

Facultad de Medicina

Departamento de Cirugía



Universidad Autónoma
de Madrid

**Ciclofilina A como marcador de daño y
muerte celular en el túbulo renal**

TESIS DOCTORAL

Ramiro Cabello Benavente

Madrid, 2021

Facultad de Medicina



Universidad Autónoma
de Madrid

Departamento de Cirugía

**Ciclofilina A como marcador de daño y
muerte celular en el túbulo renal**

TESIS DOCTORAL

Ramiro Cabello Benavente

Licenciado en Medicina y Cirugía

Directores:

Carmen González Enguita

Ana Belén Sanz Bartolomé

Madrid, 2021

Certificado de los directores

Dña. Carmen Gonzalez Enguita, Profesor Asociado Ciencias de la Salud. Medicina-Urología. Departamento de Cirugía. Unidad Docente Urología-Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz (HUFJD). Universidad Autónoma de Madrid.

Dña. Ana Belén Sanz Bartolomé, Investigadora Principal del Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD) y Colaborador Docente. Área de conocimiento enfermedades del riñón e hipertensión. Universidad Autónoma de Madrid.

Directores de la tesis doctoral,

Certifican

Que el trabajo titulado “**Ciclofilina A como marcador de daño y muerte celular en el túbulo renal**”, realizado por **D. Ramiro Cabello Benavente** reúne los requisitos metodológicos y valor científico adecuado como para ser presentado y defendido para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que así conste, se expide el presente certificado en Madrid a seis de junio de dos mil veintiuno.

Dra. Carmen González Enguita

Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Medicina

Dra. Ana Belén Sanz Bartolomé

Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Medicina

DECLARACIÓN DE COMPROMISO ÉTICO Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS DOCTORAL

AUTOR/-A: Ramiro Cabello Benavente

DIRECTOR/-A(S): Carmen González Enguita y Ana Belén Sanz Bartolomé

PROGRAMA DE DOCTORADO: Medicina y Cirugía

TÍTULO: Ciclofilina A como marcador de daño y muerte celular en el túbulo renal

Hago entrega de la citada tesis doctoral en tiempo y forma de acuerdo a la normativa vigente de la Escuela de Doctorado de la Universidad Autónoma de Madrid.

Asimismo, como autor de la citada tesis doctoral,

DECLARO:

- Que el documento responde al *Código de Buenas Prácticas en la Investigación* de Universidad Autónoma de Madrid.
- Que es un trabajo original y sin plagios, donde se han seguido los estándares internacionales de citación y normas de publicación.
- Que soy conocedor de que el incumplimiento de las declaraciones anteriores supone la anulación del título de Doctor/-a

Del mismo modo, **ASUMO** frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse del incumplimiento del compromiso ético de la presente declaración.

Madrid, 10 de Abril de 2021

Fdo: D./D.ª

Ramiro Cabello

A mis padres,

mi mujer

y a mis hijos

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de tesis doctoral no hubiera sido posible sin el apoyo de muchas personas a las que quiero agradecer a continuación:

En primer lugar, a todos los pacientes que de manera voluntaria y altruista han participado en este estudio, para el avance y conocimiento de la Medicina.

A mis directores de tesis a Carmina y a Ana. Gracias a Carmina por todo el apoyo desde el comienzo de esta aventura. Gracias por la confianza que depositaste en mí cuándo sólo era un proyecto del urólogo que soy hoy. Gracias por la ilusión y ser ejemplo de trabajo y de vocación docente. A Ana por todo lo que me ha orientado y enseñado sobre investigación básica en el laboratorio y por la paciencia que ha tenido durante todo este tiempo.

A Alberto Ortiz por llevar las riendas del trabajo de investigación y darme la oportunidad de desarrollar esta tesis.

Gracias, a todo el personal del Laboratorio de Nefrología, del IIS-Fundación Jiménez Díaz, por su esencial contribución para el desarrollo de esta tesis. Especialmente a Miguel, Diego, Ana M^a, Susana y Loli.

Muchas gracias a todo el servicio de Urología, de la Fundación Jiménez Díaz, Hospital Universitario Infanta Elena, Hospital General de Villalba y Hospital Universitario Rey Juan Carlos de Móstoles, a todos mis colegas adjuntos y residentes, que mediaron para captar a los pacientes, y al personal de enfermería y auxiliar que han hecho esto posible. Esta tesis es un trabajo de equipo.

No me puedo olvidar mencionar al servicio de Urología del Hospital Universitario Gregorio Marañón, lugar donde me formé como especialista. Gracias.

Muchísimas gracias por toda la ayuda brindada por el personal no investigador ni clínico de la FJD. En particular al Servicio de Biblioteca, en la persona de María García-Puente, por su eficacia en el suministro de los artículos solicitados y por sus siempre pertinentes consejos y ayuda en gestión de citas. A Ignacio Mahillo, por su contribución en la estadística que está detrás de este

trabajo. Y finalmente a Consuelo Sánchez, muchas gracias por su inestimable ayuda en la maquetación y diseño de impresión de esta tesis.

A nivel personal, esta tesis no hubiera sido posible sin las personas más importantes que me acompañan:

A Leticia, sin duda la luz que ilumina mi vida. A nuestros hijos que son alegría, ilusión y esperanza compartida, el mejor de los regalos.

Un agradecimiento especial a mis padres por su constancia, integridad, esfuerzo y motivación para hacer posible mi educación y haberme forjado en la persona que soy en la actualidad. Gracias por todo el apoyo incondicional y por todo lo que han hecho por mí, para poder llegar a cumplir mis sueños.

A mi hermano Pablo, por ser un ejemplo de trabajo, determinación y optimismo.

No puedo dejar de mencionar a mis abuelos, que siguen presentes en la memoria y recuerdo. Me sorprende cada día, al descubrir que sus enseñanzas continúan vigentes, sus augurios se cumplen y sus consejos siguen ayudando a elegir el mejor de los caminos. El que no sabe de dónde viene, no sabe a dónde va.

A mis amigos y a las personas más cercanas por todo el ánimo que me han transmitido estos años, apoyo y energía que me ha ayudado a terminar este proyecto.

Madrid, junio de 2021

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	3
ABREVIATURAS.....	5
INTRODUCCIÓN	9
1 EL RIÑÓN.....	10
1.1 <i>El riñón y su función en la homeostasis del medio interno.....</i>	<i>10</i>
1.2 <i>Anatomía renal</i>	<i>11</i>
1.2.1 <i>La nefrona.....</i>	<i>11</i>
1.2.2 <i>Parénquima y vasos renales.....</i>	<i>11</i>
1.3 <i>Flujo sanguíneo y susceptibilidad renal a la isquemia.....</i>	<i>14</i>
2 EL FRACASO RENAL AGUDO	14
2.1 <i>Impacto clínico del FRA.....</i>	<i>15</i>
2.2 <i>Diagnóstico del FRA</i>	<i>16</i>
2.3 <i>Daño renal sin elevación de creatinina.....</i>	<i>19</i>
2.4 <i>Biomarcadores para detección de FRA.....</i>	<i>20</i>
2.4.1 <i>Creatinina (sCr).....</i>	<i>21</i>
2.4.2 <i>Lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL).....</i>	<i>22</i>
2.4.3 <i>Un nuevo biomarcador por explorar: Ciclofilina A (CypA).....</i>	<i>23</i>
3. MUERTE CELULAR	26
3.1 <i>Apoptosis:</i>	<i>28</i>
3.1.1 <i>Extrínseca (mediada por receptor):</i>	<i>30</i>
3.1.2 <i>Intrínseca (vía de la perturbación de la homeostasis o mitocondrial):</i>	<i>30</i>
3.2 <i>Necrosis:.....</i>	<i>31</i>
3.2.1 <i>Tipos de necrosis regulada (NR).....</i>	<i>32</i>
3.2.1.1 <i>Necroptosis</i>	<i>33</i>
3.2.1.2 <i>Ferroptosis</i>	<i>34</i>
3.3 <i>Muerte de las células tubulares por IR</i>	<i>35</i>
4 EL RIÑÓN Y LA ISQUEMIA-REPERFUSIÓN.....	36
4.1 <i>Isquemia.....</i>	<i>38</i>
4.2 <i>Reperusión.....</i>	<i>41</i>
5. ISQUEMIA-REPERFUSIÓN A NIVEL CELULAR	43
5.1 <i>Células epiteliales.....</i>	<i>43</i>
6. LA LESIÓN RENAL POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN (IR) EN LA CIRUGÍA RENAL	44
6.1 <i>Cirugía conservadora de nefronas (CCN).....</i>	<i>46</i>
6.1.1 <i>Indicación y objetivo</i>	<i>46</i>
6.1.2 <i>Evaluación preoperatoria</i>	<i>46</i>
6.1.2.1 <i>Anatomía y nefrometría.....</i>	<i>46</i>

6.1.3 Función renal	47
6.1.3 Intraoperatorio.....	48
6.1.4 Postoperatorio	49
6.2 Trasplante renal (TR)	49
6.2.1 TR y daño por IR	49
6.2.2 Tipos de isquemia: caliente y fría.....	50
6.2.3 Reperusión	51
6.2.4 Consecuencias en el TR del daño por IR.....	52
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	55
1. HIPÓTESIS	56
2. OBJETIVOS.....	56
MATERIAL Y MÉTODOS	58
ESQUEMA GENERAL DEL TRABAJO	59
1. NIVEL PRECLÍNICO: CULTIVOS CELULARES	60
1.1 <i>Cultivo in vitro de células epiteliales del túbulo contorneado proximal</i>	60
1.1.1 Líneas celulares	60
1.1.1.1 Las células HK2:.....	60
1.1.1.2 Las células MCT:.....	61
1.1.2 Periodo de estudio	62
1.1.3 Western blot.....	62
1.1.4 Ensayo de viabilidad celular	63
1.1.5 Estadística	64
2. NIVEL CLÍNICO:	64
2.1 <i>Nivel I: Pacientes con agresión quirúrgica renal</i>	64
2.1.1 Aprobación Comité de Investigación	64
2.1.2 Ámbito del estudio	64
2.1.2.1 Brazos del estudio	65
2.1.2.1.1 CCN.	65
2.1.2.1.2 TR.....	66
2.1.3 Periodo de estudio	66
2.1.4 Aleatorización de los pacientes.....	66
2.1.5 Obtención de los datos	66
2.1.6 Procesamiento de los datos	66
2.1.7 Criterios de inclusión	67
2.1.8 Criterios de exclusión	67
2.1.9 Criterios de retirada	68
2.1.10 Rutina del estudio	68
2.1.10.1 Visita de inclusión	68
2.1.10.2 Visita basal	68
2.1.10.3 Ingreso hospitalario y cirugía	69

2.1.10.3.1 Protocolo quirúrgico CCN.	69
2.1.10.3.2 Protocolo quirúrgico TR de DV.	71
2.1.10.4 Registro de seguimiento.	73
2.1.11 Confidencialidad.....	73
2.1.12 Conflictos de interés.....	73
2.1.13 Descripción de las variables estudiadas.....	74
2.1.13.1 Variables demográficas.....	74
2.1.13.2 Datos de la cirugía.....	74
2.1.13.3 Variables analíticas.	76
2.1.14 Estadística.....	76
2.2 Nivel II: Pacientes hospitalizados con FRA.....	76
2.2.1 Aprobación Comité de Investigación.....	77
2.2.2 Ámbito del estudio.....	77
2.2.3 Periodo del estudio.....	77
2.2.4 Aleatorización de los pacientes.....	77
2.2.5 Obtención de los datos.....	78
2.2.6 Procesamiento de los datos.....	78
2.2.7 Criterios de inclusión.....	78
2.2.8 Criterios de exclusión.....	78
2.2.9 Criterios de retirada.....	79
2.2.10 Rutina del estudio.....	79
2.2.10.1 Visita de inclusión.....	79
2.2.10.2 Visita basal.....	79
2.2.10.3 Ingreso hospitalario.....	79
2.2.10.4 Registro de seguimiento.....	80
2.2.11 Confidencialidad.....	80
2.2.12 Conflictos de interés.....	80
2.2.13 Descripción de variables estudiadas.....	81
2.2.13.1 Variables demográficas.....	81
2.2.13.2 Variables analíticas.....	81
2.2.14 Estadística.....	81
RESULTADOS.....	83
1. NIVEL PRECLÍNICO:.....	84
1.1 Efecto de la hipoxia sobre la liberación de CypA en células tubulares.....	84
1.1.1 Hipoxia química en células tubulares humanas HK2.....	84
1.1.2 Hipoxia/reoxigenación (H/R) en células tubulares murinas MCT.....	86
1.2 Las células tubulares renales liberan CypA en respuesta a la activación de mecanismos específicos de muerte celular.....	87
2. NIVEL CLÍNICO:.....	90
2.1 Nivel I pacientes con agresión quirúrgica renal.....	90
2.1.1 CCN.....	90

2.1.1.1 Variables descriptivas de la serie	90
2.1.1.2 Análisis de uCypA en pacientes sometidos a CCN	96
2.1.1.2.1 Puntos de corte uCypA para definir lesión renal.....	97
2.1.1.3 Análisis de uNGAL en pacientes sometidos a CCN	100
2.1.1.3.1 Puntos de corte uNGAL para definir lesión renal.....	101
2.1.1.4 Correlación uCypA y uNGAL.....	103
2.1.2 TR de DV	104
2.1.2.1 Variables descriptivas de la serie	104
2.1.2.2 Análisis de uCypA y uNGAL en pacientes sometidos a TR de DV	105
2.2 Nivel II pacientes hospitalizados con FRA.	107
2.2.1 Variables descriptivas de la serie	107
2.2.2 Análisis de uCypA y uNGAL	108
DISCUSIÓN	112
INTRODUCCIÓN	113
1. NIVEL PRECLÍNICO	113
1.1 <i>Una agresión por hipoxia en cultivo de células del túbulo contorneado proximal provoca liberación de CypA.....</i>	<i>113</i>
1.2 <i>Las células tubulares renales liberan CypA en respuesta a la activación de mecanismos específicos de muerte celular</i>	<i>114</i>
2. NIVEL CLÍNICO	116
2.1 <i>Nivel I: pacientes con agresión quirúrgica renal.....</i>	<i>117</i>
2.1.1 CCN	117
2.1.1.1 Variables descriptivas de la serie	118
2.1.1.1.1 Tamaño y ubicación dos variables para tener en cuenta.....	118
2.1.1.1.2 Tiempo de isquemia en la CCN.....	119
2.1.1.2 El clampaje arterial durante la CCN se asocia con un incremento de uCypA.....	123
2.1.1.3 El clampaje arterial durante la CCN se asocia con un incremento de uNGAL.....	124
2.1.1.4 Correlación uCypA y uNGAL en pacientes sometidos a CCN.....	124
2.1.2 TR.....	125
2.1.2.1 Los niveles de uCypA se elevaron tras el TR	125
2.1.2.2 Los niveles de uNGAL se reducen tras el TR	127
2.1.2.3 Correlación uCypA y uNGAL en pacientes sometidos a Tx de DV	128
2.2 <i>Nivel II: pacientes hospitalizados con FRA.....</i>	<i>128</i>
2.2.1 Variables descriptivas de la serie	129
2.2.2 En el FRA se objetiva elevación de uCypA.....	130
2.2.3 En el FRA se objetiva elevación de uNGAL.....	131
2.2.4 FRA: la correlación entre uCypA y uNGAL.....	131
3. LIMITACIONES	132
4. ESQUEMA DE CONCEPTO CLÍNICO	133
CONCLUSIONES	136

CONCLUSIONES	137
BIBLIOGRAFÍA.....	139
ANEXOS.....	167
ANEXO I: AUTORIZACIÓN COMITÉS INVESTIGACIÓN CLÍNICA	168
ANEXO II: CONSENTIMIENTOS INFORMADOS.....	170
PUBLICACIONES A LAS QUE HA DADO LUGAR ESTA TESIS.....	176
OTRAS PUBLICACIONES DURANTE ESTA TESIS	195

