana por reducción de la apoptosis de células endoteliales vasculares<sup>56</sup>. *Hotchkiss RS y col.* utilizando dos bloqueantes de muerte celular, el z-VAD y Ig Bcl-2, y *Weber P.*

y *col.* mediante VX-166 en modelos CLP, obtuvieron como resultado una disminución de la apoptosis mejorando la supervivencia<sup>199,200</sup>.

### A.3 CILASTATINA REDUCE EL ESTRÉS OXIDATIVO

Como se ha comentado, durante la sepsis se produce un incremento de radicales libres que son clave en el FRA. Hay una pérdida del equilibrio redox que dan lugar a ROS y que se relacionan con la inflamación y muerte celular. Para regular este aumento y evitar el EO, tiene que existir un balance entre la apoptosis y los sistemas antioxidantes. Existe una pérdida de funcionalidad de estos sistemas que impiden eliminar los reactivos intermedios o reparar el daño resultante<sup>60,70</sup>. Enzimas implicadas e importantes por su participación en estos procesos son la Cu/Zn SOD y la catalasa<sup>201</sup>. Como consecuencia del EO, se produce un aumento de peroxidación lipídica a nivel de membrana plasmática aumentando la concentración de los metabolitos secundarios que se desprenden al citoplasma. Asociadas al daño endotóxico e inducidas rápidamente como respuesta a situaciones de estrés para prevenir el EO, se encuentran las HSPs. Éstas son proteínas altamente conservadas y que protegen las estructuras celulares de cambios irreversibles. Parece que su síntesis está asociada con un descenso del daño a nivel oxidativo en el túbulo proximal<sup>202</sup>. Nuestros resultados muestran como disminuye la capacidad antioxidante total y las concentraciones de las enzimas Cu/Zn SOD y catalasa, tanto a nivel proteico como génico. Es posible que la célula deje de sintetizar estas enzimas para provocar la muerte de la célula por agotamiento antioxidante y así acotar la lesión. Así mismo, encontramos un incremento en los niveles de metabolitos como el 4-HNE y el MDA, marcadores de peroxidación lipídica. Además, valoramos la expresión de varias proteínas HSP como HSP32, HSP27 y HSP70, mostrando un aumento significativo. Todos estos resultados confirman lo obtenido en estudios similares de FRA y sepsis<sup>203-205</sup>. Algo importante es que HSP70 actúa como alarma siendo ligando de TLR4 y activando otras vías de señalización implicadas en la inflamación y en la eliminación de patógenos<sup>206</sup>.

La administración de cilastatina fue capaz de reducir el EO y la peroxidación lipídica, recuperando los sistemas antioxidantes y por tanto disminuyendo las proteínas HSPs, ya que se reduce el daño endotóxico y el estrés al que se ven sometidas. Así mismo, los metabolitos producidos por la peroxidación lipídica se ven reducidos hasta valores similares a los encontrados en los animales control. Estudios similares utilizando otras sustancias que ejercerían el mismo efecto que cilastatina, corroboran nuestros resultados: *Chen H. y col.*<sup>63</sup> mediante sulfuro de hidrógeno y *Xia S. y col.*<sup>65</sup> con honokiol, un polifenol natural, demostraron atenuación del daño renal asociado a sepsis vía inhibición del EO y la inflamación. Varios estudios

con dioscina, una saponina esteroide presente en las raíces de algunas especies, han demostrado que es capaz de aliviar el daño renal inflamatorio inducido por LPS vía bajarregulación de MyD88, caspasa-8/3 activas, disminuyendo citoquinas proinflamatorias y el complejo Fas/FasL<sup>207</sup>. Zeng H. y col.<sup>208</sup> además, señalan el incremento del daño a la sobreexpresión de HSP70, ligando de TLR4, y como la dioscina es capaz de reducir sus niveles y por lo tanto reducir el daño, ratificando los resultados obtenidos con cilastatina.

#### A.4 CILASTATINA BLOQUEA LA VÍA INFLAMATORIA

El papel de los PRR de membrana como el TLR2 y TLR4 son clave en el proceso inflamatorio séptico, ya que se van a producir moléculas que se comportan como PAMPs (LPS) y DAMPs (HSP70, ADNmit) que actúan como ligandos y su unión activa vías de señalización que dan lugar a la síntesis de factores que amplifican la respuesta inflamatoria. Durante la sepsis se incrementa la concentración de LBP y CD14<sup>209,210</sup>, situado éste en las BDC<sup>211-213</sup>. También en éstas podemos encontrar a TLR2, y algunos estudios incluirían también a TLR4, aunque parece ser que éste se transloca a dichas BDC cuando CD14 es activado por el complejo LPS/LBP<sup>212</sup>. Lo que está claro es que ambos receptores, tanto TLR2 como TLR4, aumentan su expresión durante el proceso séptico. Hay que destacar que las PTEC presentan de base TLR4 en la membrana celular apical y en menor medida TLR2, ya que como se ha comentado anteriormente, las PTEC presentan características inmunológicas propias y pueden comportarse como APC<sup>211,214</sup>. La activación de la cascada de señalización ocurre a través de la proteína acopladora MyD88 que se asocia a los TLRs y aumenta su expresión de base en la células renales. Confirmando los resultados de estos autores, encontramos un incremento en la proteína LBP, aunque en nuestro caso observamos una reducción en los niveles de CD14. Existen varias posibilidades a este resultado que estarían dándose a la vez: i) Podría deberse a la degradación de CD14 una vez internalizado el complejo CD14/TLR4 en una señalización tardía independiente de MyD88<sup>215</sup>, además la medida la determinamos en tejido renal sin valorar lo que ocurre a nivel sérico. Según *Laugerette y col.* CD14 soluble aumentaría como mecanismo compensatorio de la disminución de CD14 de membrana inducido por sepsis<sup>216</sup>. ii) Puede ser debido a la apoptosis que ocurre durante el FRA séptico como se ha comentado anteriormente. iii) Según varios autores, CD14 es capaz de formar agregados con otras moléculas como HSP70 y fosfolípidos oxidados, provocando la activación de otras vías inflamatorias por endocitosis independiente de TLR4<sup>217,218</sup>. También observamos un aumento en ambos PRR junto con su proteína acopladora MyD88, aunque a nivel transcripcional ésta no presentó ningún cambio. Durante esta activación se produce la liberación de NFκB y citoquinas como IL-6 o TNFα, importantes en patologías con

componente inflamatorio como es la sepsis siendo clave para la activación de otros procesos que potencian el daño inflamatorio. Pudimos comprobar como existe un aumento en la síntesis tanto de NFκB como de IL-6 en animales sépticos, aunque a nivel transcripcional, la IL-6 presentaba una reducción al igual que el receptor TNFR1. Esta reducción en el receptor coincide con los bajos niveles detectados de TNFα en suero, y como afirma *Villa P. y col.* en un modelo similar en ratón, en el modelo CLP de sepsis polimicrobiana el TNFα ve reducido sus niveles 200 veces en comparación con el modelo LPS<sup>219</sup>. A partir de las 8 horas no consiguieron detectarlo, proponiendo que sus niveles se encontrarían aumentados en tejidos implicados en la producción de TNFα, regulados por su receptor.

El tratamiento con cilastatina disminuyó la expresión de los receptores TLR2 y TLR4, y su proteína acopladora MyD88, así como incrementó los niveles de CD14. Al bloquear las BDC se estaría impidiendo la activación e internalización de estos receptores presentes en la misma por su unión con la DHP-I. Con cilastatina también observamos una reducción de LBP. Esa interferencia en las BDC provocaría que el LBP no presentara correctamente el LPS al CD14 y al no poder activarse la vía de señalización junto con una disminución en los niveles de LPS, provocaría una reducción en su síntesis<sup>220</sup>. Ese bloqueo en las balsas, provocaría también un aclaramiento, ya sea del propio complejo LPS/LBP o por detoxificación del LPS al ser transferido desde el LBP a proteínas HDL<sup>221</sup>. Por otro lado, un aumento de CD14 soluble tendría un efecto protector al favorecer la detoxificación de LPS y de igual manera, la transferencia del LPS a lipoproteínas<sup>216,222</sup>. Quedarían bloqueadas tanto la vía TLR2/MyD88 como la vía TLR4/CD14/MyD88, así como la activación vía CD14, por lo que la síntesis y liberación de NFκB y de IL-6 se verían disminuidas. Resultados similares de protección en modelos de inducción de sepsis en roedores con distintas estrategias terapéuticas, corroboran nuestras observaciones<sup>223-225</sup>: *Bor-Chyuan Su y col.* utilizando epinecidina-1, un péptido polimicrobiano, demostraron como éste interfería en la interacción entre LPS/LBP compitiendo con el LPS por la unión a la superficie celular evitando la endocitosis de TLR4, resultando en la inhibición de la formación de ROS inducidas por LPS, en la síntesis de NFκB y la subsecuente liberación de citoquinas. *Zhao H. y col.* realizaron ensayos con betulina, compuesto natural de tipo alcohólico, mostrando una atenuación del daño renal inducido por CLP mediante la mejora de la función renal y una reducción en la secreción de citoquinas proinflamatorias en el riñón séptico. Fue capaz de reducir el ARNm de TLR4 e inhibir la síntesis de NFκB. Estudios de *Yu C. y col.* con rhein, un compuesto vegetal con actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, mejoraron la función renal y la morfología tisular, así como redujo la inflamación mediada por NFκB y la apoptosis, a la par que mejoró la supervivencia.

El inflamasoma tiene un papel muy importante en el proceso séptico ya que amplifica la respuesta inflamatoria. Una vez que tiene lugar la primera señal de activación a través de los PRR liberándose NFkB, junto con la segunda señal que implica el daño mitocondrial, formación de radicales libres y/o pérdida de potasio, se produce el ensamblaje del complejo<sup>226</sup>. Hemos comprobado como la sepsis incrementa tanto el sensor NLRP3 como la caspasa-1 efectora y la IL-1 $\beta$ , citoquina liberada tras su maduración, tanto a nivel de proteína como de ARNm, reproduciendo lo obtenido en modelos similares de inducción de sepsis<sup>227,228</sup> que muestran la relevancia del inflamasoma en esta patología. Cilastatina parece que impide la activación del inflamasoma reduciendo la síntesis y liberación de sus componentes. El bloqueo de las BDC donde se localizan los PRR junto con los receptores de muerte como Fas, tras la unión cilastatina/DHP-I, podría llevar a una alteración en la membrana que impediría la activación de estas vías de señalización bloqueando la apoptosis, el daño mitocondrial<sup>160</sup> y el ensamblaje del inflamasoma, reduciendo la liberación de NFkB y otras citoquinas proinflamatorias como la IL-6 y la IL-1 $\beta$ . Estudios similares sobre el bloqueo del inflamasoma y la consiguiente reducción del daño apoyan nuestros resultados obtenidos<sup>229-231</sup>. Específicamente, *Giamarellos-Bourboulis EJ. y col.* mediante la inhibición de la activación de la caspasa-1 y la consiguiente disminución en la producción de IL-1 $\beta$ ; y *Wang P. y col.* utilizando CO exógeno, disminuyeron el daño renal inducido por sepsis y la activación del inflamasoma NLRP3.

Debido al ambiente séptico y a las citoquinas circulantes, se produce una activación del endotelio que favorece la expresión de moléculas de adhesión endoteliales para facilitar la llegada de leucocitos, como p-selectina, VCAM-1 e ICAM-1 en los capilares peritubulares. A su vez, estas moléculas llevan a la activación de leucocitos creando un círculo vicioso que amplifica y perpetúa la respuesta inflamatoria<sup>232</sup>. Además, se produce una pérdida de las uniones intercelulares que mantienen ancladas la células entre sí y a la membrana basal para favorecer su extravasación. Durante el proceso séptico el tejido renal se ve afectado por un aumento en la concentración de macrófagos activados por las células dendríticas, que se encargarán de eliminar la infección y las células muertas producidas, así como de la activación de otras células inmunes<sup>233,234</sup>. Este hecho pudimos comprobarlo con el aumento en la expresión de moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1, así como del marcador de macrófagos CD68 y de la proteína quimiotáctica MCP-1 implicada en la migración y reclutamiento de leucocitos<sup>235</sup>.

La administración de cilastatina y el bloqueo de la activación de la vía inflamatoria, llevó a la reducción en la expresión de moléculas de adhesión y con ello la infiltración celular, como se pudo comprobar con la reducción de leucocitos, tanto a nivel hematológico como a nivel de marcadores monocito/macrófago, reduciendo así la amplificación de la inflamación y

protegiendo el riñón. *Wang X. y col.* realizaron un estudio similar de inducción de sepsis mediante CLP en ratón y demostraron que resveratrol, un antioxidante, era capaz de atenuar la inflamación microvascular vía disminución de la expresión de moléculas de adhesión y mejorando la supervivencia, de la misma forma que hemos encontrado con cilastatina<sup>236</sup>.

## A.5 CILASTATINA REDUCE LA APARICIÓN DE FIBROSIS

Un daño mantenido en el tiempo como ocurre durante la sepsis y una mala reparación tisular va a provocar un cambio de fenotipo desde el perfil epitelial al mesenquimal, aumentando la expresión de proteínas como la vimentina. Así mismo, tiene lugar una pérdida de las uniones tanto estrechas como adherentes, que junto con la vía TLR/inflamasoma NLRP3 conduciría al desarrollo de fibrosis<sup>113,237,238</sup> incrementando moléculas profibróticas como TGF $\beta$  y CTGF. Éstas aparecen de forma precoz y en nuestro modelo de daño a las 48 horas de inducir la sepsis, observamos como se incrementan sus niveles. Aunque se expresan estas moléculas profibróticas de forma temprana, no apreciamos diferencias significativas en la aparición de fibras de colágeno, debido posiblemente a la corta duración del modelo, 48 horas, que no es suficiente para generar una inflamación crónica y desarrollo de fibrosis, tal y como podríamos encontrar en un FRC, aunque estas vías moleculares ya se habrían iniciado.

La administración de cilastatina evitó la pérdida de uniones intercelulares manteniendo los niveles de ZO-1, proteína de unión estrecha, y reduciendo los niveles de vimentina, marcador mesenquimal. También se produjo una disminución de los marcadores profibróticos, indicando que cilastatina es capaz de bloquear de manera precoz la aparición de TEM, así como el desarrollo de fibrosis que haría progresar hacia un FRC. Aparte, todos los resultados obtenidos nos indican que cilastatina es capaz de reducir el FRA inducido por sepsis, en su vertiente apoptótica, oxidativa e inflamatoria, que además se relaciona con el aumento de la supervivencia como se pudo demostrar en el estudio realizado en un modelo más severo de sepsis. En este ensayo, la mortalidad se redujo un 33% con la administración de cilastatina. Otros estudios similares realizados con otras intervenciones terapéuticas apoyan nuestros resultados, como el de *Castellano G. y col.* que utilizando la adsorción por filtración de plasma asociado a citrato (CPFA), redujeron los niveles de factores profibróticos y la TEM. *Silva JB. y col.* mediante mediadores lipídicos (ATRvD1), atenuaron el daño tubulointersticial renal reduciendo la inflamación y los mediadores pro-fibróticos tras sepsis. De la misma forma, *Hümmeje-Oppers F. y col.* con fosfatasa alcalina, hidrolasa responsable de eliminar fosfatos, y *Hsu YH. y col.* con lactoferrina, glicoproteína presente en la leche, tendrían efectos renoprotectores en el FRA y la fibrosis renal temprana<sup>112,239–241</sup>.

## B. FRA INDUCIDO POR RABDOMIÓLISIS

La rabdomiólisis es un síndrome clínico que se caracteriza por la destrucción del músculo esquelético, provocando la liberación de componentes intracelulares a la sangre que son tóxicos en otros ambientes biológicos, incluyendo el riñón<sup>242,243</sup>. La incidencia es difícil de establecer por la falta de registros actualizados y estudios epidemiológicos exhaustivos<sup>81</sup>, pero se sabe que el FRA es la complicación más grave. Hasta un 55% de pacientes que sufren una rabdomiólisis desarrollará un FRA<sup>20</sup> con una alta mortalidad, hasta casi el 60% en el paciente crítico cuando se presentan ambas circunstancias<sup>87</sup>. Para estudiar los principales mecanismos fisiopatológicos del FRA inducido por rabdomiólisis y comprobar el efecto ejercido por cilastatina, realizamos en rata un modelo de rabdomiólisis inducido por glicerol. Este modelo está ampliamente descrito y desarrollado en la literatura y reproduce fielmente el síndrome clínico humano<sup>244,245</sup>.

Los mecanismos que producen el daño tubular cada vez se conocen mejor, jugando un papel clave la acumulación de mioglobina y sus productos de degradación. El hierro contenido en la hemoproteína mioglobina es uno de los factores patogénicos del FRA inducido por rabdomiólisis. La mioglobina liberada desde el músculo dañado es rápidamente filtrada por el glomérulo y absorbida por las PTEC vía receptor endocítico megalina/cubulina. En el interior celular la mioglobina puede rotar entre varios estados oxidativos encabezando la formación de ROS citotóxicos y promoviendo peroxidación lipídica. El hemo libre y/o hierro generados por la rotura de la mioglobina intracelular puede catalizar además la producción de ROS vía reacción de Fenton. Así mismo, la mioglobina extracelular en el lumen tubular forma cilindros proteicos que pueden llevar a la obstrucción tubular. Los cristales de ácido úrico liberados por las células dañadas también potencian esta obstrucción al precipitar en medio ácido<sup>242,246</sup>. Los tejidos dañados e isquémicos exponen al organismo a PAMPs/DAMPs y a EO, iniciando una compleja respuesta inmunofisiológica que da lugar a alteraciones macro y microcirculatorias en el riñón, y a un deterioro funcional. La activación simultánea de los componentes de la inmunidad innata, incluidos los leucocitos, los factores de coagulación y las proteínas del complemento, impulsa la inflamación renal y el daño glomerular. Esta respuesta inmunitaria es también una parte integral de la intensa interrelación postraumática entre los riñones, el sistema nervioso y otros órganos, lo que agrava la disfunción multiorgánica. Los procedimientos terapéuticos para el tratamiento de los traumatismos pueden tener un doble efecto, ya que estabilizan el tejido y los órganos lesionados y al mismo tiempo pueden agravar la lesión renal<sup>247</sup>.

Actualmente no existe tratamiento salvo el encaminado a tratar la causa que produce la rabdomiólisis y de apoyo temprano de restablecimiento de fluidos. Aunque la mayoría de los pacientes se recuperan una vez desaparece la causa, en conflictos bélicos, desastres naturales o accidentes, urge tener un tratamiento rápido y efectivo que prevenga el FRA al que dará lugar este síndrome.

Para valorar cilastatina como nefroprotector, realizamos un modelo de FRA inducido por rabdomiólisis en ratas de 48 y 72 horas de duración. Los resultados mostrados se basan en el modelo de 48 horas, si bien es cierto que se incluyen determinados parámetros a 72 horas debido a su relevancia en el desarrollo del estudio, que sirve así mismo para comparar el desarrollo temporal del FRA.

## **B.1 CILASTATINA MEJORA LA FUNCIÓN RENAL Y EL DAÑO TISULAR**

La rabdomiólisis presenta una fisiopatología compleja que implica disfunción vascular, inflamación, EO y apoptosis. La complicación más grave es el FRA como pudimos comprobar en animales con rabdomiólisis. Observamos como sufren una pérdida de función renal con aumento de creatinina y BUN, y una reducción importante de la TFG<sup>248</sup>. Además, sufrieron una pérdida de peso significativa con hipertrofia renal tanto a 48 como a 72 horas, debido a la poliuria y deshidratación. La proteinuria también indicativa de pérdida de función renal se incrementó notablemente sobre todo a 48 horas debido a la liberación masiva de mioglobina. El calcio es un parámetro importante dentro del FRA mioglobinúrico y debido a su acumulación intracelular se produce un disminución en suero, como pudimos comprobar a ambos tiempos de daño. El resto de los parámetros bioquímicos también se vieron alterados, como el aumento de transaminasas, la LDH y el potasio, estos liberados al medio tras la ruptura de las células musculares. El sodio inicialmente se reduce al ser secuestrado junto con el calcio al interior celular y se ven aumentados la excreción fraccional de sodio y de agua, y el aclaramiento de agua libre. En orina los valores también se vieron alterados corroborando así la pérdida de función renal<sup>249,250</sup>. A 72 horas los datos parecen normalizarse en sangre, pero en orina siguen permaneciendo alterados.

Para comprobar sobre el tejido renal la existencia de FRA que mostraban los datos bioquímicos, realizamos un estudio histológico. El FRA mioglobinúrico se caracteriza por la formación de cilindros proteicos que provocan obstrucción tubular, infiltración leucocitaria y muerte celular. Pudimos observar la presencia de gran cantidad de túbulos obstruidos que eran más abundantes a 72 horas, y sobre todo a nivel medular. También observamos infiltrado celular y zonas hemorrágicas, así como una mayor cantidad de células en mitosis a 48 horas que a 72,

lo que podría indicar una activación temprana de los procesos de reparación que se vería disminuida a tiempos más largos. La mioglobina tiene efectos tóxicos directos sobre las células tubulares y sobre todo se ven afectadas las PTEC ya que éstas presentan el complejo megalina/cubilina, vía de entrada de la mioglobina al interior celular<sup>246,249</sup>. Pudimos comprobar cómo se ven afectadas estas células al determinar la expresión del biomarcador de daño renal, KIM-1, que se ve incrementado de manera radical en los animales con rabiomiólisis, tanto a nivel de tejido como en suero. Este resultado es similar al obtenido en modelos parecidos realizados en roedores<sup>251</sup>, en los que también se induce daño renal mediante administración de glicerol.

