



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

Mecanismos moleculares implicados en el daño renal agudo por rabdomiolisis.

Juan Manuel Amaro Villalobos

Madrid 2018.

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID

***Mecanismos moleculares implicados en el daño renal
agudo por rabdomiolisis.***

Memoria que presenta el graduado en Biología Sanitaria

Juan Manuel Amaro Villalobos

para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Directores de Tesis: Juan Antonio Moreno Gutiérrez y Jesús Egido de los Ríos

Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz

Universidad Autónoma de Madrid.

*A mi abuela,
A mi madre,
Por y para ellas.*

“Defiende tu derecho a pensar, porque incluso pensar de manera errónea es mejor que no pensar.”

Hipatia de Alejandría, científica y revolucionaria
(370 – 415, Alejandría)

Resumen

El fracaso renal agudo (FRA) es la pérdida súbita de la función renal. El 7-10% de los FRA están provocados por rhabdomiolisis, un síndrome caracterizado por la ruptura de músculo esquelético que provoca la liberación masiva de mioglobina al torrente sanguíneo, lo que resulta tóxico a nivel renal. Actualmente no existe ningún tratamiento farmacológico específico para esta patología, tan solo cuidados paliativos, por lo que la búsqueda de nuevos mecanismos implicados en el desarrollo de este fenómeno resulta de gran interés. Klotho es una proteína que se expresa mayoritariamente en el riñón y que posee acciones antiinflamatorias y antioxidantes, además de estar implicada en la homeostasis del fósforo y el calcio. La expresión renal de Klotho disminuye en contextos de estrés oxidativo e inflamación. Estas dos condiciones ocurren durante el FRA asociado a rhabdomiolisis. En esta tesis hemos estudiado los mecanismos fisiopatológicos implicados en el daño renal por rhabdomiolisis, prestando especial interés en la expresión renal de Klotho. Para ello, hemos desarrollado varios abordajes experimentales en modelos de rhabdomiolisis con ratones y realizado estudios en células tubulares estimuladas con mioglobina. Además, analizamos los niveles plasmáticos de Klotho en pacientes con rhabdomiolisis. Nuestros datos muestran que la inducción de rhabdomiolisis en ratones disminuye la función renal, provoca hiperfosfatemia, hipocalcemia e incrementa el daño tubular y el estrés oxidativo a las 24 horas, existiendo una mejoría paulatina de estos parámetros entre los 3 y 7 días. La expresión de citoquinas inflamatorias aumentó a las 24 h, observando infiltrado de macrófagos a 3 y 7 días. Nuestros resultados *in vivo* muestran un descenso significativo de la expresión génica de Klotho en el riñón a partir de las 3h y proteica a partir de las 24 horas, la cual se mantiene reducida a los 30 días, coincidiendo con un aumento de la fibrosis renal y una respuesta inflamatoria crónica. Los niveles plasmáticos de Klotho disminuyen en pacientes con FRA asociado a rhabdomiolisis. En células tubulares estimuladas con mioglobina se produce un aumento del estrés oxidativo y de mediadores inflamatorios, así como un descenso significativo de la expresión génica y proteica de Klotho de forma dosis dependiente. El descenso de Klotho por mioglobina se revierte con el uso de antioxidantes y un inductor de la activación de Nrf2 *in vitro*, pero no *in vivo*. Por último, nuestros datos muestran que Klotho desempeña un importante papel en la prevención del daño renal por rhabdomiolisis, ya que la administración exógena de Klotho recombinante mejora la función renal y reduce la expresión de marcadores de daño tubular. En conclusión, nuestros resultados ponen de manifiesto que el FRA asociado a rhabdomiolisis reduce la expresión renal de Klotho de forma temprana, la cual se mantiene disminuida aún cuando la función renal se ha restablecido. El descenso de Klotho en rhabdomiolisis puede estar relacionado con el estrés oxidativo, si bien éste no es el único mecanismo responsable.

Summary

Acute kidney injury (AKI) is the abrupt decrease in kidney function, which encompasses both injury and impairment. The 7-10% of AKIs are caused by rhabdomyolysis, a syndrome characterized by the rupture of skeletal muscle and massive release of myoglobin into the bloodstream, resulting in increased renal injury. Currently there is no specific pharmacological treatment for this pathology, only palliative care, so the search for new mechanisms involved in the development of this phenomenon is of great interest. Klotho is a protein that is expressed mainly in the kidney and has anti-inflammatory and antioxidant actions, in addition to being involved in the homeostasis of phosphorus and calcium. Klotho's renal expression decreases in contexts of oxidative stress and inflammation. These two conditions occur during rhabdomyolysis associated AKI. In this thesis we have studied the physiopathological mechanisms involved in renal damage by rhabdomyolysis, with special interest in Klotho's renal expression. To this end, we have developed several experimental approaches in rhabdomyolysis models in mice and we have performed studies on tubular cells stimulated with myoglobin. In addition, we have tested Klotho's plasma levels in patients with rhabdomyolysis. Our data show that induction of rhabdomyolysis in mice decreases renal function, causes hyperphosphatemia, hypocalcemia, and increases tubular damage and oxidative stress at 24h, with gradual improvement of these parameters at 3 and 7 days. Inflammatory cytokine expression increased at 24 h, observing macrophage infiltration at 3 and 7 days. Our *in vivo* results show a significant decrease in Klotho's gene expression in the kidney from 3h and in protein from 24h which was still reduced at 30 days, coinciding with an increase in renal fibrosis and a chronic inflammatory response. We observed a decrease in Klotho plasma levels in patients with rhabdomyolysis associated AKI. In tubular cells stimulated with myoglobin, we observed an increase in oxidative stress and inflammatory mediators, as well as a dose dependent decrease in Klotho mRNA and protein expression of Klotho. The decrease of Klotho by myoglobin was reversed with the use of antioxidants and Nrf2 activators *in vitro*, but not *in vivo*. Finally, our data show that Klotho plays an important role in the prevention of kidney damage by rhabdomyolysis, since the exogenous administration of recombinant Klotho improved renal function and reduced the expression of markers of tubular damage. In conclusion, our results show that rhabdomyolysis-associated AKI reduces Klotho's renal expression early, which remained reduced even when renal function has been restored. The decrease of Klotho in rhabdomyolysis may be related to oxidative stress, although it is not the main mechanism responsible.

Índice

Contenido

Abreviaturas.....	1
INTRODUCCIÓN.....	7
1. El riñón.....	9
1.1. Estructura y función.....	9
1.2. Daño renal.....	10
1.3. Fracaso renal agudo.....	10
2. Rabdomiolisis.....	12
2.1. Prevalencia de la rabdomiolisis.....	13
2.2. Mioglobina.....	13
3. Rabdomiolisis y fracaso renal agudo.....	14
3.1. Mecanismo fisiopatológico.....	14
3.2. Mecanismos de defensa.....	18
4. Klotho.....	23
4.1. Estructura.....	24
4.2. Fenotipo del ratón <i>knock out</i> (KO) para Klotho.....	25
4.3. Funciones de Klotho.....	26
4.4. Regulación de la expresión de Klotho en el riñón.....	28
4.5. Participación de Klotho en la prevención del daño renal.....	28
Hipótesis y objetivos.....	31
Hipótesis.....	33
Objetivos.....	33
Material y métodos.....	35
1. Modelo experimental de rabdomiolisis.....	37
2. Procesamiento de las muestras obtenidas.....	37
3. Análisis bioquímicos.....	38
4. Estudios histológicos.....	38
5. Evaluación del daño renal mediante tinciones histológicas.....	38
5.1. Hematoxilina-eosina.....	38
5.2. Rojo sirio.....	39
6. Inmunohistoquímicas.....	39
7. TUNEL.....	40
8. Cultivos celulares.....	40
9. Análisis de proteínas.....	41

9.1.	Extracción de proteínas.....	41
9.2.	Determinación de GSH	41
9.3.	Determinación de MDA.....	41
9.4.	Western Blot	41
10.	Análisis de la expresión génica.....	42
10.1.	Extracción de mRNA.....	42
10.2.	Transcripción inversa	43
10.3.	PCR cuantitativa a tiempo real.....	43
11.	Citometría de Flujo.....	44
12.	Pacientes con rabdomiolisis.....	44
13.	Análisis estadístico	45
	Resultados.....	47
1.	La inducción de rabdomiolisis provoca daño renal agudo, estrés oxidativo e inflamación en un modelo experimental <i>in vivo</i>	49
2.	El FRA inducido por rabdomiolisis disminuye la expresión renal de Klotho	53
3.	Expresión renal de Klotho en fases iniciales de FRA por rabdomiolisis	56
4.	Los niveles plasmáticos de Klotho disminuyen en pacientes con FRA asociado a rabdomiolisis	58
5.	El FRA por rabdomiolisis disminuye la expresión renal de Klotho a largo plazo.....	59
6.	Los niveles de Klotho disminuyen en células tubulares estimuladas con mioglobina....	63
7.	La modulación del estrés oxidativo regula la expresión de Klotho <i>in vitro</i> pero no <i>in vivo</i>	65
8.	La activación de Nrf2 reduce el descenso de Klotho mediado por mioglobina.....	70
9.	La administración de Klotho recombinante protege del daño renal inducido por rabdomiolisis	73
	Discusión	75
	Conclusiones	87
	Bibliografía	91
	Anexo	113

Abreviaturas

Relación de abreviaturas que aparecen en el texto. En muchos casos, se ha mantenido la correspondiente abreviatura en inglés debido a su frecuente utilización en el lenguaje científico.

Aa	Aminoácido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
ARE	<i>Antioxidants response elements</i> . (Elementos de respuesta antioxidante)
ATP	Adenosín trifosfato
BUN	Nitrógeno ureico en sangre
CCL-	<i>CCchemokine ligand</i> . (Ligandos de quimioquinas CC)
CPK	Creatina fosfoquinasa
CTGF	<i>Connective tissue growth factor</i> . (Factor crecimiento de tejido conectivo)
Cul3	<i>Cullin 3. (culina-3)</i>
CytC	Citocromo C
DAB	3,3'-diaminobencidina
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
dNTP	Dexosirribonucleótido fosfato
EER	Error estándar de la media
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ERC	Enfermedad renal crónica
FBS	Suero fetal bovino

Abreviaturas

FITC	<i>Fluoresceine isothiocyanate</i> . (Isotiocianato de fluoresceína)
FRA	Fracaso renal agudo
Gpx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación reducido
GST	Glutación-S-transferasa
HDL	<i>High density lipoprotein</i> . (Lipoproteína de alta densidad)
HIF-1α	<i>Hypoxia-inducible factor 1 alpha</i> . (Factor inducible de hipoxia 1 alfa).
His	Histidina
HO	Hemoxigenasa
Hp	Haptoglobina
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> . (Peroxidasa del rábano)
HSP	<i>Heat shock protein</i> . (Proteína de choque térmico)
H₂DCFDA	2,7-diclorodihidrofluoresceína
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible.
Keap 1	<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
KI	<i>Klotho</i>
Kl	<i>Gen de Klotho</i>
KIM-1	<i>Kidney injury molecule 1</i> . (Proteína 1 de daño renal)
LDH	Lactato deshidrogenasa

Leu	Leucina
LPS	Lipopolisacárido
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases.</i> (Proteína quinasa activada por mitógenos)
Mb	Mioglobina
MDA	Malondialdehído
MMP	Metaloproteínasas
NAC	N-acetil cisteína
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NF-κB	Factor nuclear κB
NGAL	<i>Neutrophil gelatinase-associated lipocalin.</i> (gelatinasa asociada con lipocalina del neutrófilo)
NTA	Necrosis tubular aguda
NOS	Óxido nítrico sintasa
NQO1	<i>NADPH quinonedehydrogenase 1.</i> (NADPH quinona deshidrogenasa 1)
Nrf2	<i>Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth (factor.</i> Factor de crecimiento derivado de plaquetas)
PFA	Paraformaldehido
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
PVDF	Fluoruro de polivinilideno

Abreviaturas

RNA	Ácido ribonucleico
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPMI1640	Medio <i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i>
SFN	Sulforafano
sCR	Creatinina sérica
SOD	Superóxido dismutasa
SV40	Retrovirus termosensible de simio 40
TBP	<i>TATA binding protein</i> . (Proteína de unión a caja TATA)
TBS	Tampón de tris
TLR	<i>Toll-like receptor</i> . (Receptor de tipo Toll)
TGF-β	<i>Transforming growth factor beta</i> . (Factor de crecimiento transformante beta)
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i> . (Factor de necrosis tumoral alfa)
TRX	Tiorredoxina
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl Transferase dUTP nick end labeling</i>
TWEAK	<i>Tumoral necrosis factor-related weak inducer of apoptosis</i> (Inductor débil de apoptosis similar al factor de necrosis tumoral)
UTR	<i>Untranslated region</i> . (Región no codificante)

INTRODUCCIÓN

1. El riñón

1.1. Estructura y función

El riñón es un órgano que realiza funciones imprescindibles para el mantenimiento de la homeostasis del organismo:

- Eliminación de desechos del metabolismo en forma de orina.
- Mantenimiento del equilibrio hidroelectrolítico y ácido-base.
- Endocrino-metabólica, destacando la producción de eritropoyetina (estimula y controla la producción de glóbulos rojos), renina (implicada en el sistema renina-angiotensina-aldosterona, regulador del volumen extracelular y de la presión sanguínea) y vitamina D (se transforma en calcitriol, que regula los niveles de calcio).

Los riñones eliminan urea y otros productos de desecho que transporta la sangre a través de sus unidades de filtración, denominadas nefronas. Cada riñón contiene alrededor de 1 millón de estas unidades de filtración. La nefrona constituye la unidad estructural y funcional de los riñones. Cada nefrona está formada por:

- Corpúsculo renal o de Malpighi: formado a su vez por el glomérulo y la capsula de Bowman. Esta es la parte responsable del filtrado del plasma sanguíneo.
- Sistema tubular: formado por el túbulo contorneado proximal, el segmento delgado y grueso del asa de Henle y el túbulo contorneado distal. Esta es la parte de la nefrona que se encarga de reabsorber agua, sustancias e iones útiles para el cuerpo.

Los corpúsculos de Malpighi y los túbulos proximal y distal se encuentran en la zona del riñón denominada corteza, mientras que los dos segmentos del asa de Henle se localizan en la médula (E. Hall, 2016b) (**Figura 1**).

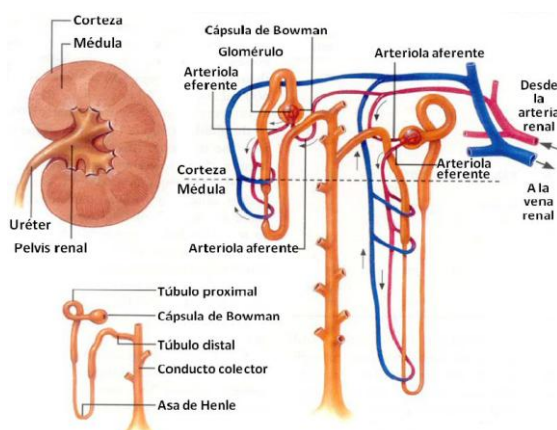


Figura 1. Estructura del riñón. En la parte superior izquierda, corte esquemático de riñón que representa la topografía general del órgano. A la derecha, localización cortical y medular de los componentes de la nefrona y del sistema de los conductos colectores. En la parte inferior izquierda, esquema simplificado de la nefrona

Para que el riñón ejerza sus funciones es precisa la integridad de tres aspectos (E. Hall, 2016a):

- Una perfusión renal suficiente para mantener una presión de filtración adecuada.
- La integridad anatómica y funcional del parénquima renal: glomerulos, túbulos, intersticio y vasos sanguíneos.
- Una vía excretora libre que permita la eliminación de la orina.

1.2. Daño renal

La mayoría de las enfermedades renales conocidas producen un efecto perjudicial sobre el funcionamiento de las nefronas y los túbulos. Esto impide una correcta eliminación de las toxinas o desechos que produce el organismo, las cuales se acumulan en la sangre. Además, como consecuencia del daño renal se producen otras alteraciones importantes en el mantenimiento del equilibrio electrolítico y la volemia. En la actualidad, la clasificación de la mayor parte de las nefropatías sigue basándose en la naturaleza de la lesión inicial que afecta al parénquima renal y la porción del riñón que se ve afectada con más intensidad. De esta forma, las nefropatías pueden ser glomerulares, tubulointersticiales o vasculares. Según su evolución, las nefropatías se califican como agudas o crónicas y pueden causar fracaso renal agudo (FRA) o enfermedad renal crónica (ERC) (Remuzzi, Ruggenti and Benigni, 1997). Independientemente del tipo de nefropatía, la consecuencia más grave del daño renal es el fracaso de las funciones del riñón, que puede ocasionar la muerte del paciente. El FRA y la ERC son síndromes integrados debido a que la ocurrencia de uno puede incrementar el riesgo de la aparición del otro (Chawla and Kimmel, 2012). Ambas patologías tienen respuestas adaptativas y patológicas comunes como son la muerte celular, proliferación, indiferenciación celular e inflamación, que determinan en conjunto el deterioro del filtrado glomerular. En esta tesis nos vamos a centrar en el fracaso renal agudo, el cual describiremos a continuación.

1.3. Fracaso renal agudo

El FRA es un síndrome clínico caracterizado por la pérdida brusca de la función renal que conduce a un incremento de nivel de toxinas urémicas en sangre, las cuales resultan deletéreas para el propio riñón y otros órganos (Liaño and Pascual, 1996). El FRA está asociado con una alta mortalidad y frecuentemente con una progresión hacia ERC (Siew and Davenport, 2015). Aunque la mortalidad ante un FRA aislado ha disminuido hasta un 21% gracias a los recientes avances en la terapia del remplazo renal, la mortalidad del FRA complicado por una disfunción multiorgánica se ha mantenido sin cambios y se calcula en aproximadamente el 50% (Belcher *et al.*, 2013). Las opciones para el tratamiento del FRA se limitan a sustituir la

función renal mediante diálisis, si es necesario, y no existen herramientas para acelerar la recuperación funcional del riñón. El FRA puede ser prerenal si falla el aporte sanguíneo, por falta de volumen o de presión, parenquimatoso si se alteran las estructuras renales u obstructivo en el caso que se produzca una incapacidad de eliminar la orina por un problema mecánico en la vía excretora (Liaño and Pascual, 1996; Sharfuddin and Molitoris, 2011). La forma más frecuente de FRA es el parenquimatoso (45% de los casos). Dentro de éste, la causa más frecuente es la necrosis tubular aguda (NTA), estando presente en el 85% de los mismos (50% de origen isquémico y 35% de causa toxica o mixta). El término de NTA fue definido por las necropsias estudiadas antes de que se definiera la apoptosis como una forma distinta de muerte celular. Sin embargo, en la NTA, la forma más frecuente de muerte celular es la apoptosis (Solez, Morel-Maroger and Sraer, 1979; Olsen, Olsen and Hansen, 1985). Los cambios morfológicos del FRA en el ser humano incluyen muerte celular, regeneración, inflamación y edema intersticial (Olsen, Olsen and Hansen, 1985). Los riñones tienen la capacidad de recuperarse de un daño agudo. Durante el FRA, tras una primera fase en la que la principal característica es la muerte de células tubulares, hay una segunda fase de recuperación (Humes, Lake and Liu, 1995). Las células tubulares que permanecen en los túbulos después del daño proliferan para regenerar el epitelio tubular y recuperar la función renal. Las células madre también participan en la reparación tisular después del daño (Jakubowski *et al.*, 2005). Se ha sugerido la existencia de células progenitoras en el riñón que participan en la reparación del epitelio tubular. Estas células proliferarían después de un daño renal y se diferenciarían para contribuir a la regeneración tubular, aunque también pueden estar involucradas en procesos fibróticos (Maeshima, Yamashita and Nojima, 2003; Yamashita, Maeshima and Nojima, 2005). Dicho aumento de los procesos fibróticos provoca un reemplazo progresivo de las nefronas funcionales por tejido de cicatrización, lo que puede llegar a ocasionar pérdida crónica de función renal.

Actualmente existen varios biomarcadores que nos indican el inicio o el grado de daño renal provocado. Nos centraremos en los dos que más uso tienen tanto en la práctica clínica como en las investigaciones renales. La gelatinasa asociada con lipocalina del neutrófilo (NGAL), es una proteína de 25 kD, también llamada lipocalina 2. Tiene un bajo nivel de expresión en distintos órganos como riñón, pulmón, estómago y colon. Su expresión está fundamentalmente inducida por el daño epitelial. Por ello, es un importante biomarcador para la detección precoz de la lesión renal aguda por distintas etiologías, dada su rápida expresión y detección en orina (J. M. Belcher *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2014). Otro biomarcador de uso muy extendido es la molécula 1 de lesión renal (KIM-1), una glicoproteína transmembrana que se

sobreexpresa en las células del túbulo proximal tras un daño renal. Su detección sirve para el diagnóstico diferencial de la NTA frente a otros tipos de FRA como el prerrenal (J. M. Belcher *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2014).

2. Rabdomiolisis

La rabdomiolisis se define como la ruptura del músculo esquelético y se caracteriza por la liberación de su contenido celular al plasma. La rotura de las fibras musculares se puede deber a diferentes causas (Bosch, Poch and Grau, 2009; Khan, 2009):

- Traumáticas
 - Aplastamiento
 - Electrocutación
 - Quemaduras
- No Traumáticas
 - Ejercicio excesivo
 - Hipoxia
 - Hipertermia
 - Alteraciones metabólicas de las células musculares
 - Agentes biológicos
 - Efectos tóxicos derivados de químicos, fármacos o drogas

La compresión muscular y la isquemia provocan estrés en la membrana plasmática, lo que provoca la apertura de canales transmembrana que permiten la entrada a la célula muscular de sodio y calcio. El edema intracelular y el alto contenido de calcio ocasionan la activación de las proteasas neutrales citoplasmáticas y la posterior degradación de las proteínas miofibrilares y la activación de fosforilasas dependientes de calcio que degradan la membrana citoplasmática. Entre las moléculas liberadas tras la ruptura de las fibras musculares, se encuentran la mioglobina (Mb), enzimas como la lactato deshidrogenasa, la creatinfosfoquinasa y electrolitos como el potasio o el fósforo (Khan, 2009). La Mb liberada se puede filtrar a nivel glomerular e inducir un aumento del estrés oxidativo, vasoconstricción, inflamación y necrosis tubular, pudiendo producir FRA (Korantzopoulos, Galaris and Papaioannides, 2002). Se ha observado que no todos los pacientes con rabdomiolisis presentan FRA, lo que sugiere la presencia de otros factores nefrotóxicos para la aparición de FRA. Entre ellos se encuentra un nivel bajo de hidratación, volumen sanguíneo reducido y una disminución del pH. La hipovolemia ocasionada disminuye la perfusión renal y facilita el

proceso de obstrucción de la nefrona por la precipitación de la Mb. A un pH menor a 5.4, la Mb se disocia en las globinas y el grupo hemo, induciendo un efecto túbulo-tóxico (Sinert *et al.*, 1994; Clarkson and Hubal, 2002; Sayers and Clarkson, 2002; Huerta-Alardín, Varon and Marik, 2005). Otras complicaciones de la rabdomiolisis son la desregulación del sistema de coagulación, alteraciones del ritmo cardiaco y la disminución del ion calcio del torrente sanguíneo por la falta de reabsorción renal por el daño en el riñón, así como por el calcio acumulado en el músculo dañado o el precipitado en los vasos en forma de fosfato cálcico. Por último, todo este proceso patológico produce un aumento de fósforo en suero ya que hay una gran liberación de este elemento desde el músculo y el riñón dañado no es capaz de excretarlo (Vanholder *et al.*, 2000).

2.1. Prevalencia de la rabdomiolisis

La rabdomiolisis es una patología que causa el 7-10% de los casos de FRA cada año en EE.UU. (Korantzopoulos, Galaris and Papaioannides, 2002; Bagley, Yang and Shah, 2007; Khan, 2009), aunque su prevalencia puede estar subestimada, ya que no existen grandes estudios epidemiológicos o registros actualizados sobre dicha relación. Además, existen varias definiciones y los escenarios clínicos varían dependiendo del país. El 50% de las personas con rabdomiolisis desarrolla FRA, con las consecuentes comorbilidades asociadas (Ward, 1988; Korantzopoulos, Galaris and Papaioannides, 2002; Fernandez *et al.*, 2005; Melli, Chaudhry and Cornblath, 2005). La mortalidad estimada en pacientes con rabdomiolisis se encuentra entre un 2-46%, dependiendo de la causa, del tiempo desde que se produjo hasta que se trata y de la presencia de otras patologías concomitantes que puedan generar complicaciones (Khan, 2009; Zimmerman and Shen, 2013).

2.2. Mioglobina

La estructura de la mioglobina fue descrita por Jhon Kendrew entre 1958 y 1963 (KENDREW *et al.*, 1958, 1960; KENDREW, 1963). La cadena principal de Mb consta de ocho hélices α asignadas con las letras A-H (Frauenfelder *et al.*, 2001). La Mb es una hemoproteína citoplasmática de 154 aa y un peso molecular de 17 kDa que está codificada en el cromosoma 22q12 de humano y en el cromosoma 15D3 de ratón. Su estructura terciaria tiene una zona de bolsillo que consta, casi exclusivamente, de residuos no polares en su interior y donde se alberga el grupo prostético hemo, posicionado entre dos residuos de histidina (His), His-64 e His-93. Está expresada en los miocitos y en las células de las fibras musculares esqueléticas.

Recibe ese nombre ya que tiene grandes similitudes funcionales y estructurales con la hemoglobina (KENDREW *et al.*, 1954; Wittenberg and Wittenberg, 1989).

Evolutivamente, la mioglobina y la hemoglobina surgieron de un gen común hace más de 500 millones de años. Al igual que la hemoglobina, la mioglobina se une de manera reversible al oxígeno, por lo que facilita su transporte desde la hemoglobina de los glóbulos rojos a las mitocondrias de las células musculares durante periodos de mayor actividad metabólica. Además, la Mb sirve de reservorio de oxígeno en el músculo durante condiciones hipóxicas o anóxicas. A diferencia de la hemoglobina, la mioglobina es monomérica y tiene un único sitio de unión al oxígeno, lo que hace que su curva de saturación sea hiperbólica, característica de la cinética enzimática normal de Michaelis-Menten en lugar de la curva sigmoidea de la hemoglobina tetramérica (Ordway and Garry, 2004). El grupo hemo de la mioglobina es un tetrapirrol cíclico, encargado del transporte del oxígeno. Contiene un átomo de hierro que les proporciona el color rojo a los eritrocitos y a los músculos estriados. El átomo de hierro se encuentra en estado de oxidación ferroso (Fe^{+2}) y puede formar 5 o 6 enlaces de coordinación, dependiendo de su unión con el oxígeno.

3. Rabdomiolisis y fracaso renal agudo

3.1. Mecanismo fisiopatológico

Los mecanismos por los cuales se provoca un fallo renal tras la rabdomiolisis son la disminución de la perfusión renal, la obstrucción tubular por la filtración de la Mb y los efectos tóxicos directos de la Mb sobre los túbulos renales. La Mb liberada tras la rabdomiolisis atraviesa directamente la membrana de filtración glomerular debido a su bajo tamaño molecular. En la luz del túbulo, la Mb es capaz de precipitar y formar agregados con la proteína de Tamm-Horsfall y originar cilindros hemáticos, que provocan la obstrucción intratubular en los segmentos distales de las nefronas (Heyman *et al.*, 1996; Rosenberger *et al.*, 2008). Esta obstrucción se encuentra favorecida por el pH ácido de la orina, que incrementa la estabilidad de los enlaces entre la mioglobina y la proteína de Tamm-Horsfall (Zager, 1996; Krouzecký *et al.*, 2003). Además de precipitar, la Mb se puede reabsorber por los túbulos proximales a través del complejo de receptores megalina/cubilina (Tracz, Alam and Nath, 2007) o bien degradarse liberando el grupo hemo y hierro libre, los cuales también tienen acciones deletéreas, tales como la neutralización del óxido nítrico, vasoconstricción e isquemia (Heyman and Brezis, 1995). El descenso de la biodisponibilidad del óxido nítrico provoca la

desregulación de factores que controlan el tono vascular, como endotelina-1, tromboxano A2, factor de necrosis tumoral e isoprostanos (Bonventre and Weinberg, 2003; Bain *et al.*, 2013).

En el interior de las células tubulares, la mioglobina se disocia liberando la globina y el grupo hemo, el cual induce estrés oxidativo, producción de citocinas inflamatorias, fibrosis y muerte celular (Korantzopoulos, Galaris and Papaioannides, 2002). En los siguientes puntos nos centraremos en los 2 primeros efectos adversos.

3.1.1. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como el desequilibrio en el balance agentes oxidantes/antioxidantes. Está promovido por un aumento de moléculas con carácter oxidante y un descenso de las moléculas y enzimas antioxidantes, lo que promueve un microambiente oxidante (Sies and Cadenas, 1985; Sies, 2015; McGarry *et al.*, 2018). El estrés oxidativo está mediado por las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS), las cuales son las responsables de la modificación de macromoléculas. Existen dos clases de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno; por un lado, se encuentran los radicales libres que son moléculas o átomos que contienen uno o más electrones desapareados en su orbital más externo. Entre los radicales libres destacan: el anión superóxido (O_2^-), que en sí es poco reactivo, pero resulta potencialmente tóxico debido a los intermediarios que puede producir; el radical hidroxilo (OH^\cdot), que es muy reactivo y con una semivida extremadamente corta; el radical peroxilo (ROO^\cdot), que surge de la peroxidación de lípidos; el radical alcóxil (RO^\cdot) y peroxinitrito ($ONOO^-$) que es muy reactivo y es resultado de la reacción entre el óxido nítrico (NO) con O_2^- . Por otro lado, se encuentran las especies reactivas que no contienen electrones desapareados, pero son agentes oxidantes. Entre ellos se encuentran: el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el ozono (O_3), el oxígeno singlete (1O_2) y el dióxido de nitrógeno (NO_2) (Dröge, 2002; Valko *et al.*, 2007; Palipoch, 2013) (**Tabla 1**).

Tabla 1. Principales especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS).

Radicales Libres	Especies reactivas no radicales
Superóxido O_2^-	Peróxido de hidrogeno H_2O_2
Hidroxilo OH^\cdot	Hidroperóxidos ROOH
Alcoxil RO^\cdot	Ozono O_3
Peroxilo ROO^\cdot	Oxígeno singlete 1O_2
Oxido Nítrico NO	Peroxinitrito $ONOO^-$

Las especies reactivas de oxígeno juegan un papel muy importante a nivel celular, ya que pueden modular rutas de señalización específicas, lo que se conoce como señalización redox (Gill and Wilcox, 2006; Sirker, Zhang and Shah, 2011; Sedeek *et al.*, 2013). Además de los oxidantes de origen exógeno, el organismo también puede generar ROS de forma fisiológica, como en el caso de los fagocitos activados, los cuales pueden producir O_2^- y H_2O_2 . El NO es normalmente producido por las óxido nítrico sintasas (NOS) en el endotelio vascular o en fagocitos, mientras que O_2^- se genera a través de varias formas de oxidasas como la xantina oxidasa, la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NAD(P)H) oxidasa, la citocromo P450 mono-oxigenasa mitocondrial y la lipooxigenasa (D'Autréaux and Toledano, 2007; Drummond *et al.*, 2011).

La Mb, así como el grupo hemo libre, se pueden considerar una fuente endógena de ROS. El grupo hemo de la Mb posee actividad peroxidasa y en presencia de H_2O_2 , es capaz de generar radicales libres (Baron and Andersen, 2002; Buehler and Alayash, 2005; Glasauer and Chandel, 2013; Schaer *et al.*, 2013). Además, la Mb interacciona con el óxido nítrico, reduciendo sus niveles disponibles, y éste es responsable de mantener el tono vascular, la relajación del músculo liso o la activación plaquetaria. La Mb es capaz de auto-oxidar las globinas y producir dímeros en presencia de H_2O_2 , generando radicales en las globinas, principalmente en los residuos aromáticos de histidina (Baron and Andersen, 2002).