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

ILUSTRACIÓN 1. ESQUEMA DE LA ESTRUCTURA BÁSICA RENAL: LA NEFRONA.	10
ILUSTRACIÓN 2. ANATOMÍA VASCULAR ARTERIAL RENAL: ARTERIOGRAFÍA RENAL IZQUIERDA.....	12
ILUSTRACIÓN 3. ANATOMÍA Y VASCULARIZACIÓN RENAL: ESQUEMA.	13
ILUSTRACIÓN 4. ESQUEMA PARA LA EVALUACIÓN DEL FRA BASADO EN BIOMARCADORES.	19
ILUSTRACIÓN 5. NGAL: CONFORMACIÓN 3D.....	23
ILUSTRACIÓN 6. CYP A: CONFORMACIÓN 3D.	25
ILUSTRACIÓN 7. PRINCIPALES VÍAS DE MUERTE CELULAR PROGRAMADA.....	27
ILUSTRACIÓN 8. MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS.	28
ILUSTRACIÓN 9. ESQUEMA GENERAL MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS.....	29
ILUSTRACIÓN 10. MUERTE CELULAR POR NECROSIS.	31
ILUSTRACIÓN 11. PRINCIPALES VÍAS DE MUERTE CELULAR POR NECROSIS REGULADA: NECROPTOSIS Y FERROPTOSIS.	32
ILUSTRACIÓN 12. CADENA TRANSPORTADORA DE ELECTRONES MITOCONDRIAL EN NORMOXIA.	37
ILUSTRACIÓN 13. CADENA TRANSPORTADORA DE ELECTRONES MITOCONDRIAL EN HIPOXIA.....	40
ILUSTRACIÓN 14. CADENA TRANSPORTADORA DE ELECTRONES MITOCONDRIAL EN REPERFUSIÓN.	42
ILUSTRACIÓN 15. ESQUEMA GENERAL DE LA INVESTIGACIÓN REALIZADA.....	59
ILUSTRACIÓN 16. LIBERACIÓN CYP A EN CÉLULAS HK2 SOMETIDAS COCL ₂	85
ILUSTRACIÓN 17. LIBERACIÓN CYP A EN CÉLULAS MCT SOMETIDAS A H/R.	86
ILUSTRACIÓN 18. LIBERACIÓN CYP A EN CÉLULAS MCT EN RESPUESTA AL COCTEL DE CITOQUINAS PRO-APOPTÓTICO TTI Y EN RESPUESTA A LA NECROPTOSIS INDUCIDA POR TTI/zVAD.....	88
ILUSTRACIÓN 19. LIBERACIÓN CYP A EN CÉLULAS HK2 EN PRESENCIA DEL INDUCTOR DE FERROPTOSIS RSL3.	89
ILUSTRACIÓN 20. NIVELES DE UCYP A EN PACIENTES SOMETIDOS A CCN “GRUPO CCN”.....	96
ILUSTRACIÓN 21. PUNTOS DE CORTE DE UCYP A TRAS LA CCN “GRUPO CCN”.....	99
ILUSTRACIÓN 22. NIVELES DE UNGAL EN PACIENTES SOMETIDOS A CCN “GRUPO CCN”.....	100
ILUSTRACIÓN 23. PUNTOS DE CORTE DE UNGAL TRAS LA CCN “GRUPO CCN”.....	102
ILUSTRACIÓN 24. CORRELACIÓN ENTRE UCYP A Y UNGAL EN PACIENTES SOMETIDOS A CCN “GRUPO CCN”.....	103
ILUSTRACIÓN 25. NIVELES DE UCYP A Y UNGAL EN EL GRUPO DE PACIENTES SOMETIDOS A TR DE DV “GRUPO Tx”.....	106
ILUSTRACIÓN 26. UCYP A Y UNGAL EN “GRUPO FRA” DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS FRA FRENTE A “GRUPO SANOS”.	108
ILUSTRACIÓN 27. PORCENTAJE DE PACIENTES “GRUPO FRA” FRENTE A “GRUPO SANOS” CON UCYP A Y UNGAL POR ENCIMA Y DEBAJO DE VALOR BASAL.	109
ILUSTRACIÓN 28 NIVEL DE sCr EN LOS GRUPOS FRA Y SANOS.	110
ILUSTRACIÓN 29. PACIENTES CON FRA ETIOLOGÍA PRERRENAL Y RENAL (PARENQUIMATOSO): UCYP A, sCr Y UNGAL.....	110
ILUSTRACIÓN 30. RESULTADOS EN ESQUEMA DE CONCEPTO.....	133

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. FACTORES DE RIESGO DE FRA: NO MODIFICABLES/MODIFICABLES	16
TABLA 2. CLASIFICACIÓN KDIGO: DEFINICIÓN DE FRA Y SUS ESTADIOS.....	18
TABLA 3. CONCENTRACIÓN TISULAR DE CICLOFILINA	24
TABLA 4. WESTERN BLOT. ANTICUERPOS PRIMARIOS Y DILUCIÓN UTILIZADA.....	63
TABLA 5. "GRUPO CCN". VARIABLES DEMOGRÁFICAS Y HÁBITO TABÁQUICO.	90
TABLA 6. "GRUPO CCN". COMORBILIDAD Y ENFERMEDAD RENAL ASOCIADA.	91
TABLA 7. "GRUPO CCN". TRATAMIENTO HABITUAL DE LOS PACIENTES.	91
TABLA 8. "GRUPO CCN". VARIABLES RELACIONADAS CON LAS CARACTERÍSTICAS DEL TUMOR AL DIAGNÓSTICO.	92
TABLA 9. "GRUPO CCN". VALORES DE RIESGO ASA Y TIEMPOS DE CIRUGÍA, CLAMPAJE Y SANGRADO ESTIMADO.	93
TABLA 10. "GRUPO CCN". VARIABLES ANALÍTICAS Y DIURESIS.	94
TABLA 11. "GRUPO CCN". HISTOLOGÍA Y SITUACIÓN ONCOLÓGICA AL FINAL DEL SEGUIMIENTO.....	95
TABLA 12. "GRUPO TX". VARIABLES DESCRIPTIVAS	104
TABLA 13. "GRUPO FRA" VARIABLES DESCRIPTIVAS.	107
TABLA 14. "GRUPO SANOS" VARIABLES DESCRIPTIVAS.	107

Introducción

Los métodos utilizados en la práctica clínica para diagnosticar fracaso renal agudo (FRA, en inglés “AKI”) tienen una reducida sensibilidad y especificidad. Utilizamos marcadores de “función”, no de “lesión” o “daño” que no son capaces de detectar precozmente la lesión renal.

Una causa frecuente de FRA es la isquemia-reperfusión (IR). La disfunción renal ocasionada por la IR puede pasar desapercibida con los métodos de diagnóstico disponibles. La investigación de nuevos biomarcadores que pongan de manifiesto esta agresión, aún en etapas iniciales antes de tener una lesión establecida, podría mejorar los resultados funcionales de los pacientes.

La ciclofilina A (CypA) es una proteína intracelular abundante en las células tubulares renales, que son la estirpe celular diana de la lesión renal en el FRA. Hemos explorado la CypA como un marcador potencial de lesión renal y comparado su comportamiento en este escenario con la lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL).

Material y métodos

Se midió la liberación de CypA por western blot en células epiteliales tubulares proximales humanas (HK2) y murinas (MCT) expuestas a hipoxia química, hipoxia/reoxigenación (H/R) y a estímulos específicos de diversas formas de muerte celular (apoptosis, necroptosis, ferroptosis).

En segundo lugar, mediante ELISA analizamos los niveles urinarios de CypA (uCypA) y de NGAL (uNGAL) en pacientes sometidos a cirugía renal con potencial lesión de IR (como son la cirugía conservadora de nefronas (CCN) para el tratamiento del tumor renal localizado y trasplante renal (TR) de donante vivo (DV)). Finalmente analizamos la uCypA en pacientes hospitalizados con FRA de etiología diversa.

Resultados

En células tubulares cultivadas, la concentración de CypA en el medio extracelular aumentó en respuesta a hipoxia, H/R y a diferentes inductores de muerte celular, independientemente del tipo de muerte.

Los niveles de uCypA fueron más altos en pacientes sometidos a cirugía renal que presentaron FRA o daño por IR (CCN con necesidad de clampaje de la arteria renal y en los receptores de TR de DV), incluso si los valores de creatinina sérica (sCr) no eran diagnósticos de FRA. Este comportamiento no fue observado para uNGAL. Finalmente, uCypA aumentó también en pacientes con FRA de diversas causas diagnosticado por el aumento de sCr.

Conclusiones

La CypA es liberada por células epiteliales del túbulo contorneado proximal renal en respuesta a diferentes formas de muerte celular. Los niveles de uCypA aumentan en contextos de lesión renal clínica inducida por IR, independientemente de los parámetros de función renal, y también en el FRA de diversa índole. La información ofrecida por uCypA en el escenario clínico difirió de la mostrada por uNGAL. Por tanto, identificamos a la uCypA como un potencial biomarcador de lesión renal, independiente de la función renal.

ABSTRACT

Background

Methods used in clinical practice to diagnose acute kidney injury (AKI) have a reduced sensitivity and specificity since they are markers of kidney "function", not of "injury" or "damage". These tests are not capable to detect early a kidney injury.

A common cause of AKI is ischemia-reperfusion (IR). Renal dysfunction caused by IR may remain undetected with available diagnostic methods. Investigating new biomarkers that reveal this aggression, even in the initial stages before having an established lesion, could improve functional outcomes.

Cyclophilin A (CypA) is an intracellular protein abundant in renal tubular cells, the target cell line of kidney injury in AKI. We have explored CypA as a potential marker of kidney injury and compared its behavior in this setting with neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL).

Material and methods

CypA release was measured by western blot in human (HK2) and murine (MCT) proximal tubular epithelial cells exposed to chemical hypoxia, hypoxia/reoxygenation (H/R) and specific stimuli of various forms of cell death (apoptosis, necroptosis, ferroptosis).

Secondly, urinary CypA (uCypA) and NGAL (uNGAL) levels were analyzed by ELISA in patients undergoing renal surgery with potential IR lesion (such as nephron sparing surgery and living donor renal transplantation). Finally, we measured uCypA in hospitalized patients with diverse etiology AKI.

Results

In cultured tubular cells, the concentration of CypA in the extracellular medium increased in response to hypoxia, H/R and different inducers of death, regardless of the type of cell death.

Furthermore, uCypA levels were higher in patients undergoing kidney surgery who developed AKI or damage due to IR (nephron sparing surgery requiring clamping of the renal artery and in living donor kidney transplant recipients), even if sCr values were not diagnosed of AKI. This behavior was not observed for uNGAL. Finally, uCypA was also increased in patients with diverse causes of AKI diagnosed based on an increase in sCr.

Conclusions

CypA is released by renal proximal tubular epithelial cells in response to different forms of cell death. uCypA levels increase in IR-induced kidney injury settings, regardless of renal function parameters, and in patients diagnosed of AKI based on increased sCr. The information brought by uCypA in the clinical setting differs from that shown by uNGAL. Therefore, we identified uCypA as a potential biomarker of kidney injury, independent of kidney function.

ABREVIATURAS

ABC	Del inglés <i>“Arterial Based Complexity”</i>
ADQI	Del inglés <i>“Acute Dialysis Quality Initiative”</i>)
AKI	Del inglés <i>“Acute Kidney Injury”</i>
AKIN	Del inglés <i>“Acute Kidney Injury Network”</i>
APAF1	Del inglés <i>“Apoptotic Peptidase Activating Factor 1”</i>
BAK	Del inglés <i>“BCL2 Antagonist/Killer 1”</i>
BAX	Del inglés <i>“BCL2 Associated X”</i>
BCL2	Del inglés <i>“B Cell Lymphoma 2”</i>
C.Index	Del inglés <i>“Centrality Index”</i>
CCN	Cirugía Conservadora de Nefronas
CitC	Citocromo C
CoQ	Coenzima Q
CsA	Ciclosporina A
CSA	Del inglés <i>“Contact Surface Area”</i>
Cyp	Del inglés <i>“Cyclophilin”</i>
CypA	Del inglés <i>“Cyclophilin A”</i>
CysC	Del inglés <i>“Cystatin C”</i>
DAP	Diámetro Axial-Polar
DMSO	Dimetilsulfóxido
DC	Donante Cadáver
DPI	Disfunción Precoz del Injerto
DRI	Disfunción Retardada del Injerto
DV	Donante Vivo
EEM	Error Estándar de la Media
ERC	Enfermedad Renal Crónica
ERCT	Enfermedad Renal Crónica Terminal
EROs	Especies Reactivas de Oxígeno

FADD	Del inglés <i>“Fas Associated via Death Domain”</i>
Fas-L	Fas-Ligando
FG	Filtrado Glomerular
FI	Función Inicial
FLI	Función Lenta del Injerto
FRA	Fracaso Renal Agudo
FSR	Flujo Sanguíneo Renal
GAPDH	Del inglés <i>“GlycerAldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase”</i>
GPx4	Glutación Peroxidasa 4
GSH	Glutación
HIF-1	Del inglés <i>“Hypoxia Inducible Factor 1”</i>
HK2	Del inglés <i>“Human Kidney cells”</i>
H/R	Hipoxia-Reoxigenación
IC	Isquemia Caliente
IF	Isquemia Fría
IFNγ	Interferón γ
IL-18	Interleucina 18
IMC	Índice de Masa Corporal
IR	Isquemia-Reperfusión
KDIGO	Del inglés <i>“Kidney Disease: Improving Global Outcomes”</i>
KIM-1	Del inglés <i>“Kidney Injury Molecule 1”</i>
LDH	Lactato Deshidrogenasa
MAG3	Tecnecio-99m-mercaptoacetil-triglicina
MAP	Del inglés <i>“Mayo Adhesive Probability”</i>
MCT	Del inglés <i>“Mouse Cortical Tubule cells”</i>
MLKL <i>pseudokinase”</i>	Del inglés <i>“Mixed Lineage Kinase Domain Like</i>
mPTP	Del inglés <i>“mitochondrial Permeability Transition Pore”</i>

MPT-RN	Del inglés <i>“Mitochondria Permeability Transition-Regulated Necrosis”</i>
NAG	N-acetil-B-D-Glucosaminidasas
Nec-1	Necrostatina-1
NFP	No Función Primaria
NGAL	Del inglés <i>“Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin”</i>
NR	Necrosis Regulada
ON	Óxido Nítrico
ONS	Óxido-Nítrico Sintetasa
PMAD	Patrón Molecular Asociado al Daño celular
PMEM	Permeabilización Membrana Externa Mitocondrial
PPIasa	Peptidil-Proilili cis-trans-Isomerasa
PQHR	Poliquistosis Hepatorrenal
PUFAs	Del inglés <i>“PolyUnsaturated Fatty Acids”</i>
RIPK	Del inglés <i>“Receptor-Interacting Protein Kinase”</i>
RPS	Del inglés <i>“Renal Pelvic Score”</i>
sCr	Creatinina sérica
Smac/DIABLO	Del inglés <i>“Second mitochondria-derived activator of caspase”</i>
SBF	Suero Bovino Fetal
TBS-T	Del inglés <i>“Tris Buffered Saline Tampon”</i>
TFG	Tasa de Filtración Glomerular
TNF	Del inglés <i>“Tumor Necrosis Factor”</i>
TR	Trasplante Renal
TRADD	Del inglés <i>“TNFR associated via death domain”</i>
TWEAK	Del inglés <i>“Tumor necrosis factor-like Weak inducer of apoptosis”</i>
uCypA	Del inglés <i>“urinary CypA”</i>
uNGAL	Del inglés <i>“urinay NGAL”</i>
VCAM-1	Del inglés <i>“Vascular Cell Adhesion Molecule-1”</i>

zVAD Inhibidor inespecífico de caspasas benzolixicarbonil-Val-
Ala-DL-Asp-fluorometilcetona

Introducción

1 EL RIÑÓN

1.1 EL RIÑÓN Y SU FUNCIÓN EN LA HOMEOSTASIS DEL MEDIO INTERNO.

Los riñones filtran el plasma sanguíneo y eliminan desechos, según las necesidades del organismo. Depuran las sustancias de desecho del filtrado glomerular (FG) excretándolas a la orina, mientras devuelven a la sangre las que son necesarias. Además, intervienen en otros procesos que mantienen la homeostasis:

- **Regulación del equilibrio hidroelectrolítico y acido-básico.**
- **Regulación de la osmolaridad de los líquidos corporales y de las concentraciones de electrolitos.**
- **Regulación de la presión arterial.**
- **Secreción, metabolismo y excreción de hormonas.**
- **Gluconeogénesis.**
- **Excreción de sustancias químicas extrañas.**

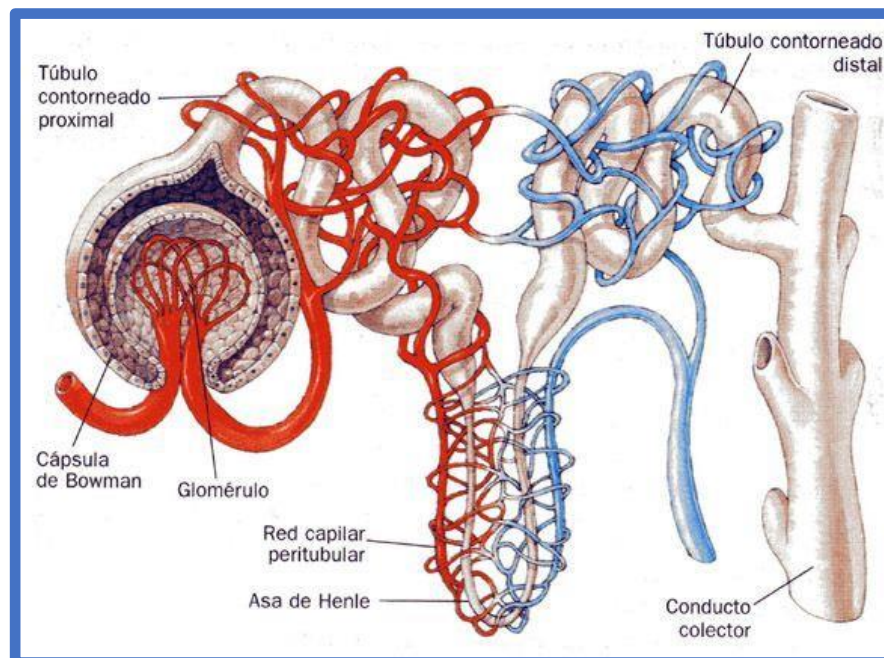


Ilustración 1. Esquema de la estructura básica renal: la nefrona.

Nefrona en esquema: corpúsculo renal o de Malpighi (glomérulo y cápsula de Bowman) y sistema tubular (túbulo contorneado proximal, asa de Henle y túbulo contorneado distal). Los túbulos contorneados de varias nefronas confluyen en un túbulo colector.

1.2 ANATOMÍA RENAL

1.2.1 LA NEFRONA

Es la unidad funcional del riñón, está formada por un corpúsculo renal o de Malpighi y un sistema tubular (**Ilustración 1**). En el ser humano, cada riñón contiene aproximadamente 1 millón de nefronas, y cada nefrona está constituida por un corpúsculo renal o de Malpighi y un sistema tubular. El corpúsculo de Malpighi está formado por el glomérulo, en el cual se encuentra la arteriola aferente que se ramifica en capilares para permitir la filtración del plasma y que posteriormente se vuelve a agrupar para conformar la arteriola eferente, y por la cápsula de Bowman, cavidad que rodea al glomérulo y donde comienza el sistema tubular. De la cápsula de Bowman sale el túbulo contorneado proximal que se continúa con los segmentos descendente y ascendente del Asa de Henle y el túbulo contorneado distal. Los túbulos contorneados distales de varias nefronas confluyen en un túbulo colector.

1.2.2 PARÉNQUIMA Y VASOS RENALES

Los riñones están situados en la pared posterior del abdomen, en el espacio retroperitoneal, a cada lado de la columna vertebral. Cada unidad renal pesa aproximadamente 150gr en un varón y 120gr en una mujer, mientras sus dimensiones son de 10 a 12 cm de longitud vertical, de 5 a 7 cm de diámetro transversal y cerca de 3 cm de espesor anteroposterior [1]. En una sección renal, en el plano coronal se aprecian dos regiones principales: la externa, conocida como corteza y la interna, llamada médula (**Ilustraciones 2 y 3**).