Cilastatina mejora los parámetros de función renal, devolviendo los valores a un nivel parecido los observados en el grupo control. Destaca el aumento de proteínas en orina a las 48 horas que cilastatina no es capaz de revertir, siendo debido esto a la gran cantidad de mioglobina liberada. A las 72 horas el incremento de proteínas es ligeramente menor y cilastatina es capaz de revertir los valores. A nivel histológico, cilastatina mantuvo la morfología tubular y redujo los signos de daño, aunque se mantuvo la obstrucción sobre todo en túbulo distales. La expresión del biomarcador KIM-1 se vio también reducida tanto en tejido como en suero. *García Reis N. y col.* demostraron que el calcitriol, análogo de la vitamina D, de manera similar a cilastatina, tenía efectos protectores frente al FRA inducido por rabiomiólisis, siendo capaces de reducir tanto la EFNa<sup>+</sup> como restablecer la TFG, efectos asociados con la disminución del daño oxidativo y la inflamación<sup>252</sup>.

## B.2 CILASTATINA REDUCE LA MUERTE CELULAR

El FRA inducido por rabiomiólisis se caracteriza por presentar alteraciones vasculares como VC renal y disfunción endotelial. Esto implica una alteración en la llegada de oxígeno al tejido y una mala utilización del ATP, generando daño mitocondrial y liberando radicales libres que dañan la integridad celular y llevan a la activación de la vía intrínseca de la apoptosis<sup>253</sup>. Nuestros resultados muestran un incremento de Bax y una reducción de Bcl-2, por lo que el ratio Bax/Bcl-2 haría a las células más susceptibles a la apoptosis. Además, la caspasa-9 efectora también presentó un incremento en su expresión. Esto nos llevó a estudiar la implicación de la vía extrínseca de la apoptosis, ya que, tras la agresión, se generan moléculas de muerte que amplifican el daño celular como el complejo Fas/FasL y el posterior reclutamiento y activación de caspasa-8, que inicia la cascada de señalización llevando a la muerte celular. Los animales con rabiomiólisis presentaban un aumento de estas proteínas, lo que implica que tras la formación del complejo Fas/FasL, éste trimeriza y se internaliza, activando la caspasa-8 y la vía

extrínseca de la apoptosis. Ambas rutas llevan a una vía común, la caspasa-3 ejecutora que aumenta en el FRA inducido por glicerol y se transloca al núcleo activando nucleasas que fragmentan el ADN. Pudimos comprobar como los animales con rabiomólisis presentaban un aumento en la expresión tanto de caspasa-3 como del número de células TUNEL-positivas, sobre todo a 72 horas, que implicaría ese proceso de fragmentación del ADN. Estos resultados confirman los estudios realizados por otros autores en los que el FRA mioglobínico induce apoptosis, ya sea a nivel *in vitro* o *in vivo*<sup>254,255</sup>.

Cilastatina fue capaz de impedir la activación de la apoptosis mediante el bloqueo de la internalización de las BDC e interfiriendo por tanto con la internalización del complejo Fas/FasL y su trimerización. Las moléculas de FasL se soltarían de su receptor Fas bloqueado y se liberarían por la orina, dejando de actuar sobre las células renales y de amplificar la señal de muerte. También se redujeron las caspasas implicadas en ambas vías de apoptosis y la consiguiente disminución de la fragmentación de ADN. Un estudio realizado por *Homsí E. y col.* sobre inhibición de caspasas en FRA inducido por glicerol ratifica nuestros resultados, poniendo de manifiesto la importancia del sistema de caspasas en la patogénesis del FRA inducido por rabiomólisis<sup>99</sup>. *Wang Y. y col.* también consiguieron mejorar el FRA inducido por rabiomólisis inhibiendo las dos vías de la apoptosis, tras la administración temprana de fasudil, inhibidor específico de Rho-quinasa<sup>256</sup>.

### B.3 CILASTATINA REDUCE EL ESTRÉS OXIDATIVO

La mioglobina liberada a la circulación es endocitada por las células tubulares induciendo rutas pro-oxidantes de daño, tanto por la mioglobina directamente como por sus productos de degradación (hemo libre/hierro), que inducen la formación de radicales libres y de la aparición de EO<sup>257</sup>. Aunque existen los sistemas antioxidantes, estos se ven sobrepasados y los sistemas depurativos como la haptoglobina y el SER se saturan. De esta forma, se ve reducida tanto la capacidad antioxidante total, como las enzimas Cu/Zn SOD y catalasa. Algunos estudios han mostrado que cantidades insuficientes de SOD da lugar a la formación de ROS, por lo que su actividad es fundamental para prevenir el EO<sup>251,258</sup>. Pudimos comprobar como la capacidad antioxidante total esta reducida al igual que la Cu/Zn SOD tanto a nivel proteico como génico, lo que indicaría, al igual que en el FRA inducido por sepsis, que se estaría provocando la muerte celular por agotamiento enzimático y así acotar la lesión. De igual modo los niveles de catalasa también se vieron reducidos. La aparición de EO da lugar a la peroxidación lipídica y a la formación de metabolitos bioactivos como el 4-HNE. Nuestros resultados muestran un incremento de esta molécula que se correlaciona con la disminución de los sistemas

antioxidantes. Las proteínas HSP se expresan cuando hay daño endotóxico para reducir el daño oxidativo. Nuestros resultados muestran un aumento en la expresión de HSP27 lo que indicaría una relación con la protección celular frente al EO y la apoptosis. En cuanto a la HSP70, nuestros resultados muestran una reducción de sus niveles. Esto podría deberse a que cuando aparece la agresión se comporta como alarma, movilizándose a la membrana actuando como ligando de TLR4 y su posterior degradación tras la internalización del receptor. Otra posibilidad es que forme agregados con la Cu/Zn SOD, ya que según *Shinder G. y col.* mutaciones en esta enzima facilitarían la formación de agregados y reducirían su disponibilidad<sup>259</sup>. Se podría pensar en cuanto a la SOD, que la presencia de mioglobina provocaría algún cambio en ella inactivándola, lo que no estaría respaldado por la reducción en los niveles de ARNm.

El tratamiento con cilastatina reduce el EO y la consiguiente aparición de peroxidación lipídica. Es capaz de reducir la formación de radicales libres evitando el daño mitocondrial y la muerte celular. Restaura los sistemas antioxidantes haciendo que las células sean capaces de combatir la formación de ROS y RNS. Nuestros resultados confirman lo obtenido por otros autores utilizando otras estrategias terapéuticas frente al FRA mioglobinúrico. Por ejemplo, *AlBasher G. y col.* mediante nanopartículas de selenio demostraron nefroprotección por reducción de alteraciones bioquímicas, celulares e histológicas producidas por el glicerol, así como de mediadores oxidativos y apoptóticos<sup>260</sup>.

#### **B.4 CILASTATINA BLOQUEA LA VÍA INFLAMATORIA**

La inflamación es una de las vías principales de daño renal durante la rabiomólisis. Se produce un aumento en la síntesis y liberación de citoquinas y quimioquinas, favoreciendo la infiltración leucocitaria, principalmente macrófagos y de la expresión de MCP-1. Nuestros resultados muestran cómo se incrementan sus niveles tanto en tejido como en suero, así como CD68 (marcador de macrófagos), siendo resultados similares a lo obtenido por otros autores<sup>261</sup>. Los macrófagos con un papel clave en el FRA mioglobinúrico, presentan distintos fenotipos como los M1 o proinflamatorios, M2 antiinflamatorios y los *naive* M0<sup>97</sup>. Al inicio del daño predominan los tipo M1 de perfil proinflamatorio (Arg-2), que posteriormente pasa a un tipo M2 predominante (CD163) que además actúa como secuestrador de grupos hemo<sup>93,182</sup>. A las 48 horas del daño, nuestros resultados muestran un perfil predominante de tipo M2, posiblemente para tratar de reducir el daño provocado por la mioglobina. El ligando de CD135 (FLT-3L) que también aumenta el número de linfocitos y es crucial para el desarrollo de células dendríticas, se incrementa sobre todo a las 72 horas. La activación de células dendríticas en los órganos linfoides permite la llegada de M2 al foco inflamatorio<sup>34</sup>.

Estudiamos a nivel transcripcional la expresión de algunas citoquinas importantes, como la IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  y TNF $\alpha$ . Observamos como existe un aumento de TNF $\alpha$ , pero una reducción a nivel sérico, posiblemente porque se localicen los mayores niveles en el tejido local<sup>219</sup>, a la reducción en los niveles de M1, bajos niveles de CCL3/Mip-1a y la depleción de leucocitos; una reducción de la IL-10 liberada por M2, mientras que a nivel sérico se vio aumentada aunque no significativamente; el IFN- $\gamma$  y la IL-6 no presentaron cambios, pero a nivel sérico aparecen reducidos, posiblemente por la reducción de Mip-1a. Aunque la subunidad CD130/GP130 de los receptores de IL-6, sí que presenta un gran aumento. Esto puede deberse a que otros ligandos como el factor neurotrófico ciliar (CNTF) se unan y favorezcan su expresión evitando la unión de IL-6<sup>262</sup>.

*Komoda y col.* ya demostraron el papel patogénico crucial del inflamasoma llevando a la activación de caspasa-1 y liberación de citoquinas proinflamatorias IL-1 $\beta$ /IL-18, así como el hemo libre fue identificado como un potente activador dependiente de ROS<sup>105</sup>. Como ya se ha comentado anteriormente, para su activación se requiere de una primera señal que tiene relación con la unión de los PRR a sus ligandos. Se sabe que TLR4 tiene como ligandos el HSP70 y el hierro procedente del grupo hemo de la mioglobina, lo que desencadenaría la síntesis de NF $\kappa$ B con la implicación del receptor megalina<sup>263</sup>. Todo ello junto con el daño mitocondrial, la formación de ROS y/o pérdida de concentración de potasio, llevarían a la síntesis y ensamblaje del inflamasoma. Nuestros resultados lo corroboran, ya que observamos un incremento tanto de la proteína sensor NLRP3 como de la caspasa-1, dando lugar a la muerte celular por piroptosis y a la liberación de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 $\beta$ , aunque a nivel sérico no mostró un incremento significativo. Esto posiblemente es debido a que el nivel de IL-1RA, antagonista del receptor de IL-1 $\alpha$  y  $\beta$  está muy aumentado en suero lo que impediría su unión. Además, comprobamos cómo se produce un aumento tanto a nivel proteico como génico de NF $\kappa$ B. Esto reproduce lo mostrado en otros estudios similares realizados en roedores<sup>105</sup>. En este caso no valoramos la expresión de TLR4, pero sí que a nivel sérico determinamos la proteína TREM-1, que es un receptor de activación expresado en células mieloides que activa la respuesta inflamatoria mediada por monocitos y neutrófilos. Se comporta como un TLR, liberando citoquinas y aumentando la expresión en la superficie celular de marcadores de activación celular. Observamos como se incrementa a 48 horas siendo más significativa a las 72 horas, corroborando lo observado por otros autores<sup>264-266</sup>.

Cilastatina fue capaz de reducir la inflamación inducida en el FRA mioglobinúrico mediante el bloqueo de las BDC, impidiendo la correcta activación del inflamasoma por bloqueo de TLR4 y de los complejos Fas/FasL que llevan a la apoptosis. Se reducen la liberación de NF $\kappa$ B,

así como citoquinas proinflamatorias y la infiltración leucocitaria. Resultados similares mostraron *Huang R. y col.* mediante inhibición inflamatoria en modelos de FRA inducido por rabdomiólisis<sup>267</sup>. *Huang N. y col.* mediante la delección de NLRP3, mostró protección frente a la inflamación por reducción de síntesis de IL-1 $\beta$ <sup>268</sup>.

## B.5 CILASTATINA REDUCE LA APARICIÓN DE FIBROSIS

Las moléculas de adhesión presentes en leucocitos, células epiteliales y endoteliales, se encargan de la unión intercelular y con la MEC. En procesos inflamatorios su expresión cambia y se incrementan para favorecer la migración e infiltración celular. Esto fue corroborado por nuestros resultados en los que los animales con rabdomiólisis presentaban un incremento en la expresión de VCAM-1 e ICAM-1, tanto a nivel proteico como génico y sérico. También valoramos en suero L-selectina, expresada en leucocitos que permite su unión al endotelio y el rodaje, paso crítico en la respuesta inmune, y permite su entrada en órganos linfáticos secundarios donde son activadas<sup>269</sup>. Fractalquina, un quimioatrayente de monocitos, NK y células T, que es expresada en monocitos durante condiciones inflamatorias, también aumentó su expresión. Cuando está presente los mecanismos de adhesión de leucocitos se alteran y pasa a ser una molécula de adhesión permitiendo la extravasación de leucocitos a través de la pared vascular al tejido<sup>270</sup>. Cilastatina reduce la expresión alterada de estas moléculas a todos los niveles.

Tras un daño, la reparación implica una reepitelización donde el tejido es reemplazado por tejido conectivo. Una mala reparación puede llevar a la TEM y desembocar en un proceso fibrótico. Un proceso inflamatorio crónico o que lleve a un incremento en la producción de MEC puede llevar a un FRC. Hay factores que inducen esta TEM como el TGF $\beta$ , NF $\kappa$ B, la vía Notch<sup>271,272</sup> y la Wnt/ $\beta$ -catenina. Nuestros resultados muestran como ya en tiempos cortos de daño aparecen fibras de colágeno en el tejido renal, si bien no es un aumento significativo, parece que a tiempos más largos podría desarrollarse un proceso fibrótico. Para ahondar más en este aspecto estudiamos las proteínas TGF $\beta$  y CTGF, que participan en la TEM, y progresión y desarrollo de fibrosis<sup>273,274</sup>. Nuestros resultados corroboran lo establecido hasta ahora, mostrando un incremento en la expresión de manera precoz de ambas proteínas inductoras. Para complementar estos datos ya que anteriormente habíamos observado el incremento de TGF $\beta$  y de NF $\kappa$ B, analizamos la expresión de varias proteínas entre ellas Wnt5 en tejido renal y a nivel sérico y otras implicadas como: la decorina; p-cadherina y Notch 1-2 (regulador de interacciones intercelulares); JAM-A, importante en la formación de uniones estrechas epiteliales e involucrada en la integridad de la barrera epitelial; y galectina-1, que modula la interacción intercelular y con la MEC. Nuestros resultados mostraron un incremento de la

proteína Wnt5 y en la expresión de decorina, componente de tejido conectivo que potencia la actividad de TGF $\beta$  e inhibe la regulación del ciclo celular<sup>275</sup>. Obtuvimos, para complementar este resultado un gran incremento de GAS-1, proteína de arresto celular, característico de la TEM, a las 48 horas. También aumentó la p-cadherina y las proteínas Notch 1 y 2, junto con el resto de las proteínas medidas. Todos estos resultados, confirman que la activación de la señalización por TGF $\beta$  contribuye al cambio de un estado mesenquimal y estado profibrótico, induciendo la transición a miofibroblastos y liberación de colágeno. Como marcador mesenquimal, determinamos la citoquina SCF o KIT-ligando, que se une a su receptor CD117. Es producida por fibroblastos y células endoteliales, y su unión activa la migración de células madre. Nuestros resultados mostraron un gran incremento a las 48 horas que fue mayor a las 72 horas.

Valoramos en suero inhibidores de la metaloproteinasas de matriz, TIMP1 (MMP-7, MMP-9, MMP-1 y MMP-3) y TIMP2 (MMP-2) observando un incremento en los niveles, por lo que las peptidasas encargadas de degradar la MEC estarían bloqueadas y habría un aumento en su formación. A las 72 horas los valores se normalizan por lo que se activarían de forma precoz.

Cilastatina es capaz de bloquear la TEM evitando de forma temprana la síntesis de factores inductores y reduciendo la formación de MEC, evitando y protegiendo del desarrollo y/o progresión a FRC. *DiRocco D. y col.* realizaron un estudio en el que la inhibición de CDK4/6 (kinasa dependiente de ciclina) inducía un arresto del ciclo de las células epiteliales tubulares, mejorando la función renal, disminuyendo los marcadores inflamatorios y la infiltración de macrófagos llevando a la reducción del FRA<sup>276</sup>.

## **B.6 CILASTATINA REDUCE LA ACUMULACIÓN DE HIERRO**

La liberación del hierro catalítico desde el grupo hemo de la mioglobina es clave para entender el FRA mioglobinúrico. Cuando el grupo hemo es degradado, el hierro se almacena en forma de ferritina, pero si los sistemas de degradación se ven superados se puede acumular en el interior celular provocando ROS llevando a EO y peroxidación lipídica<sup>91,277</sup>. Además, se comporta como DAMP activando la vía inflamatoria a través de TLR4. En la luz del túbulo, el ambiente ácido provoca que el hemo se disocie provocando también ROS que dañan a la célula. Para comprobar la distribución del hierro en la célula realizamos una tinción que pone de manifiesto dónde se localiza y que tiñe específicamente este hierro catalítico. En ambos tiempos de daño, observamos un incremento brusco de los depósitos de hierro al igual que un aumento en los niveles de ferritina en los animales dañados. Cilastatina fue capaz de reducir la concentración de ferritina y de los depósitos de hierro localizados en el tejido renal.

Estudios similares al realizado aquí con diferentes estrategias terapéuticas destinadas a disminuir la inflamación, el EO o la muerte celular confirman nuestros resultados demostrando como la inhibición de estas vías producen protección frente a la rabdomiólisis<sup>278-284</sup>: *Gois P. y col.* usando alopurinol, inhibidor de oxidasa xantina; *Wu J. y col.* y *Guerrero-Hue M.* con curcumina, sustancia antiinflamatoria, o *Soares da Silva H. y col.* con catelicidina, un péptido antimicrobiano, demostraron una reducción de la disfunción renal por disminución del EO, apoptosis e inflamación. Un modelo de FRA inducido por glicerol en ratón utilizando cilastatina como nefroprotector, obtuvo resultados similares a los obtenidos en esta tesis a nivel de mejora de la TFG por interferencia con megalina y aclaramiento de mioglobina<sup>285</sup>.

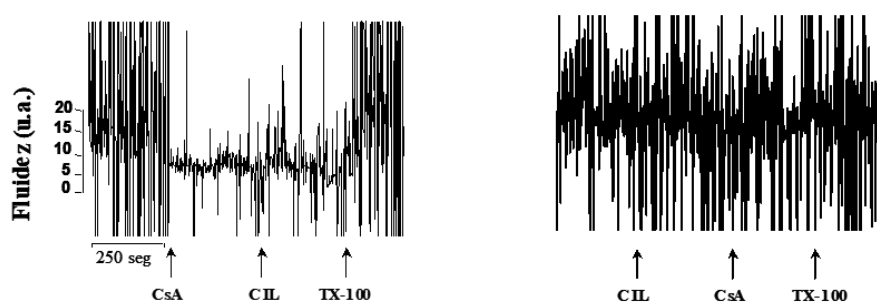
### C. CILASTATINA COMO NEFROPROTECTOR FRENTE AL FRA PARENQUIMATOSO ENDOTÓXICO

Por los hallazgos encontrados en la tesis doctoral, hemos comprobado de forma extensa como cilastatina, un inhibidor de la enzima DHP-I renal, es capaz de prevenir y proteger frente al FRA parenquimatoso de origen endotóxico inducido en este caso tanto por sepsis como por rabdomiólisis, lo que unido a la protección que ya se había observado frente a fármacos tóxicos, hace de cilastatina un protector universal frente al FRA.

Los resultados nos proporcionan evidencias consistentes de que cilastatina puede reducir en los modelos estudiados el FRA inducido por agentes endotóxicos, interfiriendo con la activación de receptores o moléculas implicadas en vías de daño, como los receptores de muerte Fas (que corrobora todo lo que habíamos estudiado hasta ahora con fármacos tóxicos), que dan lugar a la reducción de las vías de muerte celular, y la posterior amplificación del daño, mediante la disminución de la activación de NFκB y del inflammasoma. Además, interfiere en la entrada de mioglobina al interior celular que se produce a través de megalina<sup>286,287</sup> reduciendo su citotoxicidad, generándose menos grupo hemo/hierro, y por consiguiente menos ROS, reduciendo la muerte celular. En el caso de sepsis, además favorecería el aclaramiento de los complejos LBP/LPS reduciendo la activación de los TLRs y el tiempo que este complejo permanece en contacto con las PTEC.

Todas estas interferencias producidas por la administración de cilastatina, pueden ser consecuencia de un efecto ejercido sobre las BDC localizadas en el borde en cepillo de las PTEC, al llevarse a cabo la interacción de cilastatina con la DHP-I justo en esa región de la membrana. Nuestro grupo ha comprobado que dicha unión provoca un cambio en la fluidez de membrana<sup>148</sup> (**Figura 87**) que podría inducir un reordenamiento estructural en la misma que podría afectar a

determinados procesos a nivel de las BDC y que llevaría a proteger a las células tubulares. Esta hipótesis viene apoyada por resultados obtenidos previamente por el laboratorio, en los cuales cilastatina reducía el daño interfiriendo en la internalización del complejo Fas/FasL bloqueándolo<sup>159,160,186</sup> al igual que ocurriría con megalina<sup>176</sup>, transportador a través del cual muchos nefrotóxicos alcanzan el interior celular<sup>132</sup>, todos presentes en la BDC. El bloqueo que ejerce cilastatina al unirse a la enzima en las BDC puede deberse a que estéricamente impide el acoplamiento correcto de estos ligandos a sus correspondientes receptores de membrana o que, al provocar el cambio en la fluidez de membrana, haga que la BDC no se internalice, resultado que ha sido demostrado previamente. Resultados similares han sido obtenidos por Szabo G. y col. utilizando etanol, que era capaz de interferir en las BDC a nivel del citoesqueleto de actina y alterar varios complejos importantes de receptores del sistema inmune, como TLR4. Se alteraba la redistribución de los componentes de TLR4 en las BDC, evitando la interacción con CD14 impidiendo la activación, disminuyendo la inflamación y el daño<sup>288</sup> de manera similar a nuestros resultados. Esto denota la importancia de las BDC como diana terapéutica.