Cuando la mioglobina es captada por las células tubulares, éstas muestran un incremento de H_2O_2 y una dramática depleción de glutatión (Shah and Walker, 1988; Barrouillet, Moiret and Cambar, 1999). Además, el grupo hemo es oxidado de Fe^{+2} a Fe^{+3} y da lugar a radicales hidroxilo (Holt and Moore, 2000; Baron and Andersen, 2002). En presencia de peróxidos el Fe^{+3} se oxida a Fe^{+4} y genera radicales hidroperóxido, los cuales son altamente reactivos y contribuyen a la formación de nuevas especies reactivas de oxígeno en el riñón (Gutteridge, 1986; Boutaud and Roberts, 2011). Todos estos radicales promueven la peroxidación de los lípidos que constituyen las membranas citoplasmáticas y generan malonaldehído (MDA), que intervendrá en la oxidación de proteínas y DNA (Jia *et al.*, 2007; Buehler, D'Agnillo and Schaer, 2010; Panizo *et al.*, 2015). Este proceso da lugar a isoprostanos, citoquinas proinflamatorias y a la expresión de moléculas de adhesión, lo que amplifica la respuesta inflamatoria (Moore *et al.*, 1998).

3.1.2. Inflamación

La inflamación es un proceso biológico inespecífico, en el cual participan el sistema inmune innato y adquirido, que se produce ante una agresión, interna o externa, que puede estar producida por diversos factores de tipo biológico, químico o mecánico. La finalidad de la inflamación es la eliminación del agente causante, así como la reparación del daño producido y está dirigida por varios tipos celulares, principalmente mastocitos, neutrófilos, linfocitos y monocitos-macrófagos. Si las condiciones nocivas cesan, la respuesta inflamatoria aguda finaliza y el sistema inmune recupera sus condiciones homeostáticas basales. La respuesta inflamatoria crónica puede estar debida a que la inflamación aguda no se resuelva o a que no se elimine la causa inicial. La inflamación crónica está presente en diversas patologías, incluida la enfermedad renal (Medzhitov, 2008).

La respuesta inflamatoria es un proceso complejo que implica varias fases. Cuando se produce una agresión, ya sea por un agente patógeno o por una situación de estrés, las células sensoriales (macrófagos residentes, mastocitos, neuronas sensoriales o células del tejido dañado) son las encargadas de iniciar la respuesta inflamatoria, mediante la detección de patógenos, toxinas o el agente causante del daño. Esta detección se puede producir de forma directa o indirecta mediante el reconocimiento de su efecto sobre la homeostasis del tejido, como la detección de apoptosis, degradación de la matriz extracelular, necrosis tisular, producción de ROS o daño tisular (Medzhitov, 2010). Los macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y células implicadas en la promoción de la inflamación, son capaces de detectar un amplio rango de moléculas que forman parte de los patógenos a través de un conjunto de receptores denominados receptores de reconocimiento de patrones (PRR), como los receptores TLRs, de sus siglas en inglés "*Toll-like Receptors*", mediante los cuales se inicia una cascada de señalización que induce la activación del factor nuclear κ B (NF- κ B), la proteína activadora-1 (AP-1) y otros factores de transcripción que inducen la expresión génica de moléculas pro-inflamatorias y estimulan la generación de ROS, fagocitosis y liberación de diferentes citoquinas y quimioquinas, cuyo resultado es la amplificación de la respuesta inflamatoria (Akira, Takeda and Kaisho, 2001; Kawai and Akira, 2006; Yoneyama, Jogi and Onomoto, 2016). Además, las propias células del tejido dañado pueden secretar mediadores, entre los que se encuentran citoquinas como IL-1, IL-6 y TNF- α , factores de crecimiento como TGF- β , PDGF y CTGF y quimioquinas como CCL-2 y CCL5, que junto a la generación de cuerpos apoptóticos liberados por las células dañadas, estimulan la infiltración de células del sistema inmune hacia el foco inflamatorio (Segeer, Nelson and Schlöndorff, 2000; Guijarro and Egido,

2001; Mezzano *et al.*, 2001; Peshkova, Schaefer and Koltsova, 2016). Una vez que las células infiltrantes se encuentran en la zona de lesión tisular, junto con células residentes del tejido diana, producen la secreción de diversos mediadores pro-inflamatorios, que exacerbaban la respuesta inflamatoria (Chung and Lan, 2011).

La inflamación es un componente esencial en el daño renal. Se genera como respuesta a una agresión como un aumento de estrés oxidativo, tóxicos o desregulación fisiológica, pero a su vez, puede dañar el riñón. Cuando la inflamación es exacerbada en intensidad y tiempo, acaba produciendo un daño crónico que merma la función renal de forma permanente. Las células tubulares renales juegan un papel importante en la inflamación y producen citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión que atraen células inflamatorias al riñón (González-Cuadrado *et al.*, 1996; van Kooten, Daha and van Es, 1999; de Haij *et al.*, 2002). Existen evidencias que muestran que la inflamación juega un papel muy importante en el desarrollo del FRA causado por rabiomiolisis (Belliere *et al.*, 2015). El grupo hemo es capaz de unirse a TLR-4 y desencadenar una respuesta pro-inflamatoria a través de la activación del factor de transcripción NF- κ B (Lin *et al.*, 2012; J. D. Belcher *et al.*, 2014; Nara *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2017). Además, la Mb promueve la activación de señales de transducción como JNK, p38 y MAPK, que se han relacionado con la inflamación (Medzhitov, 2008; Nielsen, Møller and Moestrup, 2010). Otra de las vías implicadas en respuesta inflamatoria en rabiomiolisis está mediada por la activación del inflammasoma NLRP3 (*Nitrogen permease regulator like 3*), responsable de la liberación de diferentes citoquinas y quimioquinas implicadas en el reclutamiento de monocitos/macrófagos (Komada *et al.*, 2015). Así, se ha descrito la presencia de macrófagos de tipo pro-inflamatorio (M1) en fases tempranas en modelos experimentales de FRA por rabiomiolisis, los cuales se diferencian a macrófagos anti-inflamatorios (M2) en etapas posteriores (Belliere *et al.*, 2015; Rubio-Navarro *et al.*, 2016).

3.2. Mecanismos de defensa

El organismo tiene diferentes mecanismos y estrategias para protegerse de los efectos deletéreos de la Mb y el grupo hemo, pudiéndose diferenciar dos tipos:

- Directos: Ejercen su acción frente a la Mb y el grupo hemo de una forma específica promoviendo su metabolismo y posterior eliminación.
- Indirectos: Ejercen su acción sobre el estrés oxidativo ocasionado por la presencia de estas moléculas.

3.2.1. Directos: HO-1

La hemoxigenasa (HO) es la enzima responsable del catabolismo del grupo hemo, dando como productos de su degradación al monóxido de carbono (CO), ion ferroso (Fe^{+2}) y biliverdina. Existen tres isoformas de hemoxigenasa (HO-1, HO-2 y HO-3), las cuales se diferencian en su distribución tisular, regulación y función. La HO-1, que posee una masa molecular de 32 kDa, es expresada en numerosos tipos celulares y tejidos como el hígado, riñón, ovarios, pulmones, intestino, corazón o macrófagos peritoneales. Esta enzima se induce frente a diversos estímulos pro-oxidantes, entre los que se incluye la Mb. La HO-2, con 36 kDa, representa la isoforma constitutiva y se encuentra fundamentalmente en testículos y cerebro (Wang and Chau, 2010). La HO-3 se identificó en ratas al secuenciar el gen que la expresaba y que tenía grandes semejanzas con el gen de la HO-2. Su expresión dio como resultado una proteína que tenía poca capacidad de degradación del grupo hemo y actualmente aún no se le ha encontrado ninguna función a esta isoforma (McCoubrey, Huang and Maines, 1997; Hayashi *et al.*, 2004). HO-1 y HO-2 están reguladas por genes diferentes y solo poseen un 45% de homología, aunque comparten una región con un 100% de homología que corresponde con el sitio catalítico de la enzima (Maines, 1988).

La HO-1 pertenece a la familia de las proteínas de choque térmico y también es denominada *Heat Shock Protein 32* (HSP-32). Es una enzima monomérica que está anclada a la parte externa de la membrana microsomal, situada en el retículo endoplásmico (Yoshida and Sato, 1989). El proceso de degradación del grupo hemo se puede dividir en tres fases; en primer lugar, el grupo hemo se oxida a hidroxihemo, posteriormente se produce verdohemo en una reacción que libera CO y como resultado final se obtiene biliverdina y Fe^{2+} . Para que la reacción ocurra se necesitan 3 moléculas de O_2 y 7 electrones, los cuales son donados por la NAD(P)H citocromo p450 reductasa, situada junto a HO-1 en el retículo endoplásmico (Unno, Matsui and Ikeda-Saito, 2007, 2012; Linnenbaum *et al.*, 2012). El CO liberado en la reacción ejerce un efecto anti-inflamatorio mediante la inhibición de citoquinas pro-inflamatorias como $\text{TNF-}\alpha$ o $\text{IL-1}\beta$, y la inducción de IL-10 (Hu *et al.*, 2015). Tanto la bilirrubina como la biliverdina poseen propiedades antioxidantes, por lo que se ha postulado que puede ser uno de los efectos beneficiosos mediados por HO-1 (Stocker, 2004; Jansen and Daiber, 2012).

La regulación de la expresión de HO-1 es compleja, existiendo un gran número de moléculas endógenas y exógenas que inducen su expresión (Ryter, Alam and Choi, 2006; Lever *et al.*, 2016; Bolisetty, Zarjou and Agarwal, 2017). El grupo hemo es un potente inductor, pero también se han descrito otros estímulos capaces de promover la expresión de HO-1 como el

choque térmico, radiación ultravioleta, LPS, H₂O₂, NO, metales pesados, hipoxia o citoquinas (Thomsen *et al.*, 2013). La HO-1, tras un aumento de ROS, hipoxia o aumento de grupo hemo, puede ser proteolizada y translocarse al núcleo, donde es capaz de promover la transcripción de genes de respuesta antioxidante, incluyendo el factor de transcripción AP-1 (Lin *et al.*, 2007). El gen de HO-1 está altamente regulado a nivel transcripcional. Numerosos factores de transcripción son capaces de unirse a la región no codificante 5' (5'-UTR) del gen, tales como AP-1, factor 2 asociado al factor nuclear eritroide 2 (Nrf2), factor de hipoxia inducible 1 (HIF-1), NF-κB y Bach1 (*BTB And CNC Homology 1*). El grupo hemo promueve la activación de estos factores de transcripción, los cuales inducen la actividad transcripcional del gen de HO-1 (*Hmox1*) (Alam and Den, 1992; Lee *et al.*, 1997; Ogawa *et al.*, 2001; Alam and Cook, 2003; Igarashi and Sun, 2006; Zenke-Kawasaki *et al.*, 2007). Distintos estudios han demostrado que la inducción de HO-1 durante el desarrollo del FRA asociado a rhabdomiólisis tiene efectos beneficiosos en la progresión del daño renal (Bolisetty, Zarjou and Agarwal, 2017).

3.2.2. Indirectos

3.2.2.1. Antioxidantes

Las células del organismo han desarrollado mecanismos contra el estrés oxidativo. Estos mecanismos mantienen controlados los niveles de ROS, ya sea previniendo su síntesis, favoreciendo su eliminación una vez sintetizados o reparando los posibles daños que ocasionen (Davies, 2001; Valko *et al.*, 2007). Los mecanismos antioxidantes se pueden clasificar en mecanismos no enzimáticos y enzimáticos.

3.2.2.2. No enzimáticos

Existen numerosas moléculas en el organismo con actividad antioxidante, como por ejemplo vitaminas, ácido úrico, flavonoides, melatonina o bilirrubina. Estas moléculas se oxidan más fácilmente aún encontrándose en menor concentración que los componentes celulares más susceptibles de oxidación, como el DNA, lípidos o proteínas. Estas moléculas neutralizan los radicales libres y han sido implicadas en la protección frente al daño renal por hemoproteínas.

Un grupo de antioxidantes importante son las vitaminas, entre ellas la vitamina C, que reacciona con el anión superóxido y peróxidos lipídicos; y la vitamina E, que es liposoluble y responsable de mantener la integridad de las membranas celulares, actuando sobre el peróxido y el hidroxiperóxido. Los niveles de vitamina C disminuyen de manera drástica tras la

rabdomiolisis y su administración redujo parcialmente las alteraciones histológicas y mejoró la función renal en modelos experimentales de rabdomiolisis (Ustundag *et al.*, 2008). A diferencia de la vitamina C, el tratamiento con la vitamina E no ha resultado tan efectivo en rabdomiolisis (Kim *et al.*, 2011).

El antioxidante endógeno más importante es el glutatión, que es un péptido formado por glutámico, cisteína y glicina y que presenta un grupo sulfhidrilo susceptible de oxidarse. A través de diversas reacciones enzimáticas, el glutatión en estado reducido (GSH) puede oxidarse a glutatión disulfuro (GSSG). En diversos modelos experimentales de rabdomiolisis se detectó una reducción de los niveles de GSH en el riñón (Abul-Ezz, Walker and Shah, 1991; Ferraz *et al.*, 2002; Manikandan *et al.*, 2014).

3.2.2.3. Enzimáticos

Este grupo encuadra moléculas con actividad enzimática que disminuyen el contenido de ROS intracelular y, por tanto, protegen a la célula del daño oxidativo. La superóxido dismutasa (SOD) tiene la capacidad de dismutar el O_2^- en O_2 y H_2O_2 . Para la eliminación del H_2O_2 , existen otras enzimas con actividad peroxidasa, como son la Catalasa, la glutatión peroxidasa (GPx) y la tioxirredoxina reducida (TRX). La catalasa es una oxidorreductasa que cataliza la reacción de descomposición de H_2O_2 en O_2 y H_2O , como cofactores tiene el grupo hemo y el magnesio. La Gpx cataliza la descomposición de H_2O_2 mediante la oxidación de GSH a GSSG y H_2O . La tioxirredoxina (TRX) reducida, junto con la peroxirredoxina de TRX (PRX) cataliza la reacción de descomposición de H_2O_2 en H_2O (Powis, Briehl and Oblong, 1995; Lee and Johnson, 2004; Abed *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016).

La actividad de la GPx, catalasa y SOD se encuentra reducida en modelos experimentales de rabdomiolisis (Singh, Chander and Chopra, 2004; Ibrahim *et al.*, 2011; Manikandan *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2017). Finalmente, la TRX protege del daño renal asociado a rabdomiolisis mediante la reducción de estrés oxidativo y la inflamación (Nishida *et al.*, 2015).

3.2.2.4. Nrf2

Nrf2 es el principal factor de transcripción implicado en la defensa antioxidante celular. Controla la expresión constitutiva e inducible de algunos genes de enzimas detoxificantes de fase II a partir de su unión a elementos de respuesta antioxidante (ARE, *Antioxidant response element*) localizados en la región promotora de estos genes. Nrf2 está formado por 589 aa y tiene una masa molecular de 68kDa, aunque debido a que es una proteína muy ácida su

movilidad en geles de poliacrilamida está disminuida y presenta un tamaño aparente de 110kDa (Moi *et al.*, 1994). Nrf2 se expresa de manera constitutiva en la mayoría de células en humanos, pero además su actividad está regulada a distintos niveles: transcripción, degradación, translocación al núcleo y modificaciones post-traduccionales (Huang, Nguyen and Pickett, 2000; Kwak *et al.*, 2003; Zhang and Hannink, 2003).

Existen 6 dominios conservados de regiones homologas entre Nrf2 y ECH (*Erythroid cell-derived protein with CNC homology*) denominadas Nrf2-ECH homology (Neh) que nos han permitido determinar la estructura y función de Nrf2 (Itoh *et al.*, 1995, 1999; Tian *et al.*, 2018). Neh tiene dominios CNC-bZip, que son los encargados de la dimerización de Nrf2 con las proteínas pequeñas Maf y de su unión al DNA. Se observó que al eliminar el dominio Neh2, la actividad de Nrf2 aumentaba, lo que indicaba que este dominio es responsable de la interacción con un represor en la célula, denominado Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*). Keap1 suprime la translocación nuclear y, por lo tanto, la actividad transcripcional de Nrf2 (Itoh *et al.*, 1999; Katoh *et al.*, 2005; Nioi *et al.*, 2005).

Keap1 es una proteína de 69 kDa que consta de 5 dominios, 2 de ellos dominios canónicos, el dominio BTB (*Bric-a-brac, tramtrack, broad complex*) y el dominio Kelch o DGR (*Double glycine repeat*). En humanos, la proteína tiene 27 residuos de cisteína (C), de los cuales C-151, C-273 y C-288 poseen capacidad para reaccionar con ROS y moléculas electrófilas (Itoh *et al.*, 1999; Zhang and Hannink, 2003; Levonen *et al.*, 2004; Wakabayashi *et al.*, 2004; Egger *et al.*, 2005). Keap1 utiliza el dominio DGR para interactuar con el dominio Neh2 de Nrf2 y retenerlo en el citoplasma y también para anclarse a la actina del citoesqueleto (X. Li *et al.*, 2004). Nrf2, en condiciones de no estrés, está en constante proceso de degradación a través de un proceso mediado por Keap1, el cual se une a *Cullin-3* (Cul3) formando el complejo de ubiquitina ligasa E3, mediante su asociación con la proteína *Ring-Box1* (Rbx1 o Roc1), que es capaz de ubiquitinar Nrf2 para su posterior degradación vía proteasoma (Geyer *et al.*, 2003; Cullinan *et al.*, 2004; Kobayashi *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004; Furukawa and Xiong, 2005).

En situaciones de estrés oxidativo, las cisteínas C151, C273 y C288 de Keap1 se oxidan y forman puentes disulfuro entre ellas, lo que lleva a la disociación de la unión entre Nrf2 y Keap1. En ese momento, Nrf2 escapa de la ubiquitinización por Cul3/Rbx1, lo que produce una disminución de su velocidad de degradación y un aumento de su estabilidad (Zhang and Hannink, 2003; Wakabayashi *et al.*, 2004; Nguyen, Nioi and Pickett, 2009). Además, la oxidación de los residuos de Keap1 afectan a la unión de los filamentos de actina del

citoesqueleto con Keap1, lo que facilita la liberación y posterior translocación al núcleo de Nrf2 (Kang *et al.*, 2004).

Nrf2 tiene regiones de localización y de exclusión nucleares (NLS y NES respectivamente). El aumento de ROS o de elementos electrófilos inactiva NES, modificando una cisteína en el dominio Neh5, lo que facilita su acumulación nuclear. Neh6 y una de las regiones NES no son sensibles a oxidación, lo que indica que, además de por la oxidación, la translocación al núcleo de Nrf2 puede estar regulada por otros procesos (McMahon *et al.*, 2004; Li, Yu and Kong, 2006; Li and Kong, 2009). Otra vía para estabilizar y activar Nrf2 es a través de las cascadas de señalización intracelular mediadas por proteína quinasa C (PKC), fosfatidilinositol 2-quinasa (PI3K/Akt) y por las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK). Como resultado de la activación de estas quinasas, Nrf2 puede ser fosforilado en residuos de serina o treonina. La fosforilación supone un paso que facilita la disociación definitiva de Nrf2, su estabilización y translocación al núcleo para su posterior unión a regiones ARE (Huang, Nguyen and Pickett, 2002; Bloom and Jaiswal, 2003). Una vez en el núcleo, Nrf2 dimeriza con las proteínas pequeñas Maf para poder unirse a las regiones AREs. En condiciones basales de oxidación Bach1 se encuentra formando un heterodímero con las proteínas Maf. Cuando Nrf2 se transloca al núcleo desplaza a Bach para unirse con Maf y producir así la formación del heterodímero Nrf2-Maf, que una vez unido a ARE da lugar a la transcripción de genes que codifican para proteínas con actividad antioxidante y detoxificante (Dhakshinamoorthy and Jaiswal, 2000; Niture, Khatri and Jaiswal, 2014). Además de su translocación al núcleo, se ha determinado que Nrf2 es capaz de controlar su propia expresión y la de Keap1 a través de sitios ARE localizados en el promotor de ambos genes. De igual forma, se ha observado que Nrf2 puede controlar la expresión de Cul3 y Rbx1. Todas estas evidencias muestran un sistema de auto-regulación controlado por Nrf2, que potencia sus efectos frente a un aumento de estrés oxidativo (Kwak *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2007; Kaspar and Jaiswal, 2010).

4. Klotho

Klotho (Kl) es una proteína de origen primordialmente renal, con propiedades antienvjecimiento, descrita como una proteína deficitaria en ratones con envejecimiento acelerado. Se demostró que ratones deficientes en Kl presentaban una reducción del 80% en su esperanza de vida, mientras que la sobreexpresión del gen la mejoraba en un 30% (Kuro-o *et al.*, 1997; Kurosu *et al.*, 2005).

4.1. Estructura

Kl recibe este nombre por la Moira griega que hilaba las hebras de la vida con una rueca. Kl fue identificado en 1997 de manera fortuita al integrar un transgén en su región promotora. Los ratones deficientes en este gen mostraban múltiples trastornos que se asemejan a los síndromes del envejecimiento humano (Kuro-o *et al.*, 1997).

El gen que codifica a Kl está localizado en el cromosoma 13q12 en humanos y en el cromosoma 5G3 en ratones. La región promotora del gen *Kl* no tiene caja TATA y contiene cuatro sitios de unión para la proteína específica-1 (SP1) (Shiraki-Iida *et al.*, 1998). El gen humano *KL* tiene polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) que están implicados en la aparición de patologías relacionadas con la edad. Determinados polimorfismos se asocian a una mayor expresión de Kl (Arking *et al.*, 2002, 2003, 2005; Ichikawa *et al.*, 2007; Paroni *et al.*, 2017). En un estudio con pacientes en hemodiálisis las personas con los SNPs de *KL* asociados a una mayor expresión tienen mejor supervivencia que las que tienen el SNPs asociados a una menor expresión de la proteína. Kl posee dos transcritos que codifican para una proteína de membrana y una proteína secretada. El transcrito de la isoforma de membrana está formado por cinco exones y muestra la misma organización en humano y en ratón. El transcrito de la isoforma secretada humana contiene cinco exones, mientras que el de ratón contiene tres exones. En los humanos la expresión de la isoforma secretada es mayor que el de la isoforma de membrana, mientras que en los ratones ocurre lo contrario (Matsumura *et al.*, 1998; Shiraki-Iida *et al.*, 1998).

El transcrito de la isoforma de membrana da como resultado una proteína transmembrana de tipo I. Se compone de 1012 aminoácidos en humano y 1014 aminoácidos en ratón (135 kDa). La isoforma de membrana de Kl está compuesta de un dominio extracelular con dos repeticiones internas (KL1 y KL2) que comparten una secuencia de aminoácidos homólogos a la β -glucosidasa (Tohyama *et al.*, 2004), un dominio transmembrana y un pequeño dominio intracelular (Tohyama *et al.*, 2004; Xu and Sun, 2015). Además, tiene un pequeño grupo de aminoácidos básicos entre KL1 y KL2, que es un posible sitio de escisión proteolítica (Matsumura *et al.*, 1998). Kl puede ser escindido por la actividad α - y β -secretasa de dos desintegrinas y metaloproteinasas, ADAM10 y ADAM17, que son dependientes de insulina. Estas proteinasas generan dos fragmentos de Kl, uno de 130 kDa y otro de 68 kDa (Chen *et al.*, 2007). Parte del dominio extracelular de la proteína Kl puede ser liberada en el espacio extracelular por escisión proteolítica y la forma secretada de Kl puede funcionar como un factor humoral (Matsumura *et al.*, 1998).

Kl se expresa mayoritariamente en el riñón, el cerebro (en el plexo coroideo), la glándula paratiroides, y el músculo esquelético. También se expresa en el páncreas, los ovarios, los testículos y la placenta de manera más minoritaria (S.-A. Li *et al.*, 2004). En el riñón, Kl se expresa principalmente en el túbulo contorneado distal. Klotho se puede detectar tanto en plasma como en orina (Kuro-o *et al.*, 1997; Boisvert *et al.*, 2018; Fan *et al.*, 2018; Zheng *et al.*, 2018).

4.2. Fenotipo del ratón *knock out* (KO) para Klotho

El ratón KO para Klotho (Kl -/-) es un modelo animal que reproduce múltiples desórdenes asociados al envejecimiento humano (Kuro-o *et al.*, 1997):

- Retraso en el crecimiento y período de vida corto: Su vida media es de 2 meses (ninguno de ellos sobrevive más de 100 días), frente a los 3 años de los ratones control.
- Atrofia de los órganos genitales (testículos, útero y ovarios) y deterioro de la maduración de las células gonadales, que les impide aparearse. Las células productoras de la hormona del crecimiento, la hormona luteinizante y la hormona estimulante del folículo son más pequeñas que las de los ratones control.
- Atrofia del timo en las etapas tardías.
- La creatinina puede elevarse tardíamente hacia las 10-12 semanas.
- Calcificación ectópica (órganos y paredes arteriales) y arteriosclerosis (calcificación de la aorta, de arterias musculares de tamaño medio y de pequeñas arterias renales).
- Osteoporosis generalizada y osteopenia: Disminución de la densidad mineral ósea, del espesor del hueso cortical y del número de osteoblastos y osteoclastos.
- Alteración en el modo de andar y en el funcionamiento del sistema nervioso central (hipokinesia). Se asemeja a la manera de andar parkinsoniana del humano.
- Atrofia de la piel: Reducción en el número de folículos pilosos y en el espesor dérmico y epidérmico. La grasa subcutánea es difícilmente detectable.
- Enfisema pulmonar: Dilatación de los espacios aéreos distales a los bronquiolos terminales, acompañada de una destrucción de la arquitectura alveolar normal.
- El análisis de sangre y suero muestra hipercalcemia leve, hiperfosfatemia e hipoglucemia con disminución de la insulina en el páncreas y disminución de la ratio de linfocitos a leucocitos.

4.3. Funciones de Klotho

Las funciones de KI varían dependiendo de si se encuentra de manera soluble o está unida a la membrana. La forma de KI transmembrana puede funcionar como un co-receptor para el factor de crecimiento de fibroblastos 23 (FGF23). Además, su dominio extracelular puede ser liberado y secretado, funcionando potencialmente como un factor humoral, regulando múltiples vías de señalización y la actividad de múltiples canales iónicos. Las acciones de KI sobre múltiples proteínas de membrana se han relacionado con su actividad enzimática β -glucuronidasa con la que altera los glúcidos de estas proteínas trastocando su función o su vida media. Por otro lado, KI también protege a las células y a los tejidos del estrés oxidativo (Sopjani *et al.*, 2015; Akasaka-Manyá, Manyá and Endo, 2016; Drew *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2017; Kuro-o and Moe, 2017)(Figura 2).

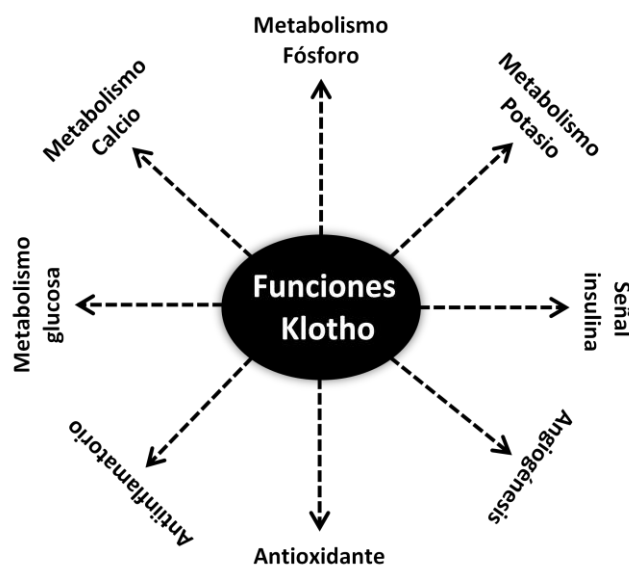


Figura 2. Funciones de Klotho.

4.3.1. FGF23 y la regulación de la homeostasis del fósforo y vitamina D

La forma transmembrana de KI actúa como un co-receptor para FGF23. FGF23 es un miembro de la superfamilia de FGF que mantiene el metabolismo de la vitamina D y la homeostasis del fosfato en el riñón. KI forma un complejo binario con varias isoformas del receptor FGF (FGFR1c, 3c ó 4) y aumenta significativamente su afinidad a FGF23, induciendo la interacción específica entre FGF23 y FGFR (G. Chen *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2018). Es la expresión diferencial de KI en un número limitado de tejidos la que restringe la actividad de FGF23 a determinados órganos (Donate-Correa *et al.*, 2013) (Figura 3).

En situaciones en las que la vitamina D y el fosfato están elevados se incrementa la síntesis de FGF23 en el hueso. Al llegar al riñón se activa la vía Kl/FGFR1, suprimiendo la actividad de la enzima 1α -hidrolasa (vía Cyp27b1) y estimulando la enzima 24-hidroxilasa (vía Cyp24a1) disminuyendo así los niveles de calcitriol (Shimada *et al.*, 2004; Kuro-o, 2011; Kuro-o and Moe, 2017). Además inhibe la expresión de los cotransportadores sodio-fosfato tipo II (Na/P IIa y Na/P IIc), disminuyendo la reabsorción tubular de fósforo a nivel de túbulo proximal e incrementando la excreción renal de fósforo (de Borst *et al.*, 2011). La deficiencia de FGF23 o de Kl genera fenotipos similares que se caracterizan por hiperfosfatemia y elevada síntesis de vitamina D activa ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$) (Schwartz *et al.*, 2009).

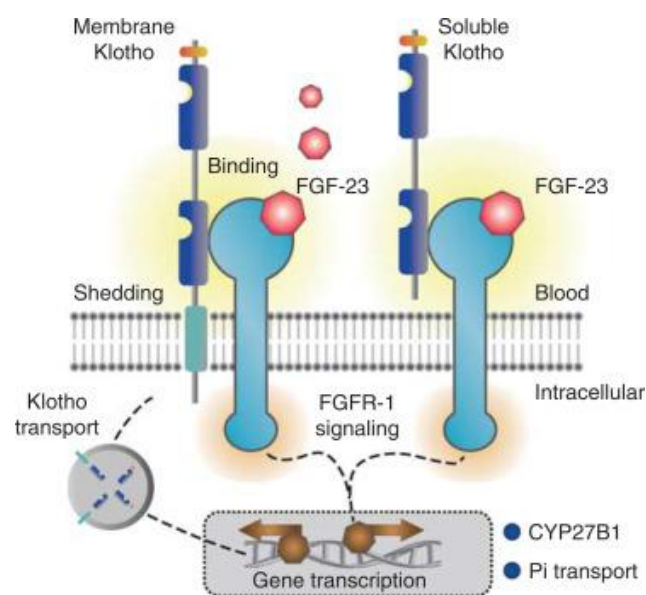


Figura 3. Klotho y FGF-23.

4.3.2. Klotho y calcio

La regulación de la concentración de ion calcio (Ca^{+2}) extracelular libre es vital para gran cantidad de procesos biológicos. Su desbalance puede provocar alteraciones del ritmo cardíaco, hiporreflexia, calambres y depresión, entre otras muchas patologías.

Kl es un factor clave en la regulación de la homeostasis del calcio ya que, por su actividad β -glucuronidasa, hidroliza los residuos de azúcar extracelulares del canal de calcio renal TRPV5 (receptor transitorio potencial vaniloide 5), activándolo y reteniéndolo en la membrana plasmática, aumentando así la reabsorción de Ca^{+2} en el riñón (Chang *et al.*, 2005; Leunissen *et al.*, 2013; Andrukhova *et al.*, 2017). Además, Kl aumenta la actividad de Na^+-K^+ ATPasa al

disminuir los niveles de calcio extracelulares y los niveles de PTH (Imura *et al.*, 2007; Nabeshima and Imura, 2008; Fan *et al.*, 2018; Navarro-García *et al.*, 2018).

4.4. Regulación de la expresión de Klotho en el riñón

La expresión renal de Kl ha sido ampliamente estudiada, pero todavía se desconocen muchos de los mecanismos involucrados en su regulación. La expresión renal de Kl aumenta tras la administración de calcitriol en ratones y en modelos en los que existe un descenso de calcio extracelular (Tsujiyama *et al.*, 2003; Nabeshima and Imura, 2008; Woudenberg-Vrenken *et al.*, 2012; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2017). En otro modelo experimental se demostró que la señal *peroxisome proliferator activated receptor γ* (PPAR γ) aumentaba la síntesis de Kl (Zhang and Zheng, 2008). La elevada ingesta de P está relacionada con el aumento de expresión de Kl (Andrukhova *et al.*, 2017; Yoshikawa *et al.*, 2018). Por el contrario, FGF23, el estrés oxidativo, la angiotensina II y diversas citoquinas inflamatorias, como TWEAK o TNF α , disminuyen la síntesis de Kl (Imura *et al.*, 2007; Marsell *et al.*, 2007; de Borst *et al.*, 2011; Moreno *et al.*, 2011; Martin, David and Quarles, 2012; Guo *et al.*, 2018; Qian *et al.*, 2018; Shen *et al.*, 2018).