En el 75% de los sujetos el **sistema arterial** renal está constituido por una sola arteria, que surge a cada lado del segmento abdominal de la aorta inmediatamente caudal al origen de la arteria mesentérica superior (**Ilustración 2**). En proximidad al seno renal la arteria renal se divide en una rama anterior, que transporta el 75% del suministro de sangre, y una posterior, que lleva el 25% restante. La división arterial anterior origina cuatro arterias segmentarias (apical, superior, media e inferior), mientras que la división posterior únicamente emite la arteria segmentaria posterior. Las arterias segmentarias son arterias terminales, entre sus ramas no existen

anastomosis, por lo que su obstrucción provoca una isquemia completa en el segmento renal correspondiente. La división de las arterias segmentarias da lugar a las arterias interlobares a nivel del fórnix, y estas continúan su recorrido por los tabiques interlobulares entre las pirámides. En la unión corticomedular cada arteria interlobar se ramificará en entre cinco y siete arterias arquedas que, a su vez, terminan emitiendo las arterias interlobulares que ascienden radialmente hacia la corteza renal. Las arteriolas aferentes surgen de las ramas de las arterias interlobulares, llegan a los glomérulos de los corpúsculos renales y serán las arteriolas eferentes las que drenen estos glomérulos [2]. La médula renal se irriga a través de las arteriolas eferentes de los glomérulos yuxtamedulares que giran hacia la médula. Estas arteriolas eferentes descienden a través de la franja externa y se dividen en los vasos rectos descendentes (**Ilustraciones 2 y 3**).

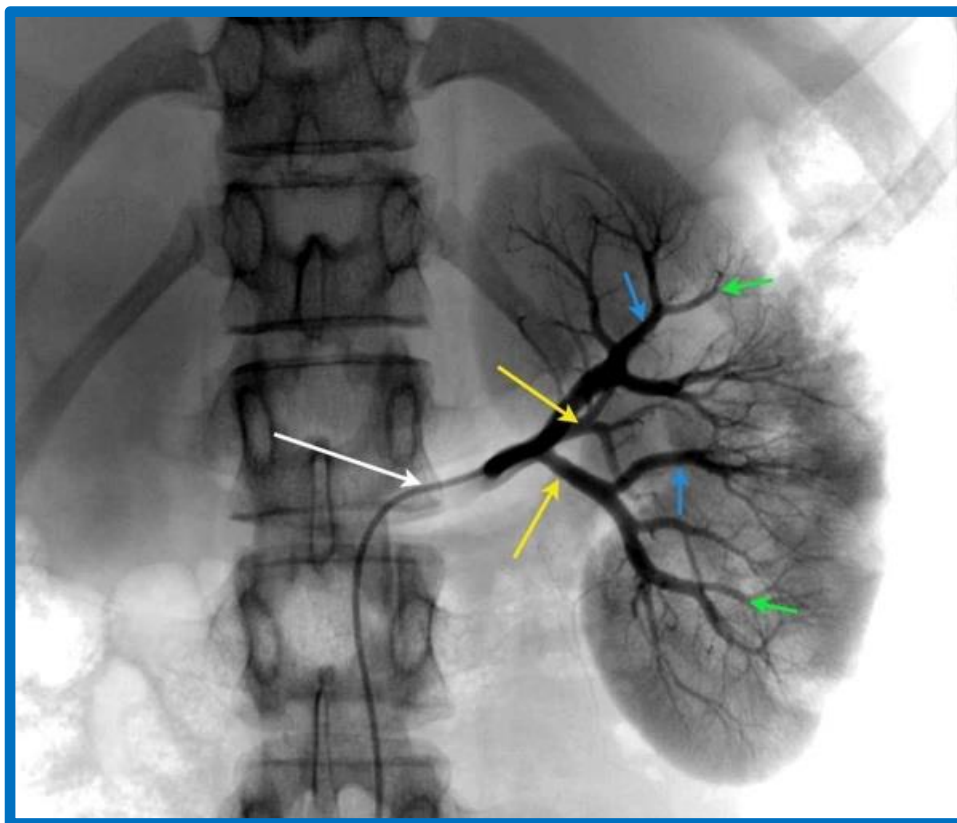


Ilustración 2. Anatomía vascular arterial renal: arteriografía renal izquierda.

Flecha blanca: catéter en arteria renal principal izquierda. Flechas amarillas: arteria renal divisiones anterior y posterior. Flechas azules: arterias segmentarias. Flechas verdes: arterias interlobulares.

El **sistema venoso** renal muestra una disposición anatómica paralela y centrípeta con relación al circuito arterial, pero a diferencia de este, no es terminal. Existen arcadas venosas longitudinales que anastomosan los vasos venosos intraparenquimatosos. El plexo venoso capilar peritubular drena a través de las venas rectas hacia las venas arqueadas. Las venas arqueadas vierten su contenido hacia la vena interlobulillar formando varios troncos (dos en aproximadamente ~50%, y tres en ~30% de los casos) que se unen como vena renal en situación anterior a la pelvis renal [2].

La vena renal derecha drena directamente en la vena cava inferior, generalmente sin otros afluentes. La vena renal izquierda es aproximadamente dos o tres veces más larga que la vena renal derecha, e ingresa en la vena cava inferior cruzando la superficie anterior de la aorta. Los vasos venosos tributarios de la vena renal izquierda incluyen la vena gonadal izquierda, la vena suprarrenal izquierda, las venas frénicas inferiores, la primera o segunda vena lumbar y venas paravertebrales en hasta un tercio de los casos.

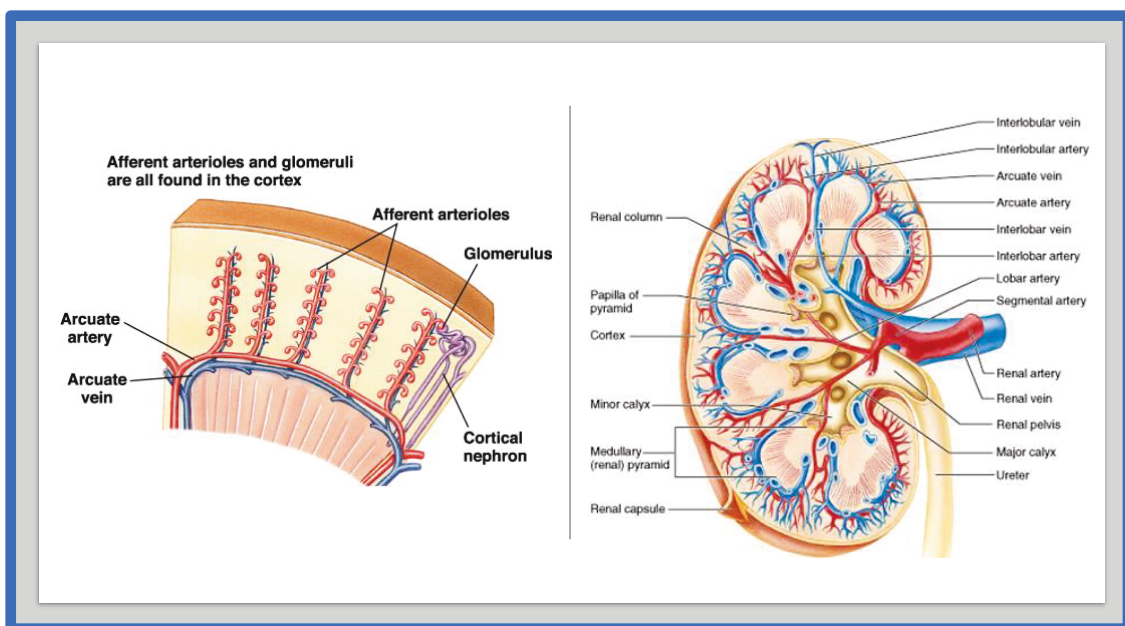


Ilustración 3. Anatomía y vascularización renal: esquema.

1.3 FLUJO SANGUÍNEO Y SUSCEPTIBILIDAD RENAL A LA ISQUEMIA

El riñón es el órgano que recibe mayor flujo sanguíneo. En un adulto sano los riñones representan aproximadamente el 0,5-1% del peso corporal total, mientras reciben casi el 25% del gasto cardiaco. Esta elevada perfusión es necesaria para mantener la tasa de filtración glomerular (TFG) y así permitir la eliminación eficiente de los materiales de desecho en la orina [3]–[5].

El flujo sanguíneo renal (FSR) promedio es de 4 ml/gr de tejido/minuto. No obstante, el suministro sanguíneo y la oxigenación del parénquima renal no tienen una distribución homogénea, la corteza externa recibe entre 5 y 6 ml/gr/min mientras a la corteza interna llega entre 2 y 3 ml/gr/min, a la médula externa 1 ml/gr/min y la médula interna de 0,5 ml/gr/min [6]. Por lo tanto, el 90% del FSR se distribuye hacia la zona cortical. La corteza recibe casi el 20% del gasto cardíaco, lo que le permite mantener una pO_2 tisular de 50-60 mmHg, mientras el suministro de sangre a la médula se limita a tan solo el 5-10% del FSR total, por lo que la pO_2 tisular será de tan solo 10-20 mmHg [3], [7], [8]. Este bajo flujo sanguíneo medular resulta esencial para preservar los gradientes osmóticos necesarios para la concentración de la orina, pero deja el tejido medular al borde de la hipoxia, especialmente la franja externa de la médula, donde se encuentra el segmento S3 del túbulo proximal y la extremidad ascendente gruesa medular. Estos son los segmentos más vulnerables a la lesión isquémica debido a su alta demanda metabólica y al precario suministro de oxígeno [9], [10].

2 EL FRACASO RENAL AGUDO

El fracaso renal agudo (FRA) es una entidad patológica multifactorial y multifásica. Se caracteriza por una rápida disminución de la función renal en forma de disminución del FG, que condiciona la acumulación de desechos metabólicos y toxinas, con la consiguiente alteración en la homeostasis del medio interno [11]. Según su fisiopatología se clasifica en, *prerenal* cuando la perfusión sanguínea renal está comprometida, *parenquimatoso* cuando el agente nosológico afecta a las estructuras

tubulares, glomerulares o intersticiales y *obstructivo*, cuando se afecta la excreción de la orina [12].

El FRA tiene una elevada incidencia y es una de las complicaciones más frecuentes en pacientes hospitalizados [13]. Puede ocurrir de forma primaria, asociado a otra circunstancia clínica o sobre una enfermedad renal crónica (ERC) [14]–[16]. Son múltiples las causas que pueden ocasionar un FRA, una de las más estudiadas, y sobre la que trabajaremos a lo largo de esta tesis, es la relacionada con el daño renal secundario a isquemia y reperfusión (IR). En la práctica clínica tiene gran importancia debido a su impacto sobre el trasplante renal (TR) y en otras situaciones que precisan una isquemia controlada de la unidad renal, como es el caso de la cirugía conservadora de nefronas (CCN) para el tratamiento del tumor renal localizado.

A pesar de los avances en las medidas preventivas y de soporte, el FRA sigue asociado a una alta morbilidad y mortalidad [15]. Realizar un diagnóstico precoz y establecer un tratamiento eficaz constituyen todavía hoy retos sin solución a los que se enfrenta el clínico. Existen innumerables estudios y modelos experimentales para su estudio que proponen nuevos marcadores y medios para anticipar el diagnóstico y abortar su evolución, pero desgraciadamente no han solucionado el desafío clínico que supone el FRA.

2.1 IMPACTO CLÍNICO DEL FRA

El tratamiento del FRA es sintomático y consiste en dar soporte o sustitución de la función renal por diálisis si la insuficiencia renal es grave. La relación entre el FRA y morbimortalidad es bien conocida.

El FRA es tanto un factor estadísticamente relacionado como un factor independiente para padecer ERC y enfermedad renal crónica terminal (ERCT). El riesgo será proporcional a la presencia de situaciones comórbidas o a la susceptibilidad para un daño acelerado por alteración de la capacidad de recuperación renal [17], [18].

El FRA no solo se ha asociado con mala evolución y mortalidad en los pacientes con ingresos hospitalarios por patología médica, también está relacionado con mala evolución y complicaciones en los pacientes sometidos a cirugía. Se han desarrollado

nomogramas para predecir el desarrollo de FRA tras cirugía cardíaca, si bien las medidas establecidas para prevenir esta complicación y la necesidad de tratamiento sustitutivo de la función renal no han reducido su incidencia ni la necesidad de diálisis tras esta cirugía [19].

El FRA es también un factor de riesgo para tener una mala evolución en aspectos de la salud no relacionados con la función renal [14], [17]. No obstante, se mantiene el debate abierto sobre si hay una relación de causalidad entre el FRA y padecer un mal pronóstico a largo plazo, o si simplemente es un indicador clínico de una mala situación de salud [17].

Factores de riesgo de FRA	
No modificables	Potencialmente modificables
Edades extremas de la vida	Anemia
Sexo masculino	Sepsis
Raza negra	Enfermedad aguda
ERC previa	Traumatismo
Proteinuria o albúmina/creatinina ↑ ↑	Cirugía cardíaca
Hipertensión	Cirugía mayor no cardíaca
Diabetes mellitus	Administración contrastes iodados
Enfermedad hepática	Sobrecarga hídrica
Insuficiencia cardíaca	Sobrecarga de coloides o soluciones Cl-
Cardiopatía isquémica	Fármacos nefrotóxicos
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	Enfermedad aguda
Enfermedad vascular periférica	Someterse a procedimientos quirúrgicos de alto riesgo de urgencia
Neoplasia	

Tabla 1. Factores de riesgo de FRA: no modificables/modificables

Factores de riesgo de FRA según Rewa et al. [20]

2.2 DIAGNÓSTICO DEL FRA

En la práctica clínica, el diagnóstico del FRA se fundamenta en la determinación de creatinina sérica (sCr) y el volumen de diuresis, ambos marcadores de función, no de lesión renal. Esto ocurre a pesar de su nombre (FRA en inglés es *“acute kidney injury”*,

cuyo acrónimo es “AKI”), que incluye el término “injury” (daño) y no el de “failure” (fracaso) [11].

La sCr se utiliza como método de diagnóstico de FRA desde principios de los 1950’s [21], a pesar de su limitada sensibilidad/especificidad, y de no permitir un diagnóstico precoz [22]. La propia clasificación del FRA basada en la determinación de sCr tiene limitaciones, como son la falta de precisión para el diagnóstico del daño estructural renal, no proporcionar información sobre su etiología, pronóstico, mecanismo molecular subyacente o potencial respuesta al tratamiento [23]. La mayoría de las causas de FRA afectan inicialmente al epitelio tubular, no al glomérulo, por lo que no observaremos elevación de la sCr hasta que no se reduce de forma significativa la TFG, un signo que puede ocurrir hasta 48-72h después de la lesión [23]. La elevación de la sCr no permite detectar el daño subclínico ya que permanece estable hasta que se reducen a >50% las nefronas funcionantes [24]. En el momento en el que se detecta un cambio en la sCr es posible que se haya pasado por alto la ventana de oportunidad terapéutica, particularmente en el FRA establecido. Existen además situaciones en las que se objetiva elevación de sCr sin que esto traduzca la presencia de lesión renal, como por ejemplo la reducción del FSR en los síndromes cardiorrenal y hepatorrenal, o en pacientes en tratamiento con inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina o trimetoprim [23].

El **volumen de diuresis** puede proporcionar información respecto al FRA ya que los pacientes anúricos tendrán una TFG de cero. Es posible que las alteraciones menos graves de la función renal provoquen oliguria mucho antes de que aumente el nivel de sCr. Sin embargo, la producción de orina también carece de sensibilidad y tiene una especificidad limitada como marcador del FRA [25].

Las guías y grupos de trabajo adoptaron diferentes definiciones del FRA (ADQI (del inglés “Acute Dialysis Quality Initiative”) [26], AKIN (del inglés “Acute Kidney Injury Network”) [27] y la actualmente vigente KDIGO de 2012 (del inglés “Kidney Disease: Improving Global Outcomes” [11]). La clasificación KDIGO define FRA por un incremento en sCr $\geq 50\%$ en los 7 días anteriores o en 0,3mg/dl desde el valor inicial en 48h, y/o un volumen de orina $<0,5\text{ml/kg/h}$ durante 6h [11]. Modifica el sistema previo de

clasificación, al añadir dos tiempos para definir el FRA; incremento de 0,3 mg/dl en la concentración de sCr en 48h o un aumento igual o superior al 50% del valor basal de la misma en 7 días (**Tabla 2**).

Estadio	sCr (mg/dl)	Diuresis (ml/kg/h)	FG
I	↑ ≥ 0,3mg/dl en 48h o ↑ >1,5 a 1,9 veces sobre basal en 7 días	<0,5ml/kg/h en 6h-12h	Esta clasificación no tiene en cuenta la alteración del FG
II	↑ 2 a 2,9 veces	<0,5ml/kg/h ≥12h	
III	↑ >4mg/dl o ↑ ≥3 veces o necesidad de diálisis	<0,3ml/kg/h ≥24h o anuria ≥12h	

Tabla 2. Clasificación KDIGO: definición de FRA y sus estadios.

Esta estandarización en el diagnóstico mejora el manejo clínico y la investigación al permitir comparaciones entre estudios, cohortes y centros sanitarios [20]. No obstante, todas estas clasificaciones para la definición del FRA tienen limitaciones, al confiar a la determinación de sCr y su oscilación respecto a un hipotético nivel basal que no siempre es conocido.

En la práctica clínica, los métodos para el diagnóstico de una agresión (“*injury*”) al riñón no son óptimos. Con frecuencia escapa a la detección de las herramientas disponibles o se detecta con retraso. Un diagnóstico precoz del FRA podría favorecer un tratamiento adecuado y conseguir su recuperación completa. Igualmente, profundizar en el conocimiento de los factores desencadenantes de la lesión renal subclínica debería permitir su corrección, así como mejorar el seguimiento de los pacientes de riesgo [28]. Resulta urgente contar con métodos más precisos para diagnosticar mejor el FRA. Actualmente no disponemos de una herramienta no invasiva que permita diagnosticar el FRA en su fase inicial, gradúe de forma precisa su gravedad y diferencie su etiología.