**Figura 87. Estudio sobre la fluidez de membrana con CsA.** Se realizaron ensayos en los que se administraba cilastatina antes y después del tratamiento con CsA. Ésta es un endopeptido cíclico liposoluble, que se disuelve en la membrana antes de permear la célula. Al hacerlo aumenta la rigidez de la membrana (izquierda). El tratamiento con cilastatina evita el cambio producido por CsA manteniéndola casi en su estado normal (derecha). *Extraído de Pérez M<sup>148</sup>.*

Parece claro que el inicio del FRA como consecuencia de una agresión renal es difícil de parar (**Figura 88**), pero cilastatina mediante el bloqueo de las BDC es capaz de frenar la extensión y amplificación del FRA. De esta manera se ven reducidas las vías de activación que llevan a una evolución hacia el FRC. Impidiendo la activación de Fas en las BDC, se reduce la apoptosis y con ello la descamación celular y obstrucción tubular. De la misma manera, este bloqueo reduce la inflamación por interferencia con los PRR impidiendo la activación del inflammasoma y reduciendo la liberación de citoquinas y la piroptosis, llevando a una disminución del reclutamiento celular, reduciendo las moléculas de adhesión, la disfunción endotelial y la TEM, evitando el desarrollo de fibrosis que desembocaría en el FRC. De la misma forma, megalina se ve alterada impidiendo su endocitosis, provocando una menor entrada de mioglobina y evitando los efectos del hierro catalítico como es la oxidación y la apoptosis (**Figura 89**).

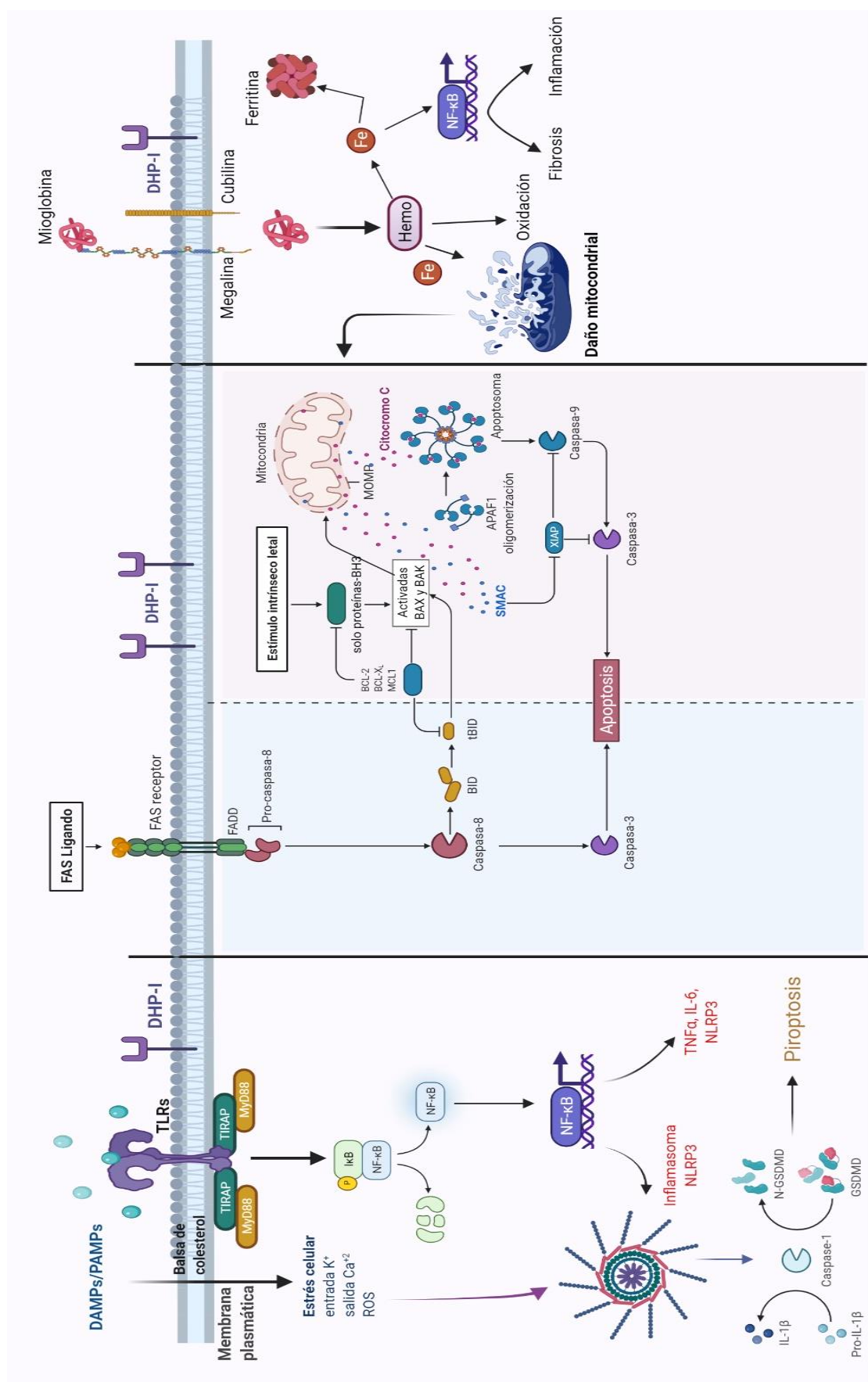


Figura 88. Imagen resumen de la localización de receptores en las BDC y sus vías de señalización sin la intervención de cilastatina. Las BDC soportan receptores que al unirse a sus ligandos activan vías de señalización que dan lugar al FRA. *Creado con BioRender.com*

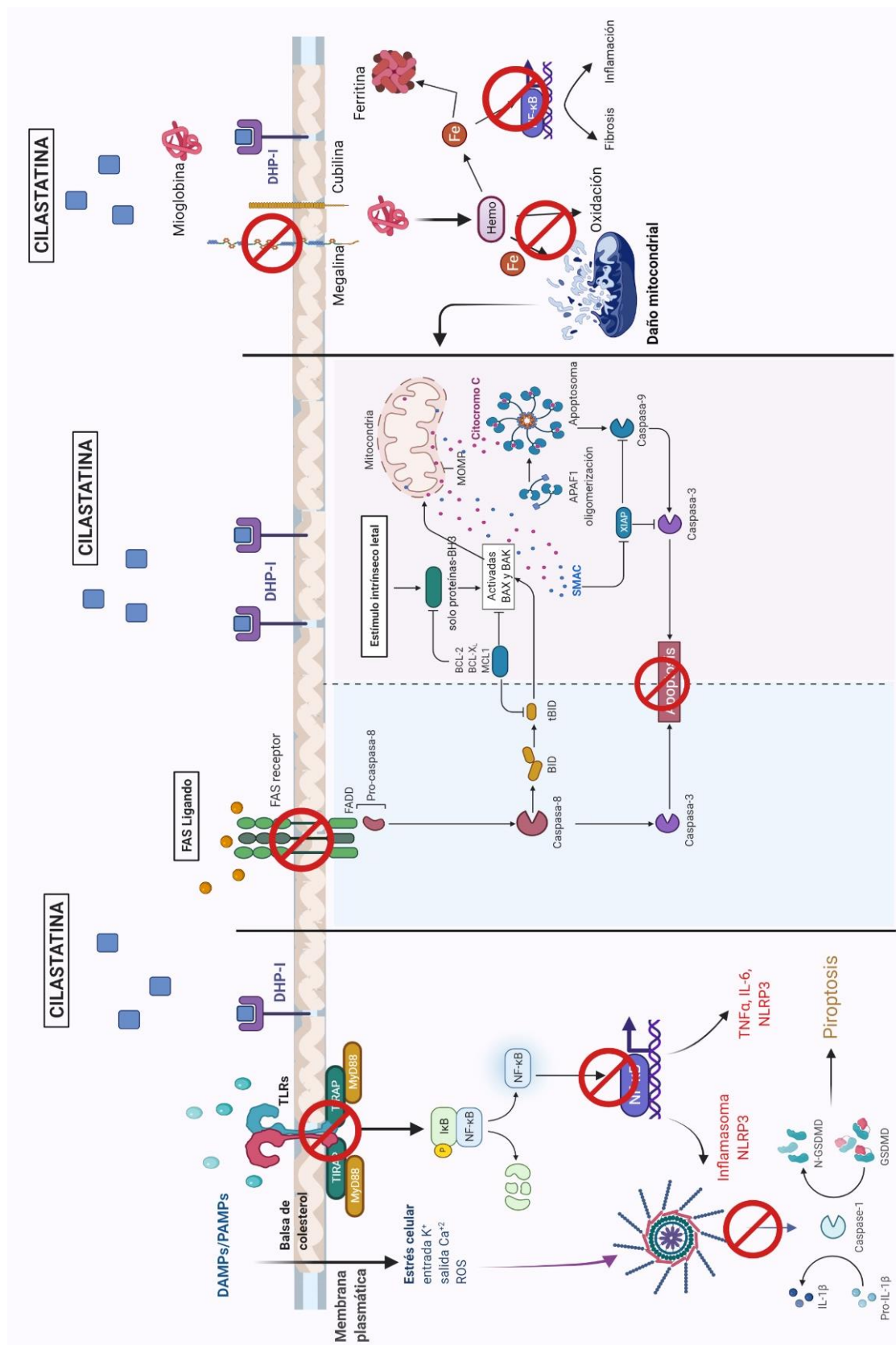


Figura 89. Imagen resumen de la localización de receptores en las BDC y sus vías de señalización bloqueadas con el tratamiento con cilastatina. Ésta no actúa en la fase inicial de la agresión, pero sí es capaz de bloquear la extensión del daño por interferencia con las BDC cuando se une a su receptor, la DHP-I que también se encuentra en las BDC. Cilastatina evita la muerte celular, el EO y la inflamación, reduciendo así el FRA endotóxico aumentando la supervivencia. *Creado con BioRender.com*

En resumen, todos nuestros resultados muestran que cilastatina puede ser una herramienta segura y eficaz en el tratamiento del FRA de origen endotóxico y que, en base a todo el conocimiento adquirido, podría ser una molécula candidata a convertirse en el primer fármaco que protege los riñones frente al FRA de cualquier etiología.

## D. PERSPECTIVA DE FUTURO DEL FÁRMACO CILASTATINA

Hace más de veinte años, gracias al gran Dr. Alberto Tejedor y casi por casualidad, comenzó esta investigación sobre la molécula cilastatina y sus posibilidades como nefroprotector. A medida que pasaba el tiempo y se realizaban cada vez más estudios, el Dr. Tejedor y su equipo se dieron cuenta de su gran potencial y de la posibilidad real de que algún día cilastatina pudiera llegar al mercado y estar a disposición del paciente. Todo el trabajo realizado durante tanto tiempo desembocó en el desarrollo de una familia de patentes, incluida la obtenida a partir de los resultados de esta tesis doctoral "*Cilastatina para el tratamiento de la sepsis*" ("*Cilastatin for use in the treatment of sepsis*" (**Anexo B**), que hacen que este hecho esté cada vez más cerca. El laboratorio consiguió licenciar el conjunto de patentes, incluyendo la de su uso para sepsis primeramente a la empresa "*Spherium Biomed S.L.*" con la que desarrollamos con éxito en 2018 el ensayo clínico de seguridad en Fase I (NCT03595189). Tras el triste fallecimiento del Dr. Tejedor a causa de la Covid-19 y poder seguir con su sueño de que cilastatina llegue por fin al paciente, desde el Laboratorio de Fisiopatología Renal se creó la compañía "*Telara Pharma S.L.*" ([www.telarapharma.com](http://www.telarapharma.com)), una spin off del IIS-GM. Gracias a esta iniciativa, desde Telara se consiguió cerrar un acuerdo de licencia de la tecnología con la empresa canadiense "*Arch Biopartners INC.*" ([www.archbiopartners.com](http://www.archbiopartners.com)) para demostrar la eficacia clínica del fármaco en futuros ensayos cuyo desarrollo está previsto para este año 2022. Cilastatina cuenta con la ventaja además de que lleva desde los años 80 administrándose en pacientes de forma segura en combinación con el antibiótico imipenem, por lo que el hecho de que se convierta en un fármaco disponible para todos los nefrólogos es casi una realidad.

Además, desde el Laboratorio de Fisiopatología Renal comenzamos este mismo año la realización de nuestro propio ensayo de investigación clínica de protección renal con cilastatina frente al FRA inducido por cisplatino en pacientes con carcinomatosis peritoneal sometidos a cirugía de citorreducción (CRS) con quimioterapia intraperitoneal intraoperatoria hipertérmica (HIPEC), y que de confirmar nuestras hipótesis, podría dar un gran apoyo y fuerte impulso a los ensayos a realizar por "*Arch Biopartners INC.*" y facilitar su futura comercialización.

A la par que esto sucede, el laboratorio sigue trabajando en otras vías de investigación y posibles aplicaciones terapéuticas en las que cilastatina podría ser beneficiosa, incluyendo la

protección del daño renal y fracaso multiorgánico en general provocado por la Covid-19 (**González-Nicolás MÁ**, González-Guerrero C, Pérez-Fernández VA, Lázaro A. Cilastatin: a potential treatment strategy against COVID-19 that may decrease viral replication and protect from the cytokine storm. *Clin Kidney J.* 2020 Sep 24;13(5):903-905. doi: 10.1093/ckj/sfaa193).

# **CONCLUSIONES**



- 1.- El fracaso renal agudo inducido por agentes endotóxicos tras la inducción de sepsis y rabdomiólisis en modelos experimentales produce alteraciones vasculares, disfunción endotelial y mitocondrial, citotoxicidad directa, apoptosis, obstrucción tubular y activación de la respuesta inflamatoria a través de los receptores de reconocimiento de patrones.
- 2.- El tratamiento con cilastatina previene y mejora el fracaso renal agudo inducido durante la sepsis y rabdomiólisis, mediante la reducción de las vías apoptóticas de muerte, oxidativas e inflamatorias, evitando la amplificación del daño renal.
- 3.- Cilastatina evita la transición epitelio-mesenquimal y la fibrosis renal inducida por sepsis y rabdomiólisis de manera precoz, impidiendo la activación de mediadores profibróticos que son activados durante la apoptosis y la inflamación, y manteniendo las uniones intercelulares epiteliales, lo que impide la transición hacia el fracaso renal agudo.
- 4.- El mecanismo de protección ejercido por cilastatina ocurre tras su unión con la dehidropeptidasa-I. Esta unión parece provocar una alteración en la membrana a nivel de las balsas de colesterol que interfiere en la acción de los receptores y transportadores localizados en ellas. De esta manera se produce la menor entrada de mioglobina a través del transportador megalina, y el bloqueo de las vías de señalización a través del receptor de muerte Fas y de los TLRs, implicados en el daño inflamatorio, apoptótico y oxidativo que tiene lugar en el fracaso renal agudo de origen endotóxico.
- 5.- Cilastatina por sí sola, no presenta efectos sobre la función renal, morfología tisular o en la expresión de mediadores apoptóticos, inflamatorios o de estrés oxidativo, demostrando la seguridad de su utilización.
- 6.- Cilastatina puede representar una importante alternativa terapéutica en el fracaso renal agudo de origen endotóxico como en el caso del inducido en sepsis o rabdomiólisis, dos de las principales causas del fracaso renal agudo parenquimatoso. Entender su modo de acción puede abrir grandes posibilidades de actuación sobre las balsas de colesterol del túbulo proximal para atajar o limitar la extensión del fracaso renal agudo.



# **BIBLIOGRAFÍA**



1. Barone LR. Anatomía y Fisiología Del Cuerpo Humano. La eliminación de los desechos. *Cultura Librera Americana S.A. Grupo Clasa*. Pag. 103-112. 2004. Buenos Aires, Rep. Argentina.
2. Marieb EN. Anatomía y Fisiología Humana. Capítulo 15: El aparato urinario. Pag: 518-543. *Pearson 9ª edición*, 2008.
3. Hall JE, Guyton AC. Tratado de Fisiología Médica. Unidad V: Los líquidos corporales y los riñones. Pag.284-412. *12ª edición Elsevier*. 2011.
4. Verschuren EHJ, Castenmiller C, Peters DJM, Arjona FJ, Bindels RJM, Hoenderop JGJ. Sensing of tubular flow and renal electrolyte transport. *Nat Rev Nephrol*. 2020 Jun;16(6):337-351. doi: 10.1038/s41581-020-0259-8.
5. Esteva-Font C, Torra Balcells R, Fernández-Llama P. Transportadores de sodio y aquaporinas: futuros biomarcadores renales? [Sodium transporters and aquaporins: future renal biomarkers?]. *Med Clin (Barc)*. 2007 Sep 29;129(11):433-7. Spanish. doi: 10.1157/13110477.
6. Musso C, López-Novoa JM, Macías-Núñez JF. Manejo de agua y sodio por el riñón senescente. Interpretación de una técnica de aclaramiento para su estudio funcional. *Rev Esp Geriatr Gerontol*. 2005;40(2):114-119. doi:10.1016/s0211-139x(05)74837-x.
7. Nakhoul N, Batuman V. Role of proximal tubules in the pathogenesis of kidney disease. *Contrib Nephrol*. 2011;169:37-50. doi: 10.1159/000313944.
8. Gilbert RE. Proximal Tubulopathy: Prime Mover and Key Therapeutic Target in Diabetic Kidney Disease. *Diabetes*. 2017 Apr;66(4):791-800. doi: 10.2337/db16-0796.
9. Wang K, Kestenbaum B. Proximal Tubular Secretory Clearance: A Neglected Partner of Kidney Function. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2018 Aug 7;13(8):1291-1296. doi: 10.2215/CJN.12001017.
10. Anzai N, Endou H. Renal drug transporters and nephrotoxicity. *Jap Soc*. 2008 Jan:447-452.
11. Huo X, Meng Q, Wang C, Zhu Y, Liu Z, Ma X, Ma X, Peng J, Sun H, Liu K. Cilastatin protects against imipenem-induced nephrotoxicity via inhibition of renal organic anion transporters (OATs). *Acta Pharm Sin B*. 2019 Sep;9(5):986-996. doi: 10.1016/j.apsb.2019.02.005.
12. Santos LL, Lima FJC, Sousa-Rodrigues CF, Barbosa FT. Use of SGLT-2 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Rev Assoc Med Bras (1992)*. 2017 Jul;63(7):636-641. doi: 10.1590/1806-9282.63.07.636.
13. Vallon V, Platt KA, Cunard R, Schroth J, Whaley J, Thomson SC, Koepsell H, Rieg T. SGLT2 mediates glucose reabsorption in the early proximal tubule. *J Am Soc Nephrol*. 2011 Jan;22(1):104-12. doi: 10.1681/ASN.2010030246.
14. Crews DC, Bello AK, Saadi G. Carga, acceso y disparidades en enfermedad renal [Burden, access, and disparities in kidney disease]. *Arch Argent Pediatr*. 2019 Jun 1;117(3):e243-e251. Spanish. doi: 10.5546/aap.2019.eng.e243.
15. Remuzzi G, Ruggenenti P, Benigni A. Understanding the nature of renal disease progression. *Kidney Int*. 1997 Jan;51(1):2-15. doi: 10.1038/ki.1997.2.
16. Chawla LS, Kimmel PL. Acute kidney injury and chronic kidney disease: an integrated