Los niveles de Kl disminuyen en determinadas condiciones patológicas, como diabetes mellitus, hipertensión o enfermedad renal crónica. Así, la expresión renal de Kl disminuye en modelos de estrés inflamatorio agudo (Ohyama *et al.*, 1998; Zhou, Kuang and Zhou, 2017; Fernandez-Fernandez *et al.*, 2018; J. Chen *et al.*, 2018). Los mismos resultados se observaron en un modelo de enfermedad inflamatoria intestinal, donde se reportó que el bloqueo de TNF- α con un anticuerpo neutralizante, revertía el descenso de la expresión de Kl (Thurston *et al.*, 2010). En nefropatía diabética también se ha descrito una disminución de Kl en el riñón (Cheng, Chen and Cheng, 2010; Zhao *et al.*, 2011; Fountoulakis *et al.*, 2018). La expresión renal de Kl disminuye durante el FRA, tal y como se ha descrito en modelos de isquemia-reperfusión, administración de ácido fólico o cisplatino. En línea con estos resultados se ha descrito un descenso de Kl en sangre y orina de ratones y pacientes con FRA (Hu *et al.*, 2010; Seibert *et al.*, 2017; Qian *et al.*, 2018).

4.5. Participación de Klotho en la prevención del daño renal

Múltiples estudios han demostrado que Kl juega un papel protector durante el desarrollo del daño renal. En modelos de FRA por isquemia-reperfusión en roedores, la administración de Kl recombinante mejoró la función renal y redujo el daño histológico (Hu *et al.*, 2010), observando un descenso de la necroptosis, un tipo de necrosis programada (Qian *et al.*, 2018).

En un modelo de enfermedad renal crónica en ratones se les trató durante 3 meses con KI recombinante, lo que disminuyó la progresión de la enfermedad y mejoró la lesión renal (Hu *et al.*, 2017). En esta misma línea, la transferencia génica de KI mediante adenovirus, mejoró los niveles de creatinina sérica, el daño renal morfológico y redujo la apoptosis inducida por isquemia-reperfusión en ratas a través de HSP-70 (Sugiura *et al.*, 2010). La sobreexpresión de KI puede modular el estrés oxidativo mitocondrial y mejorar el daño renal (Guo *et al.*, 2018; J. Chen *et al.*, 2018; Qian *et al.*, 2018; Shen *et al.*, 2018). KI también modula la inflamación, ya que, en modelos de diabetes experimental, la disminución de KI incrementaba la respuesta inflamatoria. Las 2 isoformas de KI regulan negativamente NF- κ B a y consiguen suprimir la producción de citoquinas proinflamatorias (Moreno *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2011; Zhou, Kuang and Zhou, 2017; Fernandez-Fernandez *et al.*, 2018)

Hipótesis y objetivos

Hipótesis

En los últimos años se ha producido un gran avance en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo del fracaso renal agudo por rabdomiolisis. Sin embargo, todavía estamos lejos de comprender todos los fenómenos que ocurren en este contexto. Klotho juega un importante papel en el desarrollo de la lesión renal. Por tanto, pensamos que el estudio de Klotho y su regulación durante este tipo de daño podría ser de gran interés, lo que ayudaría a incrementar el conocimiento disponible acerca de la fisiopatología de este síndrome y podría servir para diseñar nuevas opciones terapéuticas.

Objetivos

El objetivo general de esta tesis es el estudio de la fisiopatología del fracaso renal agudo asociado a rabdomiolisis, prestando especial interés en la regulación renal de Klotho. Como objetivos específicos pretendemos:

1. Caracterizar los efectos fisiopatológicos de la liberación masiva de mioglobina sobre el riñón en un modelo experimental de fracaso renal agudo por rabdomiolisis, analizando los niveles renales de Klotho.
2. Analizar los niveles séricos de Klotho en pacientes con fracaso renal agudo asociado a rabdomiolisis.
3. Estudiar si el fracaso renal agudo por rabdomiolisis altera la expresión renal de Klotho a largo plazo.
4. Evaluar las acciones tóxicas de la mioglobina *in vitro* en células tubulares murinas y analizar su efecto sobre la expresión de Klotho, así como las vías moleculares implicadas.
5. Estudiar si la modulación del estrés oxidativo, con compuestos antioxidantes o inductores de Nrf2, podría revertir el descenso de Klotho mediado por mioglobina, tanto *in vivo* como *in vitro*.
6. Analizar si la administración de Klotho recombinante durante un fracaso renal agudo por rabdomiolisis disminuye el daño renal asociado a este síndrome.

Material y métodos

1. Modelo experimental de rabdomiolisis

Los modelos experimentales realizados en esta tesis se desarrollaron en ratones macho de la cepa C57BL/6J (*Wild type*, Jackson Laboratory). Para inducir rabdomiolisis en ratones C57BL/6J de 12 semanas de edad, anestesiarnos a los animales con isoflurano (Forane, Arkema) 2% v/v en oxígeno y posteriormente se les administró una inyección intramuscular de glicerol en el músculo caudal de la pata a una dosis de 10 ml/kg al 50% v/v de glicerol ($\geq 99.5\%$ m/v, Sigma) o salino, en el caso de los ratones control. Se les retiró el agua a los ratones durante las 16 horas previas a la inyección. Una vez inyectado el glicerol, se produce una desestructuración y necrosis del músculo esquelético, lo que produce un aumento en la liberación al torrente sanguíneo de componentes intracelulares, como la mioglobina. Los ratones se sometieron a eutanasia a distintos tiempos (3 horas – 30 días) y se recogieron muestras histológicas para su posterior estudio, así como suero y orina para estudios bioquímicos. Para determinar el efecto de un antioxidante en el modelo, a un grupo de ratones se les administró por vía retro-orbital una solución de N-acetilcisteína (150 mg/kg; Sigma) 1 hora antes de la administración de glicerol. Por último, para determinar el papel del descenso de Klotho en el desarrollo de la rabdomiolisis, administramos Klotho recombinante (0.01-0,1 mg/kg, R&D) por vía intraperitoneal 1 hora antes de la inyección de glicerol. Los ratones se mantuvieron en jaulas siguiendo un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas y temperatura constante de 25°C, con acceso a comida y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos realizados en los animales se realizaron conforme a la normativa europea y nacional vigente (Directiva 2010/63/EU, Recomendación 2007/526/EC y Real Decreto 53/2013) y fueron previamente aprobados por el Comité de Experimentación Animal del Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz y, posteriormente por la Comunidad de Madrid.

2. Procesamiento de las muestras obtenidas

Al final de cada estudio, tras obtener la orina a tiempo final, los ratones se anestesiaron con 100 mg/kg de ketamina y 15 mg/kg de xilazina y se obtuvieron muestras de suero. Tras la apertura de la cavidad peritoneal, se canuló el ventrículo izquierdo del corazón y se infundieron 50 ml de solución salina 0,9% con el fin de perfundir los órganos. A continuación, se extrajeron los riñones, se decapsularon y se dividieron en varias partes: una parte se fijó en paraformaldehído al 4% y se incluyó en parafina para realizar técnicas de histología; otra parte

se incluyó en Tissue-Tek-OCT para su congelación; del resto se obtuvo corteza renal que se conservó en nitrógeno líquido para realizar estudios en proteína y RNA. La orina y la sangre se centrifugó a 2500 rpm durante 15 minutos. A continuación, se almacenaron a -80°C para posteriores estudios. Para la recogida de suero, se utilizaron tubos SST de 5ml (Vacutainer, BD), que contiene agentes coagulantes y gel para separar el suero de los demás componentes sanguíneos.

3. Análisis bioquímicos

Para evaluar la función renal en los modelos experimentales se determinaron las concentraciones séricas de creatinina, urea y nitrógeno ureico (BUN) en el servicio de analíticas del hospital Fundación Jiménez Díaz. Cuantificamos los niveles de FGF-23 circulante en suero por ELISA (Ref. 60-6300, Immotopics). La concentración de mioglobina en orina se determinó mediante el reactivo de Drabkin's (Sigma-Aldrich), la creatinina en orina se analizó por el ensayo enzimático colorimétrico de la creatinasa (Abcam, ab65340) y la albúmina mediante ELISA (Abcam, ab108792). El calcio y el fósforo séricos y en orina se midieron mediante ensayo colorimétrico (BioSystems, 11507 y 11508 respectivamente)

4. Estudios histológicos

Los tejidos se fijaron en paraformaldehído 4% durante 24 horas y después se transfirieron a etanol 70% antes de ser incluidos en parafina. Se realizaron secciones de $3\ \mu\text{m}$ y se montaron en portaobjetos recubiertos de poli-L-Lisina (Dako). Para la realización de las tinciones e inmunohistoquímicas, el tejido se desparafinó estufando a 65°C y con xilol y se rehidrató con un gradiente decreciente de etanol (100-96-90-70- H_2O).

5. Evaluación del daño renal mediante tinciones histológicas

5.1. Hematoxilina-eosina

Para observar posibles daños en la estructura renal se realizó tinción con hematoxilina-eosina en muestras de tejido renal previamente desparafinadas y rehidratadas. Las tinciones las analizó un patólogo externo al laboratorio y en ellas, se determinó el daño tubular

analizando la pérdida del borde en cepillo, vacuolización, descamación y la dilatación tubular. Cada una de estas características se calificó en forma semicuantitativa del 0 al 3 y el resultado fue la suma de cada uno de los puntos medidos.

5.2. Rojo sirio

Para el estudio de la fibrosis intersticial, se realizó la tinción de Rojo Sirio, que tiñe las fibras de colágeno de un color rojo intenso, mientras el resto del tejido se tiñe de color amarillo. Los cortes de riñón se incubaron durante 3 días en etanol 70% a temperatura ambiente, posteriormente se tiñeron durante 30 minutos con una mezcla que contenía Rojo sirio y una solución saturada acuosa de ácido pícrico (0,5 g Rojo Sirio F3BA en 250 ml de ácido pícrico). Posteriormente, las muestras se lavaron, deshidrataron y montaron en medio de montaje DPX.

6. Inmunohistoquímicas

Para la realización de las inmunohistoquímicas, los cortes de tejido renal se desparafinaron y rehidrataron, como se ha explicado anteriormente. Puesto que esta técnica está basada en la unión antígeno-anticuerpo, se realizó el proceso de recuperación antigénica en una solución de citrato a pH 6 (PTlink, DAKO) y, posteriormente, se inactivó la peroxidasa con una solución de $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}_2$ (5:4:1) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar las muestras en PBS, se bloquearon las uniones inespecíficas con una solución en PBS de BSA al 4% y 6% de suero del animal en el cual se generó el anticuerpo secundario, durante 1 hora a temperatura ambiente. Además, se realizó un bloqueo de la avidina/biotina endógena incubando los cortes durante 30 minutos con *Avidin-biotin blocking kit* (Vector Laboratories). Una vez bloqueadas las muestras, se incubaron con su correspondiente anticuerpo primario a 4°C durante toda la noche (**Tabla 2**). Después de lavar las muestras con PBS tres veces, se incubaron a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios conjugados con biotina durante una hora. A continuación, las secciones se incubaron con complejos avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) durante 30 minutos y se revelaron con 3,3'-diaminobencidina (DAB; DAKO) o 3-amino-9-etil carbazol (AEC; DAKO). Las secciones se contrastaron con hematoxilina, se deshidrataron y se montaron con resina acrílica con base de xileno (DPX, EMS), o con resina con base de agua.

Tabla 2. Anticuerpos y concentraciones utilizadas para detectar niveles de proteínas mediante inmunohistoquímica

Anticuerpo	Reactividad	Hospedador	Dilución	Casa comercial
Hemoxigenasa-1	Humano, Ratón.	Conejo	1:500	Enzo life Tech.
F4/80	Ratón	Rata	1:100	Serotec
4-HNE	Humano, Ratón	Conejo	1:100	Abcam
Ferritina	Humano, Ratón	Conejo	1:800	Abcam

7. TUNEL

Terminal deoxynucleotidyl Transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) es el método utilizado para la determinación de la muerte celular. Este ensayo se basa en la capacidad de adicionar dUTPs, marcados con fluorescencia-488, mediante la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) en zonas donde el DNA no mantiene su integridad y está cortado. Tras desparafinar y rehidratar los cortes, se realizó el desenmascaramiento de los puntos de rotura del DNA con Proteínasa K (20 µg/ml; Qiagen) durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadió la enzima TdT y 16-dUTP marcado con Alexa-488 (Roche Applied Sciences) durante 60 minutos a 37°C. Después de contrastar los núcleos con DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol), se realizó el conteo de células positivas para TUNEL frente a las totales o positivas para DAPI (10 campos por riñón- x400). La tinción TUNEL reconoce al DNA fragmentado, por lo que no es sólo positiva para células apoptóticas sino también para otras formas de muerte celular programada.

8. Cultivos celulares

Para realizar experimentos *in vitro*, se utilizaron células epiteliales de túbulo renal proximal de ratón (Línea celular MCT, Dr. Eric Neilson), las cuales se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% FBS de complementado, 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomycin y 2 mM glutamina. Los experimentos se realizaron a una confluencia del 60-70% con distintas concentraciones de mioglobina (Sigma, M1882), sulforafano (Cayman, 14797) y N-acetilcisteína (Sigma, A7250).

9. Análisis de proteínas

9.1. Extracción de proteínas

Tanto las células, como las muestras de tejido, se homogeneizaron en tampón de extracción de proteínas (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 25 mM NaF, 0.2% Tritón X-100, 0.3% NP-40, 0,2 mM PMSF, Ditiotreitól (DTT) 1mM, 0,2 mM Na₃VO₄ y 10 µL/mL de cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma)). La concentración de proteína se determinó mediante el método del ácido bicinonínico (BCA, Pierce).

9.2. Determinación de GSH

Para cuantificar el GSH libre utilizamos monoclorobimano, compuesto que es fluorescente cuando se une a GSH mediante la glutatión S-transferasa (Fernández-Checa and Kaplowitz, 1990; Kamencic *et al.*, 2000). El tejido se mantuvo en un buffer fosfato de potasio (100 mM, pH 7,4) a 4 °C y se disgregó mediante sonicación. Se añadió monoclorobimano (100 µM) y glutatión S-transferasa (0,5 U/mL). La reacción se analizó en un lector de placas a longitudes de onda de excitación y emisión de 410 y 485 nm durante 1h a temperatura ambiente. La glutatión S-transferasa es necesaria en la reacción ya que si no la tasa de unión es muy baja.

9.3. Determinación de MDA

El aumento del estrés oxidativo da como resultado un aumento de hidroperóxidos lipídicos, los cuales son altamente reactivos e inestables. Su descomposición provoca la formación de malondialdehído (MDA). Determinamos la formación de MDA en muestras de tejido homogeneizadas en tampón de extracción de proteínas mediante un ensayo colorimétrico a sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*) (Ref. 10009055, Cayman Chemical).

9.4. Western Blot

Las proteínas extraídas de células o tejido se desnaturalizaron (10 minutos a 95°C en tampón con SDS y β-mercaptoetanol) y se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida/SDS a diferentes porcentajes de acrilamida (8-12%) en condiciones reductoras. A continuación, se transfirieron a membranas de PVDF (Fluoruro de polivinilideno, Millipore),

mediante un sistema de transferencia semi-seca, utilizando el dispositivo Trans-Blot (BioRad). Las membranas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con TBS-t (1mM Tris pH 7,5, 10mM NaCl y 0,5% Tween-20) y leche desnatada al 5%, con el fin de evitar uniones inespecíficas y posteriormente se incubaron con un anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C (**Tabla 3**). Después de varios lavados con TBS-t para eliminar el exceso de anticuerpo, las membranas se incubaron con su correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa HRP durante 1 hora a temperatura ambiente. La identificación de la proteína se realizó mediante quimioluminiscencia utilizando el reactivo Luminata Crescendo (Millipore) y el dispositivo ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Biosciences). El densitometrado de las bandas que permite transformar la imagen en un valor numérico se realizó con el software QuantityOne (Bio-Rad). Como control de carga de proteína se utilizó el anticuerpo frente a α -tubulina, proteína del citoesqueleto que se mantiene constante en la mayoría de las condiciones.

Tabla 3. Anticuerpos y concentraciones utilizadas para detectar niveles de proteínas mediante western blot.

Anticuerpo	Reactividad	Hospedador	Dilución	Casa comercial
HO-1	Humano, Ratón	Conejo	1:1000	Enzo
Ferritina	Humano, Ratón	Conejo	1:2000	Abcam
α-Tubulina	Humano, Ratón	Ratón	1:5000	Sigma
p-NRF2	Humano, Ratón	Conejo	1:1000	Bioss
NRF2	Humano, Ratón	Conejo	1:1000	Santa Cruz
β-Actina	Humano, Ratón	Ratón	1:5000	Santa Cruz
Klotho	Ratón	Conejo	1:1000	Calbiochem

10. Análisis de la expresión génica

10.1. Extracción de mRNA

Las células o las muestras de tejido congelado en N₂ se homogeneizaron en 0.5 ml de TriPure (Invitrogen) y se incubaron durante 10 minutos para la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. A continuación, se añadió cloroformo (Thermo-Fischer) y se

mezcló. Tras centrifugar a 12000 rpm durante 15 minutos, se visualizaron tres fases: la fase fenol-cloroformo, la interfase y la fase superior acuosa donde se encuentra el RNA. Esta última fase se recogió y se transfirió a isopropanol, para producir la precipitación del RNA. Para obtener un mayor rendimiento en la precipitación, las muestras se mantuvieron durante toda la noche a -80°C. A continuación, se centrifugó 15 minutos a 12500 rpm y el RNA precipitado se lavó con etanol al 75% y al 100% y finalmente se dejó secar para eliminar trazas de etanol. El sedimento se resuspendió en 20 µL de agua libre de nucleasas. La concentración de RNA obtenida se determinó en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Bonsai Technologies Group). Mediante la relación de absorbancia (A) 260/280 y (A) 260/230, se determinó el grado de contaminación con impurezas inorgánicas o proteínas, que puede afectar a la sensibilidad y especificidad de la técnica.

10.2. Transcripción inversa

Para obtener DNA complementario (cDNA) se realizó una reacción de transcripción inversa con 1 µg de RNA, utilizando el kit de transcripción reversa *High-capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). Se preparó una mezcla de reacción en un volumen total de 20 µL, que contenía la enzima transcriptasa reversa MultiScript (2 µL), dextrirribonucleótido fosfato (dNTP, 1.6 µL), *random primers* (4 µL), todo ello disuelto en un tampón de retrotranscripción 10x (4 µL) y a la mezcla se añadió el RNA disuelto en agua libre de nucleasas. La retrotranscripción se realizó en un termociclador: 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C y 5 minutos a 85°C.

10.3. PCR cuantitativa a tiempo real

La reacción se realizó utilizando el sistema de detección secuencia Taqman ABI 7700 con TaqDNA polimerasa activada por calor (Amplitaq God) y las sondas utilizadas y comercializadas por Applied Biosystems. Las condiciones de amplificación fueron: 2 minutos a 50°C y 10 minutos a 95°C, tras el cual las muestras se sometieron a 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. (**Tabla 4**)

Tabla 4. Listado de las sondas utilizadas para el análisis génico por PCR a tiempo Real

Gen	Codigo	Especie
<i>Ccl2</i>	Mm00441242_m1	Ratón
<i>Ccl5</i>	Mm01302428_m1	Ratón
<i>Hmox1</i>	Mm00516005_m1	Ratón
<i>Havcr1</i>	Mm00506686_m1	Ratón
<i>Lcn2</i>	Mm01324470_m1	Ratón
<i>Klotho</i>	Mm00502002_m1	Ratón
<i>Fn1</i>	Mm01256744_m1	Ratón
<i>18s</i>	4310893E	Eucariota

11. Citometría de Flujo

Para determinar la generación de especies reactivas de oxígeno, se utilizó el 2,7-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA), una sonda que difunde a través de la membrana celular, donde se hidroliza, por esterasas intracelulares, perdiendo los grupos acetato y generando la forma no fluorescente 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCFH), que permanece en el interior de la célula. DCFH reacciona con H₂O₂ intracelular para formar diclorofluoresceína (DCF), capaz de detectarse por fluorescencia (495/517 nm). Para la realización de los experimentos, se incubaron las células previamente con H₂DCFDA (5 µM) y se estimularon con mioglobina. La determinación ROS se realizó mediante citometría de flujo.

12. Pacientes con rabiomiolisis

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de tres pacientes hospitalizados por un episodio de fracaso renal agudo inducido por rabiomiolisis en el hospital Fundación Jiménez Díaz de Madrid. Además, recogimos muestras de sangre de ocho voluntarios sanos. La sangre

se recogió en tubos con EDTA, para realizar diversas determinaciones bioquímicas en el plasma. Analizamos los niveles circulantes de α -KI mediante ELISA (JP27998, IBL). Todos los sujetos firmaron el consentimiento informado para la participación en el estudio. Además, el estudio fue aprobado por parte del Comité Ético de la Universidad Autónoma de Madrid, de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki. Todos los pacientes fueron ingresados en el hospital durante el FRA y fueron dados de alta después de la resolución completa del brote de rabdomiolisis.

13. Análisis estadístico

Todas las valoraciones se determinaron como mínimo por triplicado. Los datos se expresan como media \pm error estándar de la media. El análisis estadístico se realizó con el software SPSS 11.0 empleando diferentes parámetros para cada estudio. En pacientes se determinó la t-Student. En los experimentos con células y ratones se utilizó el Test de Mann-Whitney con el fin de comparar resultados entre dos grupos de variables no paramétricas. Las correlaciones entre dos grupos de variables se realizaron mediante el test de Pearson. Se consideró estadísticamente significativo una $p < 0.05$.

Resultados

1. La inducción de rabdomiolisis provoca daño renal agudo, estrés oxidativo e inflamación en un modelo experimental *in vivo*

Para analizar los mecanismos fisiopatológicos implicados en rabdomiolisis, desarrollamos un modelo experimental en ratones mediante la inyección intramuscular de glicerol. Nuestros resultados muestran que los ratones con rabdomiolisis sufrían una pérdida aguda de función renal, caracterizada por el aumento de los niveles plasmáticos de nitrógeno ureico (BUN) y creatinina (**Figura 4A y 4B**). Ambos parámetros alcanzaban sus niveles máximos a las 24 horas tras inyectarles el glicerol, disminuyendo progresivamente hasta los 7 días. Observamos un aumento de la concentración de mioglobina en orina a las 24 horas que decrecía en tiempos posteriores, coincidiendo con la recuperación de la función renal (**Figura 4C**).

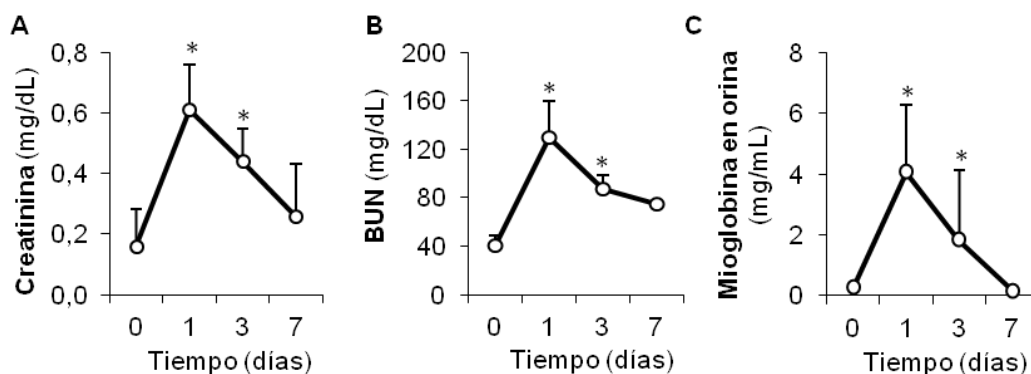


Figura 4. La rabdomiolisis provoca la pérdida aguda de función renal. Niveles séricos de creatinina (A), BUN (B) y concentración de mioglobina en orina de ratones con rabdomiolisis (C). Los resultados están expresados como media \pm ESM. * $p < 0,05$ vs control.

El análisis histológico de los riñones de nuestro modelo revelaba la existencia de daño renal caracterizado por edema intersticial y daño tubular (pérdida de borde en cepillo, presencia de detritos celulares dentro de los túbulos, cilindros proteicos y muerte celular). Tras realizar una cuantificación del daño presente en los riñones de los ratones con rabdomiolisis observamos un aumento significativo de la lesión renal desde las 24 horas, alcanzando su pico máximo a los 3 días (**Figura 5A**). Mediante tinción de TUNEL confirmamos la presencia de muerte celular en las células del epitelio tubular, principalmente a las 24 horas tras la inducción del daño (**Figura 5B**). Para corroborar la existencia de daño tubular, analizamos la expresión génica de *neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (NGAL) (*Lcn2*) y *kidney injury molecule-1* (KIM-1) (*Havcr1*), observando un incremento significativo de ambos marcadores de daño renal desde el día 1 al 3, tras la inyección de glicerol (**Figura 5C y 5D**).

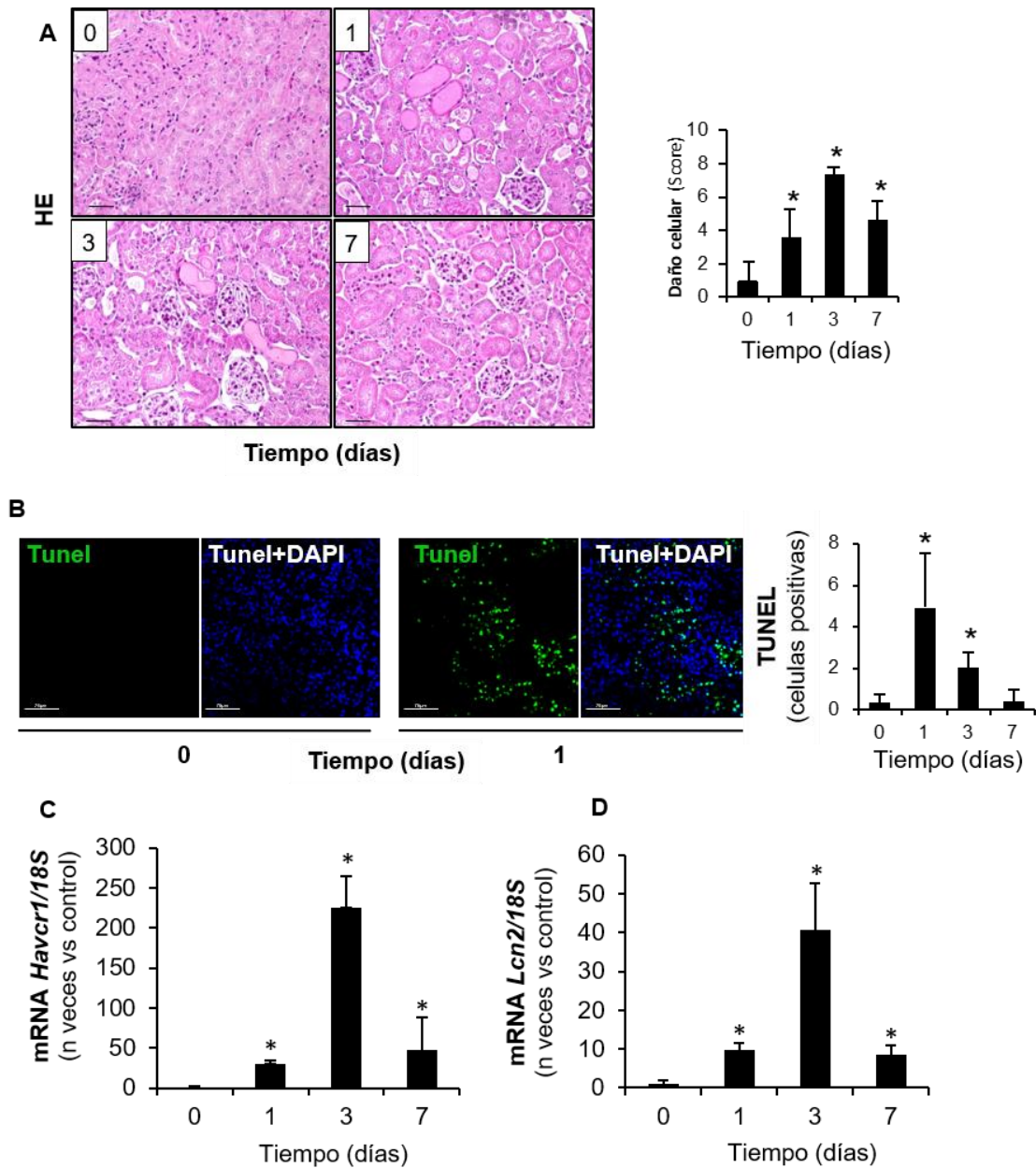


Figura 5. La rhabdmiolisis induce daño renal y muerte tubular. Imagen representativa de la tinción de hematoxilina-eosina y semicuantificación del daño renal en los ratones del modelo. Para ello, analizamos distintos parámetros de daño glomerular, intersticial y tubular, como pérdida del borde en cepillo, signos de regeneración, descamación y dilatación tubular. Barra de escala 50 μ M. (B) Fotografía representativa de células apoptóticas a 24h (TUNEL, verde) obtenida por microscopía confocal y análisis cuantitativo de células positivas. Barra de escala 75 μ M. (C-D) Niveles de expresión génica de NGAL (*Lcn2*) y KIM-1 (*Havcr1*) obtenidos mediante RT-PCR. HE: Hematoxilina-Eosina. Los resultados están expresados como media \pm ESM. * $p < 0,05$ vs control.

Posteriormente, se evaluó la presencia de estrés oxidativo en los riñones del modelo, determinando la presencia de 4-hidroxinonenal (4-HNE) mediante inmunohistoquímica. La presencia de este producto de peroxidación lipídica aumentaba a las 24 horas tras la inducción de rhabdomiolisis, observándose un descenso a 3 y 7 días (**Figura 6A**). En concordancia con estos datos, observamos un aumento de malondialdehído (MDA) en los riñones de los ratones sacrificados tras 24 horas (**Figura 6B**). Mediante estudios de inmunohistoquímica, western blot (WB) y análisis por PCR a tiempo real, observamos un aumento de la expresión génica (*Hmox1*) y proteica de HO-1, enzima antioxidante encargada del catabolismo del grupo hemo (**Figura 6C-E**). Este aumento fue más evidente a las 24 horas tras la producción del daño, observándose un descenso paulatino hasta los 7 días. El aumento de estrés oxidativo se puede producir tanto por un incremento en la producción de ROS como por un descenso en la capacidad antioxidante celular, para ello determinamos los niveles de glutatión (GSH) en nuestro modelo (**Figura 6F**). Nuestros datos muestran una disminución en los niveles de glutatión en los riñones de los ratones con rhabdomiolisis a las 24 horas.