2.3 DAÑO RENAL SIN ELEVACIÓN DE CREATININA

El riñón puede sufrir “daño” sin que se eleve la sCr, esta situación es conocida como estrés renal agudo o FRA subclínico [29]–[31]. Se considera que si la agresión se mantiene, causará daño a las células tubulares que terminará en FRA. El FRA subclínico ocurre cuando el daño tubular y reducción del FG en algunas nefronas es compensado por otras no lesionadas y normofuncionantes, no llegando a cumplir criterios clásicos de FRA, un fenómeno conocido como “reserva renal” [23].

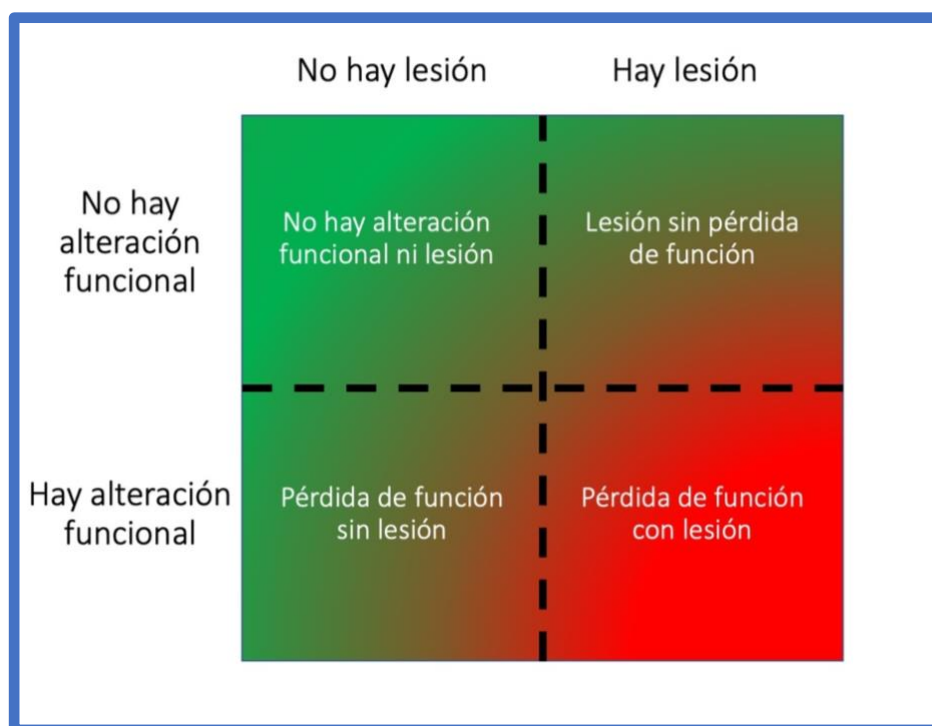


Ilustración 4. Esquema para la evaluación del FRA basado en biomarcadores.

Marco conceptual para la evaluación del paciente con FRA según la determinación de biomarcadores. Murray et al.

La detección de este daño subclínico despierta un creciente interés, ya que se considera como una etapa precoz en el espectro de la lesión renal y se ha relacionado con una peor evolución clínica [20], [31]. En un análisis realizado en biopsias renales, en el 21% de los casos se observó una lesión tubular aguda cuando el paciente no cumplía criterios KDIGO para la definición de FRA [33]. Esta situación, previamente no detectable, se ha asociado con un riesgo de muerte o necesidad de tratamiento

sustitutivo de la función renal de entre 2 y 3 veces mayor que aquellos pacientes que no elevan biomarcadores de lesión tubular [29].

2.4 BIOMARCADORES PARA DETECCIÓN DE FRA

Un biomarcador se define como un parámetro biológico medible y cuantificable, que puede servir como índice para la evaluación de un proceso biológico, o la respuesta farmacológica tras una intervención terapéutica [34]. Su fin último es mejorar la evolución de los pacientes.

El biomarcador ideal para el FRA debe ser específico del riñón, detectar a los pacientes en riesgo, anticipar su aparición, permitir la prevención, ser capaz de diferenciar entre los diferentes subtipos, determinar la ubicación y la gravedad de la lesión y, lo más importante, facilitar su detección precoz o la utilización de agentes terapéuticos eficaces [32], [35]. Además, la prueba debe ser económica, no invasiva, precisa, fácil y rápida de cuantificar por métodos de análisis habituales. Finalmente debe predecir la evolución clínica, la eficacia de los diferentes tratamientos aplicados y permitir el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas [36].

En la última década se han desarrollado nuevos biomarcadores para el diagnóstico del FRA, si bien su verdadera utilidad permanece por determinar. Se trata de moléculas que van de proteínas estructurales liberadas ante una lesión renal, a sustancias que se secretan en respuesta a una agresión pasando por productos que se filtran, reabsorben o secretan por el riñón [32]. Una limitación a la hora de analizar un marcador de lesión tubular que fuera “perfecto”, 100% sensible y específico, es que podría parecer inexacto cuando se utiliza la sCr como “*gold standard*”. La ausencia de cambio en los niveles de sCr puede no reflejar el daño tubular, aunque tampoco garantiza la ausencia del mismo [32], [37] (**Ilustración 4**). Son necesarios grandes estudios prospectivos, multicéntricos, de validación que determinen su papel en el FRA (determinación de riesgo, prevención, diagnóstico, etiología, progresión o recuperación), así como establecer unos rangos y momentos para su aplicación adecuados para cada biomarcador. Es probable que ante la imposibilidad para encontrar un único biomarcador que cumpla todos estos requisitos, sea necesario utilizar una combinación de varios para evaluar y predecir el alcance del FRA.

En el momento actual, persisten grandes lagunas en el conocimiento de los biomarcadores en el FRA, resulta evidente la necesidad de profundizar en su investigación. Ninguno de los biomarcadores disponibles de FRA se ha mostrado específico de la lesión isquémica, lo que explica la debilidad de los resultados obtenidos hasta la fecha (sCr, lipocalina asociada a la gelatina de neutrófilos (NGAL, del inglés “*Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin*”), N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG), KIM1 (del inglés “*Kidney Injury Molecule 1*”), cistatina C (CysC, del inglés “*Cystatin C*”), interleucina 18 (IL-18), albuminuria, lactato deshidrogenasa (LDH)).

Mostramos a continuación un resumen de los biomarcadores utilizados en este trabajo para el diagnóstico y seguimiento del FRA y del daño renal por IR:

2.4.1 CREATININA (SCR)

La creatinina es una molécula de pequeño tamaño (0,113kDa) de producción endógena. Deriva del metabolismo de la creatina y fosfocreatina en el tejido muscular, producida de manera constante y relacionada con la masa muscular, y es liberada al torrente sanguíneo (sCr). Se filtra de forma libre por el glomérulo y es secretada en una pequeña cantidad por los túbulos (10-15%) [23].

No refleja de forma directa el daño celular renal, sino manifiesta una reducción global de la función renal. Utilizada rutinariamente en la práctica clínica y en la mayoría de los estudios sobre FRA, a pesar de sus bien conocidas limitaciones y de estar influenciada por edad, sexo, raza, complejión, así como los estados nutricional e hídrico. La sCr no diferencia entre los cambios hemodinámicos de la función renal, de la insuficiencia renal intrínseca o la nefropatía obstructiva. Igualmente, no es adecuada para la identificación precoz de la reducción de la TFG. Es más, puede que no se eleve hasta que no se haya producido una marcada disminución de la TFG, por lo que se necesitan varias horas o días para que la sCr alcance un nuevo “*estado estable*”. La sCr reflejará el valor aproximado de la TFG en “*estado estable*” pero no mientras la función renal continúe disminuyendo [24].

2.4.2 LIPOCALINA ASOCIADA A LA GELATINASA DE NEUTRÓFILOS (NGAL)

La lipocalina es una proteína de 25kDa, descubierta por primera vez en los gránulos de los neutrófilos (**Ilustración 5**). Está involucrada en la inmunidad innata y bloquea la captación de hierro por las bacterias, por lo que se le atribuye un efecto bacteriostático [30].

De los biomarcadores de FRA la NGAL ha sido el más estudiado. Es producida por las células tubulares renales en respuesta a lesión isquémica o tóxica [38], de manera “*severidad-dependiente*”, pudiendo detectarse su elevación en orina desde las 3h tras la agresión tubular, alcanzando su pico entre las 6 a 12h dependiendo de la intensidad de la misma [25], [30]. A nivel renal tiene efecto antiinflamatorio, antiapoptótico y promueve la proliferación de las células tubulares [30]. Es un prometedor biomarcador de FRA por resultar precoz, sensible y no invasivo. Se ha propuesto de utilidad para el diagnóstico y establecimiento de severidad del FRA [35]. Puede ayudar a determinar el riesgo de FRA en el contexto de cirugía cardíaca, TR, enfermos críticos, así como predecir la duración del FRA y la recuperación de la función renal ayudando en la decisión de utilizar tratamiento sustitutivo de la función renal [25], [39], [40].

En condiciones normales, la NGAL filtrada es reabsorbida en su práctica totalidad en el túbulo proximal dependiente de endocitosis mediada por megalina, por lo que sus niveles en orina serán mínimos [41]. Su elevación en orina o plasma puede indicar daño celular tubular antes de que se afecte la TFG. La concentración en plasma y orina aumenta de 8 a 24 horas antes de que se eleve la sCr [41]. No es específica de daño renal, puede elevarse por otras causas, como son la inflamación sistémica, infección y sepsis, ERC o incluso ser producida en tejidos fuera del riñón, como el hígado, pulmón, tráquea, útero, próstata, glándula salival, estómago e intestino grueso [25], [30], [42].

En cuanto a sus limitaciones ya hemos enumerado que no es un marcador específico de FRA. Por otro lado, hay diversidad de kits para su determinación y no tiene estandarizados los puntos de corte que permiten discriminar los pacientes en riesgo de FRA en los diferentes escenarios clínicos [25], [42].

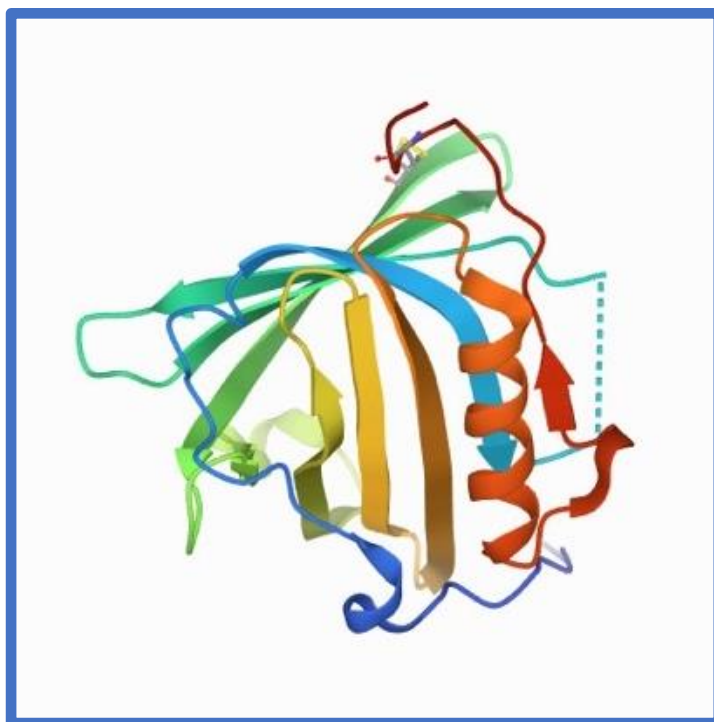


Ilustración 5. NGAL: conformación 3D.

Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL), conformación tridimensional. Imagen obtenida del banco de imágenes RCSB Protein Data Bank ·DTQ <https://www.rcsb.org/structure/3DTQ>

En este trabajo hemos analizado el comportamiento de la NGAL como marcador del daño tubular renal sobre pacientes con FRA y sometidos a agresión quirúrgica renal (tratamiento quirúrgico mediante CCN con y sin clampaje vascular y extracción renal con posterior trasplante de donante vivo (DV)).

2.4.3 UN NUEVO BIOMARCADOR POR EXPLORAR: CICLOFILINA A (CYPA)

La ciclofilina A (CypA, del inglés “*Cyclophilin A*”) pertenece a la familia de las ciclofilinas (Cyps, del inglés “*Cyclophilin*”), que son un grupo de proteínas que se encuentran en todos los organismos vivos [43], [44]. Existen cuatro isoformas (Cyp A, B, C y D) que comparten un dominio común de aproximadamente 109 aminoácidos, el “*cyclophilin-like domain*” que posee actividad enzimática fosforilasa; peptidil-prolil cis-trans isomerasa (PPIasa) [44]. La actividad PPIasa permite estabilizar el estado de transición proteico cis-trans y acelerar la isomerización, un proceso que se considera importante no solo en el plegamiento de proteínas [45], [46], sino también durante el

ensamblaje de proteínas multidominio [47]. La actividad PPIasa se ha demostrado abundante y presente en todos los órganos [48] (**Tabla 3**). A esta estructura común la rodean dominios únicos para cada miembro de la familia, que están asociados a la compartimentación subcelular y la especialización funcional [49], [50]. La presencia de Cyps a nivel extracelular puede tener implicación en la fisiopatología de diversos procesos patológicos [46], [51].

ÓRGANO	CONCENTRACIÓN Cyp µg/mg proteína
Corteza cerebral	2,8 ± 0,4
Paratiroides	1,7 ± 0,3
Timo	1,6 ± 0,4
Páncreas	1,5 ± 0,2
Bazo	1,5 ± 0,3
Ganglio linfático	1,4 ± 0,4
Riñón	1,3 ± 0,4
Intestino	1,3 ± 0,3
Corazón	1,1 ± 0,2
Tejido graso	1,1 ± 0,2
Hígado	0,9 ± 0,2
Pulmón	0,8 ± 0,1
Piel	0,8 ± 0,1

Tabla 3. Concentración tisular de Ciclofilina

Concentración tisular de Cyp según Ryffel et al. 1991 [48]

La CypA es el miembro más abundante y ubicuo de esta familia [52]. Es una proteína de 18KDa, codificada por un gen localizado en la región *7p11.2-p13* [53], que representa entre el 0,1 y el 0,6% de todas las proteínas celulares [46], [54]. La CypA de la especie humana tiene una estructura de β -barril antiparalelo de 8 hebras, con 2 α -hélices que cierran el barril por cada lado. Tiene 7 residuos aromáticos y otros 2 hidrófobos que forman un núcleo compacto dentro de la estructura de barril, el área donde se une la ciclosporina A (CsA) [47] (**Ilustración 6**). Se purificó por primera vez a partir de timocitos bovinos en 1984 y se confirmó como receptor intracelular primario del fármaco inmunosupresor CsA [55].

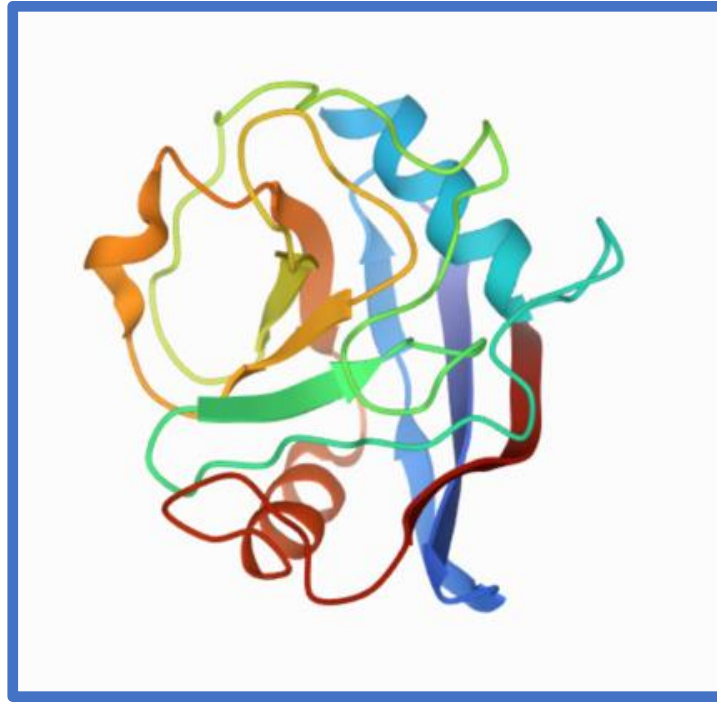


Ilustración 6. CypA: conformación 3D.

Ciclofilina A (CypA), conformación tridimensional. Imagen obtenida del banco de imágenes RCSB Protein Data Bank 4YUH <https://www.rcsb.org/structure/4YUH>

La CypA está localizada en el interior celular, en el citoplasma y el núcleo [43]. Se le atribuyen importantes funciones en muchas condiciones biológicas, incluyendo el plegamiento y el tráfico de proteínas o la activación de células T [46], [56]. En el medio extracelular puede encontrarse debido a secreción activa, en respuesta a diversos estímulos (infección, hipoxia o estrés oxidativo) o vertida de forma secundaria a la muerte celular con rotura de la membrana citoplasmática, [55], [57]–[63]. La CypA es una señal proinflamatoria crucial, cuando se libera al medio extracelular es un poderoso agente quimiotáctico para neutrófilos, eosinófilos y linfocitos T, promoviendo una rápida respuesta inflamatoria [51], [57], [63]–[66]. Por este motivo se ha sugerido considerar la CypA como un patrón molecular asociado al daño celular (PMADs) [57]. CypA estimula la respuesta inflamatoria a través de dos vías diferentes: la actividad de PPIasa y la unión al receptor CD147 [67], [68].