- clinical syndrome. *Kidney Int.* 2012 Sep;82(5):516-24. doi: 10.1038/ki.2012.208.
17. Liaño García L, Álvarez Rangel LE, Junco E. Definiciones de insuficiencia renal aguda. *Nefrología.* 2007 Jun;27(3):3-14.
  18. Ratliff BB, Abdulmahdi W, Pawar R, Wolin MS. Oxidant Mechanisms in Renal Injury and Disease. *Antioxid Redox Signal.* 2016 Jul 20;25(3):119-46. doi: 10.1089/ars.2016.6665.
  19. Finlay S, Jones MC. Acute kidney injury. *Med (United Kingdom).* 2017;45(3):173-176. doi:10.1016/j.mpmed.2016.12.010.
  20. Mas-Font S, Ros-Martínez J, Pérez-Calvo C, Villa-Díaz P, Aldunate-Calvo S, Moreno-Clari E; on behalf of the Workgroup on Nephrology Intensive Care of the SEMICYUC. Prevention of acute kidney injury in Intensive Care Units. *Med Intensiva.* 2017 Mar;41(2):116-126. English, Spanish. doi: 10.1016/j.medin.2016.12.004.
  21. Gaut JP, Liapis H. Acute kidney injury pathology and pathophysiology: a retrospective review. *Clin Kidney J.* 2020 Oct 10;14(2):526-536. doi: 10.1093/ckj/sfaa142.
  22. Hernando Avendaño L. Nefrología Clínica. *Panamericana, S.A. Editorial Médica.* 2013:954.
  23. Makris K, Spanou L. Acute Kidney Injury: Definition, Pathophysiology and Clinical Phenotypes. *Clin Biochem Rev.* 2016 May;37(2):85-98.
  24. Rodríguez-Palomares JR, García FL, Cañamas MTT, De Arriba G. Fracaso renal agudo. Concepto, definición, epidemiología, etiopatogenia y clasificación, manifestaciones clínicas, complicaciones y diagnóstico diferencial. *Med.* 2015;11(81):4842-4851. doi:10.1016/j.med.2015.06.002.
  25. Ren GL, Zhu J, Li J, Meng XM. Noncoding RNAs in acute kidney injury. *J Cell Physiol.* 2019 Mar;234(3):2266-2276. doi: 10.1002/jcp.27203.
  26. Lee SA, Cozzi M, Bush EL, Rabb H. Distant Organ Dysfunction in Acute Kidney Injury: A Review. *Am J Kidney Dis.* 2018 Dec;72(6):846-856. doi: 10.1053/j.ajkd.2018.03.028.
  27. Alscher MD, Erley C, Kuhlmann MK. Acute Renal Failure of Nosocomial Origin. *Dtsch Arztebl Int.* 2019 Mar 1;116(9):149-158. doi: 10.3238/arztebl.2019.0149.
  28. Federspiel CK, Itenov TS, Mehta K, Hsu RK, Bestle MH, Liu KD. Duration of acute kidney injury in critically ill patients. *Ann Intensive Care.* 2018 Feb 23;8(1):30. doi: 10.1186/s13613-018-0374-x.
  29. Guerrero-Hue M, Rayego-Mateos S, Vázquez-Carballo C, Palomino-Antolín A, García-Caballero C, Opazo-Ríos L, Morgado-Pascual JL, Herencia C, Mas S, Ortiz A, Rubio-Navarro A, Egea J, Villalba JM, Egido J, Moreno JA. Protective Role of Nrf2 in Renal Disease. *Antioxidants (Basel).* 2020 Dec 31;10(1):39. doi: 10.3390/antiox10010039.
  30. Shah SR, Tunio SA, Arshad MH, Moazzam Z, Noorani K, Feroze AM, Shafquat M, Hussain HS, Jeffrey SA. Acute Kidney Injury Recognition and Management: A Review of the Literature and Current Evidence. *Glob J Health Sci.* 2015 Sep 18;8(5):120-4. doi: 10.5539/gjhs.v8n5p120.
  31. Kellum JA, Ronco C, Bellomo R. Conceptual advances and evolving terminology in acute kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2021 Jul;17(7):493-502. doi: 10.1038/s41581-021-00410-w.
  32. Rodrigo E, Suberviola B, Albines Z, Castellanos Á, Heras M, Rodríguez-Borregán JC, Piñera

- C, Serrano M, Arias M. A comparison of acute kidney injury classification systems in sepsis. *Nefrología*. 2016 Sep-Oct;36(5):530-534. English, Spanish. doi: 10.1016/j.nefro.2016.03.021.
33. Hanif MO, Bali A, Ramphul K. Acute Renal Tubular Necrosis. 2021 Oct 12. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan.
34. Tejedor Jorge A. Un nuevo paradigma en el fracaso renal agudo. *Enfermería Nefrológica*. 2019;22(4):347-350. doi:10.4321/s2254-28842019000400001.
35. Tenorio MT, Galeano C, Rodríguez N, Liaño F. Diagnóstico diferencial de la insuficiencia renal aguda. *Nefro Plus*. 2010;3(2):16-32. doi:10.3265/NefroPlus.pre2010.Jul.10548.
36. Díaz MA, Briones JC, Carrillo R, Moreno A, Pérez AA. Insuficiencia renal aguda (IRA) clasificación, fisiopatología, histopatología, cuadro clínico diagnóstico y tratamiento una versión lógica. *Rev Mex Anestesiol*. 2017;40(4):280-287.
37. Bagnasco SM, Rosenberg AZ. Biomarkers of Chronic Renal Tubulointerstitial Injury. *J Histochem Cytochem*. 2019 Sep;67(9):633-641. doi: 10.1369/0022155419861092.
38. Coca SG, Singanamala S, Parikh CR. Chronic kidney disease after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Kidney Int*. 2012 Mar;81(5):442-8. doi: 10.1038/ki.2011.379.
39. Flaquer M, Romagnani P, Cruzado JM. Factores de crecimiento y regeneración renal [Growth factors and renal regeneration]. *Nefrología*. 2010;30(4):385-93. Spanish. doi: 10.3265/Nefrologia.pre2010.Jun.10463.
40. Ruíz-Ortega M, Rayego-Mateos S, Lamas S, Ortiz A, Rodríguez-Díez RR. Targeting the progression of chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2020 May;16(5):269-288. doi: 10.1038/s41581-019-0248-y.
41. Gewin L, Zent R, Pozzi A. Progression of chronic kidney disease: too much cellular talk causes damage. *Kidney Int*. 2017 Mar;91(3):552-560. doi: 10.1016/j.kint.2016.08.025.
42. Llisterri Caro JL, Gorriz Teruel JL. Protocolo local consensuado para un adecuado manejo de la enfermedad renal crónica en Atención Primaria. *SEMERGEN*. 2008;34(2):97-103. doi:10.7775/rac.es.v81.i4.2989.
43. Liu BC, Tang TT, Lv LL, Lan HY. Renal tubule injury: a driving force toward chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2018 Mar;93(3):568-579. doi: 10.1016/j.kint.2017.09.033.
44. Wang K, Xie S, Xiao K, Yan P, He W, Xie L. Biomarkers of Sepsis-Induced Acute Kidney Injury. *Biomed Res Int*. 2018 Apr 24;2018:6937947. doi: 10.1155/2018/6937947.
45. Liétor A, Cuadra R, Tenorio T, Liaño F. IRA y sepsis: conceptos actuales. *NefroPlus*. 2010;3(3):9-19. doi:10.3265/NefroPlus.pre2010.Nov.10733.
46. Cecconi M, Evans L, Levy M, Rhodes A. Sepsis and septic shock. *Lancet*. 2018 Jul 7;392(10141):75-87. doi: 10.1016/S0140-6736(18)30696-2.
47. Poston JT, Koyner JL. Sepsis associated acute kidney injury. *BMJ*. 2019 Jan 9;364:k4891. doi: 10.1136/bmj.k4891.
48. Abhishek C, Prakash B, Abraham BK, Kumar S, Ramakrishnan N, Venkataraman R. Incidence and Impact of Healthcare-associated Infections on Patients Primarily Admitted with Sepsis and Non-sepsis Diagnoses. *Indian J Crit Care Med*. 2021 Mar;25(3):292-295.

doi: 10.5005/jp-journals-10071-23760.

49. Zhang CF, Wang HJ, Tong ZH, Zhang C, Wang YS, Yang HQ, Gao RY, Shi HZ. The diagnostic and prognostic values of serum and urinary kidney injury molecule-1 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin in sepsis induced acute renal injury patients. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020 May;24(10):5604-5617. doi: 10.26355/eurrev\_202005\_21346.
50. Hecker A, Reichert M, Reuß CJ, Schmoch T, Riedel JG, Schneck E, Padberg W, Weigand MA, Hecker M. Intra-abdominal sepsis: new definitions and current clinical standards. *Langenbecks Arch Surg*. 2019 May;404(3):257-271. doi: 10.1007/s00423-019-01752-7.
51. Candel FJ, Borges Sá M, Belda S, Bou G, Del Pozo JL, Estrada O, Ferrer R, González Del Castillo J, Julián-Jiménez A, Martín-Loeches I, Maseda E, Matesanz M, Ramírez P, Ramos JT, Rello J, Suberviola B, Suárez de la Rica A, Vidal P. Current aspects in sepsis approach. Turning things around. *Rev Esp Quimioter*. 2018 Aug;31(4):298-315.
52. Matsuda A, Jacob A, Wu R, Aziz M, Yang WL, Matsutani T, Suzuki H, Furukawa K, Uchida E, Wang P. Novel therapeutic targets for sepsis: regulation of exaggerated inflammatory responses. *J Nippon Med Sch*. 2012;79(1):4-18. doi: 10.1272/jnms.79.4.
53. Velarde GC, Vélez JL, Vélez PA, Aguayo Moscoso SX, Montalvo Villagómez MP, Torres Cabezas PR, Jara González FE. Rol de la mitocondria en la Sepsis: Revisión de la literatura y enfoque traslacional. *Mov Científico*. 2020;14(2):11-22.
54. Hellwing C, Schoeniger A, Roessler C, Leimert A, Schumann J. Lipid raft localization of TLR2 and its co-receptors is independent of membrane lipid composition. *PeerJ*. 2018 Jan 5;6:e4212. doi: 10.7717/peerj.4212.
55. Hernández JC, Urcuqui S. Activación y regulación del inflammasoma NLRP3 en las enfermedades infecciosas. *Iatreia*. 2012;25(4):380-390.
56. Matsuda N, Takano Y, Kageyama S, Hatakeyama N, Shakunaga K, Kitajima I, Yamazaki M, Hattori Y. Silencing of caspase-8 and caspase-3 by RNA interference prevents vascular endothelial cell injury in mice with endotoxic shock. *Cardiovasc Res*. 2007 Oct 1;76(1):132-40. doi: 10.1016/j.cardiores.2007.05.024.
57. Yu WK, McNeil JB, Wickersham NE, Shaver CM, Bastarache JA, Ware LB. Vascular endothelial cadherin shedding is more severe in sepsis patients with severe acute kidney injury. *Crit Care*. 2019 Jan 18;23(1):18. doi: 10.1186/s13054-019-2315-y.
58. He SY, Wang G, Pei YH, Zhu HP. miR-34b-3p protects against acute kidney injury in sepsis mice via targeting ubiquitin-like protein 4A. *Kaohsiung J Med Sci*. 2020 Oct;36(10):817-824. doi: 10.1002/kjm2.12255.
59. Parikh SM, Yang Y, He L, Tang C, Zhan M, Dong Z. Mitochondrial function and disturbances in the septic kidney. *Semin Nephrol*. 2015 Jan;35(1):108-19. doi: 10.1016/j.semnephrol.2015.01.011.
60. Regueira T, Andresen M, Mercado M, Downey P. Fisiopatología de la insuficiencia renal aguda durante la sepsis [Physiopathology of acute renal failure during sepsis]. *Med Intensiva*. 2011 Oct;35(7):424-32. Spanish. doi: 10.1016/j.medin.2011.03.011.
61. Díaz de León M, Moreno SA, González Díaz DJ, Briones GJ. Sepsis severa como causa de falla renal aguda [Severe sepsis as a cause of acute renal failure]. *Nefrología*. 2006;26(4):439-44. Spanish.

62. Fani F, Regolisti G, Delsante M, Cantaluppi V, Castellano G, Gesualdo L, Villa G, Fiaccadori E. Recent advances in the pathogenetic mechanisms of sepsis-associated acute kidney injury. *J Nephrol*. 2018 Jun;31(3):351-359. doi: 10.1007/s40620-017-0452-4.
63. Chen Y, Jin S, Teng X, Hu Z, Zhang Z, Qiu X, Tian D, Wu Y. Hydrogen Sulfide Attenuates LPS-Induced Acute Kidney Injury by Inhibiting Inflammation and Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2018 Jan 31;2018:6717212. doi: 10.1155/2018/6717212.
64. Scindia Y, Wlazlo E, Leeds J, Loi V, Ledesma J, Cechova S, Ghias E, Swaminathan S. Protective Role of Hepcidin in Polymicrobial Sepsis and Acute Kidney Injury. *Front Pharmacol*. 2019 Jun 6;10:615. doi: 10.3389/fphar.2019.00615.
65. Xia S, Lin H, Liu H, Lu Z, Wang H, Fan S, Li N. Honokiol Attenuates Sepsis-Associated Acute Kidney Injury via the Inhibition of Oxidative Stress and Inflammation. *Inflammation*. 2019 Jun;42(3):826-834. doi: 10.1007/s10753-018-0937-x.
66. Russell JA. Management of sepsis. *N Engl J Med*. 2006 Oct 19;355(16):1699-713. doi: 10.1056/NEJMra043632. Erratum in: *N Engl J Med*. 2006 Nov 23;355(21):2267.
67. Castoldi A, Braga TT, Correa-Costa M, Aguiar CF, Bassi ÊJ, Correa-Silva R, Elias RM, Salvador F, Moraes-Vieira PM, Cenedeze MA, Reis MA, Hiyane MI, Pacheco-Silva Á, Gonçalves GM, Saraiva Câmara NO. TLR2, TLR4 and the MYD88 signaling pathway are crucial for neutrophil migration in acute kidney injury induced by sepsis. *PLoS One*. 2012;7(5):e37584. doi: 10.1371/journal.pone.0037584.
68. Baigorri-González F, Lorente Balanza JA. Oxigenación tisular y sepsis. *Med Intensiva*. 2005;29(3):178-184. doi:10.1016/s0210-5691(05)74225-x.
69. Doradla LPS, Prasad N. Pathophysiology of sepsis-associated AKI [SA-AKI]. *Clin Queries Nephrol*. 2016;5(1):21-25. doi:10.1016/j.cqn.2016.04.005.
70. Zhao WY, Zhang L, Sui MX, Zhu YH, Zeng L. Protective effects of sirtuin 3 in a murine model of sepsis-induced acute kidney injury. *Sci Rep*. 2016 Sep 13;6:33201. doi: 10.1038/srep33201.
71. Hotchkiss RS, Moldawer LL, Opal SM, Reinhart K, Turnbull IR, Vincent JL. Sepsis and septic shock. *Nat Rev Dis Primers*. 2016 Jun 30;2:16045. doi: 10.1038/nrdp.2016.45.
72. Shigeoka AA, Holscher TD, King AJ, Hall FW, Kiosses WB, Tobias PS, Mackman N, McKay DB. TLR2 is constitutively expressed within the kidney and participates in ischemic renal injury through both MyD88-dependent and -independent pathways. *J Immunol*. 2007 May 15;178(10):6252-8. doi: 10.4049/jimmunol.178.10.6252.
73. Lichte P, Grigoleit JS, Steiner EM, Kullmann JS, Schedlowski M, Oberbeck R, Kobbe P. Low dose LPS does not increase TLR4 expression on monocytes in a human in vivo model. *Cytokine*. 2013 Jul;63(1):74-80. doi: 10.1016/j.cyto.2013.04.014.
74. Płóciennikowska A, Hromada-Judycka A, Borzęcka K, Kwiatkowska K. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci*. 2015 Feb;72(3):557-581. doi: 10.1007/s00018-014-1762-5.
75. McGhan LJ, Jaroszewski DE. The role of toll-like receptor-4 in the development of multi-organ failure following traumatic haemorrhagic shock and resuscitation. *Injury*. 2012 Feb;43(2):129-36. doi: 10.1016/j.injury.2011.05.032.
76. Ciesielska A, Matyjek M, Kwiatkowska K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on

- LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci.* 2021 Feb;78(4):1233-1261. doi: 10.1007/s00018-020-03656-y.
77. Singer M. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. *Virulence.* 2014 Jan 1;5(1):66-72. doi: 10.4161/viru.26907.
78. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 Jan;15(1):49-63. doi: 10.1038/nrm3722.
79. Aziz M, Jacob A, Wang P. Revisiting caspases in sepsis. *Cell Death Dis.* 2014 Nov 20;5(11):e1526. doi: 10.1038/cddis.2014.488.
80. Aachoui Y, Sagulenko V, Miao EA, Stacey KJ. Inflammasome-mediated pyroptotic and apoptotic cell death, and defense against infection. *Curr Opin Microbiol.* 2013 Jun;16(3):319-26. doi: 10.1016/j.mib.2013.04.004.
81. Panizo N, Rubio-Navarro A, Amaro-Villalobos JM, Egido J, Moreno JA. Molecular Mechanisms and Novel Therapeutic Approaches to Rhabdomyolysis-Induced Acute Kidney Injury. *Kidney Blood Press Res.* 2015;40(5):520-32. doi: 10.1159/000368528.
82. Sagulenko V, Vitak N, Vajjhala PR, Vince JE, Stacey KJ. Caspase-1 Is an Apical Caspase Leading to Caspase-3 Cleavage in the AIM2 Inflammasome Response, Independent of Caspase-8. *J Mol Biol.* 2018 Jan 19;430(2):238-247. doi: 10.1016/j.jmb.2017.10.028.
83. Kellum JA, Wen X, de Caestecker MP, Hukriede NA. Sepsis-Associated Acute Kidney Injury: A Problem Deserving of New Solutions. *Nephron.* 2019;143(3):174-178. doi: 10.1159/000500167.
84. Madrazo Delgado M, Uña Orejón R, Redondo Calvo FJ, Criado Jiménez A. Rabdomiólisis isquémica y fracaso renal agudo. *Revista Española de Anestesiología y Reanimación.* 2007;54(7): 425-435.
85. Mote JD, Meza SD, Castro V. Rabdomiólisis e insuficiencia renal aguda. *Med Interna Mex.* 2007;23(1):47-58.
86. Cabral BMI, Edding SN, Portocarrero JP, Lerma EV. Rhabdomyolysis. *Dis Mon.* 2020 Aug;66(8):101015. doi: 10.1016/j.disamonth.2020.101015.
87. Nieto-Ríos JF, Vega-Miranda J, Serna-Higuaita LM. Insuficiencia renal aguda inducida por rabdomiolisis. *Iatreia.* 2016;29(2):157-169. doi:10.17533/udea.
88. Guerrero-Hue M, Rubio-Navarro A, Sevillano Á, Yuste C, Gutiérrez E, Palomino-Antolín A, Román E, Praga M, Egido J, Moreno JA. Adverse effects of the renal accumulation of haem proteins. Novel therapeutic approaches. *Nefrología (Engl Ed).* 2018 Jan-Feb;38(1):13-26. English, Spanish. doi: 10.1016/j.nefro.2017.05.009.
89. Salazar J, Mejías J, Chávez-Castillo M, et al. Rabdomiólisis: bases moleculares y presentaciones clínicas. *AVFT – Arch Venez Farmacol y Ter.* 2018;37(2).
90. Singh AP, Junemann A, Muthuraman A, Jaggi AS, Singh N, Grover K, Dhawan R. Animal models of acute renal failure. *Pharmacol Rep.* 2012;64(1):31-44. doi: 10.1016/s1734-1140(12)70728-4.
91. Zorova LD, Pevzner IB, Chupyrkina AA, Zorov SD, Silachev DN, Plotnikov EY, Zorov DB. The role of myoglobin degradation in nephrotoxicity after rhabdomyolysis. *Chem Biol Interact.*

- 2016 Aug 25;256:64-70. doi: 10.1016/j.cbi.2016.06.020.
92. Leaf DE, Swinkels DW. Catalytic iron and acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016 Nov 1;311(5):F871-F876. doi: 10.1152/ajprenal.00388.2016.
  93. Giuliani KTK, Kassianos AJ, Healy H, Gois PHF. Pigment Nephropathy: Novel Insights into Inflammasome-Mediated Pathogenesis. *Int J Mol Sci*. 2019 Apr 23;20(8):1997. doi: 10.3390/ijms20081997.
  94. Dennis JM, Witting PK. Protective Role for Antioxidants in Acute Kidney Disease. *Nutrients*. 2017 Jul 7;9(7):718. doi: 10.3390/nu9070718.
  95. Rubio-Navarro A, Carril M, Padro D, Guerrero-Hue M, Tarín C, Samaniego R, Cannata P, Cano A, Villalobos JM, Sevillano ÁM, Yuste C, Gutiérrez E, Praga M, Egido J, Moreno JA. CD163-Macrophages Are Involved in Rhabdomyolysis-Induced Kidney Injury and May Be Detected by MRI with Targeted Gold-Coated Iron Oxide Nanoparticles. *Theranostics*. 2016 Apr 21;6(6):896-914. doi: 10.7150/thno.14915.
  96. Okubo K, Kurosawa M, Kamiya M, Urano Y, Suzuki A, Yamamoto K, Hase K, Homma K, Sasaki J, Miyauchi H, Hoshino T, Hayashi M, Mayadas TN, Hirahashi J. Macrophage extracellular trap formation promoted by platelet activation is a key mediator of rhabdomyolysis-induced acute kidney injury. *Nat Med*. 2018 Feb;24(2):232-238. doi: 10.1038/nm.4462.
  97. Lee KY. M1 and M2 polarization of macrophages: a mini-review. *Med Biol Sci Eng*. 2019;2(1):1-5. doi:10.30579/mbse.2019.2.1.1.
  98. Martín-Sánchez D, Fontecha-Barriuso M, Martínez-Moreno JM, Ramos AM, Sánchez-Niño MD, Guerrero-Hue M, Moreno JA, Ortiz A, Sanz AB. Ferroptosis and kidney disease. *Nefrología (Engl Ed)*. 2020 Jul-Aug;40(4):384-394. English, Spanish. doi: 10.1016/j.nefro.2020.03.005.
  99. Homsí E, Janino P, de Faria JB. Role of caspases on cell death, inflammation, and cell cycle in glycerol-induced acute renal failure. *Kidney Int*. 2006 Apr;69(8):1385-92. doi: 10.1038/sj.ki.5000315. Erratum in: *Kidney Int*. 2006 Nov;70(9):1666.
  100. Bosch X, Poch E, Grau JM. Rhabdomyolysis and acute kidney injury. *N Engl J Med*. 2009 Jul 2;361(1):62-72. doi: 10.1056/NEJMra0801327. Erratum in: *N Engl J Med*. 2011 May 19;364(20):1982.
  101. Rubio-Navarro A, Vázquez-Carballo C, Guerrero-Hue M, García-Caballero C, Herencia C, Gutiérrez E, Yuste C, Sevillano Á, Praga M, Egea J, Cannata P, Cortegano I, de Andrés B, Gaspar ML, Cadenas S, Michalska P, León R, Ortiz A, Egido J, Moreno JA. Nrf2 Plays a Protective Role Against Intravascular Hemolysis-Mediated Acute Kidney Injury. *Front Pharmacol*. 2019 Jul 3;10:740. doi: 10.3389/fphar.2019.00740. PMID: 31333462; PMCID: PMC6619398..
  102. Wei Q, Hill WD, Su Y, Huang S, Dong Z. Heme oxygenase-1 induction contributes to renoprotection by G-CSF during rhabdomyolysis-associated acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011 Jul;301(1):F162-70. doi: 10.1152/ajprenal.00438.2010.
  103. Schaer DJ, Vinchi F, Ingoglia G, Tolosano E, Buehler PW. Haptoglobin, hemopexin, and related defense pathways-basic science, clinical perspectives, and drug development. *Front Physiol*. 2014 Oct 28;5:415. doi: 10.3389/fphys.2014.00415.