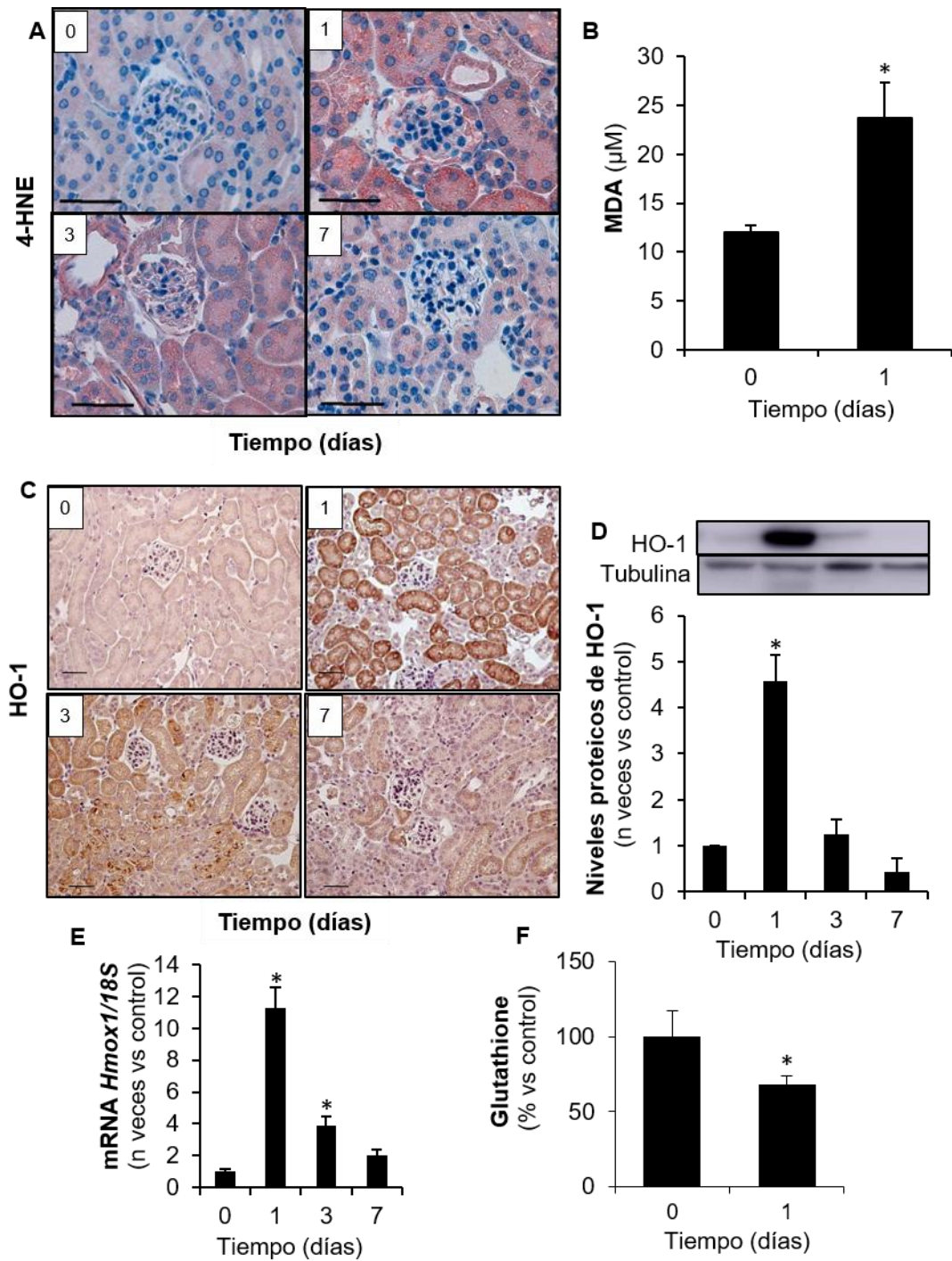


Fig.6. La rabdomiolisis induce estrés oxidativo y promueve el catabolismo del grupo hemo. (A) Inmunohistoquímica representativa de la presencia de 4-HNE tras la inducción de rabdomiolisis. Barra de escala 50 μ M. (B) Niveles renales de malondialdehído (MDA) determinado mediante ensayo TBARS. (C) Inmunohistoquímica representativa de la presencia de HO-1 tras la inducción de rabdomiolisis. Barra de escala 50 μ M. (D-E) A través de RT-PCR y WB se observó un aumento de los niveles génicos (*Hmox1*) y proteicos de HO-1. (F) Descenso de glutatión a las 24h tras la inducción de rabdomiolisis. Los resultados están expresados como media \pm ESM. * $p < 0,05$ vs control.

Por último, caracterizamos la respuesta inflamatoria asociada a rabdomiolisis. Para ello, se estudió la expresión génica de *Ccl2* y *Ccl5*, citoquinas implicadas en el reclutamiento de células inflamatorias (**Figura 7A y 7B**). Nuestros datos muestran un pico máximo de expresión a los 3 días tras la inyección de glicerol. Además, evaluamos la presencia de macrófagos infiltrantes a nivel renal, mediante inmunohistoquímica frente al antígeno F4/80, observando un aumento progresivo del infiltrado de macrófagos a partir del día 3 tras la inducción del daño (**Figura 7C**).

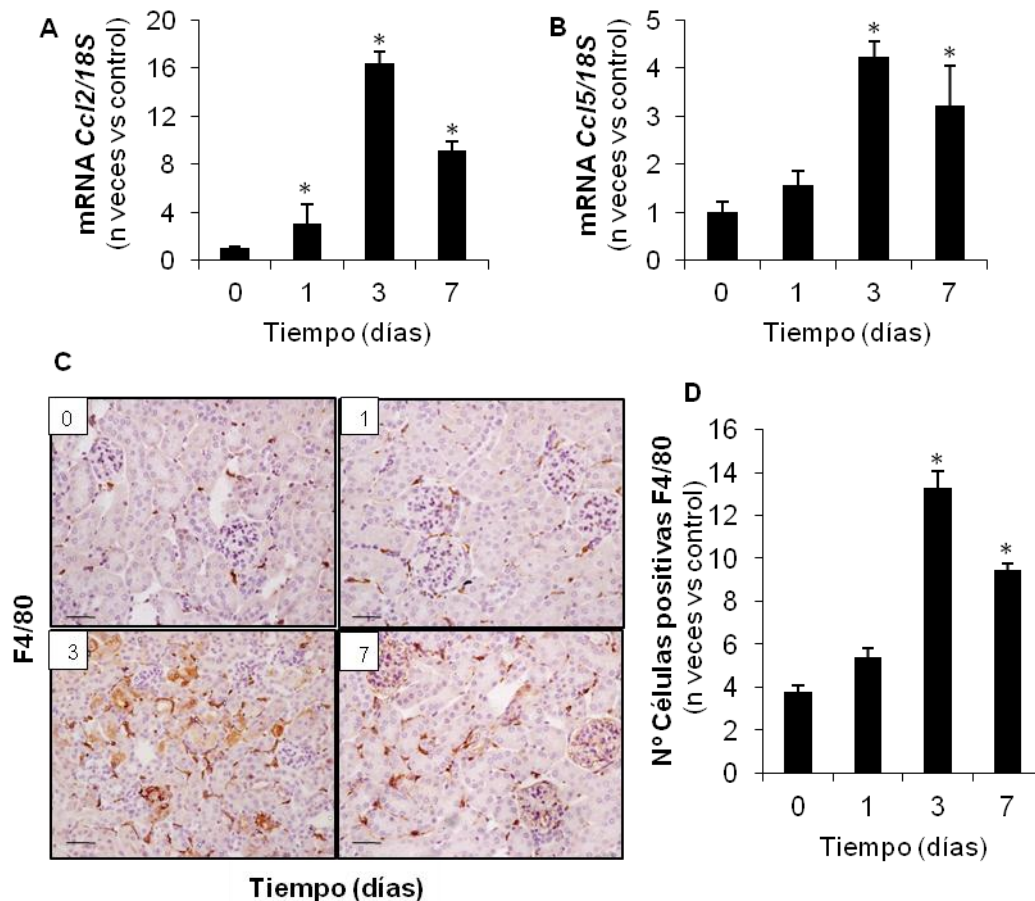


Figura 7. La rabdomiolisis experimental induce el reclutamiento renal de macrófagos. (A-B) Expresión génica de *Ccl2* y *Ccl5* determinada mediante RT-PCR. (C) Imagen representativa y cuantificación (D) de los macrófagos F4/80 en los riñones de los ratones del modelo. Barra de escala 50 μ M. Los resultados están expresados como media \pm ESM. * $p < 0,05$ vs control.

2. El FRA inducido por rabdomiolisis disminuye la expresión renal de Klotho

Una vez caracterizado el modelo experimental de rabdomiolisis, analizamos los niveles de Klotho (KI) en el tejido renal. En los ratones con rabdomiolisis pudimos observar un descenso

Resultados

de la expresión génica de *KI* y proteica de Klotho desde las 24 horas tras la inyección de glicerol (**Figura 8A-B**). Aunque la función renal se restablece a los 7 días, los niveles de Klotho seguían estando reducidos a este tiempo. Además, observamos un descenso significativo en los niveles de Klotho soluble en suero a las 24 horas (**Figura 8C**).

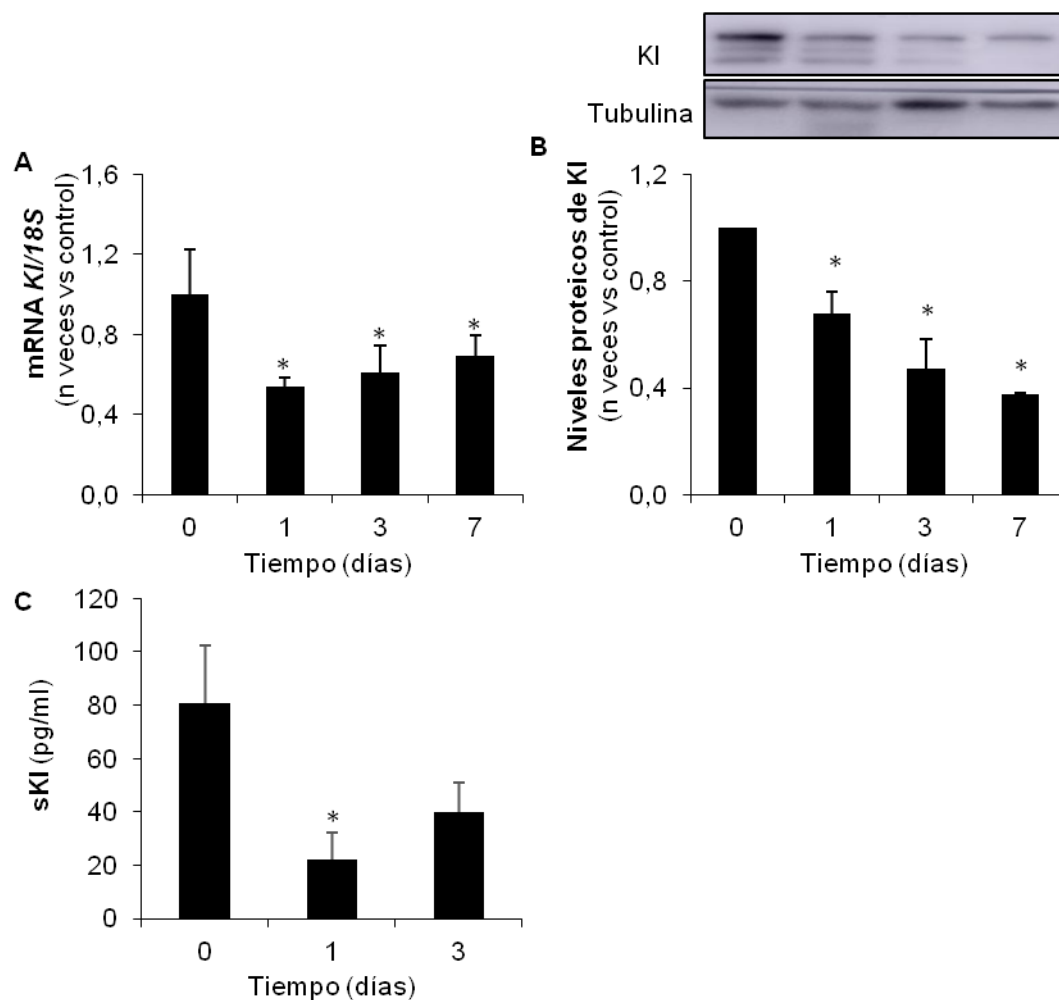


Figura 8. La rabiomolisis disminuye la expresión renal y los niveles séricos de Klotho. (A) Expresión génica de *KI* y (B) proteica de Klotho determinada mediante RT-PCR y WB, respectivamente. (C) Niveles *KI* soluble en suero analizados mediante ELISA. Los resultados están expresados como media \pm ESM. * $p < 0,05$ vs control.

Dado el papel esencial de Klotho en la regulación de los niveles de fósforo y calcio y la rabiomolisis induce una alteración en estos elementos analizamos sus niveles en muestras de sangre y de orina de nuestro modelo. Nuestros datos muestran un descenso en los niveles de calcio en el suero a las 24 horas, los cuales se normalizaban posteriormente a 3 y 7 días, mientras que los niveles de fósforo mostraban una relación inversa (**Figura 9A-D**). En línea con

el aumento de fósforo sérico, observamos un aumento de FGF-23 en sangre a 24 horas (**Figura 9E**).

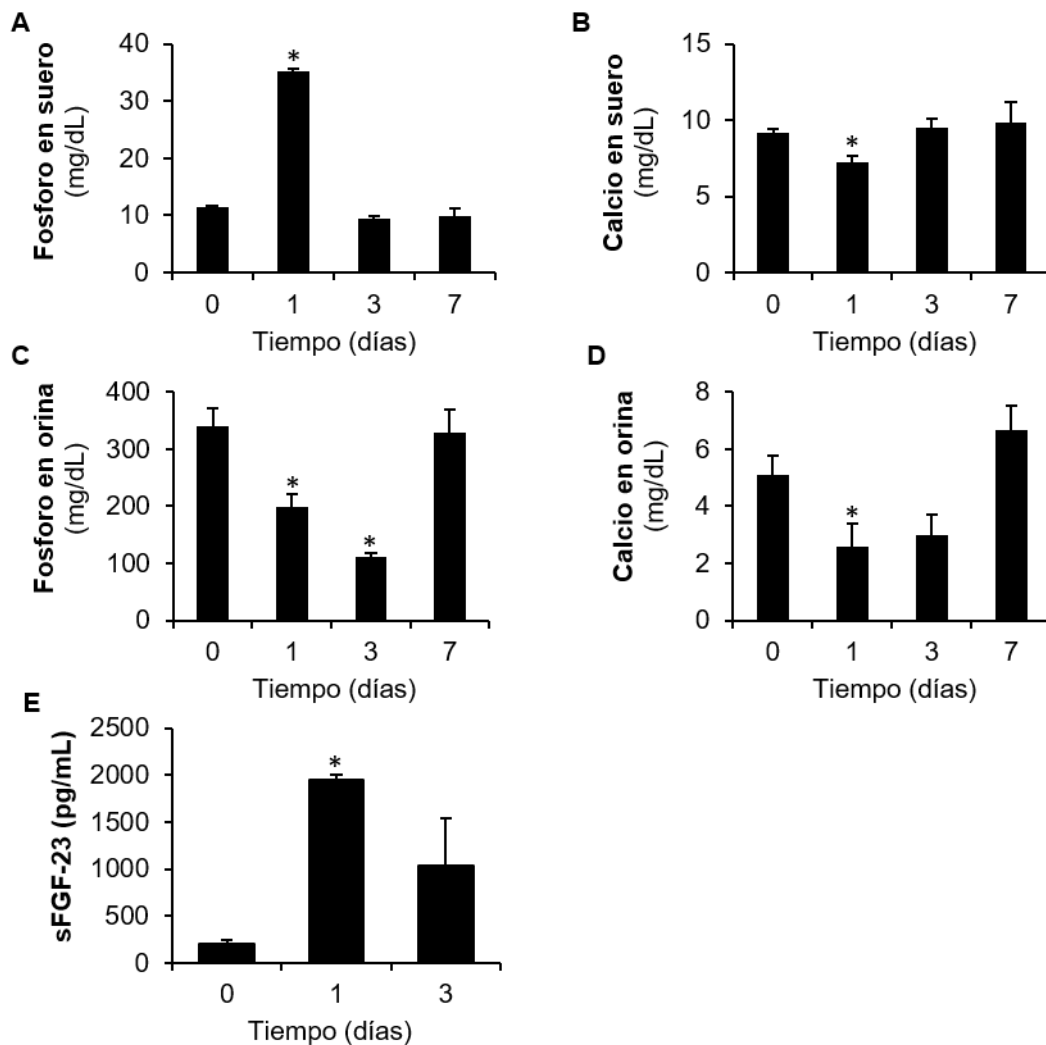


Figura 9. La rabdomiolisis experimental provoca hiperfosfatemia e hipocalcemia. (A-D) Concentración en orina y suero de fósforo y calcio de los ratones tras la rabdomiolisis determinada mediante ensayo colorimétrico. (E) Análisis de FGF-23 en suero de ratones tras 24h de la inducción del daño mediante ELISA. Los resultados están expresados como media \pm ESM. * $p < 0.05$ vs control.

Nuestros datos indican una correlación negativa significativa entre la expresión proteica de Klotho con la pérdida de función renal, marcadores de daño tubular y la respuesta inflamatoria (**Tabla 5**).

Tabla 5. Correlación entre la expresión renal de Klotho con marcadores séricos de función renal y metabolismo mineral, así como daño tubular y respuesta inflamatoria en el riñón.

Expresión proteica de Klotho	
Creatinina (mg/dL)	Corr. Coef= -0,611 p= 0,001
BUN (mg/dL)	Corr. Coef= -0,619 p= 0,001
P sérico (mg/dL)	Corr. Coef= -0,179 p= 0,334
KIM-1	Corr. Coef= -0,630 p= 0,003
NGAL	Corr. Coef= -0,420 p= 0,083
CCL2	Corr. Coef= -0,482 p= 0,036
CCL5	Corr. Coef= -0,462 p= 0,040

3. Expresión renal de Klotho en fases iniciales de FRA por rabiomiolisis

Para evaluar si la expresión de Klotho en el riñón se modificaba en fases más agudas de daño, realizamos un modelo de rabiomiolisis a 3 y 6 horas. A estos tiempos, los niveles séricos de creatinina y BUN estaban aumentados, al igual que se producía un incremento del fósforo y un descenso de calcio a nivel sérico (**Figura 10**). En las muestras de orina observamos un descenso en los niveles de fósforo, disminución que fue mucho más drástica para el caso del calcio. Cuando analizamos la expresión génica de *Lcn2* y *Havcr1*, marcadores de daño renal, tan solo observamos un incremento significativo a 6 horas de la expresión de *Lcn2* (**Figura 10G**).

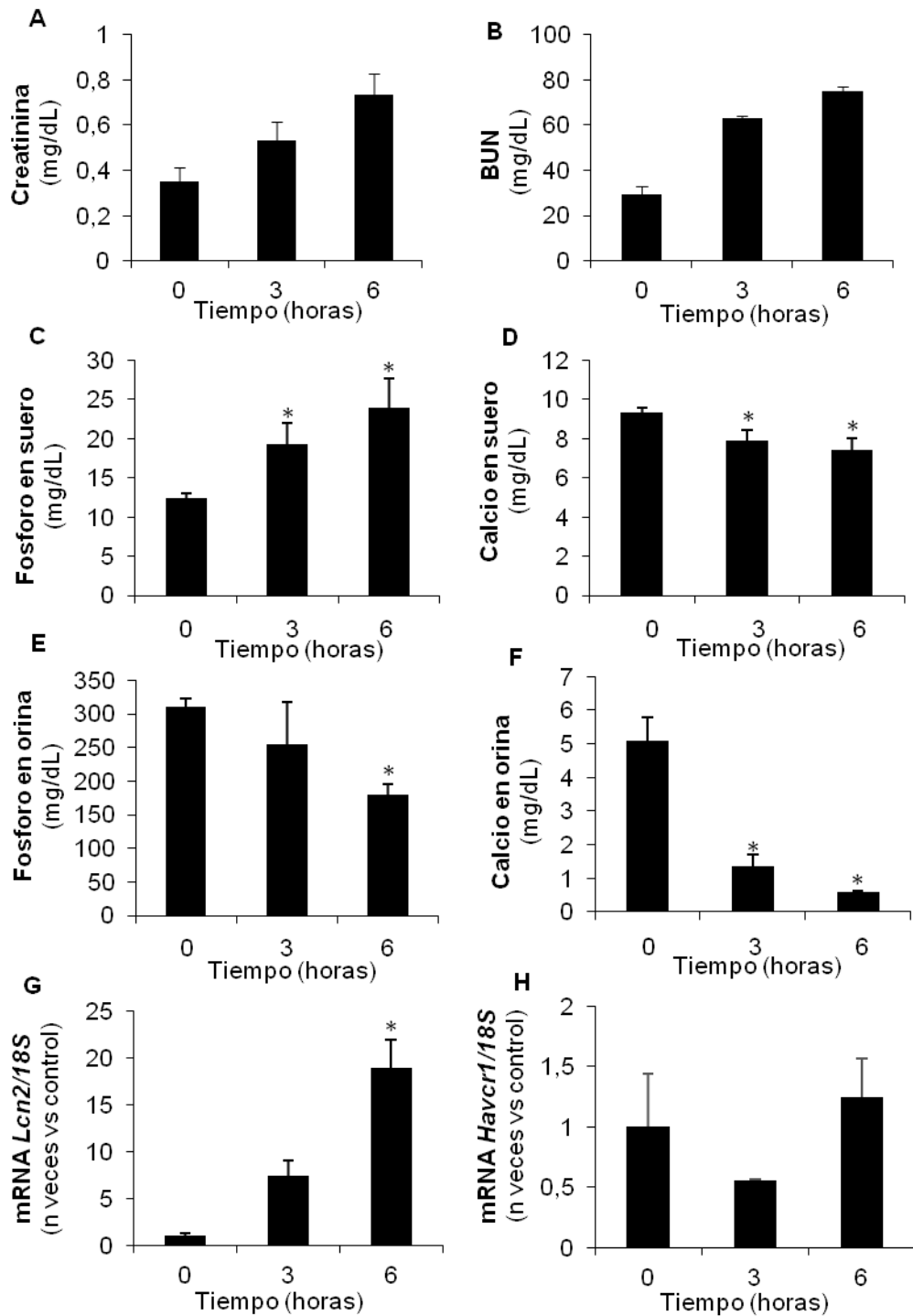


Figura 10. La inducción de rabdomiolisis induce daño renal y cambios en los niveles de fósforo y calcio, sin cambios en la función renal, a tiempos cortos. (A-F) Niveles séricos de creatinina y BUN, y concentración en orina y suero de fósforo y calcio a 3 y 6 horas tras la inducción de rabdomiolisis. (G y H) Niveles de expresión génica de Lcn2 y Havcr1 obtenidos mediante RT-PCR. Los resultados están expresados como media \pm ESM. * $p < 0.05$ vs control.

A diferencia de *Havcr1*, la expresión génica de *Kl* estaba claramente disminuida desde las 3 horas de la inducción del daño (**Figura 11A**). Cuando analizamos la expresión de Klotho a nivel proteico, observamos la misma tendencia, aunque no obtuvimos diferencias significativas (**Figura 11B**). Estos datos indican que la expresión de Klotho disminuye de forma muy temprana y que la vida media de esta proteína en el riñón es superior a 6 horas.

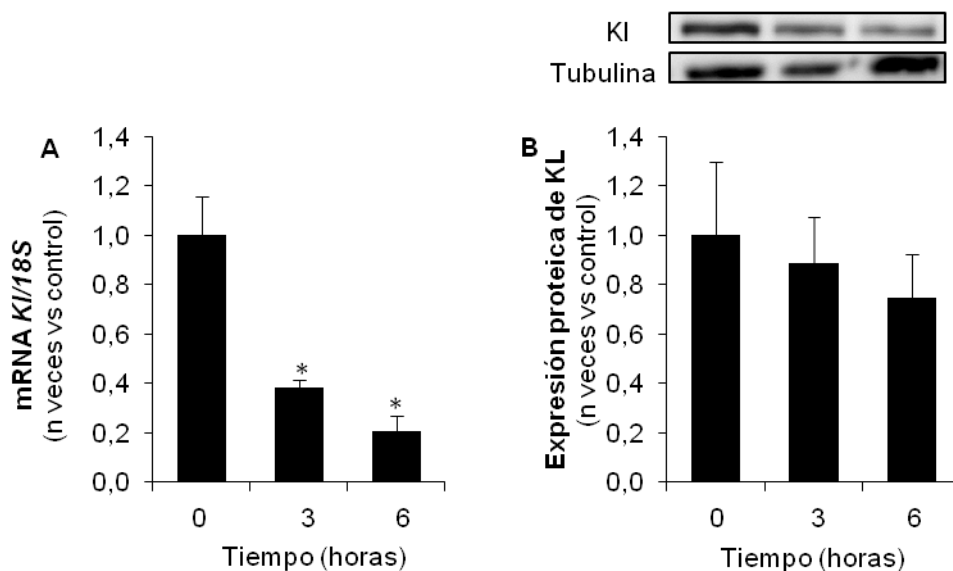


Figura 11. La rabdomiolisis disminuye la expresión génica de Klotho a nivel renal a tiempos cortos. Expresión génica de *Kl* (A) y proteica (B) de Klotho determinada mediante RT-PCR y WB a 3 y 6 horas tras la inducción de rabdomiolisis. Los resultados están expresados como media \pm ESM. * $p < 0.05$ vs control.

4. Los niveles plasmáticos de Klotho disminuyen en pacientes con FRA asociado a rabdomiolisis

Para validar si los niveles plasmáticos de Klotho estaban disminuidos en pacientes con FRA asociado a rabdomiolisis, realizamos un estudio en el que recogimos muestras de sangre de pacientes hospitalizados durante este síndrome en nuestro centro, así como muestras de voluntarios sanos (n=8). Al final del estudio, obtuvimos muestras de tres pacientes, de los cuales dos sufrieron un FRA inducido por un episodio de rabdomiolisis postraumática y la última por isquemia arterial de miembros inferiores (**Tabla 7**). Todos los pacientes presentaron niveles elevados de sCr y creatina quinasa (CK) indicando un episodio de rabdomiolisis. Además, nuestros resultados muestran un descenso de los niveles plasmáticos de Klotho en los pacientes con rabdomiolisis en comparación con los voluntarios sanos (**Figura 12**).

Tabla 6. Características bioquímicas de pacientes con rabdomiolisis y sujetos control.

	Control	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3
Causa	Sanos	Traumatismo	Traumatismo	Isquemia
Edad	47,8±5,24	84	68	73
Sexo (M/F)	7/5	M	M	F
BUN (mg/dL)	18.4±2,13	114	144	57
Crea (mg/dL)	0.89±0.14	7,4	6,0	3,66
FG (ml/min/1,73m²)	87.48±6.11	8	10	17
CK (UI/L)	-	4709	1266	4019

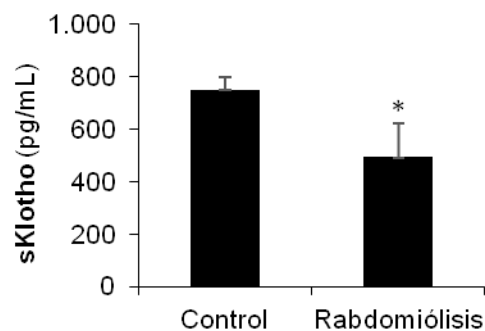


Figura 12. Los niveles Klotho soluble en plasma disminuyen en pacientes con FRA por rabdomiolisis. Concentración de Klotho soluble en el plasma de voluntarios sanos y pacientes con FRA asociado a rabdomiolisis mediante ELISA. Los resultados están expresados como media± ESM. *p<0.05 vs control.

5. El FRA por rabdomiolisis disminuye la expresión renal de Klotho a largo plazo

Existen estudios que demuestran que, como consecuencia de un FRA asociado a rabdomiolisis, se producen alteraciones estructurales importantes del riñón a largo plazo, tales

como un aumento en la fibrosis (Belliere *et al.*, 2015). Para analizar si la expresión renal de Klotho también se encuentra disminuida en fases posteriores tras la inducción de rabdomiolisis realizamos un nuevo modelo experimental a 30 días. Nuestros resultados muestran diferencias significativas en los niveles séricos de BUN. Sin embargo, no encontramos diferencias en la concentración sérica de creatinina, fósforo y calcio (**Figura 13**).

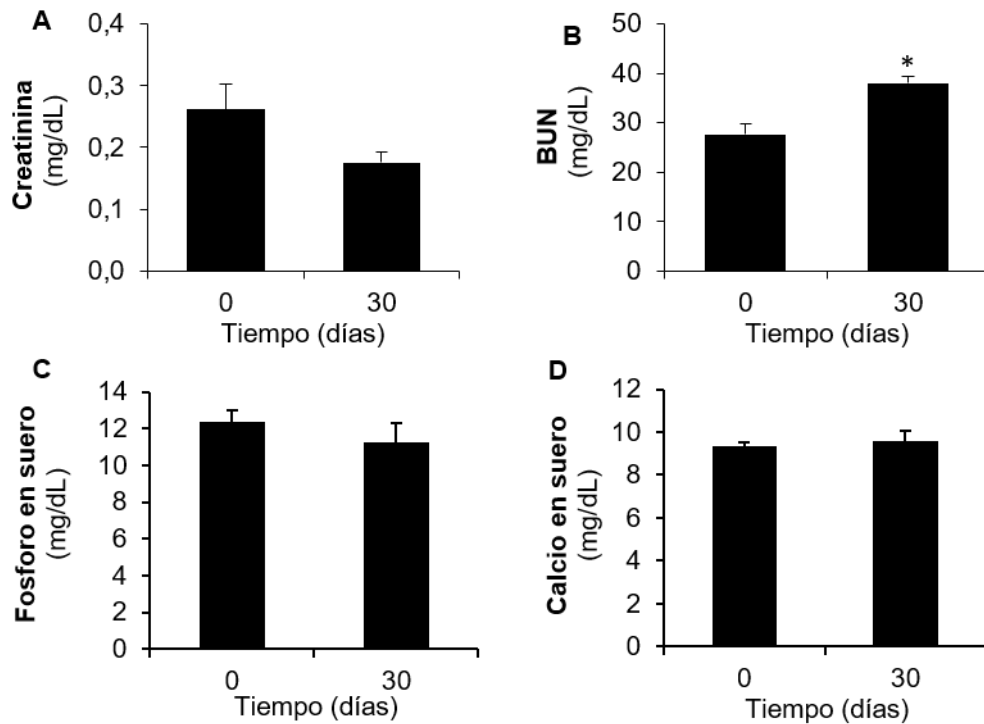


Figura 13. La rabdomiolisis experimental tras un mes altera los niveles de BUN. (A-B) Niveles séricos de creatinina y BUN. (C-D) Concentración en suero de fósforo y calcio de los ratones tras un mes de la rabdomiolisis determinada mediante ensayo colorimétrico. Los resultados están expresados como media ± ESM. * $p < 0.05$ vs control.

El análisis histológico de los riñones de estos ratones mostraba un incremento de tinción de rojo sirio que indicaba un aumento en el depósito de fibras de colágeno a los 30 días después de la inducción del daño, principalmente intersticial y perivascular. Observamos un aumento en la expresión génica de fibronectina (*Fn1*) en los ratones tras 30 días de la inyección de glicerol (**Figura 14A-C**). Además, observamos un aumento significativo del infiltrado de macrófagos en los riñones de estos ratones mediante tinción F4/80, indicando la presencia de una respuesta inflamatoria exacerbada (**Figura 14D-E**).

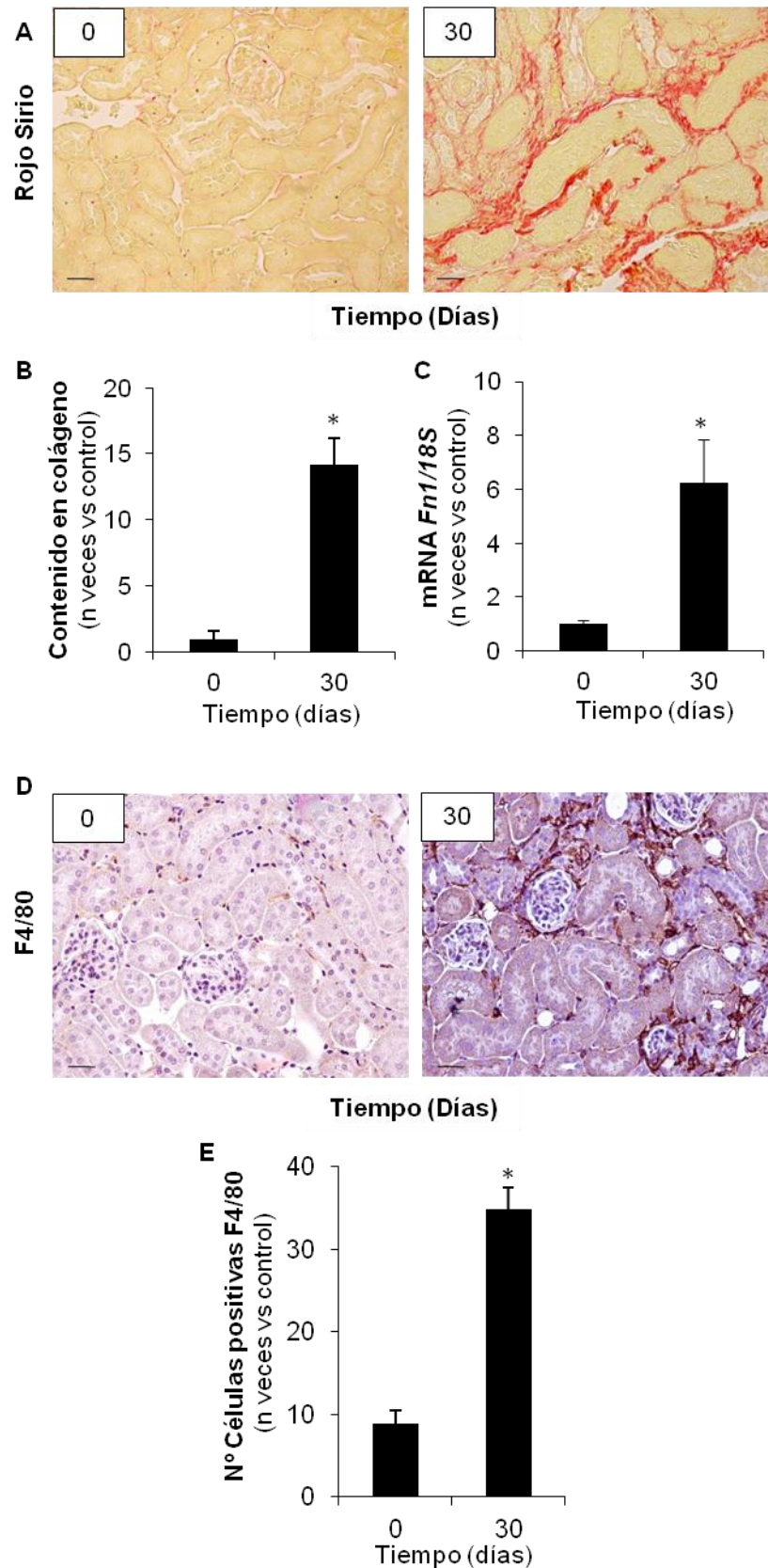


Figura 14. La rabdomiolisis experimental induce fibrosis a un mes. (A) Imágenes de la tinción de rojo sirio realizadas en los riñones de los ratones con rabdomiolisis tras un mes. Barra de escala 50 μ M. (B) La cuantificación de esta tinción muestra un aumento de fibras

de colágeno. (C) Expresión génica de fibronectina (Fn1) determinada mediante RT-PCR. (D) Inmunohistoquímica representativa de la presencia de células F4/80 positivas tras un mes de la inducción de rabiomiolisis. (E) La cuantificación de este marcador muestra un aumento del infiltrado de macrófagos tras un mes. Barra de escala 50 μ M. Los resultados están expresados como media \pm ESM. * p < 0.05 vs control.