El CD147 es una glicoproteína transmembrana de tipo I (50-60kDa), expresada por una amplia gama de tipos celulares, incluidos todos los leucocitos de sangre periférica

humana [64]. Pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y está codificada en humanos por un gen localizado en *19p/3.3* [69]. Ejerce varias funciones al interactuar con diferentes moléculas, siendo las Cyps su principal ligando [68]. En concreto la interacción CypA-CD147 contribuye al reclutamiento de neutrófilos en el tejido durante la respuesta inflamatoria y la posterior lesión tisular [63], [70]. La inhibición de CD147 podría atenuar esta respuesta inflamatoria, bloqueando la entrada de neutrófilos en los tejidos inflamados [63].

El riñón cuenta con niveles relativamente elevados de CypA (**Tabla 3**), si bien la distribución entre los diferentes tipos celulares es asimétrica; las células del túbulo proximal tienen mayor concentración que cualquier otra estructura renal [48], [71]. Se ha demostrado la expresión del receptor CypA-CD147 en células tubulares tanto proximales como distales, mientras no se detectó en las células del glomérulo [72].

El FRA se relaciona con varias formas de muerte celular, entre las que se encuentran la apoptosis y diversas formas de necrosis regulada (NR) (la necroptosis y ferroptosis serán estudiadas en este trabajo). Se ha propuesto la CypA como un biomarcador de diferentes formas de muerte celular con ruptura de membrana citoplasmática *in vitro* [65], y de diferentes formas de daño renal [39], [58], [60], [73]. A lo largo de este trabajo vamos a analizar el comportamiento de la CypA como marcador del daño tubular renal, en modelo preclínico y en modelo clínico, sobre pacientes con FRA y sometidos a agresión renal (tratamiento quirúrgico mediante CCN con y sin clampaje vascular y extracción renal con posterior trasplante de DV). También compararemos su comportamiento con el del ya mencionado NGAL.

3. MUERTE CELULAR

Una célula muere cuando cesan sus funciones de respiración, metabolismo, crecimiento y proliferación. Cada célula está programada para morir ante un determinado estímulo [74]. Las células que sufren una agresión leve tendrán la capacidad de recuperarse, funcional y estructuralmente si esta cesa, mientras que aquellas que soportan una lesión más grave finalmente morirán. Por lo tanto, el destino

de una célula renal tras una agresión, como por ejemplo un evento isquémico, dependerá de la extensión y severidad de la lesión.

Tradicionalmente, la comunidad científica ha mantenido una visión dicotómica sobre cómo mueren las células: apoptosis o necrosis. La principal diferencia entre ambas radica en la integridad de la membrana plasmática; la apoptosis mantiene la integridad de la membrana celular, por lo que no provoca respuesta inflamatoria, mientras que en la necrosis esta se rompe, liberando PMADs que producen inflamación y respuesta inmunitaria [75].

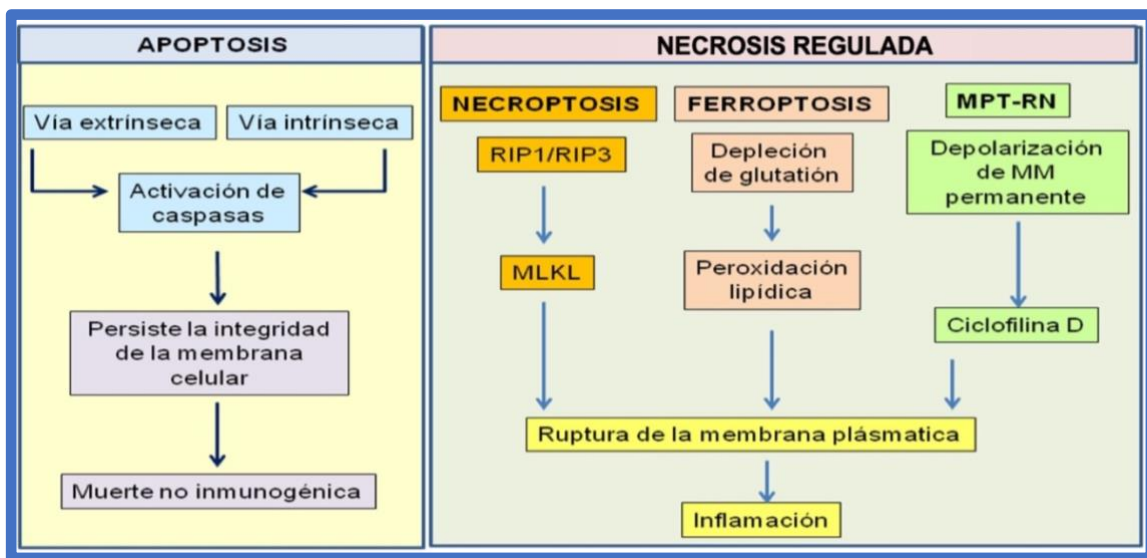


Ilustración 7. Principales vías de muerte celular programada.

Las formas de muerte celular se pueden clasificar según ocasionen o no una respuesta inflamatoria. La **apoptosis**, que depende de la activación de caspasas, es una forma de muerte no inmunogénica. Mientras las formas de **necrosis regulada (NR)** independientemente de la vía implicada, van a acompañadas de una respuesta inflamatoria que a su vez pueden amplificar la inflamación y activar otros mecanismos de muerte. **MPT-RN**: necrosis programada dependiente de depolarización de membrana mitocondrial. MM: membrana mitocondrial. La proteína de dominio de quinasa de linaje mixto (MLKL, del inglés “Mixed Lineage Kinase domain Like pseudokinase”).

La apoptosis es un proceso de muerte celular programado, estrechamente regulado y dependiente de ATP, mientras que la necrosis se consideraba como un proceso pasivo por el cual las células mueren después de una agresión, ya sea química o física [76]. En la última década una gran cantidad de investigaciones han ampliado la visión tradicional de la necrosis. Se han descrito otras vías de muerte celular no

apoptóticas, altamente reguladas, con las características morfológicas de la necrosis que se han denominado vías de NR como la necroptosis, la ferroptosis y la necrosis programada dependiente de depolarización de membrana mitocondrial (MPT-RN del inglés “*Mitochondria Permeability Transition-Regulated Necrosis*”). La NR provoca la ruptura de la membrana celular y la liberación de PMADs, lo que desemboca en inflamación y activación inmunitaria.

3.1 APOPTOSIS:

La muerte celular apoptótica o programada suele ser una respuesta al microambiente de la célula y es tan importante para la correcta fisiología celular y tisular, como la división y diferenciación celular [74]. Resulta esencial para el correcto desarrollo embrionario, lo que ha incrementado el interés por su conocimiento [77], [78].

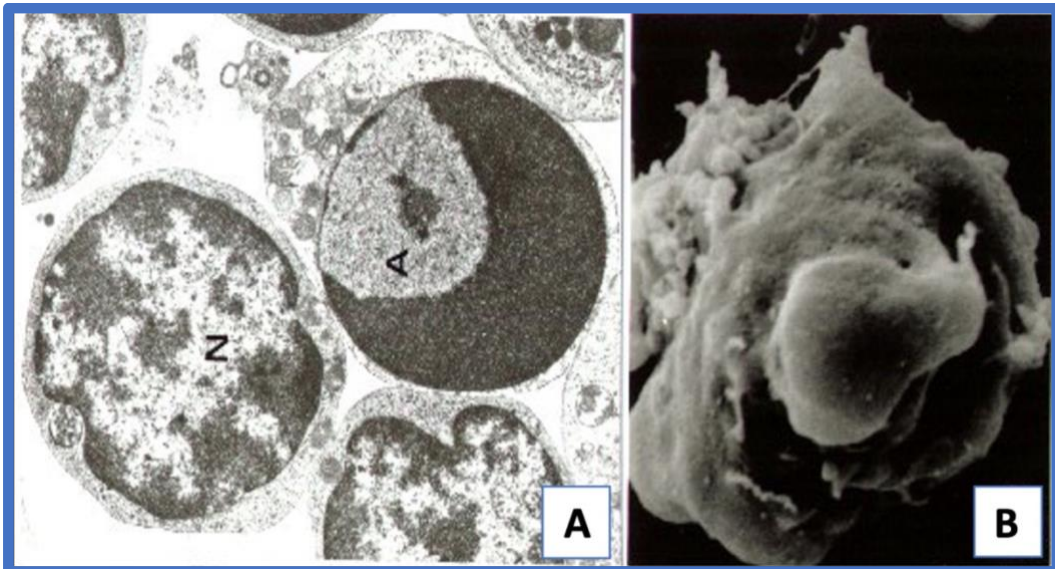


Ilustración 8. Muerte celular por apoptosis.

A. microscopía electrónica. B microscopía de barrido

El término “*apoptosis*”, proviene del griego y se utiliza para describir la “*caída de*” las hojas de un árbol, sugiriendo la pérdida controlada de células individuales de una población [79]. Se ha asumido que es una vía evolutiva que se conserva para regular la

muerte celular programada. Esta forma de muerte celular está controlada por caspasas, una familia de cisteínproteasas que se activan en respuesta a ligandos o señales de muerte celular, como son el TNF α (del inglés “*Tumor Necrosis Factor α* ”), Fas-ligando (Fas-L), TRAIL o ante una lesión mitocondrial [80].

A nivel morfológico la muerte celular por apoptosis se caracteriza por condensación nuclear y citoplasmática, fragmentación del ADN, formación de ampollas en la membrana celular con presencia de cuerpos apoptóticos y externalización de fosfatidilserina, que es una señal para que los macrófagos fagociten y eliminen las células sin generar una respuesta inflamatoria [81] (**Ilustración 8**).

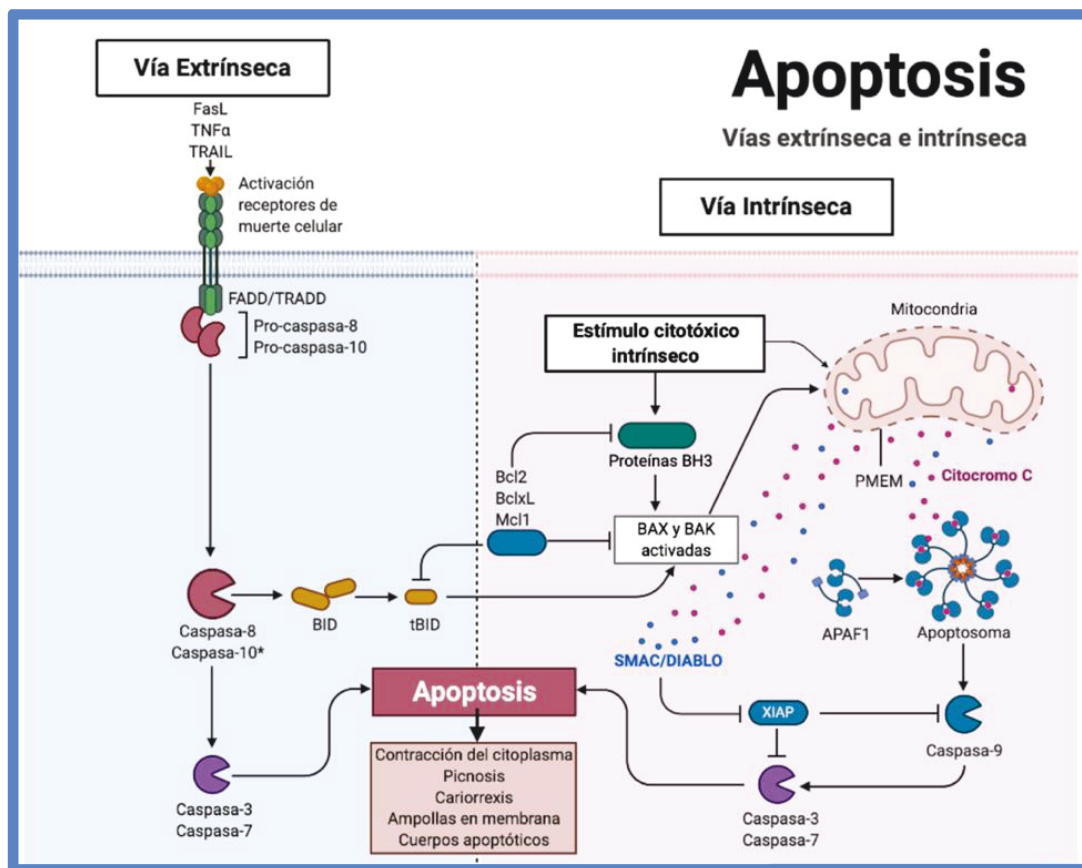


Ilustración 9. Esquema general muerte celular por apoptosis.

Vía extrínseca o mediada por receptor, e **intrínseca**, mitocondrial o citotóxica. PMEM permeabilización de la membrana externa mitocondrial. *Caspasa-10 posiblemente participe en esta vía. Smac/DIABLO (del inglés “*Second mitochondria-derived activator of caspase*”). XIAP grupo de proteínas inhibidoras de caspasa. BID proteína proapoptótica. tBID forma activa de BID. Proteínas anti-apoptóticas (BCL2, BCLXL y Mcl1). APAF-1 (del inglés “*Apoptotic Peptidase Activating Factor 1*”).

Los mecanismos que regulan la apoptosis se dividen clásicamente en dos vías: *extrínseca* e *intrínseca* (**Ilustraciones 7 y 9**).

3.1.1 EXTRÍNSECA (MEDIADA POR RECEPTOR):

Esta vía se inicia a través de la activación de receptores de muerte (TNF α , Fas-L, TRAIL) que provocan la formación un complejo con TRADD (del inglés "*TNFR associated via death domain*") y FADD (del inglés "*Fas Associated via Death Domain*"). El complejo así formado promueve la activación de la caspasa-8 que escinde y activa las caspasas 3 y 7 que finalmente ejecutaran la muerte celular. Si se inhibe la caspasa-8, el complejo IIB terminará promoviendo la muerte por necroptosis [74], [82]–[84]. La función más importante de la caspasa-8 no es la inducción de la apoptosis, sino la prevención de la necroptosis [85].

Existe intercomunicación entre la vía intrínseca y extrínseca. La proteína proapoptótica BID, puede ser activada por la caspasa-8 y su forma activa tBID se puede trasladar a la mitocondria y reclutar la vía intrínseca [86].

3.1.2 INTRÍNSECA (VÍA DE LA PERTURBACIÓN DE LA HOMEOSTASIS O MITOCONDRIAL):

La agresión celular a través de un estímulo citotóxico ya sea IR, compuesto tóxico o estrés oxidativo, inicia la vía cuyo epicentro es la mitocondria. El ataque a la célula provoca permeabilización de la membrana externa mitocondrial (PMEM), que ocasiona la liberación del citocromo C (CitC). El CitC forma el apoptosoma en el citosol junto con la caspasa 9 y APAF1 (del inglés "*Apoptotic Peptidase Activating Factor 1*") y este complejo activa la caspasa 3 que ejecutara la muerte de la célula.

La familia de proteínas relacionadas con BCL2 (del inglés "*B cell Lymphoma 2*") (proteínas BH3) tiene un importante papel en esta forma de muerte al contar con miembros pro-apoptóticos (BAK (del inglés "*BCL2 Antagonist/Killer 1*") y BAX (del inglés "*BCL2 Associated X*")) y anti-apoptóticos (BCL2, BCLXL y Mcl1). Las proteínas proapoptóticas al trasladarse a la membrana mitocondrial externa promoverán la PMEM, un punto crucial de control de la muerte por apoptosis [83].

En la apoptosis inducida por IR, los primeros cambios ultraestructurales tienen lugar en la mitocondria, la pérdida de actividad BCL2 ocurre en paralelo a la inflamación y ruptura de la membrana mitocondrial [87].

En la fase final, que es común para la vía intrínseca y extrínseca, las células apoptóticas muestran contracción del citoplasma, condensación de la cromatina (picnosis), fragmentación nuclear (cariorrhexis) y formación de ampollas en la membrana plasmática, culminando con la formación de cuerpos apoptóticos [74]. Los cuerpos apoptóticos, que contendrán estos fragmentos de proteínas intracelulares, a través del proceso de formación de ampollas en la membrana, se someterán a fagocitosis antes de que puedan derramar su contenido en el espacio extracelular.

3.2 NECROSIS:

Morfológicamente se caracteriza por inflamación de la célula y de sus organelas, disfunción mitocondrial, ausencia de fragmentación nuclear, ruptura de la membrana plasmática y pérdida del contenido intracelular [88] (**Ilustración 10**). La liberación no controlada del contenido al espacio extracelular actuará a modo de PMADs, reclutando células inflamatorias y estimulando la liberación de citocinas con capacidad para activar la respuesta inmune innata y adaptativa [89], [90].

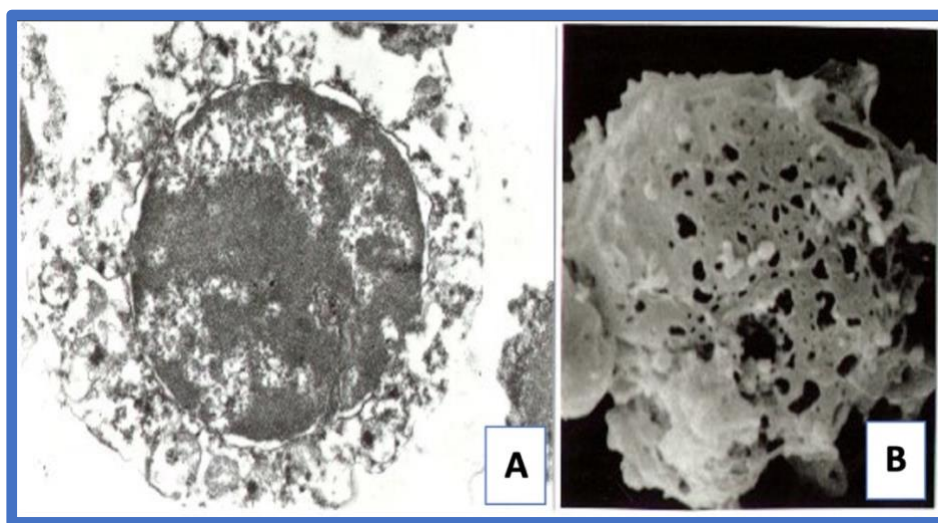


Ilustración 10. Muerte celular por necrosis.