104. Rubio-Navarro A, Guerrero-Hue M, Martín-Fernandez B, Cortegano I, Olivares-Alvaro E, de Las Heras N, Alía M, de Andrés B, Gaspar ML, Egido J, Moreno JA. Phenotypic Characterization of Macrophages from Rat Kidney by Flow Cytometry. *J Vis Exp*. 2016 Oct 18;(116):54599. doi: 10.3791/54599.
105. Komada T, Usui F, Kawashima A, Kimura H, Karasawa T, Inoue Y, Kobayashi M, Mizushina Y, Kasahara T, Taniguchi S, Muto S, Nagata D, Takahashi M. Role of NLRP3 Inflammasomes for Rhabdomyolysis-induced Acute Kidney Injury. *Sci Rep*. 2015 Jun 5;5:10901. doi: 10.1038/srep10901.
106. Song N, Liu ZS, Xue W, Bai ZF, Wang QY, Dai J, Liu X, Huang YJ, Cai H, Zhan XY, Han QY, Wang H, Chen Y, Li HY, Li AL, Zhang XM, Zhou T, Li T. NLRP3 Phosphorylation Is an Essential Priming Event for Inflammasome Activation. *Mol Cell*. 2017 Oct 5;68(1):185-197.e6. doi: 10.1016/j.molcel.2017.08.017.
107. Docherty NG, Morales AI, López Novoa JM, Pérez Barriocanal F. LA transición de células epiteliales a miofibroblastos. Mecanismos involucrados y su posible relación con la fibrosis renal [The transition of epithelial cells to fibrocytes. Mechanisms involved and its possible relationship with renal fibrosis]. *Nefrología*. 2007;27(6):681-8. Spanish.
108. González DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal*. 2014 Sep 23;7(344):re8. doi: 10.1126/scisignal.2005189.
109. Villar J, Cabrera-Benítez NE, Ramos-Nuez A, Flores C, García-Hernández S, Valladares F, López-Aguilar J, Blanch L, Slutsky AS. Early activation of pro-fibrotic WNT5A in sepsis-induced acute lung injury. *Crit Care*. 2014 Oct 21;18(5):568. doi: 10.1186/s13054-014-0568-z.
110. Schunk SJ, Floege J, Fliser D, Speer T. WNT- $\beta$ -catenin signalling - a versatile player in kidney injury and repair. *Nat Rev Nephrol*. 2021 Mar;17(3):172-184. doi: 10.1038/s41581-020-00343-w.
111. Ferenbach DA, Bonventre JV. Mechanisms of maladaptive repair after AKI leading to accelerated kidney ageing and CKD. *Nat Rev Nephrol*. 2015 May;11(5):264-76. doi: 10.1038/nrneph.2015.3.
112. Castellano G, Stasi A, Franzin R, Sallustio F, Divella C, Spinelli A, Netti GS, Fiaccadori E, Cantaluppi V, Crovace A, Staffieri F, Lacitignola L, Grandaliano G, Simone S, Pertosa GB, Gesualdo L. LPS-Binding Protein Modulates Acute Renal Fibrosis by Inducing Pericyte-to-Myofibroblast Trans-Differentiation through TLR-4 Signaling. *Int J Mol Sci*. 2019 Jul 27;20(15):3682. doi: 10.3390/ijms20153682.
113. Vilaysane A, Chun J, Seamone ME, Wang W, Chin R, Hirota S, Li Y, Clark SA, Tschopp J, Trpkov K, Hemmelgarn BR, Beck PL, Muruve DA. The NLRP3 inflammasome promotes renal inflammation and contributes to CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2010 Oct;21(10):1732-44. doi: 10.1681/ASN.2010020143.
114. Black LM, Lever JM, Agarwal A. Renal Inflammation and Fibrosis: A Double-edged Sword. *J Histochem Cytochem*. 2019 Sep;67(9):663-681. doi: 10.1369/0022155419852932.
115. Braga TT, Correa-Costa M, Guise YF, Castoldi A, de Oliveira CD, Hyane MI, Cenedeze MA, Teixeira SA, Muscara MN, Perez KR, Cuccovia IM, Pacheco-Silva A, Gonçalves GM, Camara NO. MyD88 signaling pathway is involved in renal fibrosis by favoring a TH2 immune response and activating alternative M2 macrophages. *Mol Med*. 2012 Oct 24;18(1):1231-9. doi: 10.2119/molmed.2012.00131.

116. Kahan FM, Kropp H, Sundelof JG, Birnbaum J. Thienamycin: development of imipenem-cilastatin. *J Antimicrob Chemother.* 1983 Dec;12 Suppl D:1-35. doi: 10.1093/jac/12.suppl\_d.1.
117. Birnbaum J, Kahan FM, Kropp H, MacDonald JS. Carbapenems, a new class of beta-lactam antibiotics. Discovery and development of imipenem/cilastatin. *Am J Med.* 1985 Jun 7;78(6A):3-21. doi: 10.1016/0002-9343(85)90097-x. PMID: 3859213.
118. Welch CL, Campbell BJ. Uptake of glycine from L-alanylglycine into renal brush border vesicles. *J Membr Biol.* 1980;54(1):39-50. doi: 10.1007/BF01875375.
119. Hirota T, Nishikawa Y, Tanaka M, Fukuda K, Igarashi T, Kitagawa H. Localization of dehydropeptidase-I, an enzyme processing glutathione, in the rat kidney. *J Biochem.* 1987 Sep;102(3):547-50. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122087.
120. Kahan FM, Rogers JD. Imipenem/cilastatin: evolution of the sustained-release intramuscular formulation. *Chemotherapy.* 1991;37 Suppl 2:21-5. doi: 10.1159/000238915.
121. Kropp H, Sundelof JG, Hajdu R, Kahan FM. Metabolism of thienamycin and related carbapenem antibiotics by the renal dipeptidase, dehydropeptidase. *Antimicrob Agents Chemother.* 1982 Jul;22(1):62-70. doi: 10.1128/AAC.22.1.62.
122. Norrby SR, Alestig K, Björnegård B, Burman LA, Ferber F, Huber JL, Jones KH, Kahan FM, Kahan JS, Kropp H, Meisinger MA, Sundelof JG. Urinary recovery of N-formimidoyl thienamycin (MK0787) as affected by coadministration of N-formimidoyl thienamycin dehydropeptidase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 1983 Feb;23(2):300-7. doi: 10.1128/AAC.23.2.300.
123. Drusano GL, Standiford HC, Bustamante CI, Forrest A, Rivera G, Tatem B, Schimpff SC. The plasma pharmacokinetics of high dose (1 g) imipenem coadministered with 1 g cilastatin in six normal volunteers. *Eur J Clin Microbiol.* 1984 Oct;3(5):468-70. doi: 10.1007/BF02017377.
124. Clissold SP, Todd PA, Campoli-Richards DM. Imipenem/cilastatin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs.* 1987 Mar;33(3):183-241. doi: 10.2165/00003495-198733030-00001.
125. Shayan M, Elyasi S. Cilastatin as a protective agent against drug-induced nephrotoxicity: a literature review. *Expert Opin Drug Saf.* 2020 Aug;19(8):999-1010. doi: 10.1080/14740338.2020.1796967.
126. Drusano GL, Standiford HC. Pharmacokinetic profile of imipenem/cilastatin in normal volunteers. *Am J Med.* 1985 Jun 7;78(6A):47-53. doi: 10.1016/0002-9343(85)90101-9.
127. Campbell BJ, Di Shih Y, Forrester LJ, Zahler WL. Specificity and inhibition studies of human renal dipeptidase. *Biochim Biophys Acta.* 1988 Sep 21;956(2):110-8. doi: 10.1016/0167-4838(88)90256-7.
128. Köller M, Brom J, Raulf M, König W. Cilastatin (MK 0791) is a potent and specific inhibitor of the renal leukotriene D4-dipeptidase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1985 Sep 16;131(2):974-9. doi: 10.1016/0006-291x(85)91335-x.
129. Enomoto A, Takeda M, Tojo A, Sekine T, Cha SH, Khamdang S, Takayama F, Aoyama I, Nakamura S, Endou H, Niwa T. Role of organic anion transporters in the tubular transport

- of indoxyl sulfate and the induction of its nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol*. 2002 Jul;13(7):1711-20. doi: 10.1097/01.asn.0000022017.96399.b2.
130. Takeda M, Narikawa S, Hosoyamada M, Cha SH, Sekine T, Endou H. Characterization of organic anion transport inhibitors using cells stably expressing human organic anion transporters. *Eur J Pharmacol*. 2001 May 11;419(2-3):113-20. doi: 10.1016/s0014-2999(01)00962-1. Erratum in: *Eur J Pharmacol* 2002 Apr 26;441(3):215.
131. Launay-Vacher V, Izzedine H, Karie S, Hulot JS, Baumelou A, Deray G. Renal tubular drug transporters. *Nephron Physiol*. 2006;103(3):p97-106. doi: 10.1159/000092212.
132. Hori Y, Aoki N, Kuwahara S, Hosojima M, Kaseda R, Goto S, Iida T, De S, Kabasawa H, Kaneko R, Aoki H, Tanabe Y, Kagamu H, Narita I, Kikuchi T, Saito A. Megalin Blockade with Cilastatin Suppresses Drug-Induced Nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol*. 2017 Jun;28(6):1783-1791. doi: 10.1681/ASN.2016060606.
133. Adachi H, Katayama T, Inuzuka C, Oikawa S, Tsujimoto M, Nakazato H. Identification of membrane anchoring site of human renal dipeptidase and construction and expression of a cDNA for its secretory form. *J Biol Chem*. 1990 Sep 5;265(25):15341-5.
134. Campbell BJ, Lin YC, Davis RV, Ballew E. The purification and properties of a particulate renal dipeptidase. *Biochim Biophys Acta*. 1966 May 5;118(2):371-86. doi: 10.1016/s0926-6593(66)80046-2.
135. Hooper NM. Glycosyl-phosphatidylinositol anchored membrane enzymes. *Clin Chim Acta*. 1997 Oct 9;266(1):3-12. doi: 10.1016/s0009-8981(97)00161-7.
136. Keynan S, Hooper NM, Felici A, Amicosante G, Turner AJ. The renal membrane dipeptidase (dehydropeptidase I) inhibitor, cilastatin, inhibits the bacterial metallo-beta-lactamase enzyme CphA. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995 Jul;39(7):1629-31. doi: 10.1128/AAC.39.7.1629.
137. Nitnai Y, Satow Y, Adachi H, Tsujimoto M. Crystal structure of human renal dipeptidase involved in beta-lactam hydrolysis. *J Mol Biol*. 2002 Aug 9;321(2):177-84. doi: 10.1016/s0022-2836(02)00632-0.
138. Ferguson MA, Masterson WJ, Homans SW, McConville MJ. Evolutionary aspects of GPI metabolism in kinetoplastid parasites. *Cell Biol Int Rep*. 1991 Nov;15(11):991-1005. doi: 10.1016/0309-1651(91)90052-k.
139. Takeda J, Kinoshita T. GPI-anchor biosynthesis. *Trends Biochem Sci*. 1995 Sep;20(9):367-71. doi: 10.1016/s0968-0004(00)89078-7.
140. Morandat S, Bortolato M, Roux B. Cholesterol-dependent insertion of glycosylphosphatidylinositol-anchored enzyme. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Aug 31;1564(2):473-78. doi: 10.1016/s0005-2736(02)00497-2.
141. Millán J, de Marco MC, Qaidi M, Batista A, Martín-Belmonte F, Alonso MA. Isolation of lipid raft-associated proteolipids. *Methods Mol Biol*. 2003;228:223-30. doi: 10.1385/1-59259-400-X:223.
142. Pike LJ. The challenge of lipid rafts. *J Lipid Res*. 2009 Apr;50 Suppl(Suppl):S323-8. doi: 10.1194/jlr.R800040-JLR200.
143. Zajchowski LD, Robbins SM. Lipid rafts and little caves. Compartmentalized signalling in membrane microdomains. *Eur J Biochem*. 2002 Feb;269(3):737-52. doi: 10.1046/j.0014-

- 2956.2001.02715.x.
144. de Laurentiis A, Donovan L, Arcaro A. Lipid rafts and caveolae in signaling by growth factor receptors. *Open Biochem J.* 2007;1:12-32. doi: 10.2174/1874091X00701010012.
  145. Varshney P, Yadav V, Saini N. Lipid rafts in immune signalling: current progress and future perspective. *Immunology.* 2016 Sep;149(1):13-24. doi: 10.1111/imm.12617.
  146. Cerdá J, Lameire N, Eggers P, Pannu N, Uchino S, Wang H, Bagga A, Levin A. Epidemiology of acute kidney injury. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008 May;3(3):881-6. doi: 10.2215/CJN.04961107.
  147. Calne RY, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, Dunn DC, Craddock GN, Pentlow BD, Rolles K. Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet.* 1978 Dec 23-30;2(8104-5):1323-7. doi: 10.1016/s0140-6736(78)91970-0.
  148. Pérez M, Castilla M, Torres AM, Lázaro JA, Sarmiento E, Tejedor A. Inhibition of brush border dipeptidase with cilastatin reduces toxic accumulation of cyclosporin A in kidney proximal tubule epithelial cells. *Nephrol Dial Transplant.* 2004 Oct;19(10):2445-55. doi: 10.1093/ndt/gfh397.
  149. Sido B, Hammer C, Mraz W, Krombach F. Nephroprotective effect of imipenem/cilastatin in reducing cyclosporine toxicity. *Transplant Proc.* 1987 Feb;19(1 Pt 2):1755-8.
  150. Hammer C, Thies JC, Mraz W, Mihatsch M. Reduction of cyclosporin (CSA) nephrotoxicity by imipenem/cilastatin after kidney transplantation in rats. *Transplant Proc.* 1989 Feb;21(1 Pt 1):931.
  151. Markewitz A, Hammer C, Pfeiffer M, Zahn S, Drechsel J, Reichenspurner H, Reichart B. Reduction of cyclosporine-induced nephrotoxicity by cilastatin following clinical heart transplantation. *Transplantation.* 1994 Mar 27;57(6):865-70. doi: 10.1097/00007890-199403270-00017.
  152. Carmellini M, Matteucci E, Boggi U, Cecconi S, Giampietro O, Mosca F. Imipenem/cilastatin reduces cyclosporin-induced tubular damage in kidney transplant recipients. *Transplant Proc.* 1998 Aug;30(5):2034-5. doi: 10.1016/s0041-1345(98)00523-5.
  153. Gruss E, Tomás JF, Bernis C, Rodriguez F, Traver JA, Fernández-Rañada JM. Nephroprotective effect of cilastatin in allogeneic bone marrow transplantation. Results from a retrospective analysis. *Bone Marrow Transplant.* 1996 Oct;18(4):761-5.
  154. Mraz W, Sido B, Knedel M, Hammer C. Concomitant immunosuppressive and antibiotic therapy--reduction of cyclosporine A blood levels due to treatment with imipenem/cilastatin. *Transplant Proc.* 1987 Oct;19(5):4017-20.
  155. Tejedor A, Torres AM, Castilla M, Lázaro JA, de Lucas C, Caramelo C. Cilastatin protection against cyclosporin A-induced nephrotoxicity: clinical evidence. *Curr Med Res Opin.* 2007 Mar;23(3):505-13. doi: 10.1185/030079906X167633.
  156. Luo K, Lim SW, Jin J, Jin L, Gil HW, Im DS, Hwang HS, Yang CW. Cilastatin protects against tacrolimus-induced nephrotoxicity via anti-oxidative and anti-apoptotic properties. *BMC Nephrol.* 2019 Jun 14;20(1):221. doi: 10.1186/s12882-019-1399-6.
  157. Hanigan MH, Devarajan P. Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. *Cancer Ther.* 2003;1:47-61.

158. Nakamura T, Hashimoto Y, Kokuryo T, Inui KI. Effects of fosfomicin and imipenem/cilastatin on nephrotoxicity and renal excretion of vancomycin in rats. *Pharm Res.* 1998 May;15(5):734-8. doi: 10.1023/a:1011971019868.
159. Humanes B, Camaño S, Lara JM, Sabbisetti V, González-Nicolás MÁ, Bonventre JV, Tejedor A, Lázaro A. Cisplatin-induced renal inflammation is ameliorated by cilastatin nephroprotection. *Nephrol Dial Transplant.* 2017 Oct 1;32(10):1645-1655. doi: 10.1093/ndt/gfx005.
160. Camaño S, Lázaro A, Moreno-Gordaliza E, Torres AM, de Lucas C, Humanes B, Lázaro JA, Milagros Gómez-Gómez M, Boscá L, Tejedor A. Cilastatin attenuates cisplatin-induced proximal tubular cell damage. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010 Aug;334(2):419-29. doi: 10.1124/jpet.110.165779.
161. Humanes B, Lázaro A, Camaño S, Moreno-Gordaliza E, Lázaro JA, Blanco-Codesido M, Lara JM, Ortiz A, Gómez-Gómez MM, Martín-Vasallo P, Tejedor A. Cilastatin protects against cisplatin-induced nephrotoxicity without compromising its anticancer efficiency in rats. *Kidney Int.* 2012 Sep;82(6):652-63. doi: 10.1038/ki.2012.199.
162. Moreno-Gordaliza E, Giesen C, Lázaro A, Esteban-Fernández D, Humanes B, Cañas B, Panne U, Tejedor A, Jakubowski N, Gómez-Gómez MM. Elemental bioimaging in kidney by LA-ICP-MS as a tool to study nephrotoxicity and renal protective strategies in cisplatin therapies. *Anal Chem.* 2011 Oct 15;83(20):7933-40. doi: 10.1021/ac201933x.
163. Humanes B, Lázaro A, Camaño S, Moreno-Gordaliza E, Lázaro JA, Blanco-Codesido M, Lara JM, Ortiz A, Gómez-Gómez MM, Martín-Vasallo P, Tejedor A. Cilastatin protects against cisplatin-induced nephrotoxicity without compromising its anticancer efficiency in rats. *Kidney Int.* 2012 Sep;82(6):652-63. doi: 10.1038/ki.2012.199.
164. Filippone EJ, Kraft WK, Farber JL. The Nephrotoxicity of Vancomycin. *Clin Pharmacol Ther.* 2017 Sep;102(3):459-469. doi: 10.1002/cpt.726.
165. Humanes B, Jado JC, Camaño S, López-Parra V, Torres AM, Álvarez-Sala LA, Cercenado E, Tejedor A, Lázaro A. Protective Effects of Cilastatin against Vancomycin-Induced Nephrotoxicity. *Biomed Res Int.* 2015;2015:704382. doi: 10.1155/2015/704382.
166. Elyasi S, Khalili H, Dashti-Khavidaki S, Mohammadpour A. Vancomycin-induced nephrotoxicity: mechanism, incidence, risk factors and special populations. A literature review. *Eur J Clin Pharmacol.* 2012 Sep;68(9):1243-55. doi: 10.1007/s00228-012-1259-9.
167. Mergenhagen KA, Borton AR. Vancomycin nephrotoxicity: a review. *J Pharm Pract.* 2014 Dec;27(6):545-53. doi: 10.1177/0897190014546114.
168. Chandrasekar PH, Cronin SM. Nephrotoxicity in bone marrow transplant recipients receiving aminoglycoside plus cyclosporine or aminoglycoside alone. *J Antimicrob Chemother.* 1991 Jun;27(6):845-9. doi: 10.1093/jac/27.6.845.
169. Rybak MJ, Albrecht LM, Berman JR, Warbasse LH, Svensson CK. Vancomycin pharmacokinetics in burn patients and intravenous drug abusers. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990 May;34(5):792-5. doi: 10.1128/AAC.34.5.792.
170. Toyoguchi T, Takahashi S, Hosoya J, Nakagawa Y, Watanabe H. Nephrotoxicity of vancomycin and drug interaction study with cilastatin in rabbits. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997 Sep;41(9):1985-90. doi: 10.1128/AAC.41.9.1985.