No observamos diferencias en la expresión génica de *Kl* a 30 días. Sin embargo, a este tiempo, nuestros datos muestran un descenso en la expresión proteica de Klotho, analizada por WB, lo que sugiere que los niveles de Klotho en el riñón puedan estar disminuidos a largo plazo tras sufrir un FRA por rabiomiolisis (**Figura 15A-B**). Por último, observamos una disminución de los niveles circulantes de Klotho soluble en el suero de los ratones tras 30 días del FRA (**Figura 15C**).

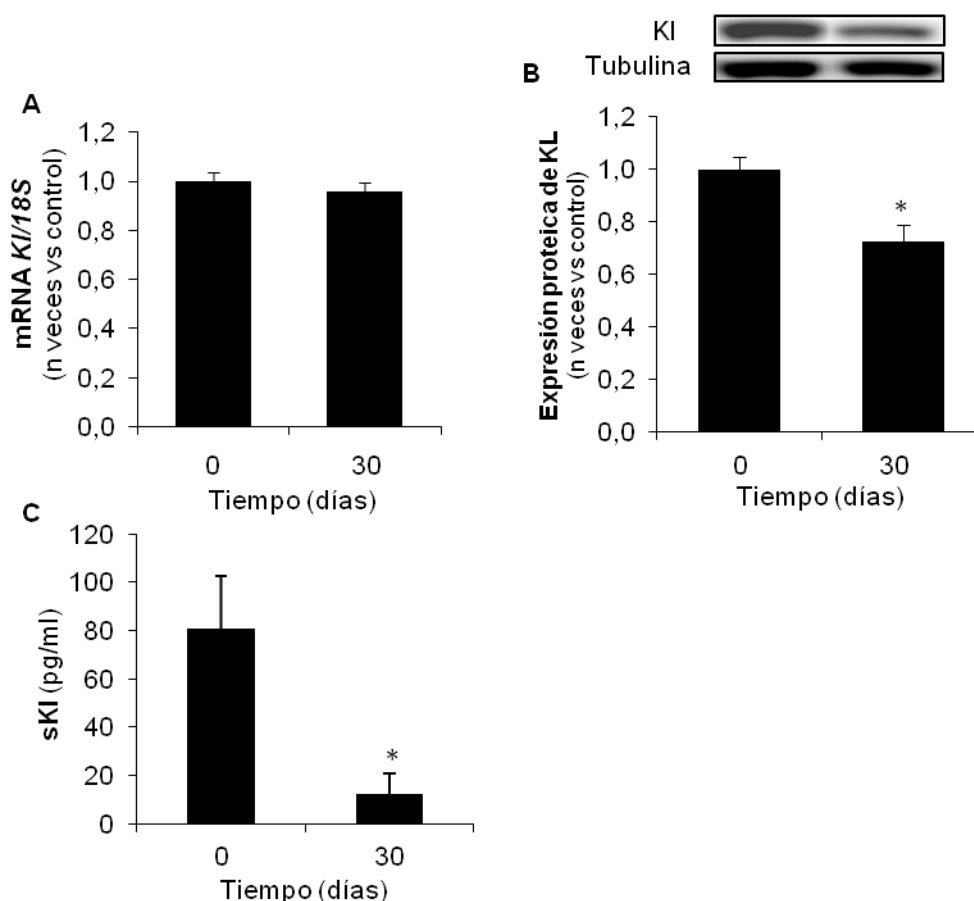


Figura 15. La rabiomiolisis tras un mes disminuye la expresión proteica renal de Klotho de forma aguda. (A) Expresión génica de *Kl* y (B) proteica de Klotho determinada mediante RT-PCR y WB. (C) Niveles Klotho soluble en plasma analizados mediante ELISA. Los resultados están expresados como media \pm ESM. * p < 0.05 vs control.

6. Los niveles de Klotho disminuyen en células tubulares estimuladas con mioglobina

Con el fin de caracterizar los mecanismos fisiopatológicos que median el daño tubular por rabdomiolisis, realizamos experimentos en células tubulares de ratón (Línea celular MCT) estimuladas con mioglobina a distintas dosis y tiempos.

El aumento del estrés oxidativo es una de las características principales del FRA producido por rabdomiolisis. Por tanto, analizamos el papel de la mioglobina como inductor de estrés oxidativo en las células MCTs. Mediante citometría de flujo, se evaluó la producción de ROS utilizando la sonda fluorescente H₂DCFDA. Tras la estimulación con mioglobina, observamos un aumento de ROS de manera dosis-dependiente. La mioglobina también incrementaba la expresión génica (*Hmox1*) y proteica de HO-1, lo que sugiere un incremento del estrés oxidativo en estas células (**Figura 16**).

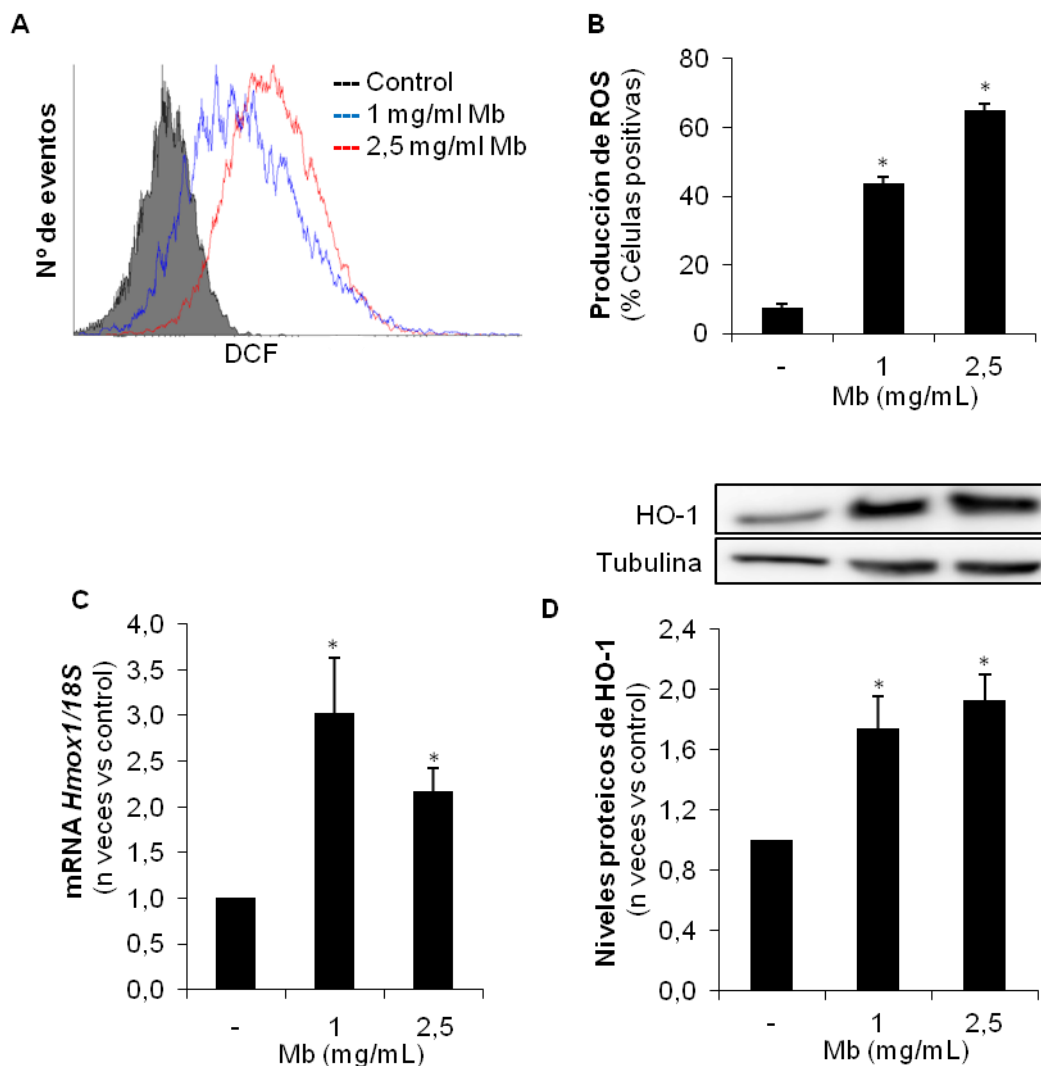


Figura 16. La mioglobina induce estrés oxidativo en células tubulares. Las células MCTs fueron estimuladas con mioglobina (Mb; 0-2,5 mg/mL) a distintos tiempos. (A) Histograma y (B) cuantificación de ROS inducido por mioglobina mediante la sonda H_2DCFDA a 3 horas. (C-D) Aumento de los niveles HO-1 a nivel de mRNA (*Hmox1*) a 6 horas y de proteína a 24 horas, medidos por RT-PCR y WB, respectivamente. Los resultados están expresados como $media \pm ESM$. * $p < 0.05$.

La inflamación es otra de las características principales del FRA producido por rdbdomiolisis y estudios previos de nuestro grupo muestran que la inflamación puede disminuir la expresión renal de Klotho (Moreno *et al.*, 2011). Por tanto, analizamos la expresión génica de *Ccl2* y *Ccl5* en células estimuladas con mioglobina mediante RT-PCR. Nuestros resultados muestran que la mioglobina indujo la expresión génica de ambas citoquinas inflamatorias a 6 horas (**Figura 17**).

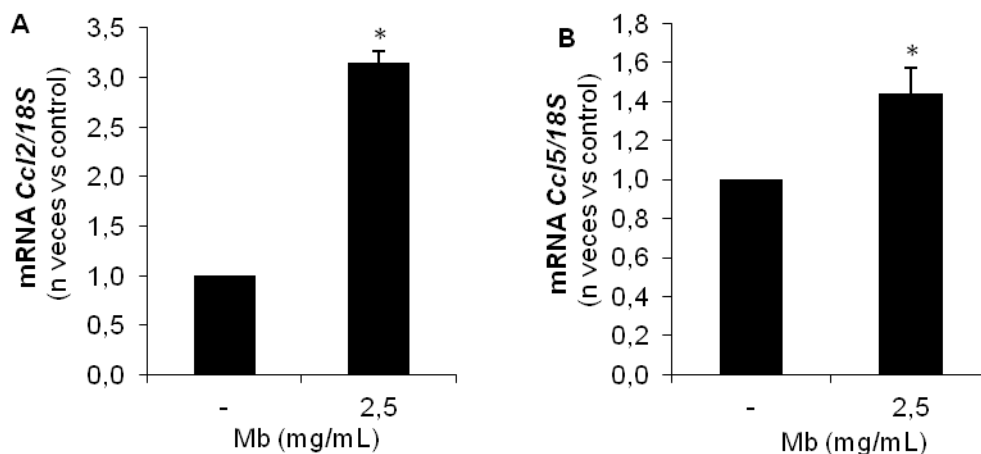


Figura 17. La mioglobina induce el aumento de citoquinas inflamatorias en MCTs. (A-B) Expresión génica de citoquinas (*Ccl2* y *Ccl5*) determinada mediante RT-PCR en células MCTs estimuladas con mioglobina (2,5 mg/mL) durante 6 horas. Los resultados están expresados como $media \pm ESM$. * $p < 0.05$.

Finalmente, analizamos la expresión génica (*Kl*) y proteica de Klotho en células estimuladas con distintas dosis de mioglobina, observando un descenso significativo a dosis de 2,5 mg/mL, sugiriendo que la mioglobina pudiera estar involucrada en el descenso de Klotho observado en los modelos de rdbdomiolisis (**Figura 18**).

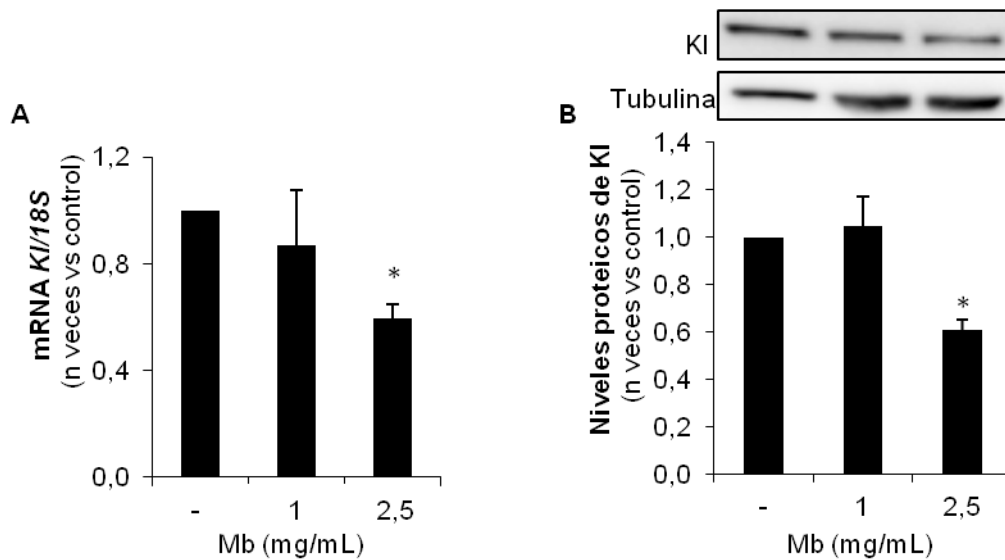


Figura 18. La mioglobina disminuye la expresión de Klotho en MCTs. Expresión génica de KI a 6 horas (A) y proteica a 24 horas (B) de Klotho determinada mediante RT-PCR y WB, respectivamente, en células MCTs estimuladas con mioglobina (Mb: 0-2,5 mg/mL). Los resultados están expresados como media \pm ESM. * $p < 0.05$ vs control.

7. La modulación del estrés oxidativo regula la expresión de Klotho *in vitro* pero no *in vivo*.

Como hemos comentado anteriormente, numerosos trabajos muestran que el aumento del estrés oxidativo disminuye los niveles de Klotho. Por tanto, quisimos analizar los niveles de Klotho al revertir dicha situación. Para ello realizamos experimentos en células MCTs pre-tratadas con antioxidantes (n-acetilcisteína (NAC) o apocinina) una hora antes de ser estimuladas con mioglobina. El pre-tratamiento con estos antioxidantes disminuía la producción de ROS analizada por H₂DCFDA y descendía la expresión génica (*Hmox1*) y proteica de HO-1, marcador indirecto de estrés oxidativo (**Figura 19**).

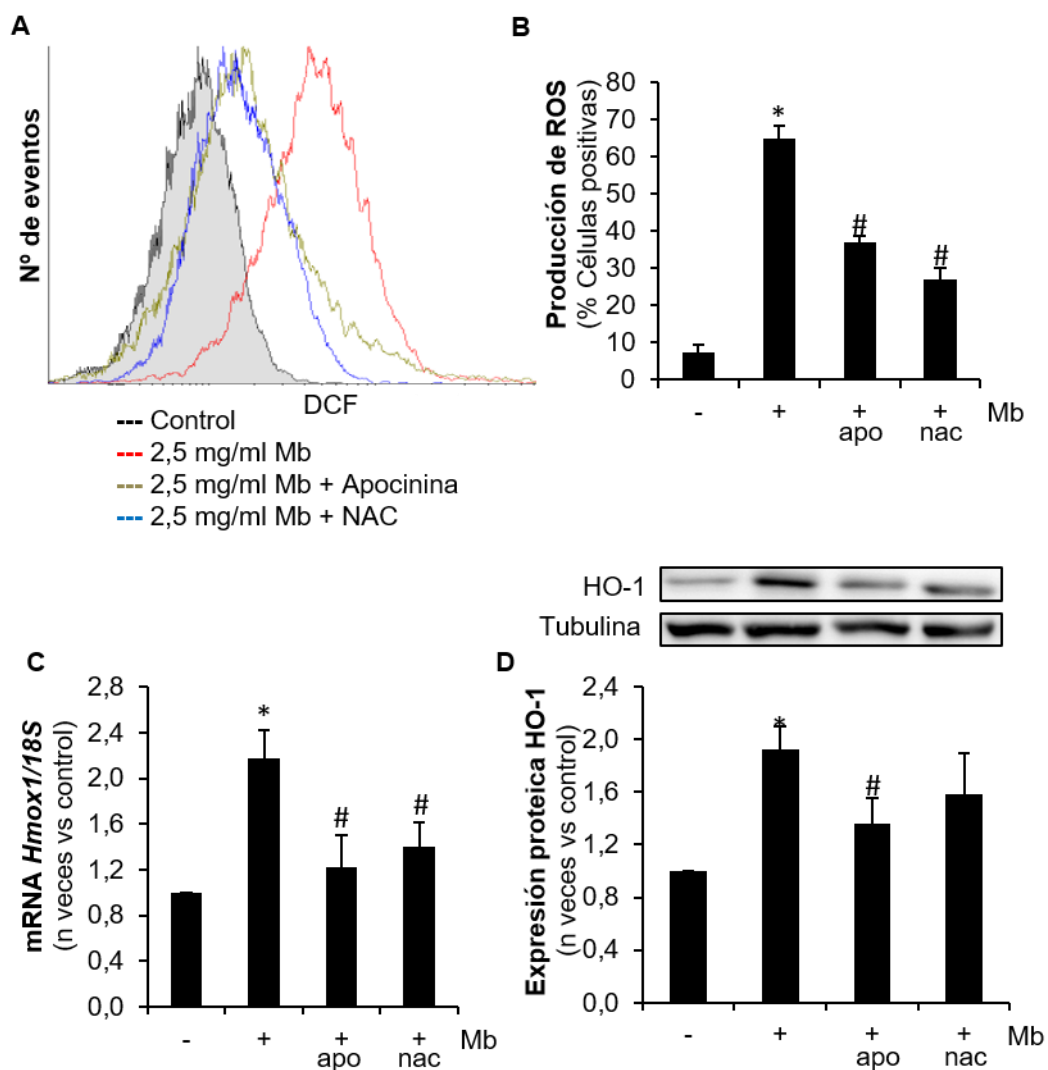


Fig.19. Distintos antioxidantes reducen el estrés oxidativo inducido por mioglobina en MCTs. (A) Histograma y (B) cuantificación de ROS en células estimuladas con mioglobina (Mb; 2,5 mh/mL) y pre-tratadas 1 hora antes con apocinina (apo, 50 μ M) y N-acetilcisteína (nac, 1mM). La producción de ROS se midió mediante la sonda H₂DCFDA a las 3 horas tras la estimulación con mioglobina (C-D). Descenso de los niveles de expresión génica (Hmox1) a 6 horas y proteica a 24 horas de HO-1 en células MCTs pre-tratadas con antioxidantes. Los resultados están expresados como media \pm ESM. * $p < 0.05$ vs control. # $p < 0.05$ vs células estimuladas con mioglobina.

Además, observamos que el uso de ambos compuestos antioxidantes descendía la expresión génica de las citoquinas inflamatorias *Ccl2* y *Ccl5* (Figura 20). Finalmente, observamos que el tratamiento con NAC y apocinina revertía la disminución de la expresión génica (*Kl*) y proteica de Klotho mediada por mioglobina (Figura 21).

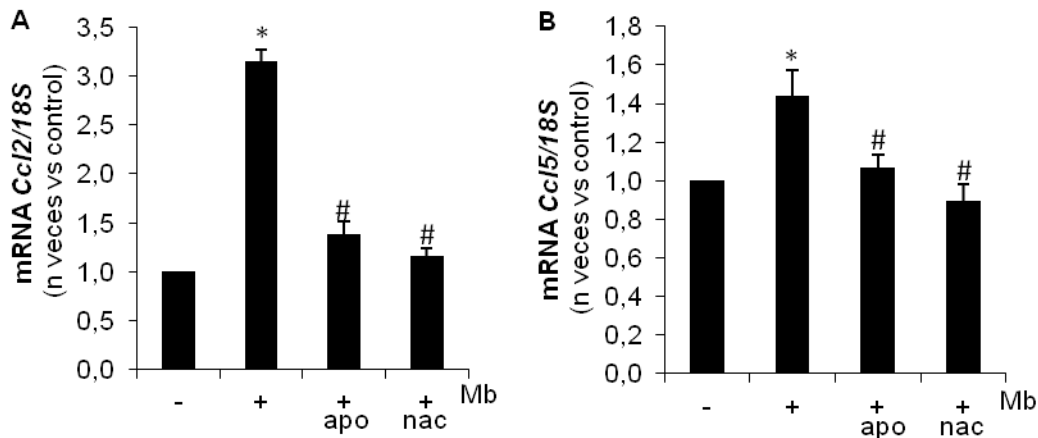


Figura 20. La apocinina y la NAC reducen la respuesta inflamatoria provocada por mioglobina en MCTs. Las células MCTs fueron pre-tratadas durante 1 hora con N-acetilcisteína (nac, 1 mM) o apocinina (apo, 50 μ M) y posteriormente fueron estimuladas con mioglobina (Mb; 2,5 mg/ml) durante 6 horas. (A-B) Expresión génica de citoquinas (Ccl2 y Ccl5) determinada mediante RT-PCR. Los resultados están expresados como media \pm ESM. * $p < 0.05$. # $p < 0.05$ vs células estimuladas con mioglobina.

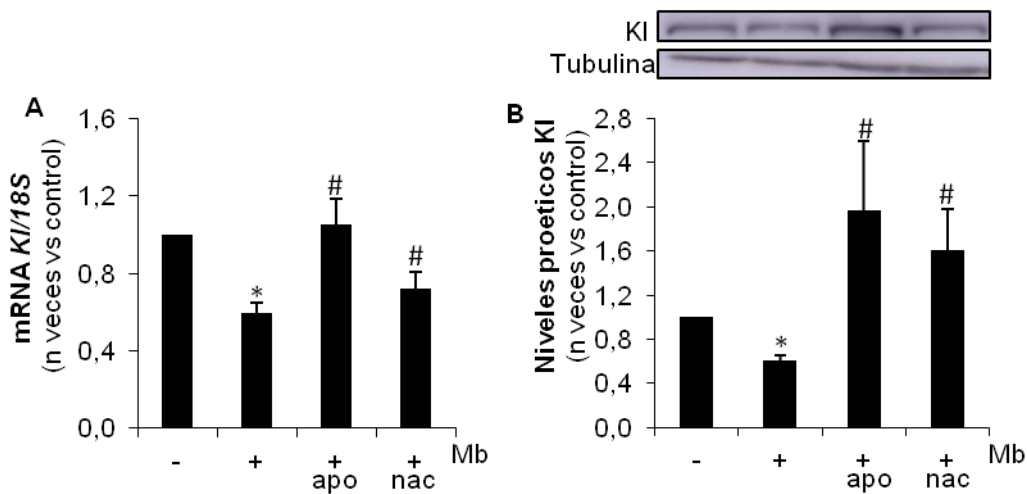


Figura 21. Los antioxidantes revierten el descenso de Klotho provocada por mioglobina en MCTs. Las células MCTs fueron pre-tratadas durante 1 hora con N-acetilcisteína (nac, 1 mM) o apocinina (apo, 50 μ M) y posteriormente fueron estimuladas con mioglobina (Mb; 2,5 mg/ml). (A) Expresión génica de KI a 6 horas y (B) proteica a 24 horas de Klotho determinada mediante RT-PCR y WB. Los resultados están expresados como media \pm ESM. * $p < 0.05$ vs control. # $p < 0.05$ vs células estimuladas con mioglobina

Para validar estos resultados, realizamos un modelo experimental de rabiomiolisis a 24h en ratones a los que inyectamos NAC (150 mg/Kg) 1h antes de la producción del daño. Los

Resultados

ratones que fueron tratados con NAC tenían una mejora significativa de la función renal, presentando menores niveles de BUN y creatinina sérica, que aquellos ratones sin este tratamiento antioxidante. Al analizar la expresión génica de NGAL (*Lcn2*), mediante RT-PCR, observamos que los ratones tratados con NAC tenían un menor daño renal en comparación con los ratones sin tratar (**Figura 22**).

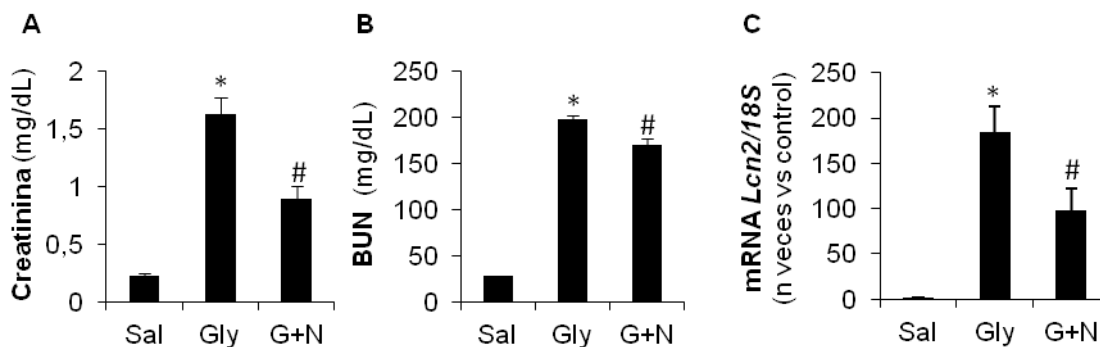


Figura 22: La administración de NAC mejora la función renal y disminuye el daño tubular asociado a rabdomiolisis. (A-B) Niveles séricos de creatinina y BUN y concentración de mioglobina en orina de ratones con rabdomiolisis. (C) Expresión génica de *Lcn2* determinada mediante RT-PCR. Sal: ratón control; Gly: ratón con inyección de glicerol; G+N: ratón tratado con NAC y con inyección de glicerol. Los resultados están expresados como media \pm ESM. * $p < 0.05$ vs control. # $p < 0.05$ vs ratones Gly.

Se evaluó la presencia de estrés oxidativo en los riñones de los ratones del modelo mediante inmunohistoquímica de 4-HNE. En ella pudimos ver que había una gran disminución de este producto de peroxidación lipídica en los ratones tratados con NAC. En línea con estos resultados, observamos una menor expresión génica (*Hmox1*) y proteica de HO-1 en los ratones tratados con NAC (**Figura 23**).

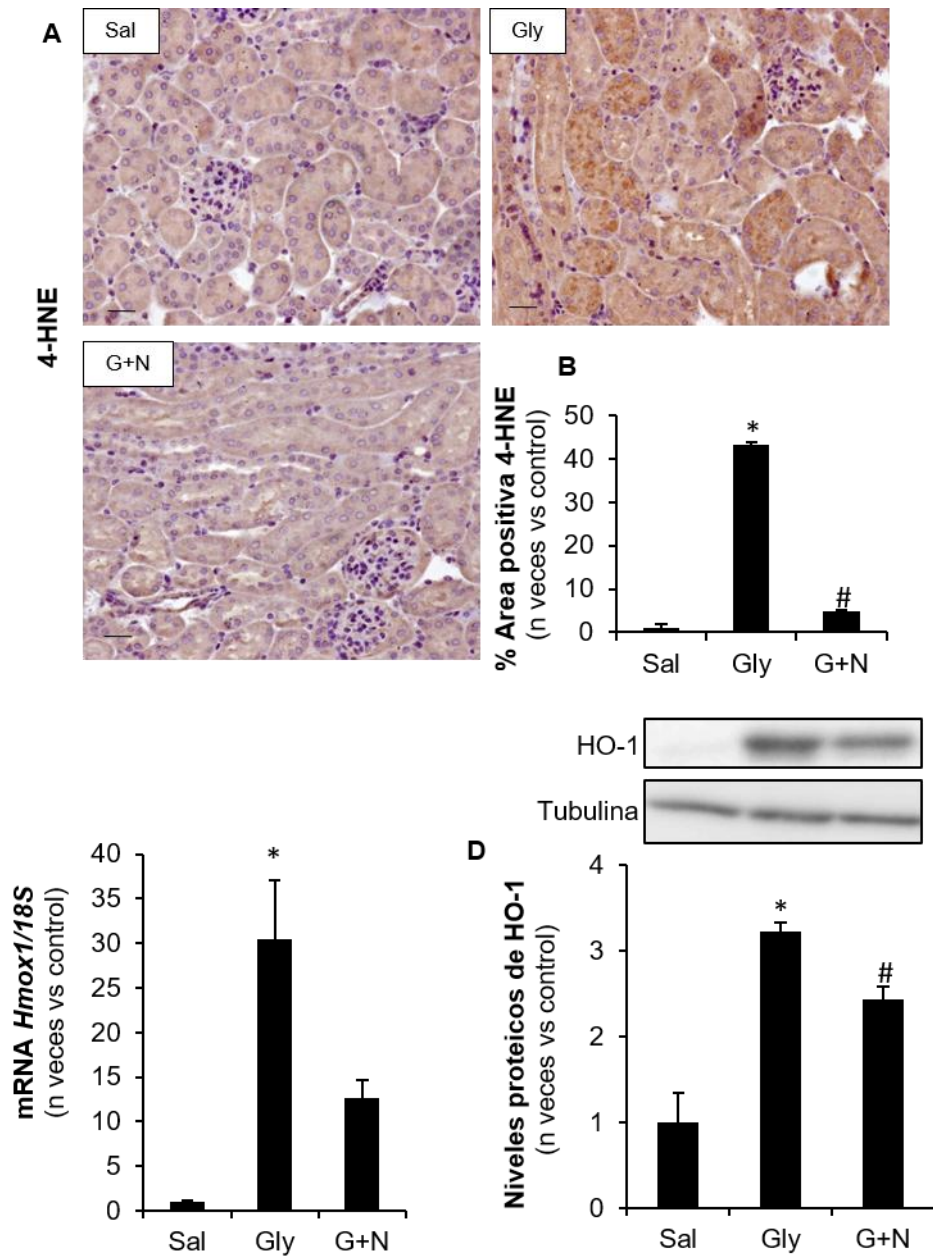


Figura 23. La administración de NAC disminuye el estrés oxidativo asociado a rabiomiolisis. (A) Inmunohistoquímica representativa de la presencia de 4-HNE. (B) La cuantificación de este marcador muestra una disminución de peroxidación lipídica con el tratamiento antioxidante. Barra de escala 50 μ M. (C-D) A través de RT-PCR y WB se analizaron los niveles génicos (*Hmox1*) y proteicos de HO-1. Sal: ratón control; Gly: ratón con inyección de glicerol; G+N: ratón tratado con NAC y con inyección de glicerol. Los resultados están expresados como media \pm ESM. * $p < 0.05$ vs control. # $p < 0.05$ vs ratones Gly.

Posteriormente analizamos los niveles de Klotho en los riñones de estos ratones. La inducción de rabiomiolisis redujo la expresión génica (*Kl*) y proteica de Klotho a 24h. Sin embargo, no observamos diferencias entre los ratones tratados o no con NAC, indicando la existencia de otros mecanismos de daño implicados en el descenso de Klotho por rabiomiolisis *in vivo* (Figura 24).