A microscopía electrónica. B microscopía de barrido

La apoptosis y la necroptosis no son mutuamente excluyentes y pueden coexistir en muchas condiciones patológicas renales [74], [91]–[93]. La aparición y proporción de células muertas por cada uno de estos dos mecanismos depende del estímulo, la intensidad del evento desencadenante o de la propia la susceptibilidad celular. Alternativamente, la apoptosis puede causar necrosis secundaria, como ante una lesión renal prolongada en el tiempo, en cuyo caso la membrana plasmática de las células apoptóticas se rompe, adquiriendo así una morfología necrótica [74].

3.2.1 TIPOS DE NECROSIS REGULADA (NR)

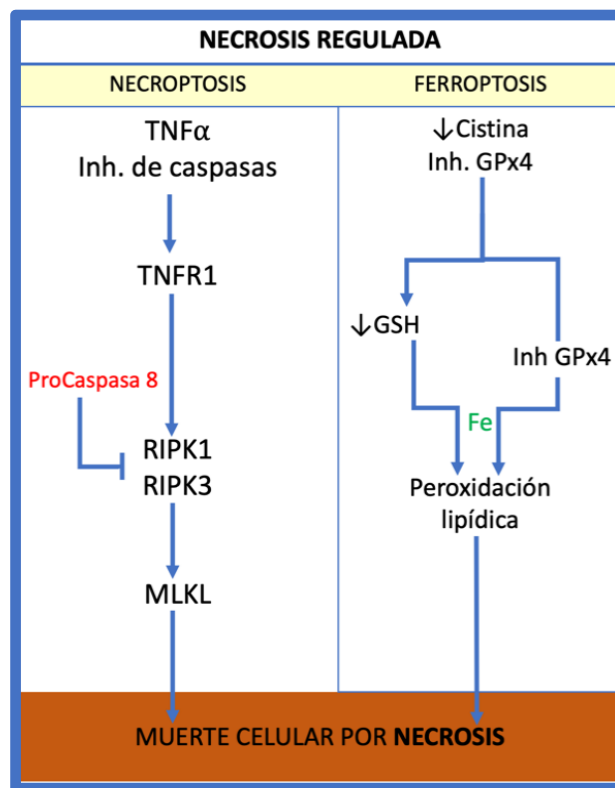


Ilustración 11. Principales vías de muerte celular por necrosis regulada: necroptosis y ferroptosis.

Necroptosis: su mecanismo más conocido implica la activación del TNFR1 y la inhibición de la Caspasa-8, de otra manera la célula moriría por apoptosis. RIPK1 y RIPK3 (del inglés "Receptor-Interacting Protein Kinase"). La proteína de dominio de quinasa de linaje mixto (MLKL, del inglés "Mixed Lineage Kinase domain Like pseudokinase").

Ferroptosis: muerte celular por agotamiento de GSH (glutación) o inactivación de la GPx4 (glutacion peroxidasa) se promueve la peroxidación lipídica, catalizada por ion Fe.

En los últimos años, varios estudios funcionales preclínicos han demostrado que la NR juega un papel clave en el daño renal asociado a las diferentes causas de FRA. El

interés por conocer estas vías de muerte celular implicadas en el FRA radica en la posibilidad de interferir farmacológicamente para bloquearlas o minimizarlas como causa de daño renal asociado en situaciones de riesgo, como en pacientes sometidos a cirugía cardíaca o TR [75]. Numerosas evidencias destacan la necroptosis y ferroptosis como formas de NR con más relevancia en el daño renal por IR (**Ilustración 11**) [76], [94]–[96]. La contribución del resto de vías de NR está menos establecida.

Repasaremos las vías de NR más frecuentemente relacionadas con daño IR renal:

3.2.1.1 NECROPTOSIS

La necroptosis es la NR mejor caracterizada. Se ha demostrado en el contexto del daño tisular por IR en varias situaciones: sepsis, colitis, pancreatitis y accidente cerebrovascular [97]. También es un mecanismo de muerte celular implicado en la defensa frente al cáncer e infecciones virales [98], [99]. Algunos virus expresan inhibidores de la caspasa-8, probablemente con el objetivo de evitar la respuesta apoptótica defensiva del huésped. Una vía alternativa de defensa frente a estos patógenos es inducir la muerte celular vía necroptosis [100]. A nivel renal, la muerte celular por necroptosis se ha relacionado de forma directa con la nefrotoxicidad por cisplatino, adriamicina y CsA, así como especialmente con el daño renal por IR y en el TR [92].

A nivel molecular la necroptosis se caracteriza por la fosforilación y activación secuencial de sus componentes. La activación de los receptores de muerte de la superfamilia del TNF (**Ilustración 11**) provocan la fosforilación y activación de la quinasa RIPK1 (del inglés *“Receptor-Interacting Protein Kinase”*) que a su vez activa a RIPK3 y ésta a la pseudoquinasa MLKL (del inglés *“Mixed Lineage Kinase domain Like pseudokinase”*) [101]. La fosforilación de MLKL desencadena su oligomerización en la membrana plasmática donde se une a fosfolípidos con carga negativa favoreciendo la permeabilización de la membrana y su posterior ruptura, aunque los mecanismos que producen la discontinuidad de la membrana plasmática no están del todo definidos [74], [89]. Por otro lado, la activación de RIPK1 y RIPK3 provoca un aumento de especies reactivas de oxígeno (EROs) a través de la activación de las oxidasas NADPH, o un aumento de la producción de oxidantes mitocondriales

La necroptosis requiere una baja expresión o activación de la caspasa-8 [101]. Como se ha demostrado recientemente, RIPK1 se inactiva mediante escisión proteolítica gracias a la caspasa-8 [102].

La necroptosis se puede inhibir con inhibidores específicos para cada uno de sus componentes RIPK1, RIPK3 y MLKL, aunque el abordaje más estudiado ha sido la inhibición de RIPK1 con la necrostatina 1 (Nec-1), con potencial utilidad para diversas patologías en los sistemas cardiovascular, neurológico, digestivo, renal e inmune [103].

3.2.1.2 FERROPTOSIS

Se trata de una forma de muerte celular, del grupo de NR, que se desencadena por la alteración del ambiente intracelular. Se produce por una severa peroxidación lipídica de manera hierro dependiente [104], [105]. Fue descrita por primera vez como una forma de muerte inducida por la pequeña molécula de erastina, un inhibidor de la importación de cistina, que provoca depleción de glutatión (GSH) y la inactivación de la glutatión peroxidasa 4 (GPx4) [94], [104]. Esta vía de NR se puede inhibir mediante la molécula antioxidante ferrostatina-1 [94].

El eje GSH-GPx4 es el único sistema responsable del que dispone la célula para la reparación eficiente de fosfolípidos oxidados, actuando como regulador de la muerte por ferroptosis [106]. El GSH reducido es un importante antioxidante celular. Se sintetiza a partir de glutamato, cisteína y glicina por las enzimas citosólicas dependientes de ATP (glutamato-cisteína ligasa y la glutatión sintetasa) [105], [107]. El GSH es el sustrato esencial para mantener la actividad de GPx4, una enzima que protege las células contra la oxidación lipídica, convirtiendo los hidroperóxidos lipídicos (L-OOH) potencialmente tóxicos en alcoholes lipídicos no tóxicos (L-OH) [108], [109].

El agotamiento de GSH, o la inactivación de GPx4, tiene como resultado la peroxidación de fosfolípidos, lo que conduce a la pérdida de la integridad de membrana plasmática. Otra forma de inducir ferroptosis es reducir la actividad GPX4 con inhibidores químicos como el RSL3 o mediante delección génica [110], [111].

La ejecución de la ferroptosis sólo se puede realizar cuando los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, del inglés "*PolyUnsaturated Fatty Acids*") susceptibles de

peroxidación, como el ácido araquidónico, estén presentes en una concentración suficiente en la membrana de las células diana [109], [112] (**Ilustración 11**).

La muerte celular ferroptótica es catalizada por hierro, elemento necesario para la acumulación de peróxidos lipídicos. El hierro es capaz de reaccionar con oxígeno y generar EROs que participarán en la peroxidación lipídica a través de una reacción química conocida como *reacción de Fenton* [113]. Este proceso puede ser suprimido por quelantes de hierro, antioxidantes lipofílicos, inhibidores de la peroxidación de lípidos y agotamiento de ácidos grasos poliinsaturados [105].

3.3 MUERTE DE LAS CÉLULAS TUBULARES POR IR

La muerte de células tubulares, tanto por vía de la apoptosis como de necrosis, es una característica central del daño renal por IR. Clásicamente, la pérdida de células renales en el periodo postisquémico del FRA se ha atribuido a la necrosis. La apoptosis podría contribuir al daño renal, especialmente en el periodo de reperfusión y en zonas limítrofes al tejido isquémico, donde la lesión es menos grave. La actividad apoptótica aparece con periodos de isquemia cortos, se incrementa a medida que el periodo de isquemia se prolongaba, a la par que la muerte por necrosis resultaba más evidente [114].

La investigación de estos procesos de muerte celular secundaria a IR es técnicamente muy compleja, tanto a nivel clínico como experimental. La heterogeneidad de los tipos celulares estudiados, las diferencias entre los órganos y sistemas, la diversidad de los patrones de muerte y la exacerbación del daño tisular causado por la inflamación, son solo algunas de las variables que condicionan su conocimiento [115].

Los eventos celulares que siguen al daño por IR y FRA todavía están mal caracterizados. En los últimos años se ha visto que la NR también participa en los mecanismos de muerte asociados al daño renal por IR, proporcionando nuevas vías que podría ser susceptibles de intervención farmacológica. En concreto la activación de la ferroptosis y la necroptosis puede jugar un papel clave en diferentes formas de FRA, incluido el FRA por IR.

La Nec-1, un inhibidor de RIPK1, ha demostrado a nivel experimental tener efecto nefroprotector en el daño renal por IR al inhibir la muerte por necroptosis [95]. Los estudios in vitro apuntan hacia a una sensibilidad celular renal individualizada a la necroptosis, siendo las células tubulares y endoteliales glomerulares más susceptibles que las células mesangiales o los podocitos [116]. A nivel experimental se ha sugerido que la reducción de la necroptosis en riñones para trasplante podría tener impacto en la función y supervivencia del TR, ya que el RIPK3 tiene un papel importante en el daño renal por IR [117]. La detección inmunohistológica de MLKL fosforilada (pMLKL) es un método lógico para evaluar la necroptosis en riñones humanos afectados por daño IR, aunque actualmente carecemos de anticuerpos debidamente validados para realizar esta determinación [76]. La proteína citosólica CypA, que se libera precozmente en la necroptosis, podría ser un buen marcador para determinar este tipo de muerte celular así como otros procesos de lesión en los que la integridad de la membrana esté comprometida [80].

La inhibición de la ferroptosis también ha tenido un efecto protector en modelos experimentales de FRA incluidos modelos de IR [118]. En un modelo murino de IR severa el tratamiento con ferrostatin-1 redujo la lesión tubular y mejoró la función renal. Además, la inhibición combinada de necroptosis, MPT-RN y ferroptosis ofrecieron una protección completa, siendo más eficaz que la monoterapia, Esto sugiere que las tres vías cooperan en la inducción de FRA bajo IR [94].

4 EL RIÑÓN Y LA ISQUEMIA-REPERFUSIÓN

La agresión por IR se presenta en cualquier entidad patológica que provoque un compromiso en el suministro de sangre a un órgano o tejido y que posteriormente sea restaurado.

La lesión por IR ocurre en el riñón cuando se interrumpe o reduce drásticamente el flujo sanguíneo a una parte o a todo el órgano, seguido por el restablecimiento de la perfusión. La IR renal aparece con frecuencia en la práctica clínica y es una causa común de daño renal y FRA. Esta agresión puede ser originada por una variedad de eventos

vasculares, como son la embolia, trombosis, shock circulatorio, hipotensión severa, CCN para tratamiento de un tumor renal, extracción y preservación de órganos para TR, y una amplia gama de otros insultos o agresiones al riñón.

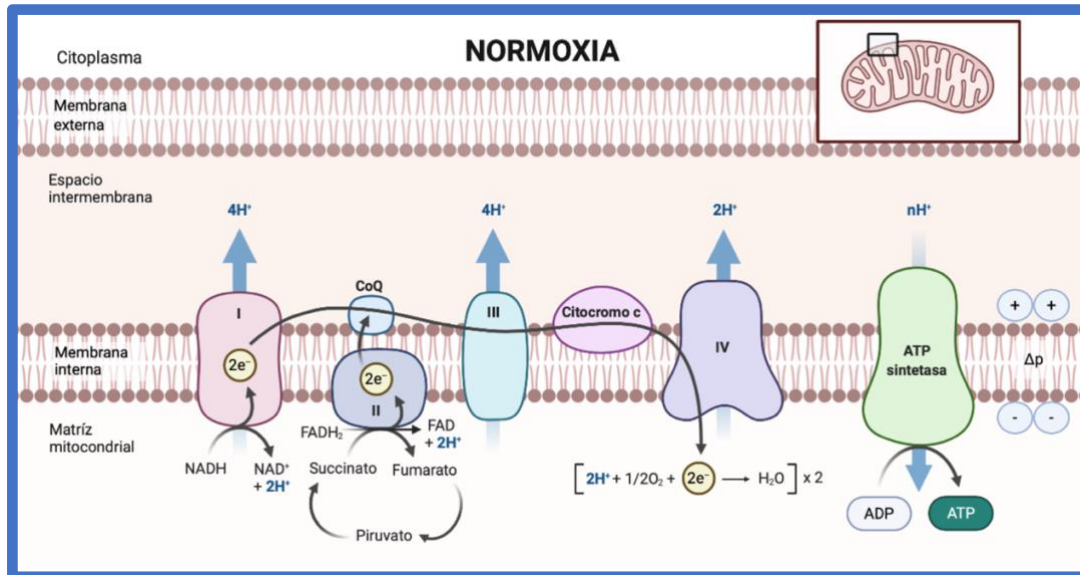


Ilustración 12. Cadena transportadora de electrones mitocondrial en normoxia.

Mitocondria: Esquema en situación de **normoxia**. La cadena transportadora de electrones transfiere electrones de NADH y FADH₂ a O₂ a través de reacciones redox. En este proceso el H⁺ es bombeado fuera de la mitocondria generando gradiente de protones que promueve la producción de energía (ATP) por la ATP-sintetasa. Cadena transportadora de electrones: complejo I, complejo II, CoQ (conenzima Q), complejo III, citocromo c (CitC), complejo IV y ATP-sintetasa.

El daño por IR es un proceso dinámico complejo, con una respuesta vigorosa de estrés inflamatorio y oxidativo a la hipoxia y a la reperfusión, que provoca disfunción y muerte celular, causando daño renal. La IR puede provocar una disminución rápida de la función, definida clínicamente como FRA, elevando la morbilidad y mortalidad del proceso clínico subyacente. El pronóstico a corto y largo plazo del paciente varía según la reversibilidad y capacidad de recuperación de la lesión causal. Del mismo modo, la magnitud de la disfunción renal resultante de estas condiciones y su reversibilidad dependerá de la duración de la anoxia y la temperatura del órgano, oscilando entre la ausencia de síntomas visibles hasta el FRA [114], [119], [120]. El FRA puede predisponer

al desarrollo de ERC y esta, en su fase terminal (ERCT), precisar tratamiento sustitutivo de la función renal de forma indefinida.

4.1 ISQUEMIA

La primera consecuencia inducida por la isquemia es la disminución del suministro de oxígeno. La hipoxia resultante de la disminución del flujo sanguíneo reduce en la célula la llegada de nutrientes y la eliminación de productos de desecho que causan una ruptura en el metabolismo energético, disfunción endotelial y epitelial, edema, generación de EROs y aumento del calcio intracelular, así como activación de fosfolipasas, proteasas y endonucleasas [10], [115], [121].

Las células de los mamíferos tienen la capacidad intrínseca de detectar el nivel de oxígeno y activar mecanismos protectores frente a la hipoxia [122]. La merma del suministro de oxígeno inducirá un cambio en el metabolismo de la glucosa pasando de aeróbico a anaeróbico. El metabolismo anaeróbico disminuye la producción intracelular de ATP y reduce el pH debido a la generación de lactato [89]. Las células rebajan su metabolismo oxidativo, agotando por tanto su reserva de ATP [74]. La falta de energía provoca desacople ribosomal, y por consiguiente reducción de la síntesis de proteínas [123]. A los 10 minutos de la oclusión de la arteria renal, la concentración renal de ATP disminuye a alrededor del 20% de los valores basales [124], [125]. El metabolismo anaeróbico resulta insuficiente para satisfacer la demanda del tejido aeróbico [126] y, la falta de oxígeno incrementará el consumo de ATP en la mitocondria en un intento de mantener el potencial de membrana, comprometido por la inhibición de la cadena transportadora de electrones [127] (**Ilustración 13**).

En el lisosoma, los niveles bajos de ATP y pH provocan la desestabilización de la membrana, fuga de enzimas, descomposición del citoesqueleto e inhibición de la actividad ATPasa Na^+/K^+ unida a la membrana, lo que causará un daño en la estructura celular [89], [128]–[130]. Este último proceso provoca acumulación intracelular de Na^+ y agua, con la consiguiente inflamación celular [126], [129], [130]. A medida que se acumula Na^+ , el transportador $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ deja de bombear calcio fuera de la célula y comienza a trabajar en dirección inversa [126], [131]. Los niveles de Ca^{2+} intracelular aumentarán aún más por la inhibición de su recaptación en el retículo endoplasmático

al agotarse el ATP [132]. En conjunto, todos estos fenómenos producen una sobrecarga de Ca^{2+} y estimularán la activación de proteasas, como las calpaínas, que permanecen inhibidas por el bajo pH intracelular durante la isquemia, pero que se activarán al normalizarse el pH en la reperfusión [89], [131].