171. Kusama M, Yamamoto K, Yamada H, Kotaki H, Sato H, Iga T. Effect of cilastatin on renal handling of vancomycin in rats. *J Pharm Sci.* 1998 Sep;87(9):1173-6. doi: 10.1021/js9801135.
172. Ford DM, Dahl RH, Lamp CA, Molitoris BA. Apically and basolaterally internalized aminoglycosides colocalize in LLC-PK1 lysosomes and alter cell function. *Am J Physiol.* 1994 Jan;266(1 Pt 1):C52-7. doi: 10.1152/ajpcell.1994.266.1.C52.
173. Hock R, Anderson RJ. Prevention of drug-induced nephrotoxicity in the intensive care unit. *J Crit Care.* 1995 Mar;10(1):33-43. doi: 10.1016/0883-9441(95)90029-2.
174. Mathew TH. Drug-induced renal disease. *Med J Aust.* 1992 May 18;156(10):724-8. doi: 10.5694/j.1326-5377.1992.tb121517.x.
175. Yanagida C, Ito K, Komiya I, Horie T. Protective effect of fosfomycin on gentamicin-induced lipid peroxidation of rat renal tissue. *Chem Biol Interact.* 2004 Jul 20;148(3):139-47. doi: 10.1016/j.cbi.2004.05.005.
176. Jado JC, Humanes B, González-Nicolás MÁ, Camaño S, Lara JM, López B, Cercenado E, García-Bordas J, Tejedor A, Lázaro A. Nephroprotective Effect of Cilastatin against Gentamicin-Induced Renal Injury In Vitro and In Vivo without Altering Its Bactericidal Efficiency. *Antioxidants (Basel).* 2020 Sep 3;9(9):821. doi: 10.3390/antiox9090821.
177. Humanes B, Camaño S, Lara JM, Sabbisetti V, González-Nicolás MA, Bonventre JV, Tejedor A, Lázaro A. Cisplatin-induced renal inflammation is ameliorated by cilastatin nephroprotection. *Nephrol Dial Transplant.* 2017 Oct 1;32(10):1645-1655. doi: 10.1093/ndt/gfx005.
178. Lázaro A, Humanes B, Jado JC, Mojena M, González-Nicolás MA, Del Cañizo JF, Tejedor A, Lledó-García E. Beneficial Effect of Short Pretransplant Period of Hypothermic Pulsatile Perfusion of the Warm-Ischemic Kidney after Cold Storage: Experimental Study. *Biomed Res Int.* 2016;2016:2518626. doi: 10.1155/2016/2518626.
179. González-Nicolás MA, Lázaro A. Inducción de un modelo de sepsis en rata mediante técnica de ligadura y punción cecal. *Animales de laboratorio, SECAL.* Otoño 2019;83: 15-19.
180. Tamada S, Asai T, Kuwabara N, Iwai T, Uchida J, Teramoto K, Kaneda N, Yukimura T, Komiya T, Nakatani T, Miura K. Molecular mechanisms and therapeutic strategies of chronic renal injury: the role of nuclear factor kappaB activation in the development of renal fibrosis. *J Pharmacol Sci.* 2006 Jan;100(1):17-21. doi: 10.1254/jphs.fmj05003x4.
181. Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, Nugent K. Cisplatin nephrotoxicity: a review. *Am J Med Sci.* 2007 Aug;334(2):115-24. doi: 10.1097/MAJ.0b013e31812dfe1e.
182. O'Reilly VP, Wong L, Kennedy C, et al. Urinary soluble CD163 in active renal vasculitis. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(9):2906-2916. doi:10.1681/ASN.2015050511.
183. Desanti De Oliveira B, Xu K, Shen TH, Callahan M, Kiryluk K, D'Agati VD, Tatonetti NP, Barasch J, Devarajan P. Molecular nephrology: types of acute tubular injury. *Nat Rev Nephrol.* 2019 Oct;15(10):599-612. doi: 10.1038/s41581-019-0184-x.
184. Scholz H, Boivin FJ, Schmidt-Ott KM, Bachmann S, Eckardt KU, Scholl UI, Persson PB. Kidney physiology and susceptibility to acute kidney injury: implications for renoprotection. *Nat Rev Nephrol.* 2021 May;17(5):335-349. doi: 10.1038/s41581-021-

- 00394-7.
185. Kahan JS, Kahan FM, Goegelman R, Currie SA, Jackson M, Stapley EO, Miller TW, Miller AK, Hendlin D, Mochales S, Hernandez S, Woodruff HB, Birnbaum J. Thienamycin, a new beta-lactam antibiotic. I. Discovery, taxonomy, isolation and physical properties. *J Antibiot (Tokyo)*. 1979 Jan;32(1):1-12. doi: 10.7164/antibiotics.32.1.
  186. Lázaro A, Camaño, S., Humanes, B. & Tejedor A. Novel strategies in drug-induced acute kidney injury. *Gall L Pharmacol Intech, Rijeka, Croat*. 2012:381-396.
  187. Zhai X, Yang Z, Zheng G, Yu T, Wang P, Liu X, Ling Q, Jiang L, Tang W. Lactate as a Potential Biomarker of Sepsis in a Rat Cecal Ligation and Puncture Model. *Mediators Inflamm*. 2018 Mar 7;2018:8352727. doi: 10.1155/2018/8352727.
  188. Brooks HF, Osabutey CK, Moss RF, Andrews PL, Davies DC. Caecal ligation and puncture in the rat mimics the pathophysiological changes in human sepsis and causes multi-organ dysfunction. *Metab Brain Dis*. 2007 Dec;22(3-4):353-73. doi: 10.1007/s11011-007-9058-1.
  189. Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov*. 2005 Oct;4(10):854-65. doi: 10.1038/nrd1854.
  190. García-Callejo FJ, Bécares-Martínez C, Escorihuela-García V P-GI y col. Aproximación no serológica para el diagnóstico rápido de mononucleosis infecciosa mediante la orientación clínica, analítica y citológica. *An Orl Mex*. 2013;58:26-34.
  191. Bellomo R, Kellum JA, Ronco C, Wald R, Martensson J, Maiden M, Bagshaw SM, Glassford NJ, Lankadeva Y, Vaara ST, Schneider A. Acute kidney injury in sepsis. *Intensive Care Med*. 2017 Jun;43(6):816-828. doi: 10.1007/s00134-017-4755-7.
  192. Mohamed AF, Safar MM, Zaki HF, Sayed HM. Telluric Acid Ameliorates Endotoxemic Kidney Injury in Mice: Involvement of TLR4, Nrf2, and PI3K/Akt Signaling Pathways. *Inflammation*. 2017 Oct;40(5):1742-1752. doi: 10.1007/s10753-017-0617-2.
  193. Díaz de León Ponce M, Alberto Moreno Santillán A, Iván González Díaz J, Manuel Jiménez Mor H. Insuficiencia renal aguda en el paciente séptico. *Medicina Crítica y Terapia Intensiva*. 2004 Nov-Dic;18(6):199-206.
  194. Linkermann A, Stockwell BR, Krautwald S, Anders HJ. Regulated cell death and inflammation: an auto-amplification loop causes organ failure. *Nat Rev Immunol*. 2014 Nov;14(11):759-67. doi: 10.1038/nri3743.
  195. Duarte-Mote J, Domínguez HI, Vega HC, Lee Eng CV, Romero FS, Espinosa LR, Sánchez RG. Disfunción mitocondrial como explicación del síndrome de disfunción orgánica múltiple en la sepsis. *Med Interna Mex*. 2013;29(5):504-512.
  196. Sarhan M, von Mässenhausen A, Hugo C, Oberbauer R, Linkermann A. Immunological consequences of kidney cell death. *Cell Death Dis*. 2018 Jan 25;9(2):114. doi: 10.1038/s41419-017-0057-9.
  197. Iturbe BR, Fernández L. Apoptosis en enfermedades renales. *Nefrología*. 1997; Dic 17(6):451-538.
  198. Hotchkiss RS, Osmon SB, Chang KC, Wagner TH, Coopersmith CM, Karl IE. Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathways. *J Immunol*. 2005 Apr 15;174(8):5110-8. doi: 10.4049/jimmunol.174.8.5110.

199. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Chang KC, Cobb JP, Buchman TG, Korsmeyer SJ, Karl IE. Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Dec 7;96(25):14541-6. doi: 10.1073/pnas.96.25.14541.
200. Weber P, Wang P, Maddens S, Wang PSh, Wu R, Miksa M, Dong W, Mortimore M, Golec JM, Charlton P. VX-166: a novel potent small molecule caspase inhibitor as a potential therapy for sepsis. *Crit Care*. 2009;13(5):R146. doi: 10.1186/cc8041.
201. Harijith A, Ebenezer DL, Natarajan V. Reactive oxygen species at the crossroads of inflammasome and inflammation. *Front Physiol*. 2014 Sep 29;5:352. doi: 10.3389/fphys.2014.00352.
202. Garrido C. Size matters: of the small HSP27 and its large oligomers. *Cell Death Differ*. 2002 May;9(5):483-5. doi: 10.1038/sj.cdd.4401005.
203. Quoilin C, Mouithys-Mickalad A, Lécart S, Fontaine-Aupart MP, Hoebeke M. Evidence of oxidative stress and mitochondrial respiratory chain dysfunction in an in vitro model of sepsis-induced kidney injury. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Oct;1837(10):1790-800. doi: 10.1016/j.bbabi.2014.07.005.
204. Ishimoto Y, Tanaka T, Yoshida Y, Inagi R. Physiological and pathophysiological role of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in the kidney. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2018 Nov;45(11):1097-1105. doi: 10.1111/1440-1681.13018.
205. Zager RA. 'Biologic memory' in response to acute kidney injury: cytoresistance, toll-like receptor hyper-responsiveness and the onset of progressive renal disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2013 Aug;28(8):1985-93. doi: 10.1093/ndt/gft101.23761460.
206. Qi M, Zheng L, Qi Y, Han X, Xu Y, Xu L, Yin L, Wang C, Zhao Y, Sun H, Liu K, Peng J. Dioscin attenuates renal ischemia/reperfusion injury by inhibiting the TLR4/MyD88 signaling pathway via up-regulation of HSP70. *Pharmacol Res*. 2015 Oct;100:341-52. doi: 10.1016/j.phrs.2015.08.025.
207. Qi M, Yin L, Xu L, Tao X, Qi Y, Han X, Wang C, Xu Y, Sun H, Liu K, Peng J. Dioscin alleviates lipopolysaccharide-induced inflammatory kidney injury via the microRNA let-7i/TLR4/MyD88 signaling pathway. *Pharmacol Res*. 2016 Sep;111:509-522. doi: 10.1016/j.phrs.2016.07.016.
208. Zeng H, Yang L, Zhang X, Chen Y, Cai J. Dioscin prevents LPS-induced acute lung injury through inhibiting the TLR4/MyD88 signaling pathway via upregulation of HSP70. *Mol Med Rep*. 2018 May;17(5):6752-6758. doi: 10.3892/mmr.2018.8667.
209. Chen Z, Shao Z, Mei S, Yan Z, Ding X, Billiar T, Li Q. Sepsis Upregulates CD14 Expression in a MyD88-Dependent and Trif-Independent Pathway. *Shock*. 2018 Jan;49(1):82-89. doi: 10.1097/SHK.0000000000000913.
210. Stasi A, Intini A, Divella C, Franzin R, Montemurno E, Grandaliano G, Ronco C, Fiaccadori E, Pertosa GB, Gesualdo L, Castellano G. Emerging role of Lipopolysaccharide binding protein in sepsis-induced acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant*. 2017 Jan 1;32(1):24-31. doi: 10.1093/ndt/gfw250.
211. Anderberg SB, Luther T, Frithiof R. Physiological aspects of Toll-like receptor 4 activation in sepsis-induced acute kidney injury. *Acta Physiol (Oxf)*. 2017 Mar;219(3):573-588. doi: 10.1111/apha.12798.

- 
212. Ryu JK, Kim SJ, Rah SH, Kang JI, Jung HE, Lee D, Lee HK, Lee JO, Park BS, Yoon TY, Kim HM. Reconstruction of LPS Transfer Cascade Reveals Structural Determinants within LBP, CD14, and TLR4-MD2 for Efficient LPS Recognition and Transfer. *Immunity*. 2017 Jan 17;46(1):38-50. doi: 10.1016/j.immuni.2016.11.007.
213. Gangloff M. Different dimerisation mode for TLR4 upon endosomal acidification? *Trends Biochem Sci*. 2012 Mar;37(3):92-8. doi: 10.1016/j.tibs.2011.11.003.
214. El-Achkar TM, Huang X, Plotkin Z, Sandoval RM, Rhodes GJ, Dagher PC. Sepsis induces changes in the expression and distribution of Toll-like receptor 4 in the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006 May;290(5):F1034-43. doi: 10.1152/ajprenal.00414.2005.
215. Wu Z, Zhang Z, Lei Z, Lei P. CD14: Biology and role in the pathogenesis of disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2019 Aug;48:24-31. doi: 10.1016/j.cytogfr.2019.06.003.
216. Laugerette F, Alligier M, Bastard JP, Draï J, Chanséaume E, Lambert-Porcheron S, Laville M, Morio B, Vidal H, Michalski MC. Overfeeding increases postprandial endotoxemia in men: Inflammatory outcome may depend on LPS transporters LBP and sCD14. *Mol Nutr Food Res*. 2014 Jul;58(7):1513-8. doi: 10.1002/mnfr.201400044.
217. Schmidt FI, Latz E. CD14-New Tricks of an Old Acquaintance. *Immunity*. 2017 Oct 17;47(4):606-608. doi: 10.1016/j.immuni.2017.10.003.
218. Tsukamoto H, Takeuchi S, Kubota K, Kobayashi Y, Kozakai S, Ukai I, Shichiku A, Okubo M, Numasaki M, Kanemitsu Y, Matsumoto Y, Nochi T, Watanabe K, Aso H, Tomioka Y. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein stimulates CD14-dependent Toll-like receptor 4 internalization and LPS-induced TBK1-IKKe-IRF3 axis activation. *J Biol Chem*. 2018 Jun 29;293(26):10186-10201. doi: 10.1074/jbc.M117.796631.
219. Villa P, Sartor G, Angelini M, Sironi M, Conni M, Gnocchi P, Isetta AM, Grau G, Buurman W, van Tits LJ, et al. Pattern of cytokines and pharmacomodulation in sepsis induced by cecal ligation and puncture compared with that induced by endotoxin. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1995 Sep;2(5):549-53. doi: 10.1128/cdli.2.5.549-553.1995.
220. Bashir A, Banday MZ, Haq E. Lipopolysaccharide, Mediator of Sepsis Enigma : Recognition and Signaling. *Portal Regional de la BVS*. IMSEAR. 2011; ID: sea-157807.
221. Schumann RR, Rietschel ET, Loppnow H. The role of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein (LBP) in the activation of different cell types by endotoxin. *Med Microbiol Immunol*. 1994 Dec;183(6):279-97. doi: 10.1007/BF00196679.
222. Kitchens RL, Thompson PA. Modulatory effects of sCD14 and LBP on LPS-host cell interactions. *J Endotoxin Res*. 2005;11(4):225-9. doi: 10.1179/096805105X46565.
223. Su BC, Huang HN, Lin TW, Hsiao CD, Chen JY. Epinecidin-1 protects mice from LPS-induced endotoxemia and cecal ligation and puncture-induced polymicrobial sepsis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2017 Dec;1863(12):3028-3037. doi: 10.1016/j.bbadis.2017.08.032.
224. Zhao H, Zheng Q, Hu X, Shen H, Li F. Betulin attenuates kidney injury in septic rats through inhibiting TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Life Sci*. 2016 Jan 1;144:185-93. doi: 10.1016/j.lfs.2015.12.003.
225. Yu C, Qi D, Sun JF, Li P, Fan HY. Rhein prevents endotoxin-induced acute kidney injury by inhibiting NF- $\kappa$ B activities. *Sci Rep*. 2015 Jul 7;5:11822. doi: 10.1038/srep11822.

226. Chilton PM, Embry CA, Mitchell TC. Effects of Differences in Lipid A Structure on TLR4 Pro-Inflammatory Signaling and Inflammasome Activation. *Front Immunol*. 2012 Jun 13;3:154. doi: 10.3389/fimmu.2012.00154.
227. Deng H, Chen F, Wang Y, Jiang H, Dong Z, Yuan B, Zhao X. The role of activated NLRP3 inflammatory body in acute kidney injury in rats caused by sepsis and NLRP3-TXNIP signaling pathway. *Saudi J Biol Sci*. 2020 May;27(5):1251-1259. doi: 10.1016/j.sjbs.2020.03.018.
228. Cao Y, Fei D, Chen M, Sun M, Xu J, Kang K, Jiang L, Zhao M. Role of the nucleotide-binding domain-like receptor protein 3 inflammasome in acute kidney injury. *FEBS J*. 2015 Oct;282(19):3799-807. doi: 10.1111/febs.13379.
229. Giamarellos-Bourboulis EJ, van de Veerdonk FL, Mouktaroudi M, Raftogiannis M, Antonopoulou A, Joosten LA, Pickkers P, Savva A, Georgitsi M, van der Meer JW, Netea MG. Inhibition of caspase-1 activation in Gram-negative sepsis and experimental endotoxemia. *Crit Care*. 2011;15(1):R27. doi: 10.1186/cc9974.
230. Vanden Berghe T, Demon D, Bogaert P, Vandendriessche B, Goethals A, Depuydt B, Vuylsteke M, Roelandt R, Van Wonterghem E, Vandebroecke J, Choi SM, Meyer E, Krautwald S, Declercq W, Takahashi N, Cauwels A, Vandenabeele P. Simultaneous targeting of IL-1 and IL-18 is required for protection against inflammatory and septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 Feb 1;189(3):282-91. doi: 10.1164/rccm.201308-1535OC.
231. Wang P, Huang J, Li Y, Chang R, Wu H, Lin J, Huang Z. Exogenous Carbon Monoxide Decreases Sepsis-Induced Acute Kidney Injury and Inhibits NLRP3 Inflammasome Activation in Rats. *Int J Mol Sci*. 2015 Aug 31;16(9):20595-608. doi: 10.3390/ijms160920595.
232. Umbro I, Gentile G, Tinti F, Muiesan P, Mitterhofer AP. Recent advances in pathophysiology and biomarkers of sepsis-induced acute kidney injury. *J Infect*. 2016 Feb;72(2):131-42. doi: 10.1016/j.jinf.2015.11.008.
233. Matsumoto K, Fukuda N, Abe M, Fujita T. Dendritic cells and macrophages in kidney disease. *Clin Exp Nephrol*. 2010 Feb;14(1):1-11. doi: 10.1007/s10157-009-0218-y.
234. Cavaillon JM, Adib-Conquy M. Monocytes/macrophages and sepsis. *Crit Care Med*. 2005 Dec;33(12 Suppl):S506-9. doi: 10.1097/01.ccm.0000185502.21012.37.
235. Haberstroh U, Pocock J, Gómez-Guerrero C, Helmchen U, Hamann A, Gutierrez-Ramos JC, Stahl RA, Thaiss F. Expression of the chemokines MCP-1/CCL2 and RANTES/CCL5 is differentially regulated by infiltrating inflammatory cells. *Kidney Int*. 2002 Oct;62(4):1264-76. doi: 10.1111/j.1523-1755.2002.kid572.x.
236. Wang X, Buechler NL, Yoza BK, McCall CE, Vachharajani VT. Resveratrol attenuates microvascular inflammation in sepsis via SIRT-1-Induced modulation of adhesion molecules in ob/ob mice. *Obesity (Silver Spring)*. 2015 Jun;23(6):1209-17. doi: 10.1002/oby.21086.
237. Yiu WH, Lin M, Tang SC. Toll-like receptor activation: from renal inflammation to fibrosis. *Kidney Int Suppl (2011)*. 2014 Nov;4(1):20-25. doi: 10.1038/kisup.2014.5.
238. Anders HJ, Schaefer L. Beyond tissue injury-damage-associated molecular patterns, toll-like receptors, and inflammasomes also drive regeneration and fibrosis. *J Am Soc Nephrol*.