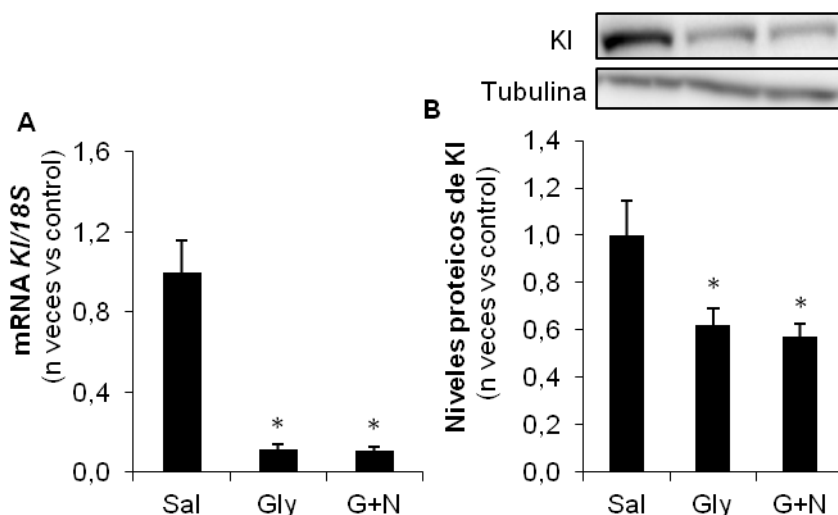


Figura 24. La administración de NAC no revierte el descenso de la expresión de Klotho asociado a rabiomiolisis. Expresión génica de *Kl* (A) y proteica (B) de Klotho determinada mediante RT-PCR y WB. Sal: ratón control; Gly: ratón con inyección de glicerol; G+N: ratón tratado con NAC y con inyección de glicerol. Los resultados están expresados como media \pm ESM. * $p < 0.05$ vs control.

8. La activación de Nrf2 reduce el descenso de Klotho mediado por mioglobina.

Con el fin de valorar el efecto de la activación de Nrf2 sobre el descenso de Klotho inducido por mioglobina, pre-estimulamos a células MCTs con sulforafano (SFN), un potente inductor de Nrf2. El pre-tratamiento con SFN disminuía la producción de ROS mediada por mioglobina y aumentaba la expresión génica (*Hmox1*) y proteica de HO-1, enzima inducida por la activación de Nrf2 (Figura 25).

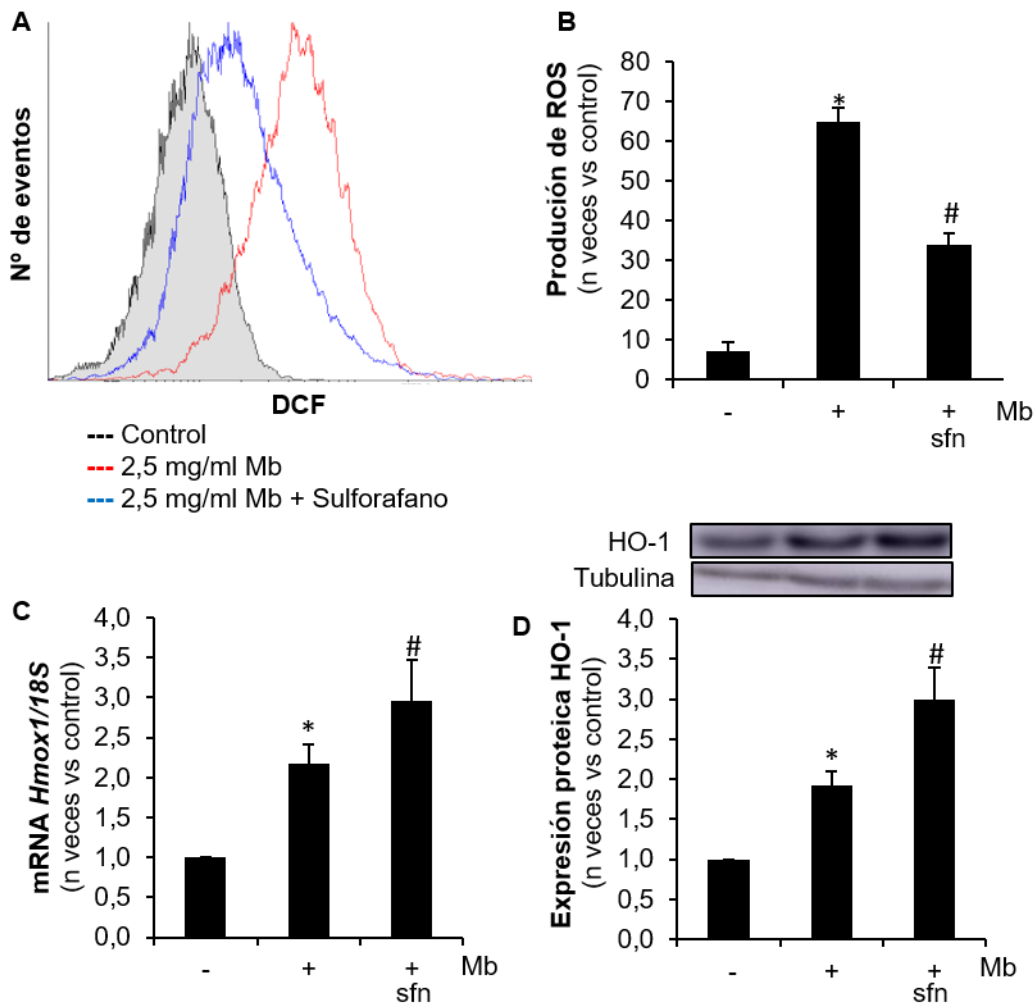


Fig.25. La activación de Nrf-2 disminuye el estrés oxidativo provocado por la mioglobina en MCTs. Las células MCTs fueron pre-tratadas durante 16 horas con Sulforafano (sfn, 10 μ M) y posteriormente fueron estimuladas con mioglobina (Mb; 2,5 mg/mL) de 3 a 6 horas. (A) Histograma de la disminución del estrés oxidativo provocado por el uso de un inductor de Nrf-2 y (B) su cuantificación en células estimuladas con mioglobina durante 3 horas. (C-D) A través de RT-PCR cuantitativa y WB analizamos la expresión génica (*Hmox1*) y proteica de HO-1 en células estimuladas con mioglobina durante 6 horas. Los resultados están expresados como media \pm ESM. * $p < 0.05$ vs control. # $p < 0.05$ vs células estimuladas con mioglobina.

Los mismos efectores protectores del SFN fueron observados cuando analizamos la expresión génica de las citoquinas inflamatorias *Ccl2* y *Ccl5* en células MCTs estimuladas con mioglobina, sugiriendo un papel protector de la activación de Nrf2 frente a las acciones adversas de la mioglobina (**Figura 26**). Finalmente, observamos que el pre-tratamiento con sulforafano revertía el descenso de la expresión génica (*Kl*) y proteica de Klotho inducido por mioglobina (**Figura 27**).

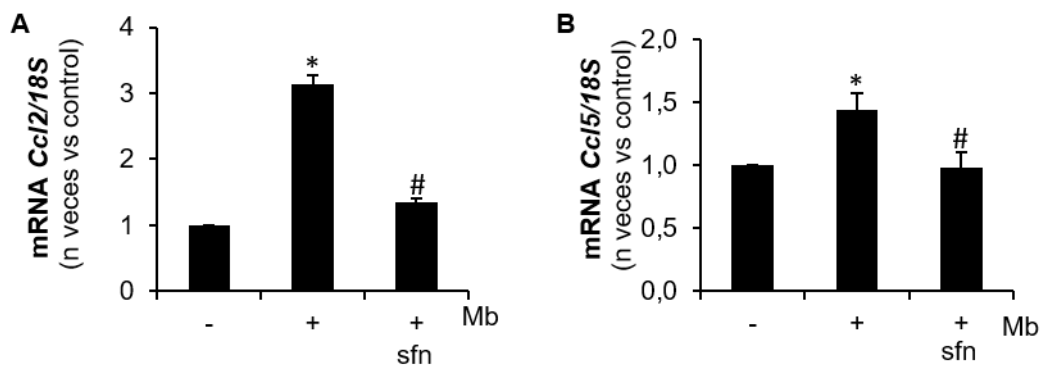


Figura 26. La activación de Nrf-2 disminuye la respuesta inflamatoria inducida por la mioglobina en MCTs. Las células MCTs fueron pre-tratadas durante 16 horas con Sulforafano (sfn, 10 μ M) y posteriormente fueron estimuladas con mioglobina (Mb; 2,5 mg/mL) durante 6 horas. (A-B) Expresión génica de las citoquinas inflamatorias Ccl2 y Ccl5 determinada mediante RT-PCR. Los resultados están expresados como media \pm ESM. * $p < 0.05$ vs control. # $p < 0.05$ vs células estimuladas con mioglobina.

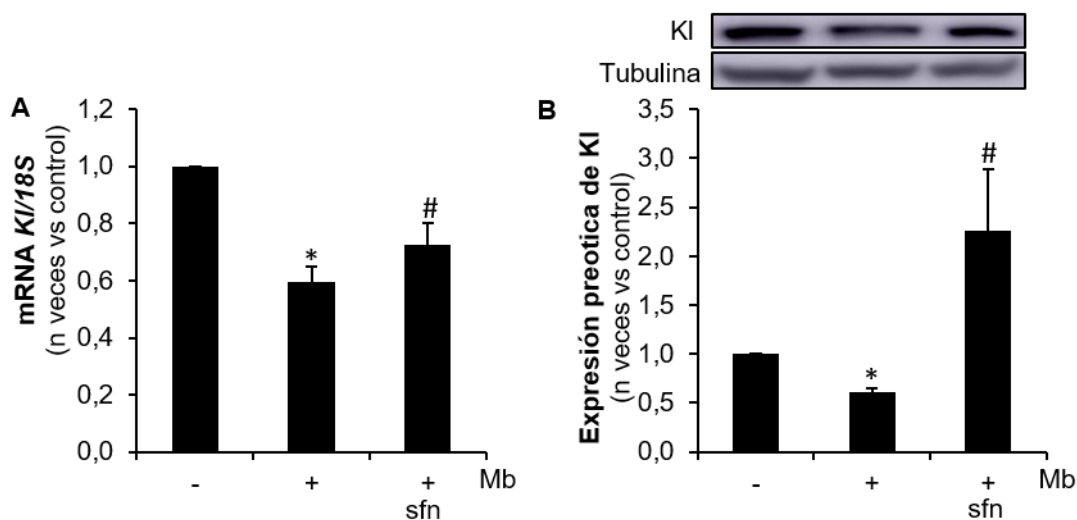


Figura 27. La activación de Nrf-2 revierte el descenso de Klotho mediado por mioglobina en MCTs. Las células MCTs fueron pre-tratadas durante 16 horas con Sulforafano (sfn, 10 μ M) y posteriormente fueron estimuladas con mioglobina (Mb; 2,5 mg/mL) durante 6-24 horas. (A-B) Expresión génica (KI) y proteica de Klotho determinada mediante RT-PCR o WB, respectivamente. Los resultados están expresados como media \pm ESM. * $p < 0.05$ vs control. # $p < 0.05$ vs células estimuladas con mioglobina.

9. La administración de Klotho recombinante protege del daño renal inducido por rabdomiolisis

Puesto que los niveles de Klotho disminuyen durante el FRA por rabdomiolisis, quisimos evaluar si la administración exógena de Klotho recombinante (rKl) tenía algún efecto beneficioso frente al daño renal asociado a este síndrome. Para ello, inyectamos rKl (0.01-0,1 mg/kg) 1h antes de la producción del daño. Nuestros resultados muestran que la administración de rKl mejoraba la función renal de forma significativa, con unos niveles séricos menores de creatinina y BUN, al compararlos con los ratones sin tratamiento con rKl (**Figura 28A-B**). Los mismos resultados observamos cuando analizamos la expresión génica de NGAL (*Lcn2*), un marcador de daño renal agudo (**Figura 28C**).

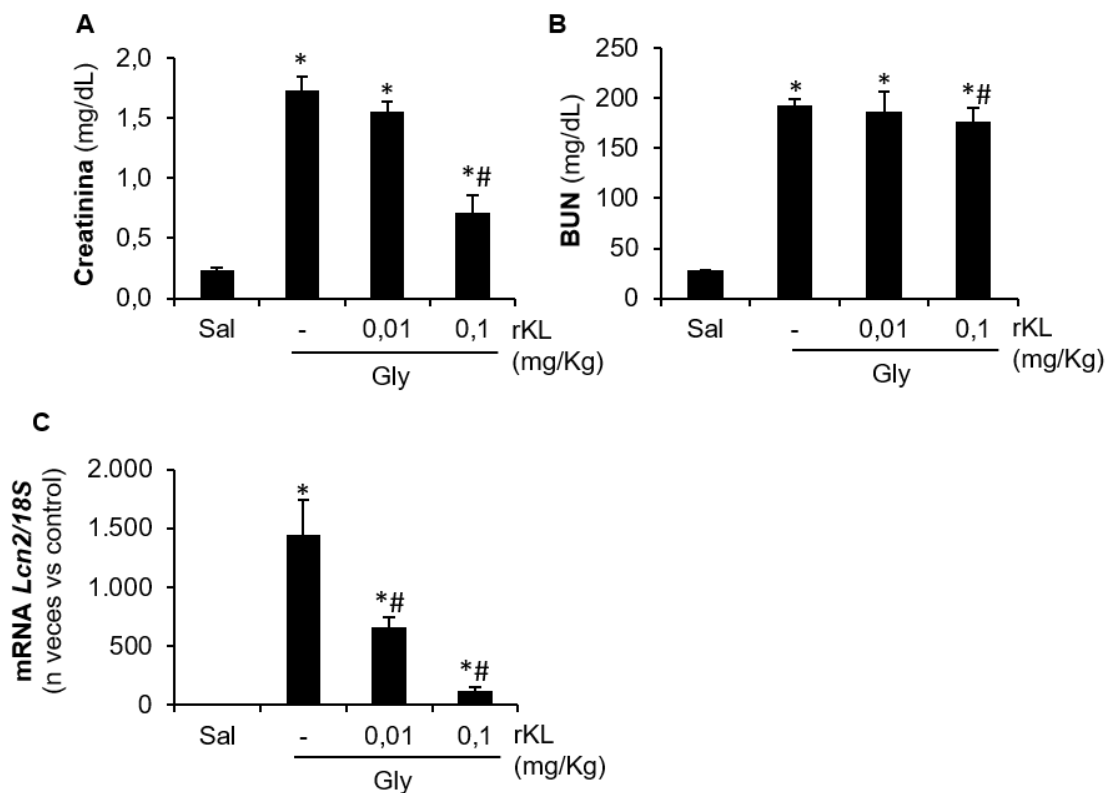


Figura 28. Klotho recombinante mejora la función renal en el modelo experimental de rabdomiolisis. (A-B) Niveles séricos de creatinina y BUN. (C) Expresión génica de *Lcn2* determinada mediante RT-PCR. Sal: ratón control; Gly: ratón con inyección de glicerol; rKl: Dosis de Klotho recombinante inyectada. Los resultados están expresados como media \pm ESM. * $p < 0.05$ vs control. # $p < 0.05$ vs ratones Gly sin rKl

Discusión

El fracaso renal agudo (FRA) es un síndrome caracterizado por un drástico descenso de la función renal que puede llegar a producir la muerte. Aproximadamente el 2% de los pacientes hospitalizados desarrolla un FRA (Liangos *et al.*, 2005) y del 7 al 10 % de éstos, están provocados por rhabdomiolisis (Korantzopoulos, Galaris and Papaioannides, 2002; Bagley, Yang and Shah, 2007; Khan, 2009). La incidencia de FRA en pacientes con rhabdomiolisis no se conoce con exactitud, debido a las diferentes definiciones de FRA y a la heterogeneidad etiológica y poblacional reportada en los diferentes estudios. Sin embargo, se ha estimado que entre un 4% y 33% de los pacientes con rhabdomiolisis presenta FRA (Bagley, Yang and Shah, 2007). La mortalidad por rhabdomiolisis global se estima entre 2 y 46%, dependiendo del tipo de causa que la origine, la administración temprana de tratamiento y la presencia de comorbilidades y complicaciones asociadas (Zimmerman and Shen, 2013).

En esta tesis hemos realizado un estudio pormenorizado de los principales mecanismos fisiopatológicos asociados a FRA por rhabdomiolisis, demostrando por primera vez que la expresión de Klotho disminuye en este contexto de daño. Hemos desarrollado un modelo experimental en ratones con rhabdomiolisis que reproduce fielmente las características de este síndrome en humanos (Abul-Ezz, Walker and Shah, 1991; Lochhead, Kharasch and Zager, 1998). Así, tras la inyección de glicerol, los ratones presentaban una pérdida aguda de función renal, con un aumento de los niveles séricos de creatinina y BUN. Hemos observado que estos marcadores de función renal se restauran rápidamente, pero las consecuencias del daño renal asociado al FRA siguen presentes en etapas posteriores, tal y como se ha descrito en modelos de FRA inducidos por isquemia-reperfusión, administración de ácido fólico o cisplatino (Abassi *et al.*, 2013; Christov *et al.*, 2013; Sinha, Vence and Salahudeen, 2013; J. M. Belcher *et al.*, 2014; Ragab, Abdallah and El-Abhar, 2014). Así, nuestros datos muestran una expresión sostenida en el tiempo de marcadores de daño renal, como NGAL y KIM-1, los cuales siguen elevados a tiempos en los que los niveles de creatinina se han restablecido. De igual modo, las lesiones histológicas de los túbulos, aunque menores que las observadas en el punto máximo del FRA, seguían estando presentes en fases asociadas a recuperación de la función renal.

Los mecanismos que producen daño tubular en rhabdomiolisis no están totalmente definidos, pero se ha sugerido que la acumulación de la mioglobina o sus productos derivados, como el grupo hemo, podrían jugar un papel clave. Durante la rhabdomiolisis se liberan cantidades masivas de mioglobina desde las células musculares dañadas. Una vez en el plasma, la mioglobina se filtra por la barrera de filtración glomerular y se endocita por las células tubulares a través del sistema de receptores megalina-cubilina (Gburek *et al.*, 2003). En el

interior de estas células, la mioglobina induce estrés oxidativo por diversos mecanismos: la mioglobina se puede oxidar desde su forma ferrosa hasta la forma férrica, produciendo anión superóxido (O_2^-). Este anión provoca una lenta autooxidación de la mioglobina que, de manera espontánea, produce H_2O_2 (Zager and Burkhart, 1998; Plotnikov *et al.*, 2009). La acumulación en la célula tubular de H_2O_2 y la propia capacidad peroxidasa del grupo hemo provoca un aumento de radicales libres (Glasauer and Chandel, 2013). Mediante la reacción de Fenton, el aumento de H_2O_2 junto con el Fe^{+2} favorece la producción de radical hidroxilo (OH^\cdot), el más reactivo de todas las ROS (Gutteridge, 1986; Liu *et al.*, 2004). En esta línea, nuestros datos muestran un aumento en la producción de ROS en células tubulares estimuladas con mioglobina. Estas ROS promueven la peroxidación de ácidos grasos de membrana y la síntesis de malondialdehído, lo que explicaría el incremento de esta molécula y de 4-HNE, un marcador de peroxidación lipídica, que observamos tras la inducción de rabiomiolisis en nuestro modelo. En línea con nuestra observación, otros trabajos también han descrito un aumento del estrés oxidativo en este contexto de daño (Plotnikov *et al.*, 2009; Nara *et al.*, 2016).

Para recuperar el equilibrio redox, las células activan diferentes mecanismos de defensa para proporcionar una respuesta antioxidante. Muchos estudios describen el papel clave de la activación de Nrf2 en la regulación de la respuesta antioxidante, ya que este factor de transcripción promueve la expresión de numerosas enzimas antioxidantes de fase 2, como HO-1 (Ruiz *et al.*, 2013; Soetikno *et al.*, 2013; Buendia *et al.*, 2016; W. Zhao *et al.*, 2016). Nuestros resultados muestran un incremento en la expresión génica y proteica de HO-1, tanto *in vivo* como *in vitro*. La expresión de esta enzima es vital en este contexto ya que es la responsable del catabolismo del grupo hemo.

Como consecuencia de la activación del proceso oxidativo y la consiguiente muerte de células tubulares, la rabiomiolisis desencadena un proceso inflamatorio en el riñón (Rubio-Navarro *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2017). Nuestros resultados muestran un aumento de la expresión génica de citoquinas inflamatorias (*Ccl2* y *Ccl5*) a los 3 días de la inyección de glicerol, así como en células tubulares estimuladas con mioglobina durante 24 horas. Además, observamos un aumento del infiltrado intersticial de macrófagos F4/80 tras 3 días de la producción del daño. Esta respuesta inflamatoria es detectable a la semana de la inducción del daño, provocando efectos adversos a largo plazo.

Otro mecanismo implicado en el daño renal por rabiomiolisis es la obstrucción tubular. Así, en nuestro modelo, observamos la presencia de cilindros hemáticos en la luz de los túbulos. Estos cilindros están producidos por la precipitación de la mioglobina junto con la

proteína de Tamm-Horsfall, un proceso favorecido por la acidificación de la orina (Sanders *et al.*, 1990; Heyman and Brezis, 1995). Este rasgo es característico de este tipo de patología y puede conllevar la obstrucción del túbulo renal.

Los pacientes que desarrollan FRA presentan hiperfosfatemia como consecuencia de la pérdida de función renal (Leaf *et al.*, 2013). Sin embargo, en los FRA asociados a rhabdomiolisis esta alteración se produce previamente a la pérdida de función renal, tal y como hemos observado en nuestro modelo. Este aumento de fósforo plasmático se produce como consecuencia de la liberación del fósforo contenido en el retículo sarcoplásmico tras la necrosis celular del músculo estriado (Llach, Felsenfeld and Haussler, 1981; Higaki *et al.*, 2015). Además, en este contexto observamos una hipocalcemia transitoria provocada por la entrada y posterior acumulación de calcio en el músculo dañado y el calcio precipitado en los vasos en forma de fosfato cálcico que disminuye los niveles plasmáticos de este ion (Vanholder *et al.*, 2000). Los niveles circulantes de fósforo y calcio están estrechamente regulados por el eje FGF-23/Klotho (de Borst *et al.*, 2011; Kuro-o and Moe, 2017). FGF-23 al llegar al riñón activa la vía FGFR1/Kl, que inhibe la expresión de los cotransportadores sodio-fosfato tipo II (Na/P IIa y Na/P IIc), disminuyendo así la reabsorción tubular de fósforo (de Borst *et al.*, 2011). Además la activación de la vía FGFR1/Kl inhibe la actividad de la enzima 1 α -hidrolasa (vía Cyp27b1) y estimula la actividad de la enzima 24-hidroxilasa (vía Cyp24a1) disminuyendo los niveles de calcitriol y con ello la absorción intestinal de fósforo y calcio (Shimada *et al.*, 2004; Kuro-o, 2011; Kuro-o and Moe, 2017). Por otro lado, Klotho es responsable de la activación del canal TRPV5 en el túbulo, el cual reabsorbe Ca⁺² en el riñón (Chang *et al.*, 2005; Leunissen *et al.*, 2013; Andrukhova *et al.*, 2017). En este sentido, nosotros encontramos un desbalance en el eje FGF-23/Klotho en nuestro modelo, observando un aumento en los niveles séricos de FGF-23 y un descenso en los niveles plasmáticos y renales de Klotho a las 24h de la inyección de glicerol, coincidiendo con la hiperfosfatemia y la hipocalcemia. Este aumento de FGF-23 también ha sido descrito en modelos experimentales de FRA inducido por ácido fólico, cisplatino y en enfermos renales (Christov *et al.*, 2013; Leaf *et al.*, 2016, 2018; Elseweidy *et al.*, 2017). La menor expresión renal de Klotho podría provocar alteraciones en la reabsorción de iones en el túbulo renal por los mecanismos anteriormente descritos.

En concordancia con los resultados del modelo experimental, observamos un descenso en los niveles séricos de Klotho en pacientes con rhabdomiolisis que habían desarrollado FRA. Distintos autores han demostrado que los niveles de Klotho soluble disminuyen en línea con la pérdida de función renal y el comienzo del FRA, postulándolo como un potencial biomarcador pronóstico (Hu, Kuro-o and Moe, 2010, 2012; Akimoto *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2014; Scholze *et*

al., 2014; Barker *et al.*, 2015; Xu and Sun, 2015). Además, se ha sugerido que los niveles de Klotho podrían ser un posible marcador del estadio de ERC (Semba *et al.*, 2011; Hu, Kuro-o and Moe, 2013; Barker *et al.*, 2015; Neyra and Hu, 2016; Tanaka *et al.*, 2016). Por último, otros autores han relacionado el descenso de los niveles de Klotho soluble con el aumento del daño cardiaco (Navarro-González *et al.*, 2014).

Los niveles de Klotho soluble provienen de la síntesis de esta proteína a nivel renal y de su escisión proteolítica de la forma de membrana por diversas enzimas (Chen *et al.*, 2007). Nuestros resultados muestran que los niveles renales de Klotho disminuyen de forma drástica tras producirse un FRA agudo. Observamos un descenso muy agudo de la expresión génica (3h), incluso antes del aumento de otros marcadores de daño renal como KIM-1 y NGAL, lo que sugiere a Klotho como marcador temprano de daño renal por rhabdomiolisis. En nuestro estudio observamos una correlación positiva entre el descenso de Klotho y la pérdida de función renal, así como los marcadores de daño renal.

Diversos estudios han relacionado el aumento del estrés oxidativo con una menor expresión de Klotho (Guo *et al.*, 2018; Qian *et al.*, 2018; Shen *et al.*, 2018). En diferentes trabajos de investigación se ha demostrado que la activación de Nrf2 está relacionada con la protección ante FRA (Shelton, Kevin Park and Copple, 2013; Wang *et al.*, 2014). Para analizar su papel protector frente al daño inducido por mioglobina, pre-tratamos las MCTs con sulforafano, un compuesto inductor de Nrf2 (Dinkova-Kostova *et al.*, 2002; Balogun *et al.*, 2003; Rojo *et al.*, 2008; Guerrero-Hue *et al.*, 2017). El uso de este compuesto reduce el estrés oxidativo provocado por la mioglobina, tal y como ha sido observado previamente por otros autores (Guerrero-Beltrán, Calderón-Oliver, *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2014; Shokeir *et al.*, 2015; Z. Zhao *et al.*, 2016). Nuestros datos muestran que la inducción de Nrf2 revertía el descenso de los niveles renales de Klotho inducidos por la mioglobina. En línea con estos resultados, nuestros datos sugieren que el estrés oxidativo inducido por mioglobina puede estar involucrado en el descenso de Klotho en células en cultivo. Así, el uso de antioxidantes como N-acetilcisteína (NAC) y apocinina, revertía el estrés oxidativo y el descenso de Klotho provocado por la mioglobina en las MCTs. Posteriormente evaluamos si el tratamiento con NAC impedía el descenso renal de Klotho *in vivo*. El tratamiento con NAC en ratones con rhabdomiolisis mejoraba la función renal y disminuyó la expresión de marcadores de daño renal y de estrés oxidativo. Los ratones que fueron tratados con NAC tenían una mejora de la función renal, mostrando menores niveles de BUN y creatinina sérica, que aquellos ratones sin el tratamiento antioxidante. Los efectos protectores de NAC se han demostrado en modelos de nefrotoxicidad inducida por cisplatino (Luo *et al.*, 2008), lesión por isquemia-reperfusión

(Nitescu *et al.*, 2006) y enfermedad renal crónica (Shimizu *et al.*, 2005). NAC también redujo el daño renal en un modelo de rhabdomiólisis en ratas, previniendo la apoptosis celular mediante la inhibición de las vías de señalización de ERK y JNK (Kim *et al.*, 2010) y el estrés oxidativo (de Bragança *et al.*, 2017). Recientemente se completó un ensayo doble ciego aleatorizado que compara la eficacia de NAC en la prevención de la insuficiencia renal en la rhabdomiólisis, aunque los resultados aún no se han publicado (Ensayo clínico N° NCT00391911). Sin embargo, la expresión génica de *Kl* y proteica de *Klotho* no se revertía tras el tratamiento antioxidante de NAC. Este resultado indica que la regulación de la expresión renal de *Klotho* no depende exclusivamente del estrés oxidativo, sino que pueden existir otros mecanismos implicados.

La expresión de *Klotho* está fuertemente regulada por la inflamación (Ohyama *et al.*, 1998; Moreno *et al.*, 2011; Zhou, Kuang and Zhou, 2017; Fernandez-Fernandez *et al.*, 2018; J. Chen *et al.*, 2018). En nuestro estudio, observamos que existía una relación entre el descenso de *Klotho* con el aumento de las citoquinas inflamatorias *Ccl2* y *Ccl5* en el riñón. Tanto el uso de antioxidantes directos como NAC y apocinina, como la activación de *Nrf2* revertían la expresión génica de ambas citoquinas inflamatorias, estableciendo una relación directa entre el estrés oxidativo inducido por mioglobina y la respuesta inflamatoria (Elmarakby and Sullivan, 2012; Youn *et al.*, 2014; Szalay *et al.*, 2015). Estudios previos muestran que el tratamiento con sulforafano y otros inductores de *Nrf2* inhibe la actividad de *NF-κB* y disminuye la expresión génica de *TNF-α*, (Guerrero-Beltrán, Mukhopadhyay, *et al.*, 2012; Soetikno *et al.*, 2013; Zhao, Zhou and Lu, 2013; Nallasamy *et al.*, 2014; He *et al.*, 2015). Además, la activación de *Nrf2* podría disminuir el estrés oxidativo y, con ello, provocar una disminución de la expresión de citoquinas inflamatorias (El Assar, Angulo and Rodríguez-Mañas, 2013; Soetikno *et al.*, 2013; Zhao, Zhou and Lu, 2013; Satapati *et al.*, 2015; Tucker, Scanlan and Dalbo, 2015). Otros estudios han relacionado directamente el aumento de *HO-1* con la disminución de la inflamación, sugiriendo que tanto *HO-1* como *Nrf2* disminuyen la respuesta inflamatoria (An *et al.*, 2012; WEI *et al.*, 2015). Por todos estos motivos, pensamos que la activación de *Nrf2* podría favorecer la presencia de *Klotho* en el riñón tanto por sus acciones antioxidantes como por sus efectos antiinflamatorios.

La mayoría de los pacientes con FRA asociado a rhabdomiólisis recuperan la función renal en pocos meses (de Meijer *et al.*, 2003). Sin embargo, incluso aparentemente resuelto, el FRA por rhabdomiólisis promueve alteraciones estructurales importantes, como fibrosis y glomerulosclerosis, lo que aumenta el riesgo de enfermedad renal crónica, tal y como se ha descrito en otros tipos de FRA (Wen, Peng and Kellum, 2011). Estos efectos adversos a largo plazo pueden estar relacionados no solo con una mayor producción de matriz extracelular por

las células renales, sino también con un papel pro-fibrótico de los macrófagos infiltrantes (Belliere *et al.*, 2015). En la presente tesis hemos demostrado por primera vez que los niveles plasmáticos y renales de Klotho están disminuidos 30 días después de la inducción de rdbdomiolisis. Esta disminución de Klotho a largo plazo se ha observado en otros modelos de FRA experimental, como el inducido por isquemia-reperfusión (Sugiura *et al.*, 2005), o en el daño renal provocado en un modelo de diabetes inducida (Cheng *et al.*, 2013). Al igual que sucedía en otro trabajo anterior (Belliere *et al.*, 2015), en nuestro estudio los niveles de BUN estaban elevados a un mes tras la inyección de glicerol. Sin embargo, no encontramos alteraciones en los niveles de creatinina, fósforo y calcio en suero a este tiempo. El hecho de no encontrar diferencias en los niveles de creatinina puede enmascarar una disminución de la función renal de los ratones tras un mes del FRA, ya que estos ratones tendrán una menor producción de creatinina al presentar una disminución de la masa muscular, lo que conlleva a unos niveles inferiores en sangre respecto a los controles con una función renal normal (Banfi, Del Fabbro and Lippi, 2009; Park *et al.*, 2013; Bilancio *et al.*, 2014; Paroni *et al.*, 2017). Los niveles de expresión proteica de Klotho tras un mes del daño estaban disminuidos, lo que avala su posible uso como biomarcador del daño renal. Sin embargo, los niveles de expresión génica de *Kl* eran semejantes al control lo que nos puede indicar que existe una regulación post-transcripcional que regula la traducción de este mRNA. Trabajos previos han visto que existen distintos miRNAs que regulan la expresión de *Kl* (Mehi *et al.*, 2014; Kang and Xu, 2016; Zhou, Kuang and Zhou, 2017). Por otro lado, nuestros datos muestran un aumento de fibrosis, caracterizado por un incremento en la expresión de fibronectina y del contenido colágeno, así como una elevada respuesta inflamatoria en los riñones de los ratones que fueron sacrificados 30 días después de la inducción de la rdbdomiolisis. Por tanto, resulta lógico pensar que la sustitución del parénquima renal por matriz extracelular o una respuesta inflamatoria exacerbada, tanto a nivel renal como sistémica, pudieran estar relacionadas con el descenso de Klotho a largo plazo.