El aumento de los niveles intracelulares de Na^+ y Ca^{2+} provocan que la mitocondria retenga calcio en la matriz mitocondrial. La sobrecarga de calcio junto con los radicales libres, daña las mitocondrias, reduce la respiración celular y está directamente involucrada en la generación de EROs durante el periodo de isquemia [133], favoreciendo la dislocación del CitC de la membrana interna mitocondrial, el primer paso en el proceso de apertura del mPTP (del inglés "*mitochondrial Permeability Transition Pore*") [126], [134]. Durante la isquemia, el bajo pH intracelular impide la apertura de mPTP inducida por Ca^{2+} . En el momento de la reperfusión, al normalizarse los valores de pH, se abrirá el mPTP, un hecho que finalmente se relaciona con la muerte celular [135], [136].

Durante el tiempo de isquemia se generan cantidades relativamente pequeñas de EROs en comparación a las que se producen después, en el momento de la reperfusión [137]. En isquemia se reduce el ATP a monofosfato de adenosina, que se degradará a hipoxantina. La hipoxantina se acumula en la célula al no disponer de oxígeno para finalizar su metabolismo a xantina [130]. Otras fuentes de EROs durante la fase de isquemia son la acumulación intracelular de hierro, por la inhibición de la unión a sus proteínas transportadoras (transferrina, ferritina), o el desacople enzimático de óxido nítrico sintetasas (ONS), que dejan de reducir arginina para producir óxido nítrico (ON) en presencia de tetrahidrobiopterina y oxígeno [138] y la activación directa de la xantina oxidasa y la NADPH oxidasa [139], [140]. Este aumento en la producción de EROs puede jugar un papel importante en la muerte, ya sea actuando como moléculas de transducción de señales, disminuyendo la actividad de las enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa y GPx4) o causando daño celular directo. Las EROs activan el proceso de la apoptosis en varios puntos. Además, la hipoxia inhibe la expresión del complejo IV del citocromo oxidasa, el aceptor final de electrones, que provocará una mayor producción de EROs tras la reperfusión [139].

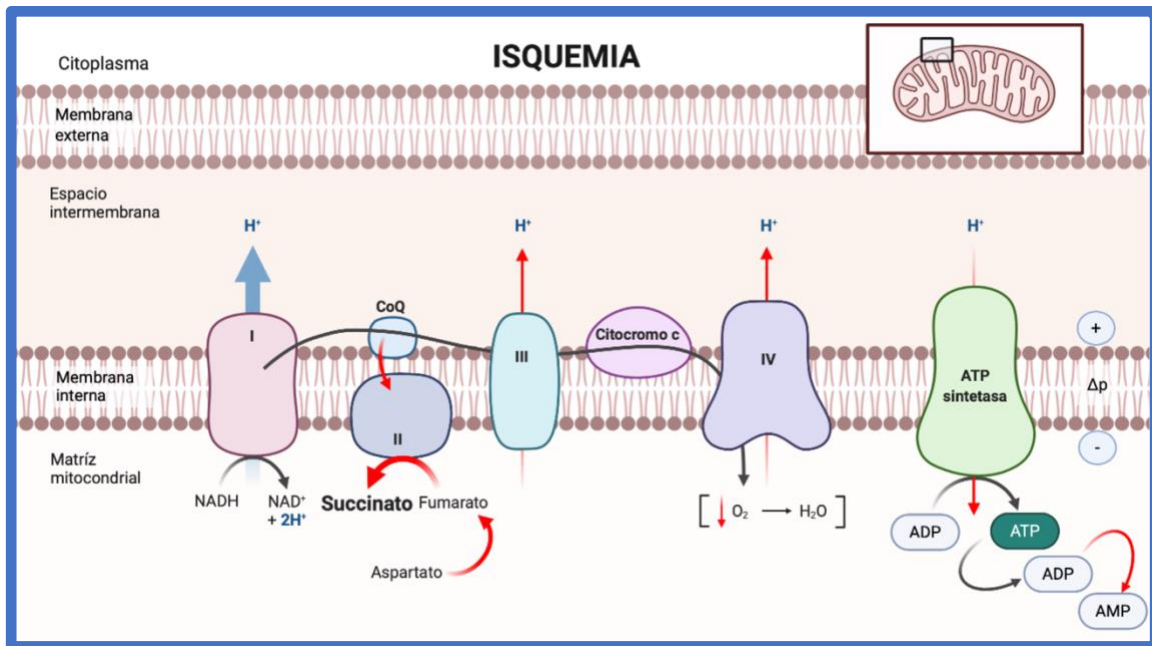


Ilustración 13. Cadena transportadora de electrones mitocondrial en hipoxia.

Mitocondria. Esquema en situación de **isquemia (hipoxia)**. En ausencia de O_2 como aceptor, la cadena transportadora de electrones se paraliza al bajar la concentración de transportadores y sustancias donantes de electrones. La CoQ y NADH se reducen. Inicialmente se compensa a través de la oxidación de fumarato a succinato.

Un entorno hipóxico estimula la transcripción de genes implicados en la angiogénesis, eritropoyesis y metabolismo energético anaeróbico. Se cree que el factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF-1, del inglés "*Hypoxia Inducible Factor-1*"), es el principal mecanismo de defensa en situaciones de déficit de oxígeno, controlando la respuesta celular, regulando varios genes implicados en el ciclo y metabolismo celular [141], [142].

HIF-1 se compone de dos subunidades: una subunidad HIF-1 α , sensible al oxígeno, y una subunidad HIF-1 β , expresada de forma constitutiva. Bajo condiciones de hipoxia se expresa HIF-1 α y en el núcleo se une a HIF-1 β activando la expresión de los genes diana. Hay tres isoformas de la subunidad α , pero solo dos de ellas son importantes en el riñón [143]; HIF1 α , que se expresa predominantemente en células tubulares, y HIF2 α , que se encuentra casi exclusivamente en células intersticiales, endoteliales y fibroblásticas [144]. En condiciones normóxicas, HIF-1 α es hidroxilado y proteolizado mientras que en hipoxia la hidroxilación se suprime. HIF-1 α escapa a la destrucción

proteosómica, lo que permite su translocación al núcleo y la dimerización con HIF1 β , regulando la expresión de más de cien productos génicos implicados en la adaptación para la supervivencia celular [143]. En modelos experimentales, HIF-1 α juega un papel protector en el modelo de FRA isquémico, al reducir la lesión de los túbulos y proteger la lesión de los glomérulos renales [145].

4.2 REPERFUSIÓN

Tras restaurar el flujo sanguíneo, se observa tanto un aumento de los niveles de oxígeno como una normalización del pH extracelular y ambas situaciones son perjudiciales para las células previamente sometidas a isquemia. Las células, al final del periodo de isquemia, tienen un pH intracelular bajo, daño mitocondrial inducido por Ca²⁺ (sensibilización a mPTP), reducción de las defensas antioxidantes e inhibición del complejo CitC IV de la cadena transportadora de electrones (**Ilustración 13**).

Con la reperfusión, la rápida normalización del pH extracelular crea de forma instantánea un gradiente extremo de H⁺ a través de la membrana plasmática, que desencadena intercambio Na⁺/H⁺ y una entrada masiva de Na⁺ [132], que provoca la inversión en el intercambiador de Na⁺/Ca²⁺, aumentando la sobrecarga de Ca²⁺ intracitoplasmático y mitocondrial, que ya había provocado la apertura del mPTP. La normalización de pH intracelular activa las calpaínas y favorece aún más la apertura del mPTP. Una vez activadas, las calpaínas hidrolizan proteínas provocando deterioro estructural, disfunción mitocondrial, alteración en el manejo del Ca²⁺ y, en última instancia la muerte [131].

Con la reoxigenación también se activa la xantina oxidasa que convierte la hipoxantina en xantina, lo que produce radicales libres de oxígeno que atacan y destruyen la estructura de la membrana celular. El succinato acumulado se reoxida rápidamente, gracias a la succinato deshidrogenasa, lo que impulsa la generación extensa de EROs mediante el antiporte de electrones en el complejo mitocondrial I, y una reducción de las defensas antioxidantes [139], [146]–[148] (**Ilustración 14**).

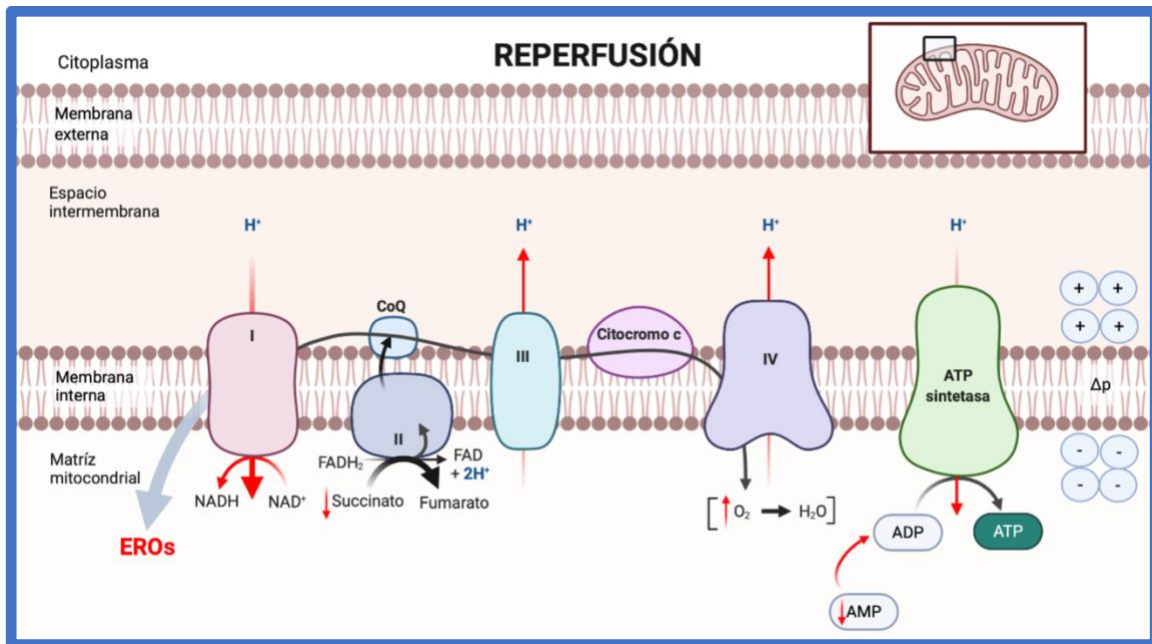


Ilustración 14. Cadena transportadora de electrones mitocondrial en reperfusion.

Mitocondria. Esquema en situación de **reperfusion**. El succinato acumulado durante la fase previa de isquemia será rápidamente oxidado, mientras se mantiene el pool de CoQ reducido. Se genera un medio favorable para invertir la cadena transportadora de electrones “antiporte” y generar de forma extensa EROs.

La enorme cantidad de EROs producidos en la mitocondria es responsable de la carbonilación de proteínas y la peroxidación lipídica, lo que contribuye al daño celular en membrana, citoesqueleto y ADN [8], [147]. Juntos, el estallido de EROs y el alto contenido de Ca^{2+} mitocondrial, desencadenarán la apertura de mPTP creando poros en la membrana mitocondrial interna [8]. Estos poros permiten que el agua y los solutos (<1,5 KDa) penetren en la matriz mitocondrial, causando inflamación y edema que provoca la ruptura de la membrana externa [135]. La ruptura de la membrana mitocondrial libera el CitC, succinato y ADN mitocondrial, sustancias capaces de inducir la muerte celular [89]. La apertura de mPTP equilibra las concentraciones de Na^+ a ambos lados de la membrana interna, eliminando la fuerza del impulso de la ATP sintetasa [136]. Una vez abierto, el mPTP conduce a la muerte a través de diferentes vías, como la apoptosis, necrosis o autofagia [8], [149].

5. ISQUEMIA-REPERFUSIÓN A NIVEL CELULAR

La agresión de IR tendrá repercusión sobre la función renal según el grado de muerte celular que ocasione. La isquemia puede provocar muerte celular de forma directa, sin embargo, muchas otras morirán de forma diferida tras la reperfusión. A pesar de todas las alteraciones descritas anteriormente en la homeostasis del medio interno, mueren pocas células durante el periodo isquemia en comparación con la pérdida observada tras la reperfusión. Esta afirmación es ratificada a través de modelos experimentales de IR en miocitos que demuestran que el 4% de la muerte celular se produce tras 1h de isquemia, el 17% tras 4h de isquemia, mientras que el 73% de las células que se pierden lo harán después de 3h de la reperfusión [150].

El FRA ocasionado por la agresión de IR tiene un sustrato histológico; lesión en células endoteliales y epiteliales con pérdida del borde en cepillo del túbulo proximal, lesión parcheada irregular de células tubulares, áreas focales de dilatación del túbulo proximal y acumulación en el túbulo distal de moldes de proteínas. También se objetivan cambios en el flujo sanguíneo local, reacción inflamatoria e inmunológica, junto con áreas de regeneración celular que aparecen en la fase de recuperación de la función renal [151], [152].

Repasaremos a continuación los cambios que la lesión de IR ocasiona en las células epiteliales del riñón:

5.1 CÉLULAS EPITELIALES

El daño a la célula tubular representa el evento final que explica en gran parte la fisiopatología del FRA isquémico [10]. El sistema tubular de la nefrona está formado por células epiteliales altamente especializadas en el control de la excreción de agua, electrolitos y otros solutos orgánicos para el mantenimiento de la homeostasis corporal. Todos los segmentos de la nefrona pueden afectarse durante la agresión isquémica, aunque el túbulo proximal es la zona más susceptible. El daño isquémico en el FRA es generalmente más severo el segmento S3 del túbulo proximal y la rama ascendente gruesa del asa de Henle [9] (**Ilustración 1**). Las células tubulares son especialmente vulnerables ya que tienen una tasa metabólica elevada, necesaria para mantener el

transporte iónico, y una limitada capacidad para realizar glucólisis anaeróbico. La congestión tisular derivada de la lesión de IR empeora el peculiar flujo sanguíneo a nivel de la franja externa de la médula, donde se encuentra el segmento S3 del túbulo proximal, incluso cuando el flujo sanguíneo cortical se ha normalizado [153].

La lesión característica asociada al daño isquémico es la pérdida del borde en cepillo de las células del túbulo proximal. Igualmente se produce una disrupción de las moléculas de adhesión (integrinas) y otras proteínas de membrana, que provocan la muerte y despegamiento de las células de la membrana basal [153], [154]. La descamación celular provoca la aparición de cilindros y agregados de detritus celulares en la luz tubular, que obstruyen y aumentan la presión intratubular reduciendo notablemente la TFG de la nefrona afectada [10], [152]. Los túbulos contorneados distales de múltiples nefronas drenan en un solo túbulo colector, por lo que la obstrucción de un número relativamente pequeño de túbulos colectores puede provocar el cese de la filtración en un gran número de nefronas [155], siendo por tanto un factor a tener en cuenta como reductor de la TFG tras la reperfusión.

6. LA LESIÓN RENAL POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN (IR) EN LA CIRUGÍA RENAL

La lesión en un órgano por IR es una condición patológica que se puede presentar de forma súbita, como ocurre en el accidente cerebrovascular o el infarto agudo de miocardio. El tratamiento se limita a dar soporte y realizar maniobras que permitan reestablecer el flujo sanguíneo al órgano lesionado, ya sea mediante fármacos o trombolisis mecánica. El objetivo terapéutico en estas circunstancias es reducir el área lesionada y paliar los síntomas derivados en el órgano de la zona infartada.

Cuando la isquemia se presenta de forma electiva, p. ej. sobre el riñón en procedimientos quirúrgicos que precisen clampaje arterial como son la CCN o el TR, se puede anticipar la lesión isquémica y las consecuencias derivadas de ésta. Sin embargo, actualmente no existe ninguna técnica o fármaco que pueda administrarse antes de una lesión isquémica que pueda preparar al riñón y evitar el FRA [119], [143], [156]. No obstante, detectar pacientes de riesgo antes de que se produzca el daño renal podría

reducir la incidencia y gravedad del FRA, según se pone de manifiesto en el estudio “PrevAKI” [157]. En este trabajo, realizado en pacientes sometidos a cirugía cardiaca con alto riesgo de padecer FRA, el establecimiento de “medidas KDIGO” redujo la incidencia de FRA frente al grupo control manejado de manera convencional (55,1% Vs 71,7%) OR 0,483 (IC 95% 0,293-0,796) (p=0,004). Estas medidas se instauran antes de la aparición del FRA, optimizando de manejo de volumen y la hemodinámica, evitando nefrotóxicos, previniendo la hiperglucemia y vigilando de forma estrecha la diuresis y sCr.

La isquemia prolongada seguida de reperfusión conducirá a la muerte de todos los tipos de células renales. Si la agresión es demasiado grave el órgano no se recuperará de la lesión inicial. Sin embargo, si la isquemia es leve, la pérdida celular inicial contribuye al establecimiento de FRA, pero serán los eventos que ocurren las horas o días posteriores los que extenderán el daño de IR, condicionando la gravedad del FRA y el resultado a largo plazo.

El FRA isquémico se asocia a necrosis tubular aguda, reducción de la TFG, elevación de los niveles de sCr y/o oliguria [154]. Esto se acompaña de una reducción de la presión de filtración glomerular asociada a un aumento del tono y reactividad vascular renal, con una pérdida de su capacidad autorreguladora y obstrucción tubular [158]. Los efectos perjudiciales de la isquemia son más evidentes en pacientes con comorbilidades, disfunción renal, edad avanzada, sexo masculino, monorrenos o que tienen un tumor renal de mayor volumen [159], [160].