- 2014 Jul;25(7):1387-400. doi: 10.1681/ASN.2014010117.
239. Silva JBNF, Calcia TBB, Silva CP, Guilherme RF, Almeida-Souza F, Lemos FS, Calabrese KS, Caruso-Neves C, Neves JS, Benjamim CF. ATRvD1 Attenuates Renal Tubulointerstitial Injury Induced by Albumin Overload in Sepsis-Surviving Mice. *Int J Mol Sci.* 2021 Oct 27;22(21):11634. doi: 10.3390/ijms222111634.
240. Hümmeke-Oppers F, Hemelaar P, Pickkers P. Innovative Drugs to Target Renal Inflammation in Sepsis: Alkaline Phosphatase. *Front Pharmacol.* 2019 Aug 23;10:919. doi: 10.3389/fphar.2019.00919.
241. Hsu YH, Chiu IJ, Lin YF, Chen YJ, Lee YH, Chiu HW. Lactoferrin Contributes a Renoprotective Effect in Acute Kidney Injury and Early Renal Fibrosis. *Pharmaceutics.* 2020 May 8;12(5):434. doi: 10.3390/pharmaceutics12050434.
242. Grivei A, Giuliani KTK, Wang X, Ungerer J, Francis L, Hepburn K, John GT, Gois PFH, Kassianos AJ, Healy H. Oxidative stress and inflammasome activation in human rhabdomyolysis-induced acute kidney injury. *Free Radic Biol Med.* 2020 Nov 20;160:690-695. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.09.011.
243. Stahl K, Rastelli E, Schoser B. A systematic review on the definition of rhabdomyolysis. *J Neurol.* 2020 Apr;267(4):877-882. doi: 10.1007/s00415-019-09185-4.
244. Abul-Ezz SR, Walker PD, Shah SV. Role of glutathione in an animal model of myoglobinuric acute renal failure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Nov 1;88(21):9833-7. doi: 10.1073/pnas.88.21.9833.
245. Lochhead KM, Kharasch ED, Zager RA. Anesthetic effects on the glycerol model of rhabdomyolysis-induced acute renal failure in rats. *J Am Soc Nephrol.* 1998 Feb;9(2):305-9. doi: 10.1681/ASN.V92305.
246. Gburek J, Verroust PJ, Willnow TE, Fyfe JC, Nowacki W, Jacobsen C, Moestrup SK, Christensen EI. Megalin and cubilin are endocytic receptors involved in renal clearance of hemoglobin. *J Am Soc Nephrol.* 2002 Feb;13(2):423-430. doi: 10.1681/ASN.V132423.
247. Messerer DAC, Halbgebauer R, Nilsson B, Pavenstädt H, Radermacher P, Huber-Lang M. Immunopathophysiology of trauma-related acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol.* 2021 Feb;17(2):91-111. doi: 10.1038/s41581-020-00344-9.
248. Malinoski DJ, Slater MS, Mullins RJ. Crush injury and rhabdomyolysis. *Crit Care Clin.* 2004 Jan;20(1):171-92. doi: 10.1016/s0749-0704(03)00091-5.
249. Chatzizisis YS, Misirli G, Hatzitolios AI, Giannoglou GD. The syndrome of rhabdomyolysis: complications and treatment. *Eur J Intern Med.* 2008 Dec;19(8):568-74. doi: 10.1016/j.ejim.2007.06.037.
250. Lima RS, da Silva Junior GB, Liborio AB, Daher Ede F. Acute kidney injury due to rhabdomyolysis. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2008 Sep;19(5):721-9.
251. Song SJ, Kim SM, Lee SH, Moon JY, Hwang HS, Kim JS, Park SH, Jeong KH, Kim YG. Rhabdomyolysis-Induced AKI Was Ameliorated in NLRP3 KO Mice via Alleviation of Mitochondrial Lipid Peroxidation in Renal Tubular Cells. *Int J Mol Sci.* 2020 Nov 13;21(22):8564. doi: 10.3390/ijms21228564.
252. Reis NG, Francescato HDC, de Almeida LF, Silva CGAD, Costa RS, Coimbra TM. Protective effect of calcitriol on rhabdomyolysis-induced acute kidney injury in rats. *Sci Rep.* 2019

- May 8;9(1):7090. doi: 10.1038/s41598-019-43564-1.
253. Plotnikov EY, Chupyrkina AA, Pevzner IB, Isaev NK, Zorov DB. Myoglobin causes oxidative stress, increase of NO production and dysfunction of kidney's mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Aug;1792(8):796-803. doi: 10.1016/j.bbadis.2009.06.005.
254. Homsí E, Andreazzi DD, Faria JB, Janino P. TNF- $\alpha$ -mediated cardiorenal injury after rhabdomyolysis in rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2015 Jun 1;308(11):F1259-67. doi: 10.1152/ajprenal.00311.2014.
255. Zhou J, Kong D, Zhang X, Wang Y, Feng Z, Zhang X, Zhang L, Wang Y, Xie Y, Chen X. Myoglobin-induced apoptosis: two pathways related to endoplasmic reticulum stress. *Ther Apher Dial*. 2012 Jun;16(3):272-80. doi: 10.1111/j.1744-9987.2011.01057.x.
256. Wang YD, Zhang L, Cai GY, Zhang XG, Lv Y, Hong Q, Shi SZ, Yin Z, Liu XF, Chen XM. Fasudil ameliorates rhabdomyolysis-induced acute kidney injury via inhibition of apoptosis. *Ren Fail*. 2011;33(8):811-8. doi: 10.3109/0886022X.2011.601830.
257. Nayak S, Jindal A. Myoglobinuria and Acute Kidney Injury. *J Integr Nephrol Androl*. 2015;2(2):50. doi:10.4103/2225-1243.155775.
258. Van Avondt K, Nur E, Zeerleder S. Mechanisms of haemolysis-induced kidney injury. *Nat Rev Nephrol*. 2019 Nov;15(11):671-692. doi: 10.1038/s41581-019-0181-0.
259. Shinder GA, Lacourse MC, Minotti S, Durham HD. Mutant Cu/Zn-superoxide dismutase proteins have altered solubility and interact with heat shock/stress proteins in models of amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem*. 2001 Apr 20;276(16):12791-6. doi: 10.1074/jbc.M010759200.
260. AlBasher G, Alfarraj S, Alarifi S, Alkhtani S, Almeer R, Alsultan N, Alharthi M, Alotibi N, Al-Dbass A, Abdel Moneim AE. Nephroprotective Role of Selenium Nanoparticles Against Glycerol-Induced Acute Kidney Injury in Rats. *Biol Trace Elem Res*. 2020 Apr;194(2):444-454. doi: 10.1007/s12011-019-01793-5.
261. Belliere J, Casemayou A, Ducasse L, Zakaroff-Girard A, Martins F, Iacovoni JS, Guilbeau-Frugier C, Buffin-Meyer B, Pipy B, Chauveau D, Schanstra JP, Bascands JL. Specific macrophage subtypes influence the progression of rhabdomyolysis-induced kidney injury. *J Am Soc Nephrol*. 2015 Jun;26(6):1363-77. doi: 10.1681/ASN.2014040320.
262. Cron L, Allen T, Febbraio MA. The role of gp130 receptor cytokines in the regulation of metabolic homeostasis. *J Exp Biol*. 2016 Jan;219(Pt 2):259-65. doi: 10.1242/jeb.129213.
263. Elshaer SS, Anwar HM. Relevance of megalin receptor injury with nuclear factor-kappa B upregulation in acute kidney injury induced in rats. *J Biochem Mol Toxicol*. 2018 Jan;32(1). doi: 10.1002/jbt.22014.
264. Anaya-Prado R, Norzgaray-Ibarra FG, Bravo-Cuéllar A, Pérez-Avila CE, Schadeegg-Peña D, Anaya-Fernández MM. Expresión de TREM-1 en pacientes con cáncer cervical invasor y lesiones precursoras [Expression of TREM-1 in patients with invasive cervical cancer and precursor lesions]. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2015 Nov-Dec;53(6):722-7. Spanish.
265. Shi X, Zhang Y, Wang H, Zeng S. Effect of Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 1 (TREM-1) Blockade in Rats with Cecal Ligation and Puncture (CLP)-Induced Sepsis. *Med Sci Monit*. 2017 Oct 23;23:5049-5055. doi: 10.12659/msm.904386.
266. Tamaro A, Derive M, Gibot S, Leemans JC, Florquin S, Dessing MC. TREM-1 and its

- potential ligands in non-infectious diseases: from biology to clinical perspectives. *Pharmacol Ther.* 2017 Sep;177:81-95. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.02.043.
267. Huang RS, Zhou JJ, Feng YY, Shi M, Guo F, Gou SJ, Salerno S, Ma L, Fu P. Pharmacological Inhibition of Macrophage Toll-like Receptor 4/Nuclear Factor-kappa B Alleviates Rhabdomyolysis-induced Acute Kidney Injury. *Chin Med J (Engl).* 2017 Sep 20;130(18):2163-2169. doi: 10.4103/0366-6999.213406.
268. Huang N, Kny M, Riediger F, Busch K, Schmidt S, Luft FC, Slevogt H, Fielitz J. Deletion of Nlrp3 protects from inflammation-induced skeletal muscle atrophy. *Intensive Care Med Exp.* 2017 Dec;5(1):3. doi: 10.1186/s40635-016-0115-0.
269. Rainer TH, Ng MH, Lam NY, Chan TY, Cocks RA. Role of monocyte L-selectin in the development of post-traumatic organ failure. *Resuscitation.* 2001 Nov;51(2):139-49. doi: 10.1016/s0300-9572(01)00409-9.
270. Jones BA, Beamer M, Ahmed S. Fractalkine/CX3CL1: a potential new target for inflammatory diseases. *Mol Interv.* 2010 Oct;10(5):263-70. doi: 10.1124/mi.10.5.3.
271. Marquez-Exposito L, Cantero-Navarro E, Lavoz C, Fierro-Fernández M, Poveda J, Rayego-Mateos S, Rodrigues-Diez RR, Morgado-Pascual JL, Orejudo M, Mezzano S, Ruiz-Ortega M. Análisis de la vía Notch como una posible diana terapéutica en la patología renal. *Nefrología.* 2018;38(5):466-475. doi:10.1016/j.nefro.2017.11.027.
272. Lavoz C, Rodrigues-Diez R, Benito-Martin A, Rayego-Mateos S, Rodrigues-Diez RR, Alique M, Ortiz A, Mezzano S, Egido J, Ruiz-Ortega M. Angiotensin II contributes to renal fibrosis independently of Notch pathway activation. *PLoS One.* 2012;7(7):e40490. doi: 10.1371/journal.pone.0040490.
273. Prieto M, Rivas JV, López Novoa JM, Pérez-Barriocanal F. El TGF-beta: síntesis y mecanismo de acción [TGF-beta: synthesis and mechanism of action]. *Nefrología.* 2002;22(2):135-43. Spanish.
274. Sánchez-López E, Rodrigues Díez R, Rodríguez Vita J, Rayego Mateos S, Rodrigues Díez RR, Rodríguez García E, Lavoz Barria C, Mezzano S, Egido J, Ortiz A, Ruiz-Ortega M, Selgas R. El factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF): factor clave en el inicio y la progresión del daño renal [Connective tissue growth factor (CTGF): a key factor in the onset and progression of kidney damage]. *Nefrología.* 2009;29(5):382-91. Spanish. doi: 10.3265/Nefrologia.2009.29.5.5429.en.full.
275. Lovisa S, LeBleu VS, Tampe B, Sugimoto H, Vадnagara K, Carstens JL, Wu CC, Hagos Y, Burckhardt BC, Pentcheva-Hoang T, Nischal H, Allison JP, Zeisberg M, Kalluri R. Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis. *Nat Med.* 2015 Sep;21(9):998-1009. doi: 10.1038/nm.3902.
276. DiRocco DP, Bisi J, Roberts P, Strum J, Wong KK, Sharpless N, Humphreys BD. CDK4/6 inhibition induces epithelial cell cycle arrest and ameliorates acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2014 Feb 15;306(4):F379-88. doi: 10.1152/ajprenal.00475.2013.
277. van Swelm RPL, Wetzels JFM, Swinkels DW. The multifaceted role of iron in renal health and disease. *Nat Rev Nephrol.* 2020 Feb;16(2):77-98. doi: 10.1038/s41581-019-0197-5.
278. Korrapati MC, Shaner BE, Schnellmann RG. Recovery from glycerol-induced acute kidney injury is accelerated by suramin. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012 Apr;341(1):126-36. doi: 10.1124/jpet.111.190249.

- 
279. Nishida K, Watanabe H, Ogaki S, Kodama A, Tanaka R, Imafuku T, Ishima Y, Chuang VT, Toyoda M, Kondoh M, Wu Q, Fukagawa M, Otagiri M, Maruyama T. Renoprotective effect of long acting thioredoxin by modulating oxidative stress and macrophage migration inhibitory factor against rhabdomyolysis-associated acute kidney injury. *Sci Rep*. 2015 Sep 28;5:14471. doi: 10.1038/srep14471.
280. Gois PHF, Canale D, Volpini RA, Ferreira D, Veras MM, Andrade-Oliveira V, Câmara NOS, Shimizu MHM, Seguro AC. Allopurinol attenuates rhabdomyolysis-associated acute kidney injury: Renal and muscular protection. *Free Radic Biol Med*. 2016 Dec;101:176-189. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.012.
281. Wu J, Pan X, Fu H, Zheng Y, Dai Y, Yin Y, Chen Q, Hao Q, Bao D, Hou D. Effect of curcumin on glycerol-induced acute kidney injury in rats. *Sci Rep*. 2017 Aug 31;7(1):10114. doi: 10.1038/s41598-017-10693-4.
282. Guerrero-Hue M, García-Caballero C, Palomino-Antolín A, Rubio-Navarro A, Vázquez-Carballo C, Herencia C, Martín-Sánchez D, Farré-Alins V, Egea J, Cannata P, Praga M, Ortiz A, Egido J, Sanz AB, Moreno JA. Curcumin reduces renal damage associated with rhabdomyolysis by decreasing ferroptosis-mediated cell death. *FASEB J*. 2019 Aug;33(8):8961-8975. doi: 10.1096/fj.201900077R.
283. da Silva BHCS, Ariga SK, Barbeiro HV, Volpini RA, Barbeiro DF, Seguro AC, Pinheiro da Silva F. Cathelicidin protects mice from Rhabdomyolysis-induced Acute Kidney Injury. *Int J Med Sci*. 2021 Jan 1;18(4):883-890. doi: 10.7150/ijms.52397.
284. NaveenKumar SK, Hemshekhar M, Kemparaju K, Girish KS. Hemin-induced platelet activation and ferroptosis is mediated through ROS-driven proteasomal activity and inflammasome activation: Protection by Melatonin. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2019 Sep 1;1865(9):2303-2316. doi: 10.1016/j.bbadis.2019.05.009.
285. Matsushita K, Mori K, Saritas T, Eiwaz MB, Funahashi Y, Nickerson MN, Hebert JF, Munhall AC, McCormick JA, Yanagita M, Hutchens MP. Cilastatin Ameliorates Rhabdomyolysis-induced AKI in Mice. *J Am Soc Nephrol*. 2021 Oct;32(10):2579-2594. doi: 10.1681/ASN.2020030263.
286. Nielsen R, Christensen EI, Birn H. Megalin and cubilin in proximal tubule protein reabsorption: from experimental models to human disease. *Kidney Int*. 2016 Jan;89(1):58-67. doi: 10.1016/j.kint.2015.11.007.
287. Christensen EI, Birn H. Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001 Apr;280(4):F562-73. doi: 10.1152/ajprenal.2001.280.4.F562.
288. Szabo G, Dolganiuc A, Dai Q, Pruett SB. TLR4, ethanol, and lipid rafts: a new mechanism of ethanol action with implications for other receptor-mediated effects. *J Immunol*. 2007 Feb 1;178(3):1243-9. doi: 10.4049/jimmunol.178.3.1243. PMID: 17237368.



**ANEXO**



## A) PERFIL DE CITOQUINAS MODELO DE FRA INDUCIDO POR RABDOMIÓLISIS

pg/mL	CONTROL	CONTROL + CIL	GLICEROL	GLICEROL + CIL
L-SELECTINA	2678 ± 162.5	2532 ± 152.7	<b>3316 ± 109.1*</b>	2486 ± 261.6
JAM-A	91.22 ± 7.8	126.2 ± 14.54	<b>303.4 ± 84.75*</b>	165.1 ± 17.95
GM-CSF	143.4 ± 10.21	183 ± 24.47	<b>96.22 ± 7.86*</b>	<b>137 ± 10.47</b>
CD86	268.2 ± 27.57	245.8 ± 36.74	266.5 ± 12.71	<b>185.1 ± 27.8#</b>
GAS1	928.7 ± 51.71	943.2 ± 60.2	<b>2431 ± 270.2*</b>	<b>1782 ± 223.9</b>
RANTES	673.8 ± 61.99	695.2 ± 8.96	887.1 ± 60.08	<b>672.7 ± 76.08#</b>
TIMP-1	6156 ± 325.1	6199 ± 422.9	<b>7298 ± 312.7*</b>	6365 ± 281.9
TREM-1	79.13 ± 301	84.3 ± 5.11	<b>262.5 ± 31.22*</b>	161.4 ± 27.02
CINC-1	53.77 ± 9.13	62.3 ± 7.11	<b>32.55 ± 3.90</b>	51.8 ± 8.68
CINC-2	14.52 ± 1.20	13.63 ± 2.48	<b>23.83 ± 3.43</b>	20.55 ± 2.11
EOTAXINA	324.4 ± 11.87	306.6 ± 12.17	<b>200.4 ± 23.18*</b>	<b>249.0 ± 11.57</b>
PROLACTINA	1101 ± 118.3	1340 ± 753.1	<b>2525 ± 491.9</b>	1747 ± 316.1
SCF	43.72 ± 11.87	38.52 ± 6.95	<b>135.4 ± 21.01*</b>	71.52 ± 23.62
NEUROFILINA-1	139.3 ± 21.79	135.1 ± 21.36	<b>469.5 ± 97.1*</b>	250.8 ± 65.82
NEUROFILINA-2	2131 ± 377.7	3773 ± 380.2	<b>13747 ± 4697*</b>	5706 ± 927.4
NOPE	5076 ± 205.7	5188 ± 209.7	<b>7931 ± 1434</b>	<b>5516 ± 271.9#</b>
TWEAK-R	23728 ± 1090	21078 ± 1434	<b>37767 ± 2114*</b>	<b>32055 ± 1973</b>
TCK-1	3102 ± 149.8	3085 ± 171.2	<b>2595 ± 85.34*</b>	2988 ± 135.2
GALECTINA-1	865.6 ± 61.97	799 ± 77.99	<b>1828 ± 519</b>	1055 ± 99.84
GFRα	588 ± 53.8	463.1 ± 53.9	<b>820.1 ± 97.6</b>	613.2 ± 82.64
CD80	57.83 ± 13.24	73.67 ± 13.03	40.60 ± 6.59	52.32 ± 33.44
RAGE	1.02 ± 1.02	0.02 ± 0.02	<b>3.98 ± 1.17*</b>	0.84 ± 0.41
TNFα	<b>914.4 ± 115.5</b>	1269 ± 189.3	<b>587.1 ± 71.65</b>	<b>671 ± 37.66</b>
INF-γ	7.53 ± 0.91	7.9 ± 0.99	<b>3.98 ± 0.59</b>	5.64 ± 0.60
b-NGF	29.77 ± 3.96	26.18 ± 3.49	26.69 ± 4.57	27.43 ± 2.31
TIMP-2	9.95 ± 1.17	7.56 ± 0.92	<b>51.8 ± 17.12</b>	32.33 ± 13.97
CINC-3	39.92 ± 5.32	44.72 ± 6.82	38.95 ± 3.83	35.63 ± 3.64
FRACKTALKINA	706.5 ± 50.01	813 ± 39.14	<b>864.3 ± 13.72*</b>	<b>571.1 ± 42.26</b>
LIX	1752 ± 186.1	1551 ± 150.2	1287 ± 245.8	<b>1915 ± 226.6#</b>
MIP-1a	755.4 ± 521.8	<b>1193 ± 318.7</b>	112.8 ± 59.31	126.7 ± 51.64
CNTF	72.05 ± 9.10	73.10 ± 7.33	82.40 ± 9.32	101.9 ± 19.34
GP130	0	0	<b>2184 ± 532.8</b>	<b>1999 ± 82.65</b>
HGF	8763 ± 216.8	8494 ± 721.4	17804 ± 8895	7789 ± 486
FLT3	2121 ± 55.5	2305 ± 334.6	2735 ± 353.6	2135 ± 286.1
IL-6	473.6 ± 53.25	484.8 ± 49.53	<b>312.2 ± 43.55</b>	<b>312.7 ± 47.21</b>
IL-1β	161 ± 23.83	<b>205.8 ± 44</b>	124 ± 14.45	155.4 ± 6.38
IL-10	339.1 ± 125.4	306 ± 84.32	544.6 ± 131	400.5 ± 104
IL-17F	2.62 ± 1.58	0.96 ± 0.59	<b>15.20 ± 6.86*</b>	4.1 ± 2.02
IL-2	21.84 ± 3.61	<b>38.85 ± 11.19</b>	19.58 ± 4.46	18.35 ± 5.81
IL-4	2.8 ± 0.22	3.14 ± 0.40	<b>1.41 ± 0.12</b>	<b>1.75 ± 0.14</b>
IL-22	797.1 ± 253.7	612 ± 371.6	1646 ± 380.6	1144 ± 433.7
IL-1RA	925.3 ± 245	854.1 ± 112.9	<b>11077 ± 3440*</b>	4696 ± 1391
IL-2RA	61.74 ± 4.32	54.68 ± 8.52	<b>111.2 ± 14.84*</b>	64.32 ± 12.03
IL-7	66.48 ± 14.29	45.66 ± 13.64	<b>145.2 ± 38.02*</b>	56.10 ± 17.48
IL-1A	18.97 ± 5.57	36.23 ± 14.76	18.02 ± 5.75	<b>61.73 ± 16.59#</b>

Tabla 22. Perfil de citoquinas analizadas en suero mediante arrays en el modelo de FRA inducido por rabdomiólisis a 48 horas. Los datos están expresados como media ± EEM, n = 6-10 animales por grupo. \*p ≤ 0.05 vs. todos los grupos; #p ≤ 0.05 vs. Glicerol. Se ha destacado solo la significación del grupo glicerol frente a todos los grupos y el glicerol + cilastatina con respecto al grupo glicerol. Cil: cilastatina.