La reducción de la expresión renal de Klotho contribuye a la progresión de la insuficiencia renal (Lin, Kuro-o and Sun, 2013), mientras que su sobreexpresión mejora la función renal y disminuye la lesión provocada por el FRA (Haruna *et al.*, 2007; Nagasu *et al.*, 2011). Por esta razón, realizamos una aproximación experimental utilizando Klotho recombinante en nuestro modelo de FRA asociado a rdbdomiolisis. En consonancia con los datos publicados en la literatura, nuestros datos muestran que los ratones a los que se les administró Klotho recombinante previo a la generación de la rdbdomiolisis presentaban una mejora en la función renal y un menor daño renal. En línea con estos resultados, otros grupos han demostrado que

la administración de Klotho reducía el daño y mejoraba la función renal en un modelo de FRA por isquemia-reperfusión (Hu *et al.*, 2010). Otros estudios demuestran que un tratamiento continuo con Klotho recombinante disminuye la progresión y mejora la función renal en un modelo de ERC mediante unifrectomía e isquemia-reperfusión en el riñón contralateral (Hu *et al.*, 2017). Todos estos efectos beneficiosos tras la administración de Klotho podrían estar relacionados a sus acciones antioxidantes (Ravikumar *et al.*, 2014; Rizzo *et al.*, 2014; Maltese *et al.*, 2017; Shen *et al.*, 2018), antiinflamatorias (Liu *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2011; Seibert *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2018) y su importante papel en la regulación del metabolismo del fósforo y el calcio en el organismo.

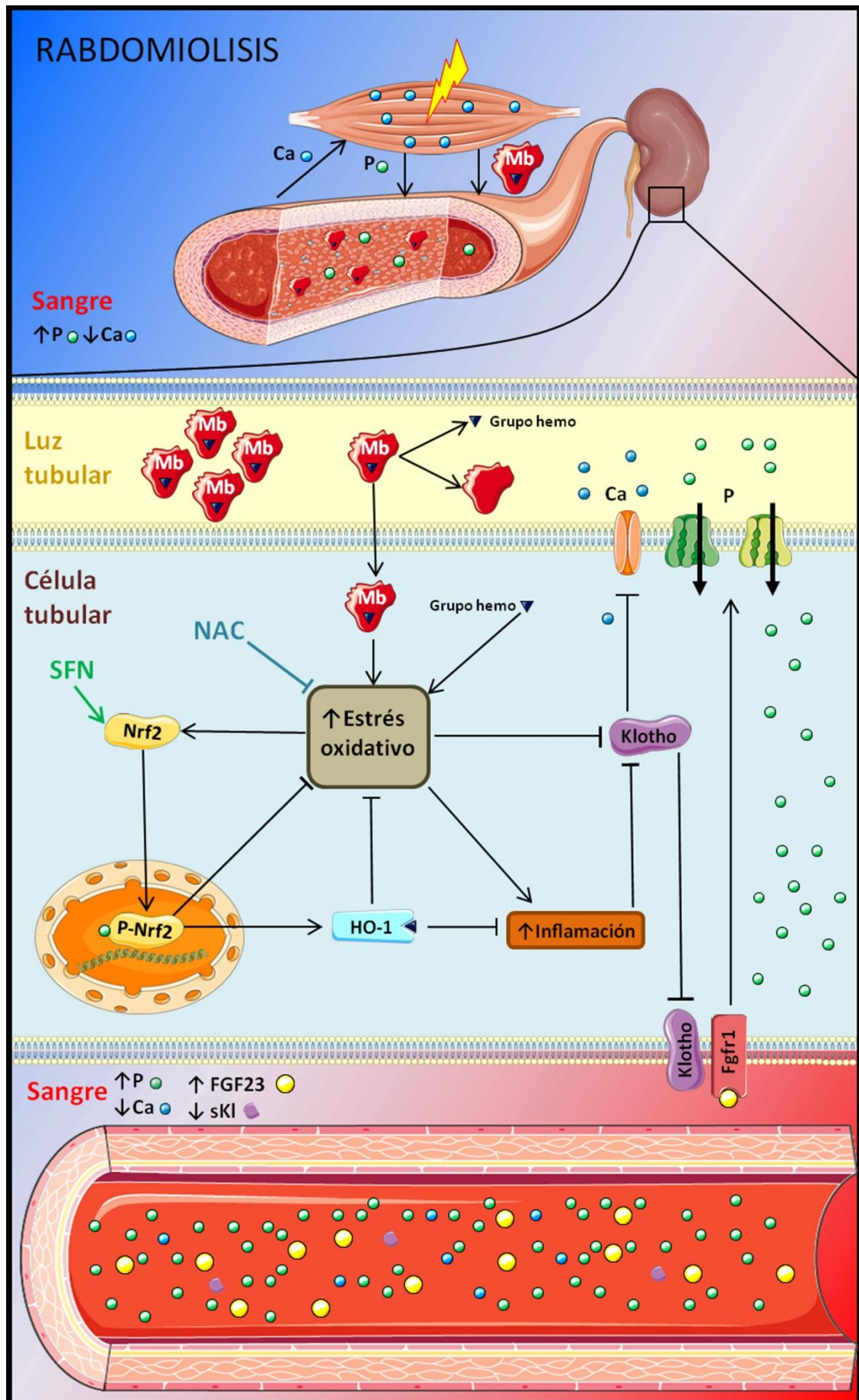


Figura 29. Mecanismos moleculares implicados en el daño renal agudo por rabdomiolisis

Conclusiones

Conclusiones

- El daño renal asociado a FRA por rabdomiolisis provoca alteraciones histológicas y funcionales del riñón, estrés oxidativo, inflamación y desbalance del metabolismo mineral.
- Durante el FRA asociado a rabdomiolisis se produce un descenso precoz en la expresión de Klotho, la cual se mantiene reducida en fases posteriores, coincidiendo con un aumento de la fibrosis renal y una respuesta inflamatoria crónica.
- Los pacientes con FRA asociado a rabdomiolisis presentan una menor concentración plasmática de Klotho con respecto a personas sanas.
- En células tubulares estimuladas con mioglobina se produce un aumento del estrés oxidativo y de mediadores inflamatorios, así como un descenso significativo de la expresión génica y proteica de Klotho.
- El descenso de Klotho por mioglobina se revierte con el uso de antioxidantes e inductores de la activación de Nrf2 *in vitro*, pero no *in vivo*.
- La administración de Klotho recombinante en un modelo de FRA por rabdomiolisis mejora la función renal y disminuye el daño tubular.

Bibliografía

- Abassi, Z. *et al.* (2013) 'Urinary NGAL and KIM-1: Biomarkers for Assessment of Acute Ischemic Kidney Injury Following Nephron Sparing Surgery', *The Journal of Urology*, 189(4), pp. 1559–1566.
- Abed, D. A. *et al.* (2015) 'Discovery of direct inhibitors of Keap1-Nrf2 protein-protein interaction as potential therapeutic and preventive agents.', *Acta pharmaceutica Sinica B*, 5(4), pp. 285–99.
- Abul-Ezz, S. R., Walker, P. D. and Shah, S. V (1991) 'Role of glutathione in an animal model of myoglobinuric acute renal failure.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(21), pp. 9833–7.
- Akasaka-Manyá, K., Manyá, H. and Endo, T. (2016) 'Function and Change with Aging of α -Klotho in the Kidney', in *Vitamins and hormones*, pp. 239–256.
- Akimoto, T. *et al.* (2012) 'The relationship between the soluble Klotho protein and the residual renal function among peritoneal dialysis patients', *Clinical and Experimental Nephrology*, 16(3), pp. 442–447.
- Akira, S., Takeda, K. and Kaisho, T. (2001) 'Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity.', *Nature immunology*, 2(8), pp. 675–80.
- Alam, J. and Cook, J. L. (2003) 'Transcriptional regulation of the heme oxygenase-1 gene via the stress response element pathway.', *Current pharmaceutical design*, 9(30), pp. 2499–511.
- Alam, J. and Den, Z. (1992) 'Distal AP-1 binding sites mediate basal level enhancement and TPA induction of the mouse heme oxygenase-1 gene.', *The Journal of biological chemistry*, 267(30), pp. 21894–900.
- An, L. *et al.* (2012) 'Heme oxygenase-1 system, inflammation and ventilator-induced lung injury', *European Journal of Pharmacology*, 677(1–3), pp. 1–4.
- Andrukhova, O. *et al.* (2017) 'Klotho Lacks an FGF23-Independent Role in Mineral Homeostasis.', *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 32(10), pp. 2049–2061.
- Arking, D. E. *et al.* (2002) 'Association of human aging with a functional variant of klotho', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(2), pp. 856–861.
- Arking, D. E. *et al.* (2003) 'KLOTHO allele status and the risk of early-onset occult coronary artery disease.', *American journal of human genetics*, 72(5), pp. 1154–61.
- Arking, D. E. *et al.* (2005) 'Association between a functional variant of the KLOTHO gene and high-density lipoprotein cholesterol, blood pressure, stroke, and longevity.', *Circulation research*, 96(4), pp. 412–8.
- El Assar, M., Angulo, J. and Rodríguez-Mañas, L. (2013) 'Oxidative stress and vascular inflammation in aging', *Free Radical Biology and Medicine*, 65, pp. 380–401.
- Bagley, W. H., Yang, H. and Shah, K. H. (2007) 'Rhabdomyolysis', *Internal and Emergency Medicine*, 2(3), pp. 210–218.
- Bain, C. C. *et al.* (2013) 'Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors.', *Mucosal immunology*, 6(3), pp. 498–510.

- Balogun, E. *et al.* (2003) 'Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element.', *The Biochemical journal*, 371(Pt 3), pp. 887–95.
- Banfi, G., Del Fabbro, M. and Lippi, G. (2009) 'Serum Creatinine Concentration and Creatinine-Based Estimation of Glomerular Filtration Rate in Athletes', *Sports Medicine*, 39(4), pp. 331–337.
- Barker, S. L. *et al.* (2015) 'The demonstration of α Klotho deficiency in human chronic kidney disease with a novel synthetic antibody', *Nephrology Dialysis Transplantation*, 30(2), pp. 223–233.
- Baron, C. P. and Andersen, H. J. (2002) 'Myoglobin-induced lipid oxidation. A review.', *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(14), pp. 3887–97.
- Barrouillet, M. P., Moiret, A. and Cambar, J. (1999) 'Protective effects of polyphenols against cadmium-induced glomerular mesangial cell myocontracture.', *Archives of toxicology*, 73(8–9), pp. 485–8.
- Belcher, J. D. *et al.* (2014) 'Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease.', *Blood*, 123(3), pp. 377–90.
- Belcher, J. M. *et al.* (2013) 'Association of AKI with mortality and complications in hospitalized patients with cirrhosis.', *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 57(2), pp. 753–62.
- Belcher, J. M. *et al.* (2014) 'Kidney biomarkers and differential diagnosis of patients with cirrhosis and acute kidney injury', *Hepatology*, 60(2), pp. 622–632.
- Belliere, J. *et al.* (2015) 'Specific Macrophage Subtypes Influence the Progression of Rhabdomyolysis-Induced Kidney Injury', *Journal of the American Society of Nephrology*, 26(6), pp. 1363–1377.
- Bilancio, G. *et al.* (2014) 'Effects of bed-rest on urea and creatinine: correlation with changes in fat-free mass.', *PloS one*. Edited by S. E. Alway, 9(9), p. e108805.
- Bloom, D. A. and Jaiswal, A. K. (2003) 'Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from INrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 gene expression.', *The Journal of biological chemistry*, 278(45), pp. 44675–82.
- Boisvert, N. C. *et al.* (2018) 'Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 deletion is associated with urinary α -klotho deficiency and perturbed phosphate homeostasis', *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, p. ajrenal.00411.2017.
- Bolisetty, S., Zarjou, A. and Agarwal, A. (2017) 'Heme Oxygenase 1 as a Therapeutic Target in Acute Kidney Injury', *American Journal of Kidney Diseases*, 69(4), pp. 531–545.
- Bonventre, J. V and Weinberg, J. M. (2003) 'Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure.', *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 14(8), pp. 2199–210.
- de Borst, M. H. *et al.* (2011) 'Cross talk between the renin-angiotensin-aldosterone system and vitamin D-FGF-23-klotho in chronic kidney disease.', *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 22(9), pp. 1603–9.

- Bosch, X., Poch, E. and Grau, J. M. (2009) 'Rhabdomyolysis and Acute Kidney Injury', *New England Journal of Medicine*, 361(1), pp. 62–72.
- Boutaud, O. and Roberts, L. J. (2011) 'Mechanism-based therapeutic approaches to rhabdomyolysis-induced renal failure.', *Free radical biology & medicine*, 51(5), pp. 1062–7.
- de Bragança, A. C. *et al.* (2017) 'Ecstasy induces reactive oxygen species, kidney water absorption and rhabdomyolysis in normal rats. Effect of N-acetylcysteine and Allopurinol in oxidative stress and muscle fiber damage', *PLOS ONE*. Edited by E. A. Burdmann, 12(7), p. e0179199.
- Buehler, P. W. and Alayash, A. I. (2005) 'Redox biology of blood revisited: the role of red blood cells in maintaining circulatory reductive capacity.', *Antioxidants & redox signaling*, 7(11–12), pp. 1755–60.
- Buehler, P. W., D'Agnillo, F. and Schaer, D. J. (2010) 'Hemoglobin-based oxygen carriers: From mechanisms of toxicity and clearance to rational drug design.', *Trends in molecular medicine*, 16(10), pp. 447–57.
- Buendia, I. *et al.* (2016) 'Nrf2–ARE pathway: An emerging target against oxidative stress and neuroinflammation in neurodegenerative diseases', *Pharmacology & Therapeutics*, 157, pp. 84–104.
- Chang, Q. *et al.* (2005) 'The beta-glucuronidase klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel.', *Science (New York, N.Y.)*, 310(5747), pp. 490–3.
- Chawla, L. S. and Kimmel, P. L. (2012) 'Acute kidney injury and chronic kidney disease: an integrated clinical syndrome', *Kidney International*, 82(5), pp. 516–524.
- Chen, C.-D. *et al.* (2007) 'Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(50), pp. 19796–801.
- Chen, G. *et al.* (2018) 'α-Klotho is a non-enzymatic molecular scaffold for FGF23 hormone signalling', *Nature*, 553(7689), pp. 461–466.
- Chen, J. *et al.* (2018) 'Secreted Klotho Attenuates Inflammation-Associated Aortic Valve Fibrosis in Senescence-Accelerated Mice P1Novelty and Significance', *Hypertension*, 71(5), pp. 877–885.
- Cheng, M.-F. *et al.* (2013) 'Decrease of FGF Receptor (FGFR) and Interstitial Fibrosis in the Kidney of Streptozotocin-induced Diabetic Rats', *Hormone and Metabolic Research*, 46(01), pp. 1–7.
- Cheng, M.-F., Chen, L.-J. and Cheng, J.-T. (2010) 'Decrease of Klotho in the Kidney of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats', *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, pp. 1–7.
- Christov, M. *et al.* (2013) 'Plasma FGF23 levels increase rapidly after acute kidney injury', *Kidney International*, 84(4), pp. 776–785.
- Chung, A. C. K. and Lan, H. Y. (2011) 'Chemokines in Renal Injury', *Journal of the American Society of Nephrology*, 22(5), pp. 802–809.

- Clarkson, P. M. and Hubal, M. J. (2002) 'Exercise-induced muscle damage in humans.', *American journal of physical medicine & rehabilitation*, 81(11 Suppl), pp. S52-69.
- Cullinan, S. B. *et al.* (2004) 'The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase.', *Molecular and cellular biology*, 24(19), pp. 8477-86.
- D'Autr aux, B. and Toledano, M. B. (2007) 'ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis.', *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(10), pp. 813-24.
- Davies, K. J. (2001) 'Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems.', *IUBMB life*, 50(4-5), pp. 279-89.
- Dhakshinamoorthy, S. and Jaiswal, A. K. (2000) 'Small maf (MafG and MafK) proteins negatively regulate antioxidant response element-mediated expression and antioxidant induction of the NAD(P)H:Quinone oxidoreductase1 gene.', *The Journal of biological chemistry*, 275(51), pp. 40134-41.
- Dinkova-Kostova, A. T. *et al.* (2002) 'Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(18), pp. 11908-13.
- Donate-Correa, J. *et al.* (2013) 'Expression of FGF23/KLOTHO system in human vascular tissue.', *International journal of cardiology*, 165(1), pp. 179-83.
- Drew, D. A. *et al.* (2017) 'Association between Soluble Klotho and Change in Kidney Function: The Health Aging and Body Composition Study', *Journal of the American Society of Nephrology*, 28(6), pp. 1859-1866.
- Dr oge, W. (2002) 'Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function', *Physiological Reviews*, 82(1), pp. 47-95.
- Drummond, G. R. *et al.* (2011) 'Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets.', *Nature reviews. Drug discovery*, 10(6), pp. 453-71.
- E. Hall, J. (2016a) *Guyton & Hall: Tratado de fisiolog a*. 13th edn. Madrid: S.A. ELSERVIER ESPA A.
- E. Hall, J. (2016b) 'Unidad V Los l quidos corporales y los ri ones', in *Guyton & Hall: Tratado de fisiolog a m dica*. 13th edn. Madrid: S.A. ELSERVIER ESPA A, p. 1168.
- Egglar, A. L. *et al.* (2005) 'Modifying specific cysteines of the electrophile-sensing human Keap1 protein is insufficient to disrupt binding to the Nrf2 domain Neh2.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(29), pp. 10070-5.
- Elmarakby, A. A. and Sullivan, J. C. (2012) 'Relationship between Oxidative Stress and Inflammatory Cytokines in Diabetic Nephropathy', *Cardiovascular Therapeutics*, 30(1), pp. 49-59.
- Elseweidy, M. M. *et al.* (2017) 'Vanillin as a new modulator candidate for renal injury induced by cisplatin in experimental rats', *Cytokine*, 99, pp. 260-265.
- Fan, Y. *et al.* (2018) 'Interrelated role of Klotho and calcium-sensing receptor in parathyroid

- hormone synthesis and parathyroid hyperplasia', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(16), pp. E3749–E3758.
- Fernández-Checa, J. C. and Kaplowitz, N. (1990) 'The use of monochlorobimane to determine hepatic GSH levels and synthesis.', *Analytical biochemistry*, 190(2), pp. 212–9.
- Fernandez-Fernandez, B. *et al.* (2018) 'Albumin downregulates Klotho in tubular cells', *Nephrology Dialysis Transplantation*.
- Fernandez, W. G. *et al.* (2005) 'Factors predictive of acute renal failure and need for hemodialysis among ED patients with rhabdomyolysis.', *The American journal of emergency medicine*, 23(1), pp. 1–7.
- Ferraz, F. F. *et al.* (2002) 'Effects of melatonin administration to rats with glycerol-induced acute renal failure.', *Renal failure*, 24(6), pp. 735–46.
- Fountoulakis, N. *et al.* (2018) 'Reduced Levels Of Anti-Ageing Hormone Klotho Predict Renal Function Decline In Type 2 Diabetes', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*.
- Frauenfelder, H. *et al.* (2001) 'The role of structure, energy landscape, dynamics, and allostery in the enzymatic function of myoglobin.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(5), pp. 2370–4.
- Furukawa, M. and Xiong, Y. (2005) 'BTB protein Keap1 targets antioxidant transcription factor Nrf2 for ubiquitination by the Cullin 3-Roc1 ligase.', *Molecular and cellular biology*, 25(1), pp. 162–71.
- Gburek, J. *et al.* (2003) 'Renal uptake of myoglobin is mediated by the endocytic receptors megalin and cubilin.', *American journal of physiology. Renal physiology*, 285(3), pp. F451-8.
- Geyer, R. *et al.* (2003) 'BTB/POZ domain proteins are putative substrate adaptors for cullin 3 ubiquitin ligases.', *Molecular cell*, 12(3), pp. 783–90.
- Gill, P. S. and Wilcox, C. S. (2006) 'NADPH Oxidases in the Kidney', *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(9–10), pp. 1597–1607.
- Glasauer, A. and Chandel, N. S. (2013) 'ROS.', *Current biology : CB*, 23(3), pp. R100-2.
- González-Cuadrado, S. *et al.* (1996) 'Expression of leucocyte chemoattractants by interstitial renal fibroblasts: up-regulation by drugs associated with interstitial fibrosis.', *Clinical and experimental immunology*, 106(3), pp. 518–22.
- Guerrero-Beltrán, C. E., Calderón-Oliver, M., *et al.* (2012) 'Protective effect of sulforaphane against oxidative stress: Recent advances', *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64(5), pp. 503–508.
- Guerrero-Beltrán, C. E., Mukhopadhyay, P., *et al.* (2012) 'Sulforaphane, a natural constituent of broccoli, prevents cell death and inflammation in nephropathy', *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 23(5), pp. 494–500.
- Guerrero-Hue, M. *et al.* (2017) 'Targeting Nrf2 in Protection Against Renal Disease', *Current Medicinal Chemistry*, 24(33), pp. 3583–3605.
- Guijarro, C. and Egido, J. (2001) 'Transcription factor- κ B (NF- κ B) and renal disease', *Kidney*

- International*, 59(2), pp. 415–424.
- Guo, Y. *et al.* (2018) 'Klotho protects the heart from hyperglycemia-induced injury by inactivating ROS and NF- κ B-mediated inflammation both in vitro and in vivo', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1864(1), pp. 238–251.
- Gutteridge, J. M. (1986) 'Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides.', *FEBS letters*, 201(2), pp. 291–5.
- de Haij, S. *et al.* (2002) 'Production of inflammatory mediators by renal epithelial cells is insensitive to glucocorticoids.', *British journal of pharmacology*, 137(2), pp. 197–204.
- Haruna, Y. *et al.* (2007) 'Amelioration of progressive renal injury by genetic manipulation of Klotho gene.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(7), pp. 2331–6.
- Hayashi, S. *et al.* (2004) 'Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene.', *Gene*, 336(2), pp. 241–50.
- He, Y. *et al.* (2015) 'Curcumin, inflammation, and chronic diseases: how are they linked?', *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20(5), pp. 9183–213.
- Heyman, S. N. *et al.* (1996) 'Myoglobinuric acute renal failure in the rat: a role for medullary hypoperfusion, hypoxia, and tubular obstruction.', *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 7(7), pp. 1066–74.
- Heyman, S. N. and Brezis, M. (1995) 'Acute renal failure in glomerular bleeding: a puzzling phenomenon.', *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 10(5), pp. 591–3.
- Higaki, M. *et al.* (2015) 'Acute Kidney Injury Facilitates Hypocalcemia by Exacerbating the Hyperphosphatemic Effect of Muscle Damage in Rhabdomyolysis', *Nephron*, 131(1), pp. 11–16.
- Holt, S. and Moore, K. (2000) 'Pathogenesis of Renal Failure in Rhabdomyolysis: The Role of Myoglobin', *Nephron Experimental Nephrology*, 8(2), pp. 72–76.
- Hu, M.-C. *et al.* (2010) 'Klotho deficiency is an early biomarker of renal ischemia-reperfusion injury and its replacement is protective.', *Kidney international*, 78(12), pp. 1240–51.
- Hu, M.-C., Kuro-o, M. and Moe, O. W. (2010) 'Klotho and kidney disease.', *Journal of nephrology*, 23 Suppl 1, pp. S136–44.
- Hu, M. C. *et al.* (2017) 'Recombinant α -Klotho may be prophylactic and therapeutic for acute to chronic kidney disease progression and uremic cardiomyopathy.', *Kidney international*, 91(5), pp. 1104–1114.
- Hu, M. C., Kuro-o, M. and Moe, O. W. (2012) 'The emerging role of Klotho in clinical nephrology', *Nephrology Dialysis Transplantation*, 27(7), pp. 2650–2657.
- Hu, M. C., Kuro-o, M. and Moe, O. W. (2013) 'Klotho and Chronic Kidney Disease', in *Contributions to nephrology*, pp. 47–63.
- Hu, Z. *et al.* (2015) 'Biliverdin Reductase A (BVRA) Mediates Macrophage Expression of

- Interleukin-10 in Injured Kidney.', *International journal of molecular sciences*, 16(9), pp. 22621–35.
- Huang, H.-C., Nguyen, T. and Pickett, C. B. (2002) 'Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription.', *The Journal of biological chemistry*, 277(45), pp. 42769–74.
- Huang, H. C., Nguyen, T. and Pickett, C. B. (2000) 'Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(23), pp. 12475–80.
- Huang, R.-S. *et al.* (2017) 'Pharmacological Inhibition of Macrophage Toll-like Receptor 4/Nuclear Factor-kappa B Alleviates Rhabdomyolysis-induced Acute Kidney Injury', *Chinese Medical Journal*, 130(18), p. 2163.
- Huerta-Alardín, A. L., Varon, J. and Marik, P. E. (2005) 'Bench-to-bedside review: Rhabdomyolysis -- an overview for clinicians.', *Critical care (London, England)*, 9(2), pp. 158–69.
- Humes, H. D., Lake, E. W. and Liu, S. (1995) 'Renal tubule cell repair following acute renal injury.', *Mineral and electrolyte metabolism*, 21(4–5), pp. 353–65.
- Ibrahim, M. *et al.* (2011) 'Involvement of catalase in the protective effect of binaphthyl diselenide against renal damage induced by glycerol.', *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*, 63(4), pp. 331–5.
- Ichikawa, S. *et al.* (2007) 'A homozygous missense mutation in human KLOTHO causes severe tumoral calcinosis', *Journal of Clinical Investigation*, 117(9), pp. 2684–2691.
- Igarashi, K. and Sun, J. (2006) 'The heme-Bach1 pathway in the regulation of oxidative stress response and erythroid differentiation.', *Antioxidants & redox signaling*, 8(1–2), pp. 107–18.
- Imura, A. *et al.* (2007) '-Klotho as a Regulator of Calcium Homeostasis', *Science*, 316(5831), pp. 1615–1618.
- Itoh, K. *et al.* (1995) 'Cloning and characterization of a novel erythroid cell-derived CNC family transcription factor heterodimerizing with the small Maf family proteins.', *Molecular and cellular biology*. American Society for Microbiology (ASM), 15(8), pp. 4184–93.
- Itoh, K. *et al.* (1999) 'Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain.', *Genes & development*, 13(1), pp. 76–86.
- Jakubowski, A. *et al.* (2005) 'TWEAK induces liver progenitor cell proliferation.', *The Journal of clinical investigation*, 115(9), pp. 2330–40.
- Jansen, T. and Daiber, A. (2012) 'Direct Antioxidant Properties of Bilirubin and Biliverdin. Is there a Role for Biliverdin Reductase?', *Frontiers in pharmacology*, 3, p. 30.
- Jia, Y. *et al.* (2007) 'Structural basis of peroxide-mediated changes in human hemoglobin: a novel oxidative pathway.', *The Journal of biological chemistry*, 282(7), pp. 4894–907.

- Kamencic, H. *et al.* (2000) 'Monochlorobimane fluorometric method to measure tissue glutathione.', *Analytical biochemistry*, 286(1), pp. 35–7.
- Kang, M.-I. *et al.* (2004) 'Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(7), pp. 2046–51.
- Kang, W.-L. and Xu, G.-S. (2016) 'Atrasentan increased the expression of klotho by mediating miR-199b-5p and prevented renal tubular injury in diabetic nephropathy.', *Scientific reports*, 6(1), p. 19979.
- Kaspar, J. W. and Jaiswal, A. K. (2010) 'An autoregulatory loop between Nrf2 and Cul3-Rbx1 controls their cellular abundance.', *The Journal of biological chemistry*, 285(28), pp. 21349–58.
- Katoh, Y. *et al.* (2005) 'Evolutionary conserved N-terminal domain of Nrf2 is essential for the Keap1-mediated degradation of the protein by proteasome.', *Archives of biochemistry and biophysics*, 433(2), pp. 342–50.
- Kawai, T. and Akira, S. (2006) 'Antiviral Signaling Through Pattern Recognition Receptors', *Journal of Biochemistry*, 141(2), pp. 137–145.
- KENDREW, J. C. *et al.* (1954) 'The species specificity of myoglobin.', *Nature*, 174(4438), pp. 946–9.
- KENDREW, J. C. *et al.* (1958) 'A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis.', *Nature*, 181(4610), pp. 662–6.
- KENDREW, J. C. *et al.* (1960) 'Structure of myoglobin: A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution.', *Nature*, 185(4711), pp. 422–7.
- KENDREW, J. C. (1963) 'Myoglobin and the structure of proteins.', *Science (New York, N.Y.)*, 139(3561), pp. 1259–66.
- Khan, F. Y. (2009) 'Rhabdomyolysis: a review of the literature.', *The Netherlands journal of medicine*, 67(9), pp. 272–83.
- Kim, H. B. *et al.* (2011) 'Phenolic antioxidants tert-butyl-bisphenol and vitamin E decrease oxidative stress and enhance vascular function in an animal model of rhabdomyolysis yet do not improve acute renal dysfunction.', *Free radical research*, 45(9), pp. 1000–12.
- Kim, J. H. *et al.* (2010) 'N-acetylcysteine attenuates glycerol-induced acute kidney injury by regulating MAPKs and Bcl-2 family proteins.', *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 25(5), pp. 1435–43.
- Kim, S.-J. *et al.* (2017) 'Klotho, an antiaging molecule, attenuates oxidant-induced alveolar epithelial cell mtDNA damage and apoptosis', *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 313(1), pp. L16–L26.
- Kobayashi, A. *et al.* (2004) 'Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2.', *Molecular and cellular biology*, 24(16), pp. 7130–9.
- Komada, T. *et al.* (2015) 'Role of NLRP3 Inflammasomes for Rhabdomyolysis-induced Acute

- Kidney Injury', *Scientific Reports*, 5(1), p. 10901.
- van Kooten, C., Daha, M. R. and van Es, L. A. (1999) 'Tubular epithelial cells: A critical cell type in the regulation of renal inflammatory processes.', *Experimental nephrology*, 7(5–6), pp. 429–37.
- Korantzopoulos, P., Galaris, D. and Papaioannides, D. (2002) 'Pathogenesis and treatment of renal dysfunction in rhabdomyolysis.', *Intensive care medicine*, 28(8), p. 1185; author reply 1186.
- Krouzecký, A. *et al.* (2003) '[Rhabdomyolysis--development, causes, sequelae and therapy].', *Vnitřní lékařství*, 49(8), pp. 668–72.
- Kuro-o, M. *et al.* (1997) 'Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing.', *Nature*, 390(6655), pp. 45–51.
- Kuro-o, M. (2011) 'Phosphate and *Klotho*', *Kidney International*, 79, pp. S20–S23.
- Kuro-o, M. and Moe, O. W. (2017) 'FGF23- α Klotho as a paradigm for a kidney-bone network', *Bone*, 100, pp. 4–18.
- Kurosu, H. *et al.* (2005) 'Suppression of Aging in Mice by the Hormone *Klotho*', *Science*, 309(5742), pp. 1829–1833.
- Kwak, M.-K. *et al.* (2002) 'Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the *nrf2* promoter.', *Molecular and cellular biology*, 22(9), pp. 2883–92.
- Kwak, M.-K. *et al.* (2003) 'Antioxidants enhance mammalian proteasome expression through the Keap1-Nrf2 signaling pathway.', *Molecular and cellular biology*, 23(23), pp. 8786–94.
- Leaf, D. E. *et al.* (2013) 'Dysregulated mineral metabolism in patients with acute kidney injury and risk of adverse outcomes.', *Clinical endocrinology*, 79(4), pp. 491–8.
- Leaf, D. E. *et al.* (2016) 'Fibroblast growth factor 23 levels are elevated and associated with severe acute kidney injury and death following cardiac surgery', *Kidney International*, 89(4), pp. 939–948.
- Leaf, D. E. *et al.* (2018) 'Fibroblast Growth Factor 23 Associates with Death in Critically Ill Patients.', *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 13(4), pp. 531–541.
- Lee, E. Y. *et al.* (2014) 'Soluble α -klotho as a novel biomarker in the early stage of nephropathy in patients with type 2 diabetes.', *PLoS one*. Edited by L. R. James, 9(8), p. e102984.
- Lee, J.-M. and Johnson, J. A. (2004) 'An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism.', *Journal of biochemistry and molecular biology*, 37(2), pp. 139–43.
- Lee, O.-H. *et al.* (2007) 'An auto-regulatory loop between stress sensors INrf2 and Nrf2 controls their cellular abundance.', *The Journal of biological chemistry*, 282(50), pp. 36412–20.
- Lee, P. J. *et al.* (1997) 'Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia.', *The Journal of biological chemistry*, 272(9), pp. 5375–81.
- Lee, S. *et al.* (2018) 'Structures of β -klotho reveal a "zip code"-like mechanism for endocrine

- FGF signalling', *Nature*, 553(7689), pp. 501–505.
- Leunissen, E. H. P. *et al.* (2013) 'The Epithelial Calcium Channel TRPV5 Is Regulated Differentially by Klotho and Sialidase', *Journal of Biological Chemistry*, 288(41), pp. 29238–29246.
- Lever, J. M. *et al.* (2016) 'Heme Oxygenase-1 in Kidney Health and Disease', *Antioxidants & Redox Signaling*, 25(3), pp. 165–183.
- Levonen, A.-L. *et al.* (2004) 'Cellular mechanisms of redox cell signalling: role of cysteine modification in controlling antioxidant defences in response to electrophilic lipid oxidation products.', *The Biochemical journal*, 378(Pt 2), pp. 373–82.
- Li, S.-A. *et al.* (2004) 'Immunohistochemical localization of Klotho protein in brain, kidney, and reproductive organs of mice.', *Cell structure and function*, 29(4), pp. 91–9.
- Li, W. and Kong, A.-N. (2009) 'Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response', *Molecular Carcinogenesis*, 48(2), pp. 91–104.
- Li, W., Yu, S.-W. and Kong, A.-N. T. (2006) 'Nrf2 possesses a redox-sensitive nuclear exporting signal in the Neh5 transactivation domain.', *The Journal of biological chemistry*, 281(37), pp. 27251–63.
- Li, X. *et al.* (2004) 'Crystal Structure of the Kelch Domain of Human Keap1', *Journal of Biological Chemistry*, 279(52), pp. 54750–54758.
- Liangos, O. *et al.* (2005) 'Epidemiology and Outcomes of Acute Renal Failure in Hospitalized Patients: A National Survey', *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 1(1), pp. 43–51.
- Liaño, F. and Pascual, J. (1996) 'Epidemiology of acute renal failure: a prospective, multicenter, community-based study. Madrid Acute Renal Failure Study Group.', *Kidney international*, 50(3), pp. 811–8.
- Lin, H. *et al.* (2014) 'Sulforaphane reverses glucocorticoid-induced apoptosis in osteoblastic cells through regulation of the Nrf2 pathway', *Drug Design, Development and Therapy*, 8, p. 973.
- Lin, Q. *et al.* (2007) 'Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress.', *The Journal of biological chemistry*, 282(28), pp. 20621–33.
- Lin, T. *et al.* (2012) 'Identification of hemopexin as an anti-inflammatory factor that inhibits synergy of hemoglobin with HMGB1 in sterile and infectious inflammation.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 189(4), pp. 2017–22.
- Lin, Y., Kuro-o, M. and Sun, Z. (2013) 'Genetic Deficiency of Anti-Aging Gene *Klotho* Exacerbates Early Nephropathy in STZ-Induced Diabetes in Male Mice', *Endocrinology*, 154(10), pp. 3855–3863.
- Linnenbaum, M. *et al.* (2012) 'Heme oxygenase isoforms differ in their subcellular trafficking during hypoxia and are differentially modulated by cytochrome P450 reductase.', *PloS one*. Edited by P. L. Oliveira, 7(4), p. e35483.
- Liu, F. *et al.* (2011) 'Klotho suppresses RIG-I-mediated senescence-associated inflammation',

Nature Cell Biology, 13(3), pp. 254–262.

Liu, Q. *et al.* (2004) 'A Fenton reaction at the endoplasmic reticulum is involved in the redox control of hypoxia-inducible gene expression.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(12), pp. 4302–7.

Llach, F., Felsenfeld, A. J. and Haussler, M. R. (1981) 'The Pathophysiology of Altered Calcium Metabolism in Rhabdomyolysis-Induced Acute Renal Failure', *New England Journal of Medicine*, 305(3), pp. 117–123.

Lochhead, K. M., Kharasch, E. D. and Zager, R. A. (1998) 'Anesthetic effects on the glycerol model of rhabdomyolysis-induced acute renal failure in rats.', *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 9(2), pp. 305–9.

Luo, J. *et al.* (2008) 'The molecular mechanisms of the attenuation of cisplatin-induced acute renal failure by N-acetylcysteine in rats.', *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 23(7), pp. 2198–205.

Luo, Q. *et al.* (2014) 'KIM-1 and NGAL as biomarkers of nephrotoxicity induced by gentamicin in rats', *Molecular and Cellular Biochemistry*, 397(1–2), pp. 53–60.

Maeshima, A., Yamashita, S. and Nojima, Y. (2003) 'Identification of renal progenitor-like tubular cells that participate in the regeneration processes of the kidney.', *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 14(12), pp. 3138–46.

Maines, M. D. (1988) 'Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications.', *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2(10), pp. 2557–68.

Maltese, G. *et al.* (2017) 'The anti-ageing hormone klotho induces Nrf2-mediated antioxidant defences in human aortic smooth muscle cells.', *Journal of cellular and molecular medicine*, 21(3), pp. 621–627.

Manikandan, R. *et al.* (2014) 'Ameliorative effect of ferulic acid against renal injuries mediated by nuclear factor-kappaB during glycerol-induced nephrotoxicity in Wistar rats.', *Renal failure*, 36(2), pp. 154–65.

Marsell, R. *et al.* (2007) 'Gene expression analysis of kidneys from transgenic mice expressing fibroblast growth factor-23', *Nephrology Dialysis Transplantation*, 23(3), pp. 827–833.

Martin, A., David, V. and Quarles, L. D. (2012) 'Regulation and function of the FGF23/klotho endocrine pathways.', *Physiological reviews*, 92(1), pp. 131–55.

Matsumura, Y. *et al.* (1998) 'Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted klotho protein.', *Biochemical and biophysical research communications*, 242(3), pp. 626–30.

McCoubrey, W. K., Huang, T. J. and Maines, M. D. (1997) 'Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3.', *European journal of biochemistry*, 247(2), pp. 725–32.

McGarry, T. *et al.* (2018) 'Hypoxia, oxidative stress and inflammation', *Free Radical Biology and Medicine*.

- McMahon, M. *et al.* (2004) 'Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 degron.', *The Journal of biological chemistry*, 279(30), pp. 31556–67.
- Medzhitov, R. (2008) 'Origin and physiological roles of inflammation.', *Nature*, 454(7203), pp. 428–35.
- Medzhitov, R. (2010) 'Inflammation 2010: new adventures of an old flame.', *Cell*, 140(6), pp. 771–6.
- Mehi, S. J. *et al.* (2014) 'MicroRNA-339 and microRNA-556 regulate Klotho expression in vitro.', *Age (Dordrecht, Netherlands)*, 36(1), pp. 141–9.
- de Meijer, A. R. *et al.* (2003) 'Serum creatine kinase as predictor of clinical course in rhabdomyolysis: a 5-year intensive care survey.', *Intensive care medicine*, 29(7), pp. 1121–5.
- Melli, G., Chaudhry, V. and Cornblath, D. R. (2005) 'Rhabdomyolysis: an evaluation of 475 hospitalized patients.', *Medicine*, 84(6), pp. 377–85.
- Mezzano, S. A. *et al.* (2001) 'Tubular NF-kappaB and AP-1 activation in human proteinuric renal disease.', *Kidney international*, 60(4), pp. 1366–77.
- Moi, P. *et al.* (1994) 'Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(21), pp. 9926–30.
- Moore, K. P. *et al.* (1998) 'A causative role for redox cycling of myoglobin and its inhibition by alkalinization in the pathogenesis and treatment of rhabdomyolysis-induced renal failure.', *The Journal of biological chemistry*, 273(48), pp. 31731–7.
- Moreno, J. A. *et al.* (2011) 'The Inflammatory Cytokines TWEAK and TNF Reduce Renal Klotho Expression through NF B', *Journal of the American Society of Nephrology*, 22(7), pp. 1315–1325.
- Muñoz-Castañeda, J. R. *et al.* (2017) 'Differential regulation of renal Klotho and FGFR1 in normal and uremic rats', *The FASEB Journal*, 31(9), pp. 3858–3867.
- Nabeshima, Y. and Imura, H. (2008) 'α-Klotho: A Regulator That Integrates Calcium Homeostasis', *American Journal of Nephrology*, 28(3), pp. 455–464.
- Nagasu, H. *et al.* (2011) 'Overexpression of klotho protein modulates uninephrectomy-induced compensatory renal hypertrophy by suppressing IGF-I signals', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 407(1), pp. 39–43.
- Nallasamy, P. *et al.* (2014) 'Sulforaphane reduces vascular inflammation in mice and prevents TNF-α-induced monocyte adhesion to primary endothelial cells through interfering with the NF-κB pathway', *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(8), pp. 824–833.
- Nara, A. *et al.* (2016) 'Evaluations of lipid peroxidation and inflammation in short-term glycerol-induced acute kidney injury in rats', *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 43(11), pp. 1080–1086.
- Navarro-García, J. A. *et al.* (2018) 'PTH, vitamin D, and the FGF-23-klotho axis and heart: Going

- beyond the confines of nephrology', *European Journal of Clinical Investigation*, 48(4), p. e12902.
- Navarro-González, J. F. *et al.* (2014) 'Reduced Klotho is associated with the presence and severity of coronary artery disease.', *Heart (British Cardiac Society)*, 100(1), pp. 34–40.
- Neyra, J. A. and Hu, M. C. (2016) 'αKlotho and Chronic Kidney Disease', in *Vitamins and hormones*, pp. 257–310.
- Nguyen, T., Nioi, P. and Pickett, C. B. (2009) 'The Nrf2-Antioxidant Response Element Signaling Pathway and Its Activation by Oxidative Stress', *Journal of Biological Chemistry*, 284(20), pp. 13291–13295.
- Nielsen, M. J., Møller, H. J. and Moestrup, S. K. (2010) 'Hemoglobin and Heme Scavenger Receptors', *Antioxidants & Redox Signaling*, 12(2), pp. 261–273.
- Nioi, P. *et al.* (2005) 'The carboxy-terminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation.', *Molecular and cellular biology*, 25(24), pp. 10895–906.
- Nishida, K. *et al.* (2015) 'Renoprotective effect of long acting thioredoxin by modulating oxidative stress and macrophage migration inhibitory factor against rhabdomyolysis-associated acute kidney injury.', *Scientific reports*, 5(1), p. 14471.
- Nitescu, N. *et al.* (2006) 'N-acetylcysteine attenuates kidney injury in rats subjected to renal ischaemia-reperfusion.', *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 21(5), pp. 1240–7.
- Niture, S. K., Khatri, R. and Jaiswal, A. K. (2014) 'Regulation of Nrf2-an update.', *Free radical biology & medicine*, 66, pp. 36–44.
- Ogawa, K. *et al.* (2001) 'Heme mediates derepression of Maf recognition element through direct binding to transcription repressor Bach1.', *The EMBO journal*, 20(11), pp. 2835–43.
- Ohyama, Y. *et al.* (1998) 'Molecular cloning of rat klotho cDNA: markedly decreased expression of klotho by acute inflammatory stress.', *Biochemical and biophysical research communications*, 251(3), pp. 920–5.
- Olsen, T. S., Olsen, H. S. and Hansen, H. E. (1985) 'Tubular ultrastructure in acute renal failure in man: epithelial necrosis and regeneration.', *Virchows Archiv. A, Pathological anatomy and histopathology*, 406(1), pp. 75–89.
- Ordway, G. A. and Garry, D. J. (2004) 'Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle', *Journal of Experimental Biology*, 207(20), pp. 3441–3446.
- Palipoch, S. (2013) 'A review of oxidative stress in acute kidney injury: protective role of medicinal plants-derived antioxidants.', *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines : AJTCAM*, 10(4), pp. 88–93.
- Panizo, N. *et al.* (2015) 'Molecular Mechanisms and Novel Therapeutic Approaches to Rhabdomyolysis-Induced Acute Kidney Injury.', *Kidney & blood pressure research*, 40(5), pp. 520–32.
- Park, J. *et al.* (2013) 'Serum creatinine level, a surrogate of muscle mass, predicts mortality in

- peritoneal dialysis patients.’, *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 28(8), pp. 2146–55.
- Paroni, G. *et al.* (2017) ‘Klotho Gene and Selective Serotonin Reuptake Inhibitors: Response to Treatment in Late-Life Major Depressive Disorder’, *Molecular Neurobiology*, 54(2), pp. 1340–1351.
- Peshkova, I. O., Schaefer, G. and Koltsova, E. K. (2016) ‘Atherosclerosis and aortic aneurysm - is inflammation a common denominator?’, *The FEBS journal*, 283(9), pp. 1636–52.
- Plotnikov, E. Y. *et al.* (2009) ‘Myoglobin causes oxidative stress, increase of NO production and dysfunction of kidney’s mitochondria’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1792(8), pp. 796–803.
- Powis, G., Briehl, M. and Oblong, J. (1995) ‘Redox signalling and the control of cell growth and death.’, *Pharmacology & therapeutics*, 68(1), pp. 149–73.
- Qian, Y. *et al.* (2018) ‘Klotho Reduces Necroptosis by Targeting Oxidative Stress Involved in Renal Ischemic-Reperfusion Injury’, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 45(6), pp. 2268–2282.
- Ragab, D., Abdallah, D. M. and El-Abhar, H. S. (2014) ‘Cilostazol Renoprotective Effect: Modulation of PPAR- γ , NGAL, KIM-1 and IL-18 Underlies Its Novel Effect in a Model of Ischemia-Reperfusion’, *PLoS ONE*. Edited by G. Drossopoulou, 9(5), p. e95313.
- Ravikumar, P. *et al.* (2014) ‘ α -Klotho protects against oxidative damage in pulmonary epithelia’, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 307(7), pp. L566–L575.
- Remuzzi, G., Ruggenenti, P. and Benigni, A. (1997) ‘Understanding the nature of renal disease progression.’, *Kidney international*, 51(1), pp. 2–15.
- Rizzo, B. *et al.* (2014) ‘Induction of antioxidant genes by sulforaphane and klotho in human aortic smooth muscle cells’, *Free Radical Biology and Medicine*, 75, pp. S14–S15.
- Rojo, A. I. *et al.* (2008) ‘Functional interference between glycogen synthase kinase-3 beta and the transcription factor Nrf2 in protection against kainate-induced hippocampal celldeath’, *Molecular and Cellular Neuroscience*, 39(1), pp. 125–132.
- Rosenberger, C. *et al.* (2008) ‘Evidence for sustained renal hypoxia and transient hypoxia adaptation in experimental rhabdomyolysis-induced acute kidney injury.’, *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 23(4), pp. 1135–43.
- Rubio-Navarro, A. *et al.* (2016) ‘CD163-Macrophages Are Involved in Rhabdomyolysis-Induced Kidney Injury and May Be Detected by MRI with Targeted Gold-Coated Iron Oxide Nanoparticles’, *Theranostics*, 6(6), pp. 896–914.
- Ruiz, S. *et al.* (2013) ‘Targeting the transcription factor Nrf2 to ameliorate oxidative stress and inflammation in chronic kidney disease’, *Kidney International*, 83(6), pp. 1029–1041.
- Ryter, S. W., Alam, J. and Choi, A. M. K. (2006) ‘Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications.’, *Physiological reviews*, 86(2), pp. 583–650.

- Sanders, P. W. *et al.* (1990) 'Mechanisms of intranephronal proteinaceous cast formation by low molecular weight proteins.', *Journal of Clinical Investigation*, 85(2), pp. 570–576.
- Satapati, S. *et al.* (2015) 'Mitochondrial metabolism mediates oxidative stress and inflammation in fatty liver', *Journal of Clinical Investigation*, 125(12), pp. 4447–4462.
- Sayers, S. P. and Clarkson, P. M. (2002) 'Exercise-induced rhabdomyolysis.', *Current sports medicine reports*, 1(2), pp. 59–60.
- Schaer, D. J. *et al.* (2013) 'Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and hemin scavengers as a novel class of therapeutic proteins.', *Blood*, 121(8), pp. 1276–84.
- Scholze, A. *et al.* (2014) 'Soluble α -Klotho and Its Relation to Kidney Function and Fibroblast Growth Factor-23', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 99(5), pp. E855–E861.
- Schwartz, N. *et al.* (2009) 'Urinary TWEAK as a biomarker of lupus nephritis: a multicenter cohort study', *Arthritis Research & Therapy*, 11(5), p. R143.
- Sedeek, M. *et al.* (2013) 'NADPH Oxidases, Reactive Oxygen Species, and the Kidney: Friend and Foe', *Journal of the American Society of Nephrology*, 24(10), pp. 1512–1518.
- Seegerer, S., Nelson, P. J. and Schlöndorff, D. (2000) 'Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies.', *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 11(1), pp. 152–76.
- Seibert, E. *et al.* (2017) 'Serum klotho levels in acute kidney injury', *Clinical Nephrology*, 87(04), pp. 173–179.
- Semba, R. D. *et al.* (2011) 'Plasma klotho and cardiovascular disease in adults.', *Journal of the American Geriatrics Society*, 59(9), pp. 1596–601.
- Shah, S. V and Walker, P. D. (1988) 'Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in glycerol-induced acute renal failure.', *The American journal of physiology*, 255(3 Pt 2), pp. F438–43.
- Sharfuddin, A. A. and Molitoris, B. A. (2011) 'Pathophysiology of ischemic acute kidney injury', *Nature Reviews Nephrology*, 7(4), pp. 189–200.
- Shelton, L. M., Kevin Park, B. and Copple, I. M. (2013) 'Role of Nrf2 in protection against acute kidney injury', *Kidney International*, 84(6), pp. 1090–1095.
- Shen, Y. *et al.* (2018) 'Klotho ameliorates hydrogen peroxide-induced oxidative injury in TCMK-1 cells', *International Urology and Nephrology*, 50(4), pp. 787–798.
- Shi, Y. *et al.* (2017) 'Inhibition of HDAC6 protects against rhabdomyolysis-induced acute kidney injury.', *American journal of physiology. Renal physiology*, 312(3), pp. F502–F515.
- Shimada, T. *et al.* (2004) 'Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism.', *The Journal of clinical investigation*, 113(4), pp. 561–8.
- Shimizu, M. H. M. *et al.* (2005) 'N-acetylcysteine attenuates the progression of chronic renal failure.', *Kidney international*, 68(5), pp. 2208–17.
- Shiraki-Iida, T. *et al.* (1998) 'Structure of the mouse klotho gene and its two transcripts

- encoding membrane and secreted protein.', *FEBS letters*, 424(1–2), pp. 6–10.
- Shokeir, A. A. *et al.* (2015) 'Activation of Nrf2 by ischemic preconditioning and sulforaphane in renal ischemia/reperfusion injury: a comparative experimental study.', *Physiological research*, 64(3), pp. 313–23.
- Sies, H. (2015) 'Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine', *Redox Biology*, 4, pp. 180–183.
- Sies, H. and Cadenas, E. (1985) 'Oxidative stress: damage to intact cells and organs.', *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 311(1152), pp. 617–31.
- Siew, E. D. and Davenport, A. (2015) 'The growth of acute kidney injury: a rising tide or just closer attention to detail?', *Kidney international*, 87(1), pp. 46–61.
- Sinert, R. *et al.* (1994) 'Exercise-induced rhabdomyolysis.', *Annals of emergency medicine*, 23(6), pp. 1301–6.
- Singh, D., Chander, V. and Chopra, K. (2004) 'Protective effect of naringin, a bioflavonoid on glycerol-induced acute renal failure in rat kidney.', *Toxicology*, 201(1–3), pp. 143–51.
- Sinha, V., Vence, L. M. and Salahudeen, A. K. (2013) 'Urinary Tubular Protein-Based Biomarkers in the Rodent Model of Cisplatin Nephrotoxicity', *Journal of Investigative Medicine*, 61(3), pp. 564–568.
- Sirker, A., Zhang, M. and Shah, A. M. (2011) 'NADPH oxidases in cardiovascular disease: insights from in vivo models and clinical studies.', *Basic research in cardiology*, 106(5), pp. 735–47.
- Soetikno, V. *et al.* (2013) 'Curcumin alleviates oxidative stress, inflammation, and renal fibrosis in remnant kidney through the Nrf2-keap1 pathway', *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(9), pp. 1649–1659.
- Solez, K., Morel-Maroger, L. and Sraer, J. D. (1979) 'The morphology of "acute tubular necrosis" in man: analysis of 57 renal biopsies and a comparison with the glycerol model.', *Medicine*, 58(5), pp. 362–76.
- Sopjani, M. *et al.* (2015) 'Intracellular signaling of the aging suppressor protein Klotho.', *Current molecular medicine*, 15(1), pp. 27–37.
- Stocker, R. (2004) 'Antioxidant Activities of Bile Pigments', *Antioxidants & Redox Signaling*, 6(5), pp. 841–849.
- Sugiura, H. *et al.* (2005) 'Klotho reduces apoptosis in experimental ischaemic acute renal failure', *Nephrology Dialysis Transplantation*, 20(12), pp. 2636–2645.
- Sugiura, H. *et al.* (2010) 'Klotho reduces apoptosis in experimental ischaemic acute kidney injury via HSP-70.', *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 25(1), pp. 60–8.
- Szalay, C. I. *et al.* (2015) 'Oxidative/Nitrative Stress and Inflammation Drive Progression of Doxorubicin-Induced Renal Fibrosis in Rats as Revealed by Comparing a Normal and a Fibrosis-Resistant Rat Strain', *PLOS ONE*. Edited by J. A. Joles, 10(6), p. e0127090.

- Tanaka, S. *et al.* (2016) 'Association between FGF23, α -Klotho, and Cardiac Abnormalities among Patients with Various Chronic Kidney Disease Stages', *PLOS ONE*. Edited by T. Shimosawa, 11(7), p. e0156860.
- Thomsen, J. H. *et al.* (2013) 'The haptoglobin-CD163-heme oxygenase-1 pathway for hemoglobin scavenging.', *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013, p. 523652.
- Thurston, R. D. *et al.* (2010) 'Tumor necrosis factor and interferon-gamma down-regulate Klotho in mice with colitis.', *Gastroenterology*, 138(4), pp. 1384–94, 1394.e1–2.
- Tian, W. *et al.* (2018) 'Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1) differentially regulates nuclear factor erythroid-2-related factors 1 and 2 (NRF1 and NRF2)', *Journal of Biological Chemistry*, 293(6), pp. 2029–2040.
- Tohyama, O. *et al.* (2004) 'Klotho is a novel beta-glucuronidase capable of hydrolyzing steroid beta-glucuronides.', *The Journal of biological chemistry*, 279(11), pp. 9777–84.
- Tracz, M. J., Alam, J. and Nath, K. A. (2007) 'Physiology and Pathophysiology of Heme: Implications for Kidney Disease', *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(2), pp. 414–420.
- Tsujikawa, H. *et al.* (2003) 'Klotho, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system.', *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 17(12), pp. 2393–403.
- Tucker, P. S., Scanlan, A. T. and Dalbo, V. J. (2015) 'Chronic Kidney Disease Influences Multiple Systems: Describing the Relationship between Oxidative Stress, Inflammation, Kidney Damage, and Concomitant Disease', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, pp. 1–8.
- Unno, M., Matsui, T. and Ikeda-Saito, M. (2007) 'Structure and catalytic mechanism of heme oxygenase.', *Natural product reports*, 24(3), pp. 553–70.
- Unno, M., Matsui, T. and Ikeda-Saito, M. (2012) 'Crystallographic studies of heme oxygenase complexed with an unstable reaction intermediate, verdoheme.', *Journal of inorganic biochemistry*, 113, pp. 102–9.
- Ustundag, S. *et al.* (2008) 'Experimental myoglobinuric acute renal failure: the effect of vitamin C.', *Renal failure*, 30(7), pp. 727–35.
- Valko, M. *et al.* (2007) 'Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), pp. 44–84.
- Vanholder, R. *et al.* (2000) 'Rhabdomyolysis.', *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 11(8), pp. 1553–61.
- Wakabayashi, N. *et al.* (2004) 'Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(7), pp. 2040–5.
- Wang, C.-Y. and Chau, L.-Y. (2010) 'Heme oxygenase-1 in cardiovascular diseases: molecular mechanisms and clinical perspectives.', *Chang Gung medical journal*, 33(1), pp. 13–24.

- Wang, Z. *et al.* (2014) 'Inhibition of cytochrome P450 2E1 and activation of transcription factor Nrf2 are renoprotective in myoglobinuric acute kidney injury', *Kidney International*, 86(2), pp. 338–349.
- Ward, M. M. (1988) 'Factors predictive of acute renal failure in rhabdomyolysis.', *Archives of internal medicine*, 148(7), pp. 1553–7.
- WEI, J. *et al.* (2015) 'Heme oxygenase-1 attenuates inflammation and oxidative damage in a rat model of smoke-induced emphysema', *International Journal of Molecular Medicine*, 36(5), pp. 1384–1392.
- Wen, X., Peng, Z. and Kellum, J. A. (2011) 'Pathogenesis of acute kidney injury: effects of remote tissue damage on the kidney.', *Contributions to nephrology*, 174, pp. 129–37.
- Wittenberg, B. A. and Wittenberg, J. B. (1989) 'Transport of oxygen in muscle.', *Annual review of physiology*, 51(1), pp. 857–78.
- Woudenberg-Vrenken, T. E. *et al.* (2012) 'Characterization of vitamin D-deficient klotho-/- mice: do increased levels of serum 1,25(OH)2D3 cause disturbed calcium and phosphate homeostasis in klotho-/- mice?', *Nephrology Dialysis Transplantation*, 27(11), pp. 4061–4068.
- Wu, J. *et al.* (2017) 'Effect of curcumin on glycerol-induced acute kidney injury in rats', *Scientific Reports*, 7(1), p. 10114.
- Xu, Y. and Sun, Z. (2015) 'Molecular Basis of Klotho: From Gene to Function in Aging', *Endocrine Reviews*, 36(2), pp. 174–193.
- Yamashita, S., Maeshima, A. and Nojima, Y. (2005) 'Involvement of renal progenitor tubular cells in epithelial-to-mesenchymal transition in fibrotic rat kidneys.', *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 16(7), pp. 2044–51.
- Yoneyama, M., Jogi, M. and Onomoto, K. (2016) 'Regulation of antiviral innate immune signaling by stress-induced RNA granules', *Journal of Biochemistry*, 159(3), p. mvv122.
- Yoshida, T. and Sato, M. (1989) 'Posttranslational and direct integration of heme oxygenase into microsomes.', *Biochemical and biophysical research communications*, 163(2), pp. 1086–92.
- Yoshikawa, R. *et al.* (2018) 'The age-related changes of dietary phosphate responsiveness in plasma 1,25-dihydroxyvitamin D levels and renal Cyp27b1 and Cyp24a1 gene expression is associated with renal α -Klotho gene expression in mice.', *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 62(1), pp. 68–74.
- Youn, J.-Y. *et al.* (2014) 'Role of Vascular Oxidative Stress in Obesity and Metabolic Syndrome', *Diabetes*, 63(7), pp. 2344–2355.
- Zager, R. A. (1996) 'Rhabdomyolysis and myohemoglobinuric acute renal failure.', *Kidney international*, 49(2), pp. 314–26.
- Zager, R. A. and Burkhart, K. M. (1998) 'Differential effects of glutathione and cysteine on Fe²⁺, Fe³⁺, H₂O₂ and myoglobin-induced proximal tubular cell attack', *Kidney International*, 53(6), pp. 1661–1672.
- Zenke-Kawasaki, Y. *et al.* (2007) 'Heme induces ubiquitination and degradation of the

- transcription factor Bach1.', *Molecular and cellular biology*, 27(19), pp. 6962–71.
- Zhang, D. D. *et al.* (2004) 'Keap1 Is a Redox-Regulated Substrate Adaptor Protein for a Cul3-Dependent Ubiquitin Ligase Complex', *Molecular and Cellular Biology*, 24(24), pp. 10941–10953.
- Zhang, D. D. and Hannink, M. (2003) 'Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress.', *Molecular and cellular biology*, 23(22), pp. 8137–51.
- Zhang, J. *et al.* (2016) 'ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, pp. 1–18.
- Zhang, R. and Zheng, F. (2008) 'PPAR-gamma and aging: one link through klotho?', *Kidney international*, 74(6), pp. 702–4.
- Zhao, W. *et al.* (2016) 'Penehyclidine Hydrochloride Pretreatment Ameliorates Rhabdomyolysis-Induced AKI by Activating the Nrf2/HO-1 Pathway and Alleviating Endoplasmic Reticulum Stress in Rats', *PLOS ONE*. Edited by S. V Pizzo, 11(3), p. e0151158.
- Zhao, X.-D., Zhou, Y.-T. and Lu, X.-J. (2013) 'Sulforaphane enhances the activity of the Nrf2–ARE pathway and attenuates inflammation in OxyHb-induced rat vascular smooth muscle cells', *Inflammation Research*, 62(9), pp. 857–863.
- Zhao, Y. *et al.* (2011) 'Klotho depletion contributes to increased inflammation in kidney of the db/db mouse model of diabetes via RelA (serine)536 phosphorylation.', *Diabetes*, 60(7), pp. 1907–16.
- Zhao, Z. *et al.* (2016) 'Sulforaphane Attenuates Contrast-Induced Nephropathy in Rats via Nrf2/HO-1 Pathway', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, pp. 1–12.
- Zheng, S. *et al.* (2018) 'Correlation of serum levels of fibroblast growth factor 23 and Klotho protein levels with bone mineral density in maintenance hemodialysis patients', *European Journal of Medical Research*, 23(1), p. 18.
- Zhou, Y., Kuang, Y. and Zhou, J. (2017) 'Klotho protects against LPS-induced inflammation injury by inhibiting Wnt and NF- κ B pathways in HK-2 cells.', *Die Pharmazie*, 72(4), pp. 227–231.
- Zimmerman, J. L. and Shen, M. C. (2013) 'Rhabdomyolysis.', *Chest*, 144(3), pp. 1058–1065.

Anexo

Trabajos realizados a lo largo de la tesis:

- Rubio-Navarro A, Carril M, Padro D, Guerrero-Hue M, Tarín C, Samaniego R, Cannata P, Cano A, **Amaro-Villalobos JM**, Sevillano ÁM, Yuste C, Gutiérrez E, Praga M, Egado 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. PMID: 27162559

- Moreno JA, Yuste C, Gutiérrez E, Sevillano ÁM, Rubio-Navarro A, **Amaro-Villalobos JM**, Praga M, Egado J. Haematuria as a risk factor for chronic kidney disease progression in glomerular diseases: A review. *Pediatr Nephrol*. 2016 Apr;31(4):523-33. PMID: 25980470.

- Panizo N, Rubio-Navarro A, **Amaro-Villalobos JM**, Egado J, Moreno JA. Molecular Mechanisms and Novel Therapeutic Approaches to Rhabdomyolysis-Induced Acute Kidney Injury. *Kidney Blood Press Res*. 2015;40(5):520-32. PMID: 26512883.

-Rubio-Navarro A, **Amaro Villalobos JM**, Lindholt JS, Buendía I, Egado J, Blanco-Colio LM, Samaniego R, Meilhac O, Michel JB, Martín-Ventura JL, Moreno JA. Hemoglobin induces monocyte recruitment and CD163-macrophage polarization in abdominal aortic aneurysm. *Int J Cardiol*. 2015 Dec 15;201:66-78. PMID: 26296046.

-Yuste C, Gutierrez E, Sevillano AM, Rubio-Navarro A, **Amaro-Villalobos JM**, Ortiz A, Egado J, Praga M, Moreno JA. Pathogenesis of glomerular haematuria. *World J Nephrol*. 2015 May 6;4(2):185-95. PMCID: PMC4419128.

-Beltrán LM, Rubio-Navarro A, **Amaro-Villalobos JM**, Egado J, García-Puig J, Moreno JA. Influence of immune activation and inflammatory response on cardiovascular risk associated with the human immunodeficiency virus. *Vasc Health Risk Manag*. 2015 Jan 6;11:35-48. PMID: 25609975