pg/mL	CONTROL	CONTROL + CIL	GLICEROL	GLICEROL + CIL
JAM-A	140.3 ± 8.82	96.67 ± 11.09	<b>393.5 ± 95.32*</b>	<b>246.6 ± 17.56</b>
B7-2	365.4 ± 7.19	243.9 ± 16.39	<b>543.4 ± 96.22</b>	<b>301.4 ± 34.12<sup>#</sup></b>
GALECTINA-1	1051 ± 134.7	917.1 ± 80.56	<b>2842 ± 917.4*</b>	1298 ± 154.8
RANTES	673.8 ± 61.99	695.2 ± 8.96	887.1 ± 60.08	672.7 ± 76.08
TIMP-1	6685 ± 275	<b>5061 ± 714.9</b>	7062 ± 643.3	7272 ± 494.4
TREM-1	132.3 ± 16.41	84.42 ± 13.57	<b>444.4 ± 106.3*</b>	<b>263.9 ± 26.94</b>
CINC-1	57.8 ± 5.74	58.43 ± 8.57	<b>91.17 ± 8.09</b>	<b>97.2 ± 10.32</b>
EOTAXINA	<b>300.4 ± 4.4</b>	269.5 ± 5.43	275.8 ± 11.47	268.6 ± 7.67
PROLACTINA	1183 ± 423.7	706.4 ± 361.6	<b>4802 ± 1438*</b>	1703 ± 643.3
SCF	77.63 ± 13.24	67.15 ± 12.50	<b>597.4 ± 265.6*</b>	120.3 ± 28.93
NEUROFILINA-2	6878 ± 889.7	2042 ± 610.9	<b>15125 ± 3828*</b>	5487 ± 1148
NOPE	5650 ± 440.1	5460 ± 441.3	<b>7358 ± 780.2*</b>	5858 ± 320.6
TWEAK-R	27894 ± 2492	22044 ± 2113	<b>48793 ± 3455*</b>	<b>40624 ± 2193</b>
TCK-1	3114 ± 101.4	2895 ± 106.6	<b>2547 ± 51.42*</b>	3115 ± 131
GAS-1	<b>1211 ± 13.47</b>	1008 ± 39.14	<b>1669 ± 73.87*</b>	1408 ± 71.10
GFRα	702.3 ± 95.78	478.4 ± 41.39	<b>2143 ± 716.9*</b>	679.2 ± 80.71
b-NGF	10.45 ± 1.45	3.95 ± 3.23	<b>303 ± 147.2</b>	<b>35.25 ± 13.85<sup>#</sup></b>
LIX	2015 ± 196.9	1849 ± 200.5	<b>1363 ± 89.26*</b>	2012 ± 79.71
HGF	8140 ± 1324	7684 ± 440.6	9423 ± 896.4	8441 ± 516.5
IL-17F	6.628 ± 1.58	6.467 ± 2.15	<b>55.45 ± 27.02*</b>	12.71 ± 3.97
IL-4	2.67 ± 0.22	2.033 ± 0.09	<b>1.9 ± 0.29</b>	2.063 ± 0.14
IL-22	1449 ± 363.8	1198 ± 500.9	<b>19923 ± 9210*</b>	3087 ± 1177
IL-1RA	1190 ± 137.5	765.1 ± 315.5	<b>17467 ± 9309*</b>	2213 ± 642.8
IL-2RA	87.6 ± 22.44	68.78 ± 14.14	<b>467.4 ± 196.9*</b>	116.4 ± 21.74
IL-7	80.07 ± 11.48	59.43 ± 13.33	<b>479.9 ± 163.7*</b>	105.6 ± 19.58
IL-10	263.6 ± 28.28	240.8 ± 9.26	263.1 ± 13.90	242.9 ± 10.82
IL-3	1.367 ± 0.57	2.22 ± 2.12	<b>58.56 ± 32.5*</b>	10.23 ± 6.2
FLT3	2365 ± 83.11	2084 ± 101.8	<b>3236 ± 469.2*</b>	2243 ± 98.38
ADIPONECTINA	31.95 ± 4.49	21.93 ± 4.78	<b>8.6 ± 2.31*</b>	<b>18.35 ± 3.6</b>

Tabla 23. Perfil de citoquinas analizadas en suero mediante arrays en el modelo de FRA inducido por rabdomiólisis a 72 horas. Los datos están expresados como media ± EEM, n = 6-10 animales por grupo. \*p ≤ 0.05 vs. todos los grupos; #p ≤ 0.05 vs. Glicerol. Se ha destacado solo la significación del grupo glicerol frente a todos los grupos y el glicerol + cilastatina con respecto al grupo glicerol. Cil: cilastatina.

## B) PATENTES

La búsqueda de los mecanismos moleculares de la enfermedad y de nuevas dianas terapéuticas ha dado lugar a la solicitud y concesión en muchos de los casos (otros están en proceso de revisión para su concesión actualmente) de una familia de patentes orientadas a la nefroprotección frente a la sepsis. Las patentes en las que participo como inventora son:

Inventores: Alberto Tejedor; Alberto Lázaro; Blanca Humanes; **María Ángeles González-Nicolás**.

Título: “**Cilastatin for use in the treatment of sepsis**”. *Nº Aplicación Internacional*: **PCT/EP2017/065609** (WO2017220810A1); Fecha de aplicación: 23/06/2017 (Fecha prioridad: 24/06/2016 con nº de solicitud de patente europea “Cilastatin for use in the treatment of sepsis”: EP16382299.2).

**Concedida en Europa**, nº de patente: **EP 3474897A1** (publicación: 27/01/2021). Actualmente validada en España, Alemania, Francia, Italia y Reino Unido.

**Concedida en EE. UU.**, nº de patente: **US 11,185,522 B2** (publicación: 30/11/2021).

Solicitada y en revisión para su concesión en: China, nº de aplicación: **CN 109843330 A** (después de la respuesta a la segunda acción oficial, los examinadores tienen la intención de conceder la misma); Japón, nº de aplicación: **2019-520490**; Canadá, nº de aplicación: **3,028,846** y Australia, nº de aplicación: **2017281744**.

Titular: Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Gregorio Marañón (FIBHGM).

Transferida mediante acuerdo de licencia a la compañía farmacéutica Spherium Biomed S.L./Grupo Ferrer (2016-01/03/2020) y a Telara Pharma S.L (24/10/2020-actualidad). Desde Telara Pharma S.L., spin off creada desde la FIBHGM, y de la que soy accionista minoritaria, se ha llegado a un acuerdo de sublicencia con la compañía farmacéutica canadiense Arch Biopartners INC (<https://www.archbiopartners.com/>), que ha sido firmado el día 7 de abril de 2021, para su uso y explotación y acelerar la transición de nuestra innovación biomédica desde la cadena de valor hasta el mercado.

## C) PUBLICACIONES

Las publicaciones derivadas de esta tesis están actualmente en preparación. Otros artículos publicados durante el desarrollo de esta tesis y relacionados con la nefroprotección por cilastatina se describen a continuación:

- Zaballos M, Power M, Canal-Alonso MI, **González-Nicolás MÁ**, Vasquez-Jimenez W, Lozano-Lominchar P, Cabrerizo-Torrente P, Palencia-García N, Gago-Quiroga S, Ginel-Feito MD, Jiménez C, Lázaro A, González-Bayón L. Effect of Cilastatin on Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Patients Undergoing Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy. *Int J Mol Sci*. 2021 Jan 27;22(3):1239. doi: 10.3390/ijms22031239.
- Jado JC, Humanes B, **González-Nicolás MÁ**, Camaño S, Lara JM, López B, Cercenado E, García-Bordas J, Tejedor A, Lázaro A. Nephroprotective Effect of Cilastatin against Gentamicin-Induced Renal Injury *In Vitro* and *In Vivo* without Altering Its Bactericidal Efficiency. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Sep 3;9(9):821. doi: 10.3390/antiox9090821.
- **González-Nicolás MÁ**, González-Guerrero C, Pérez-Fernández VA, Lázaro A. Cilastatin: a potential treatment strategy against COVID-19 that may decrease viral replication and protect from the cytokine storm. *Clin Kidney J*. 2020 Sep 24;13(5):903-905. doi: 10.1093/ckj/sfaa193.
- **María Ángeles González-Nicolás González**, Alberto Lázaro Fernández. Inducción de un modelo de sepsis en rata mediante técnica de ligadura y punción cecal. *Animales de Laboratorio, Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio*, otoño 2019. Número 83, paginas 15-19. 11/12/2019.
- López-Sánchez A, Pérez-Cantero A, Torrado-Salmerón C, Martín-Vicente A, García-Herrero V, **González-Nicolás MÁ**, Lázaro A, Tejedor A, Torrado-Santiago S, García-Rodríguez JJ, Capilla J, Torrado S. Efficacy, Biodistribution, and Nephrotoxicity of Experimental Amphotericin B-Deoxycholate Formulations for Pulmonary Aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018 Jun 26;62(7):e00489-18. doi: 10.1128/AAC.00489-18.
- Humanes B, Camaño S, Lara JM, Sabbisetti V, **González-Nicolás MÁ**, Bonventre JV, Tejedor A, Lázaro A. Cisplatin-induced renal inflammation is ameliorated by cilastatin nephroprotection. *Nephrol Dial Transplant*. 2017 Oct 1;32(10):1645-1655. doi: 10.1093/ndt/gfx005. Published by Oxford University Press on behalf of ERA-EDTA.
- Lázaro A, Humanes B, Jado JC, Mojena M, **González-Nicolás MÁ**, Del Cañizo JF, Tejedor A, Lledó-García E. Beneficial Effect of Short Pretransplant Period of Hypothermic Pulsatile Perfusion of the Warm-Ischemic Kidney after Cold Storage: Experimental Study. *Biomed Res Int*. 2016;2016:2518626. doi: 10.1155/2016/2518626.

## D) PRESENTACIONES EN CONGRESOS

Trabajos presentados en congresos y jornadas de investigación relacionados con el tema de esta tesis, y relacionados con la nefroprotección por cilastatina durante el desarrollo de esta:

- Participación en la V Jornada de Investigación e Innovación del IIS-GM. Aula Magna del pabellón docente del HGUGM. Comunicación titulada: *“Cilastatina, nueva estrategia terapéutica en el tratamiento de la sepsis”*. **Mariángeles González-Nicolás González**; Blanca Humanes; Raquel Herrero; José Ángel Lorente; Alberto Tejedor Jorge; Alberto Lázaro Fernández. Obtuvo el premio a mejor comunicación con componente de innovación. Tipo de participación: Póster. 2017, MADRID, España.
- Participación en la Kidney Week 2017 de la ASN. Póster titulado: *“Renal cholesterol rafts blockade ameliorates septic multiorganic failure”*. Alberto Lázaro, **María Ángeles González-Nicolás**, Blanca Humanes, Raquel Herrero, José Ángel Lorente, Alberto Tejedor. Del 2 al 5/11/17 New Orleans, LA. EEUU.
- Participación en el II Concurso Tesis en 3 minutos, dentro del ámbito CIENCIAS E INGENIERIA. Exposición oral con título: *“Cilastatina, nueva estrategia terapéutica en el tratamiento de la sepsis”*. U.C.M. 23/4/2018, Madrid, España.
- Participación en las VII jornadas de Investigación e Innovación del IISGM del HGUGM. Madrid, 8.30-15h. Póster titulado: *“Bloqueo en la evolución a la cronicidad del fracaso renal agudo”*. **María Ángeles González-Nicolás**, Blanca Humanes, Sonia Camaño, Verónica Pérez-Fernández, José Manuel Lara, Lisardo Boscá, Alberto Tejedor, Alberto Lázaro. 28/3/2019, Madrid, España.
- Participación en el 55th ERA-EDTA Congress, Leading European Nephrology. Póster titulado: *“Epithelial-Mesenchymal Transition may be blocked before acute kidney injury expansion”*. **Mariángeles González-Nicolás**, Blanca Humanes, Sonia Camaño, Paloma García-Piqueras, Miguel Cova, Jorge Martín-Lozoya, Laura del Baño, José Manuel Lara, Lisardo Boscá, Alberto Tejedor, Alberto Lázaro. Copenhague, Dinamarca. 24-27 mayo 2018.
- Participación en la Kidney Week 2019 de la ASN. Póster titulado: *“Cholesterol lipid rafts blocked prevents epithelial-mesenchymal transition in cisplatin-induced renal injury”*. **González-Nicolás MA**, Humanes B, Camaño S, Pérez-Fernández VA, Tejedor A, Lázaro A. Del 5 al 10 noviembre 2019 Washington, DC. EEUU.
- Participación en el 51 Congreso de la Sociedad Española de Nefrología, 15-18 octubre 2021, virtual. Participación con tres e-póster:
  - o *“El bloqueo de “lipid rafts” previene la transición epitelio-mesénquima en el daño renal inducido por cisplatino”*. **María Ángeles González-Nicolás**, Blanca Humanes, Sonia

Camaño, Alberto Tejedor, Alberto Lázaro. La S.E.N. y la Fundación Senefro, conceden el premio a la mejor comunicación e-póster a dicho trabajo.

- “Cilastatina, nueva estrategia terapéutica en el tratamiento de la sepsis”. **María Ángeles González-Nicolás**, Blanca Humanes, Mario Arenillas, Raquel Herrero, Antonio Ferruelo, José Ángel Lorente, Alberto Tejedor, Alberto Lázaro. La S.E.N. y la Fundación Senefro, conceden el premio a la mejor comunicación e-póster a dicho trabajo.
  
- “Prevención del daño por isquemia-reperfusión en el trasplante renal mediante el bloqueo temporal de las balsas de colesterol en el epitelio tubular. Prueba de concepto”  
A. Molina Andújar, J. Rovira, M. Lazo, MA. González-Nicolás, A. Lázaro, E. Poch, F. Diekmann.

(19)



(11)

**EP 3 474 897 B1**

(12)

**EUROPEAN PATENT SPECIFICATION**

(45) Date of publication and mention of the grant of the patent:  
**27.01.2021 Bulletin 2021/04**

(51) Int Cl.:  
**A61K 45/06 (2006.01) A61K 31/198 (2006.01)**  
**A61P 31/00 (2006.01)**

(21) Application number: **17731188.3**

(86) International application number:  
**PCT/EP2017/065609**

(22) Date of filing: **23.06.2017**

(87) International publication number:  
**WO 2017/220810 (28.12.2017 Gazette 2017/52)**

(54) **CILASTATIN FOR USE IN THE TREATMENT OF SEPSIS**

CILASTATIN ZUR VERWENDUNG BEI DER BEHANDLUNG VON SEPSIS

CILASTATINE POUR UTILISATION DANS LE TRAITEMENT DE LA SEPTICÉMIE

(84) Designated Contracting States:  
**AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO RS SE SI SK SM TR**

(30) Priority: **24.06.2016 EP 16382299**

(43) Date of publication of application:  
**01.05.2019 Bulletin 2019/18**

(73) Proprietor: **Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Gregorio Marañón 28007 Madrid (ES)**

(72) Inventors:  
• **TEJEDOR JORGE, Alberto 28007 Madrid (ES)**  
• **LAZARO FERNANDEZ, Alberto 28007 Madrid (ES)**  
• **HUMANES SANCHEZ, Blanca 28007 Madrid (ES)**  
• **GONZALEZ-NICOLAS GONZALEZ, Maria Angeles 28007 Madrid (ES)**

(74) Representative: **Hoffmann Eitle Hoffmann Eitle S.L.U. Paseo de la Castellana 140, 3a planta Edificio LIMA 28046 Madrid (ES)**

(56) References cited:  
**WO-A1-2017/025802 US-A1- 2011 165 264**

- **R Nagano ET AL: "Therapeutic efficacy of BO-3482, a novel dithiocarbamate carbapenem, in mice infected with methicillin-resistant Staphylococcus aureus", Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1 October 1997 (1997-10-01), pages 2278-2281, XP055328772, UNITED STATES Retrieved from the Internet: URL:<http://aac.asm.org/content/41/10/2278.full.pdf>**
- **WIJDAN RAMADAN ET AL: "Evaluation of the appropriateness of imipenem/cilastatin prescription and dosing in a tertiary care hospital", INFECTION AND DRUG RESISTANCE, 1 March 2015 (2015-03-01), page 31, XP055328783, DOI: 10.2147/IDR.S78633**
- **ADAM ROMANOVSKY ET AL: "Pathophysiology and management of septic acute kidney injury", PEDIATRIC NEPHROLOGY., vol. 29, no. 1, 12 February 2013 (2013-02-12), pages 1-12, XP055328816, DE ISSN: 0931-041X, DOI: 10.1007/s00467-013-2427-6**
- **A. ZARJOU ET AL: "Sepsis and Acute Kidney Injury", JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY., vol. 22, no. 6, 12 May 2011 (2011-05-12), pages 999-1006, XP055328818, US ISSN: 1046-6673, DOI: 10.1681/ASN.2010050484**

**EP 3 474 897 B1**

Note: Within nine months of the publication of the mention of the grant of the European patent in the European Patent Bulletin, any person may give notice to the European Patent Office of opposition to that patent, in accordance with the Implementing Regulations. Notice of opposition shall not be deemed to have been filed until the opposition fee has been paid. (Art. 99(1) European Patent Convention).



US011185522B2

(12) **United States Patent**  
**Tejedor Jorge et al.**

(10) **Patent No.:** **US 11,185,522 B2**  
(45) **Date of Patent:** **Nov. 30, 2021**

(54) **CILASTATIN FOR USE IN THE TREATMENT OF SEPSIS**

FOREIGN PATENT DOCUMENTS

(71) Applicant: **FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL HOSPITAL GREGORIO MARAÑÓN**, Madrid (ES)

CN 1878564 A 12/2006  
WO 2017/025802 A1 2/2017

(72) Inventors: **Alberto Tejedor Jorge**, Madrid (ES); **Alberto Lazaro Fernandez**, Madrid (ES); **Blanca Humanes Sanchez**, Madrid (ES); **Maria Angeles Gonzalez-Nicolas Gonzalez**, Madrid (ES)

OTHER PUBLICATIONS

Camano et al., "Cilastatin Attenuates Cisplatin-Induced Proximal Tubular Cell Damage," *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 334(2):419-429, 2010.

(73) Assignee: **FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL HOSPITAL GREGORIO MARAÑÓN**, Madrid (ES)

Del Valle et al., "Efficacy and Safety of Imipenem/Cilastatin in the Empirical Treatment of Septicemia," *Scand J Infect Dis Suppl.* 52:20-25, 1987.

(\* ) Notice: Subject to any disclaimer, the term of this patent is extended or adjusted under 35 U.S.C. 154(b) by 0 days.

Humanes et al., "Cilastatin protects against cisplatin-induced nephrotoxicity without compromising its anticancer efficiency in rats," *Kidney International* 82:652-663, 2012.

(21) Appl. No.: **16/312,825**

Humanes et al., "Protective Effects of Cilastatin against Vancomycin-Induced Nephrotoxicity," *Biomed Research International*, 12 pages, 2015.

(22) PCT Filed: **Jun. 23, 2017**

Kabbara et al., "Evaluation of the appropriateness of imipenem/cilastatin prescription and dosing in tertiary care hospital," *Infection and Drug Resistance* 8:31-38, 2015.

(86) PCT No.: **PCT/EP2017/065609**  
§ 371 (c)(1),  
(2) Date: **Dec. 21, 2018**

Kuo et al., "Meropenem versus imipenem/cilastatin in the treatment of sepsis in Chinese patients," *Zhonghua YiXue Za Zhi (Taipei)* 63(5):361-367, 2000 (abstract only).

(87) PCT Pub. No.: **WO2017/220810**  
PCT Pub. Date: **Dec. 28, 2017**

Lazaro et al., "Novel Strategies in Drug-Induced Acute Kidney Injury," *InTech*, pp. 381-396, 2012.

(65) **Prior Publication Data**  
US 2020/0069623 A1 Mar. 5, 2020

Moreno-Gordaliza et al., "Elemental Bioimaging in Kidney by LA-ICP-MS As a Tool to Study Nephrotoxicity and Renal Protective Strategies in Cisplatin Therapies," *Anal. Chem.* 83:1933-7940, 2011.

(30) **Foreign Application Priority Data**

Jun. 24, 2016 (EP) ..... 16382299

Nagano et al., "Therapeutic Efficacy of BO-3482, a Novel Dithiocarbamate Carbapenem, in Mice Infected with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47(10):2278-2281, 1997.

(51) **Int. Cl.**  
**A61K 31/198** (2006.01)  
**A61P 13/12** (2006.01)  
**A61K 9/00** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)

Perez et al., "Inhibition of brush border dipeptidase with cilastatin reduces toxic accumulation of cyclosporin A in kidney proximal tubule epithelial cells," *Nephrology Dialysis Transplantation* 19:2445-2455, 2004.

(52) **U.S. Cl.**  
CPC ..... **A61K 31/198** (2013.01); **A61K 9/0019** (2013.01); **A61K 9/0029** (2013.01); **A61K 45/06** (2013.01); **A61P 13/12** (2018.01)

Romanovsky et al., "Pathophysiology and management of septic acute kidney injury," *Pediatric Nephrology* 29:1-12, 2014.

(58) **Field of Classification Search**  
CPC ..... A61K 31/198; A61P 13/12; A61P 31/04  
See application file for complete search history.

Zarjou et al., "Sepsis and Acute Kidney Injury," *J Am Soc Nephrol* 22:999-1006, 2011.

(56) **References Cited**

U.S. PATENT DOCUMENTS

9,216,185 B2\* 12/2015 Tejedor Jorge ..... A61P 39/00  
9,522,128 B2\* 12/2016 Tejedor Jorge ..... A61K 31/167  
9,757,349 B2\* 9/2017 Tejedor Jorge ..... A61K 45/06  
2011/0165264 A1 7/2011 Tejedor Jorge et al.

Merck Sharp & Dohme Limited, "Primaxin IV 500 mg/500 mg powder for solution for infusion," retrieved from <https://www.medicines.org.uk/emc/product/1515/smpc/print> on Sep. 10, 2020 (11Pages).

Robbins et al., U.S. Appl. No. 62/203,704, filed Aug. 11, 2015, 53 pages.

Robbins et al., U.S. Appl. No. 62/264,032, filed Dec. 7, 2015, 62 pages.

(Continued)

Primary Examiner — James D. Anderson

(74) Attorney, Agent, or Firm — Seed IP Law Group LLP

(57) **ABSTRACT**

The present invention relates to the treatment of sepsis and sepsis-associated acute kidney injury (SA-AKI). More specifically, it relates to cilastatin for use in a method of treating sepsis and/or SA-AKI and reducing its associated mortality, in a mammalian subject. It is further directed to methods for treating sepsis and/or SA-AKI; and to pharmaceutical compositions for use in the methods of the invention.

**23 Claims, 13 Drawing Sheets**



*Dedicada a la memoria  
del Dr. Alberto Tejedor*