La proliferación celular está detrás de la reparación de un riñón lesionado por IR [161]. El riñón, a diferencia del corazón o cerebro, tiene la capacidad de reemplazar las células epiteliales perdidas, si la agresión fue subletal. Existe controversia sobre qué tipo celular es el responsable de esta regeneración en respuesta a la IR [152]. Las células tubulares supervivientes, las del estroma de la médula ósea, las intrarrenales progenitoras o intersticiales podían ser las responsables de la reparación tras un FRA. En el pasado se han encontrado evidencias a favor de la participación de todas estas células [152], pero técnicas recientes de mapeo genético en ratones transgénicos han demostrado que las células tubulares supervivientes son las responsables de la reposición del epitelio tubular tras la isquemia [162]. Después del daño por IR, las células

tubulares remanentes se desdiferencian, perdiendo su polaridad y borde en cepillo, y migran al sitio de la lesión donde proliferan para restaurar el número total de células. Las nuevas células se diferencian en células polarizadas funcionales [163]. Si la lesión por IR es leve, la recuperación de la función será completa, sin embargo, si la lesión es extensa, el proceso de reparación será anormal, lo que provocará atrofia tubular y fibrosis, responsables finales de ERC. El FRA isquémico puede provocar una reparación tubular incompleta, inflamación crónica e hipoxia que conducen a la proliferación de fibroblastos y al depósito excesivo de matriz extracelular, dos características de la fibrosis tisular.

6.1 CIRUGÍA CONSERVADORA DE NEFRONAS (CCN)

6.1.1 INDICACIÓN Y OBJETIVO

La CCN, ya sea mediante cirugía abierta o mínimamente invasiva, ha reemplazado a la nefrectomía radical como tratamiento *“gold standard”* del tumor renal localizado. La CCN es el tratamiento de elección de los tumores renales con estadio clínico T1a-b, y sus indicaciones se han ampliado recientemente para incluir tumores T2 cuando es técnicamente posible [164].

La CCN tiene un triple objetivo; preservación funcional, márgenes quirúrgicos negativos y recuperación de la cirugía sin complicaciones. La consecución simultánea de los tres objetivos en un mismo paciente se considera un resultado *“trifecta”* [165]. El objetivo *“trifecta”* se debe perseguir durante la CCN, a pesar de la complejidad del tumor o el abordaje quirúrgico elegido (abierto, laparoscópico o robótico). Recientemente se ha introducido el término *“pentafecta”*, que añade al triple objetivo previo la preservación de >90% de la función renal basal y la no progresión a ERC en los 12 meses siguientes a la cirugía [166]. Muchas masas renales sometidas a tratamiento quirúrgico tienen un potencial oncológico bajo, por ese motivo el impacto sobre la función renal de la CCN es determinante para incrementar la supervivencia general.

6.1.2 EVALUACIÓN PREOPERATORIA

6.1.2.1 ANATOMÍA Y NEFROMETRÍA

Los datos de nefrometría informan al cirujano de la dificultad técnica de la CCN de manera estandarizada, objetiva y reproducible, minimizando la variabilidad entre observadores y mejorando la transmisión de la información clínica y académica [167]. Se fundamentan en la anatomía renal y tumoral, y se calculan a partir de las imágenes preoperatorias, describiendo las características de la masa renal y la relación con las estructuras adyacentes. Las puntuaciones nefrométricas se han correlacionado con el tiempo de isquemia, el tiempo de cirugía, el sangrado intraoperatorio, las complicaciones y la probabilidad de conversión de CCN a nefrectomía radical [2].

Existen varios sistemas nefrométricos de puntuación: RENAL [168], PADUA [169], C.Index (del inglés *“Centrality Index”*) [170], DAP [171], NePhRO [172], CSA (del inglés *“Contact Surface Area”*) [173], MAP (del inglés *“Mayo Adhesive Probability”*) [174], ABC (del inglés *“Arterial Based Complexity”*) [175] y RPS (del inglés *“Renal Pelvic Score”*) [176].

6.1.3 FUNCIÓN RENAL

El FRA es una complicación importante después de cirugía renal, con una incidencia que oscila entre el 5,5% y el 34% [28]. Muchos factores influyen en los resultados funcionales tras la CCN, como la función renal preoperatoria, la comorbilidad, la edad (>70 años), el sexo, el tamaño del tumor, el porcentaje de parénquima renal preservado y el tiempo de isquemia [160], [177], [178]. Hasta el momento, no disponemos de un algoritmo o curva dosis-respuesta que permita predecir el riesgo de FRA y ERC en pacientes sometidos a isquemia renal.

Los factores a evaluar en el preoperatorio que están relacionados con la función renal residual tras la CCN son cuatro [179]:

- **Proteinuria:** se asocia con la progresión de la ERC con una relación directa, a mayor proteinuria mayor reducción de la TFG y más riesgo de progresión a ERCT.
- **Tensión arterial:** muchos pacientes con ERC también tienen hipertensión, posiblemente debido a una mayor tasa de hipertensión esencial o porque la propia ERC empeora el control de la presión arterial.

- **Dislipemia:** es otro factor de riesgo conocido y frecuente de enfermedad cardiovascular. Se ha demostrado que el tratamiento con estatinas es beneficioso en prevención primaria y secundaria en pacientes con sCr normal y TFG estimado de 50-59ml/min/1,73m².
- La **estimación de TFG preoperatoria** debe ser parte integral del estudio del paciente, y un dato a considerar en la toma de decisiones respecto a la planificación de la estrategia quirúrgica en tumores renales, independientemente del tamaño tumoral [160], [180]. Hasta un 25% de los pacientes con sCr normal tienen al menos una ERC moderada (TFG estimado <60ml/min/1,73m²) [160], [180]. La determinación de la TFG mediante el aclaramiento de creatinina en orina de 24 horas, o la simple estimación a través de fórmulas específicas, refleja con mayor precisión la función renal que la sCr [181]. No obstante, el criterio para evaluar la función renal en numerosos trabajos publicados sobre CCN ha sido únicamente la sCr y tener el riñón contralateral sano, un método considerado como impreciso [181], [182].

6.1.3 INTRAOPERATORIO

Los dos principios que se deben considerar durante la CCN con el fin de optimizar los resultados funcionales son dos, maximizar la preservación de parénquima sano y minimizar el tiempo de isquemia [2], [181], [183].

La cantidad y la calidad del parénquima renal conservado en la CCN son variables relacionadas con la función renal tras la cirugía [181], [184], [185]. En un estudio publicado por Mir et al. donde a través de un cálculo volumétrico mediante TAC determinaron que la pérdida de función renal postoperatoria está relacionada con el volumen preservado de parénquima, dejando el tiempo de isquemia como una variable secundaria [186]. El tiempo de isquemia no parece por tanto ser el factor más importante relacionado con la función renal tras la CCN.

Con frecuencia, durante la CCN se precisa de la oclusión temporal de los vasos renales para limitar el sangrado intraoperatorio, mejorar la visualización del tejido, el acceso a las estructuras intrarrenales, facilitar la resección completa del tumor y permitir un cierre más fácil del parénquima [180], [182], [187]. Existen varias técnicas

de control vascular durante la cirugía. La experiencia, hábitos y preferencias del cirujano son determinantes a la hora de elegir una frente a otra, según reflejan las diferentes series publicadas. Algunos autores defienden el clampaje de rutina de arteria y vena [188], destacando la importancia de un campo quirúrgico exangüe para optimizar la escisión precisa y la reconstrucción del parénquima. No obstante, a día de hoy no parece haber ninguna diferencia, en términos de función renal o complicaciones, si se clampa solo la arteria renal o todo el pedículo en bloque [189], [190].

La función renal tras la CCN está condicionada por la compleja relación entre la calidad del parénquima renal antes de la cirugía, la cantidad del parénquima preservado y la capacidad de recuperación de la unidad renal ante la agresión isquémica [184].

6.1.4 POSTOPERATORIO

Los datos de función renal tras la CCN son importantes para determinar el riesgo de ERC y supervivencia a largo plazo.

Las complicaciones tras una CCN también se han relacionado con la función renal postoperatoria. El desarrollo de una fístula urinaria con urinoma e infección secundaria y abscesificación o una hemorragia postoperatoria que precise de una cirugía de urgencia y nefrectomía o una embolización percutánea son complicaciones que impactan sobre la función renal postoperatoria [191].

6.2 TRASPLANTE RENAL (TR)

6.2.1 TR Y DAÑO POR IR

En el trasplante de órganos sólidos, el daño tisular por IR es una agresión ineludible durante el proceso de extracción, preservación e implante que puede afectar a la función y supervivencia del injerto [192].

En la última década, la investigación del TR se ha centrado en el manejo de los pacientes postTR, especialmente en optimizar el tratamiento inmunosupresor. Sin embargo, probablemente podamos provocar un mayor impacto sobre los resultados del

órgano trasplantado si se pudiera reducir, o al menos minimizar, el daño provocado por el proceso de donación, es decir el daño de IR [89], [193].

El daño de IR como causa de FRA en el TR, comienza con los cambios fisiológicos asociados con la muerte del donante, que incluyen la hipoperfusión tisular y el estrés metabólico. La lesión continua durante los procedimientos de extracción, almacenamiento, transporte y preservación renal. Finalmente, termina con el implante y reperfusión, factores a los que habría que añadir las posibles complicaciones vasculares postquirúrgicas, la vasoconstricción derivada del tratamiento inmunosupresor y el compromiso en la perfusión tisular secundaria al edema intersticial, la inflamación y fibrosis [194]–[196].

Las consecuencias del daño de IR en el TR son inciertas. A corto plazo se ha relacionado con la *disfunción precoz del injerto* (DPI), y a largo plazo aumenta la incidencia de rechazo agudo y la disfunción crónica secundaria a hipoxia tisular, fibrosis intersticial, atrofia tubular e hiperfiltración por reducción de la masa nefronal funcionante [89], [196].

6.2.2 TIPOS DE ISQUEMIA: CALIENTE Y FRÍA

Desde el momento de la extracción del órgano en el donante y hasta el momento de la reperfusión en el receptor, el riñón está expuesto a isquemia, con dos procesos diferentes: isquemia caliente (IC) e isquemia fría (IF).

Definiremos la IC como el periodo entre el clampaje vascular y la perfusión con la solución de conservación en frío. En este periodo es donde se concentra el daño celular más evidente, al provocarse una interrupción abrupta del suministro de oxígeno, con la consiguiente reducción del metabolismo aeróbico. Las células renales no pueden soportar un tiempo largo de isquemia a temperatura ambiente. Esto supone un problema en el TR de donante cadáver (DC), ya que la fase de isquemia dura varias horas, el tiempo que se tarda en localizar al receptor, transportar el órgano y preparar a ambos para la cirugía. La solución adoptada para prolongar el tiempo de almacenamiento es enfriar el órgano a temperatura muy baja (4°C), fase de IF, siguiendo la norma de Van't Hoff: el enfriamiento reduce el metabolismo celular y por tanto el

requerimiento de oxígeno [197]. La conservación estándar del injerto renal en espera de implante es la hipotermia simple. Esta permite prolongar el tiempo de isquemia, aunque también ocasiona lesión directa del órgano, lo que no impide que siga siendo viable para su implante [198].

La conservación en frío reduce el metabolismo anaeróbico y la muerte celular, pero estos procesos no se detienen por completo. A 4°C todavía se mantiene el 10-12% de actividad metabólica celular, por lo que el daño ocasionado por la isquemia continúa incluso en IF. El tiempo de IF debe de ser lo más corto posible ya que el frío *per se* es perjudicial para los tejidos [199]. Cada hora que se incrementa la duración de la IF aumenta el riesgo de DPI en los órganos de DC un 10%, aunque esta relación solo se ha documentado cuando se superan las 18 horas de IF [200]. Una IF excesivamente prolongada se relaciona con una mayor mortalidad del receptor, afecta negativamente a la función precoz, se asocia con un aumento de la DPI e implica una mayor estancia hospitalaria, lo que incrementa los costes relacionados con el TR, a pesar de que no parece que afecte a la función a largo plazo [198], [200]–[202].

6.2.3 REPERFUSIÓN

En el momento de la reperfusión se produce una lesión adicional con el recalentamiento y la reoxigenación del órgano sometido a IF. Este proceso está dominado por una reacción inflamatoria que ya se había preparado durante la fase de isquemia. El proceso y los mecanismos de la lesión por reperfusión de los órganos sometidos a IF es similar a la que se ven sometidos a IC, aunque no hay estudios comparativos [198].

Se ha demostrado a nivel experimental que la IF se relaciona con daño a las células tubulares proximales con predominio de muerte por necrosis, con signos de inflamación mitocondrial y rotura de membrana [198]. Tras la reperfusión y normalización de la temperatura, hay un cambio en el tipo de muerte celular predominante hacia la apoptosis [203].

Tampoco podemos olvidar las complicaciones quirúrgicas del TR como causa de lesión por IR, como son la estenosis de la arteria o la trombosis venosa, al comprometer

el FSR y la oxigenación del injerto. La trombosis venosa en particular ya sea debido a un fallo técnico, trastorno de la coagulación o un rechazo hiperagudo, representa una emergencia en el postoperatorio del TR. Establecer el diagnóstico, así como identificar la causa subyacente, puede no ser sencillo y, a pesar de realizar una revisión quirúrgica urgente, provocar la pérdida del injerto. En el caso de realizar una revascularización exitosa, el injerto padecerá un daño severo, ya que habrá sufrido un tiempo de IC prolongado [195].

6.2.4 CONSECUENCIAS EN EL TR DEL DAÑO POR IR

El injerto tras el TR puede que funcione de forma inmediata; *función inicial* (FI). También es posible que no funcione inicialmente como se esperaba: la DPI ocurre especialmente en el DC, y se clasifica en *función lenta del injerto* (FLI), *disfunción retardada del injerto* (DRI) o en los casos más graves *no función primaria* (NFP) [204].

Debido a su compleja fisiopatología, es difícil encontrar una definición sencilla para todo el espectro de DPI. Una de las más frecuentemente utilizadas se fundamenta en la necesidad de diálisis tras el TR. Se manifiesta clínicamente como un continuo FRA conocido como DRI (requiere de al menos una sesión de diálisis durante la primera semana del TR) [205] o FLI (reducción de la sCr desde el TR hasta el séptimo día postquirúrgico en menos del 70%) [206]. Muchos aspectos de la función y estructura renal se restauran después de un daño de IR grave, mientras que otros aspectos del riñón se alterarán de forma permanente. Tanto DRI como FLI están asociados con mayor riesgo de nefropatía crónica del injerto y fibrosis [205], [207].

La NFP está definida como la ausencia de la reducción de sCr debido a una lesión celular irreversible, y supone una complicación grave, ya que los receptores de estos riñones han estado expuestos a los riesgos de la cirugía, la inmunosupresión y la sensibilización a antígenos del donante, limitando las oportunidades de optar a un nuevo TR.

La clasificación de los diferentes estados en el daño por IR en el TR tiene interés científico. La más utilizada es la necesidad de una sesión de diálisis durante la primera semana del TR. El criterio utilizado en estas clasificaciones tiene limitaciones: la decisión

sobre la necesidad de diálisis depende de la impresión clínica subjetiva, además de los datos objetivos de sobrecarga de potasio o hídrica. Otros factores como la función renal residual de riñones nativos o realizar el TR en situación previa a iniciar tratamiento sustitutivo, también pueden conducir a establecer una clasificación errónea o con grandes variaciones en las tasas de DPI comunicadas [204].

Otras definiciones dependen de la producción de orina, la reducción de la sCr o el análisis de otros biomarcadores en orina y/o sangre, pero hasta ahora no se utilizan fuera de estudios o ensayos clínicos. Algunos autores incluyen la estimación del FSR utilizando la exploración mediante gammagrafía renal Tecnecio-99m-mercaptoacetil-triglicina (MAG3), la resonancia nuclear magnética con gadolinio (esta última resulta costosa, demora tiempo en su realización y tiene riesgo de inducir fibrosis nefrogénica) o los datos aportados por la biopsia renal analizada con microscopía óptica o análisis de transcripción genético (TNF α) realizada antes de la implantación [204].

Estas definiciones heterogéneas reflejan la complejidad de los procesos que conducen al síndrome clínico de DPI. A la vista de su enrevesada fisiopatología, es poco probable que una sola intervención elimine el FRA de origen isquémico tras el TR [208]. El FRA inducido por IR en riñones nativos, o la DPI en el TR, comparten cambios fisiopatológicos celulares y moleculares similares vinculados tanto al cese como a la restauración del flujo sanguíneo.

Es importante el diagnóstico de FRA inducido por IR para poder identificar y evaluar la influencia de factores relacionados con el donante, receptor, la asignación y distribución de órganos y, finalmente, otras causas de insuficiencia renal como complicaciones quirúrgicas, nefrotoxicidad por fármacos y rechazo.

En general, nuestra incapacidad para definir y, por lo tanto diagnosticar con precisión la DPI conduce, a una clasificación errónea de los pacientes en “la vida real”, y también en los ensayos clínicos diseñados para prevenir o tratar esta disfunción [204]. La biopsia postoperatoria del injerto sigue siendo el “*gold standard*” para evaluar la causa de la DPI, especialmente para descartar el rechazo agudo [192], [209], [210]. La biopsia del injerto con DPI normalmente da como resultado características histológicas compatibles con la necrosis tubular aguda [211]. Sin embargo, este procedimiento se

suele practicar de forma tardía, cuando clínicamente se manifiesta la disfunción del injerto, y en no pocas ocasiones ofrece resultados equívocos, por lo que tiene una utilidad limitada para el diagnóstico precoz de la DPI. Existe la necesidad de disponer de técnicas para el diagnóstico precoz de la DPI, objetivas y no invasivas que puedan ayudar en el manejo clínico de estos pacientes [212].

Hipótesis y Objetivos

1. HIPÓTESIS

El diagnóstico del FRA se fundamenta en la determinación de sCr y el volumen de diuresis, ambos marcadores de función, no de lesión renal. Esto ocurre a pesar de que su nombre en inglés es *“Acute Kidney Injury”* (*“AKI”*), que incluye el término *“injury”* (*daño*) y no el de *“failure”* (*fracaso*). Resulta, por tanto, necesario desarrollar criterios para el diagnóstico de *“daño”*, que pudieran disociarse de los de *“función”*.

El *“daño”* renal del FRA se caracteriza por la muerte de células epiteliales del túbulo proximal renal. Nuestra hipótesis es que el estudio de marcadores de muerte de células tubulares podría ser un indicador de daño renal. La proteína intracelular CypA, cuya liberación se ha asociado a muerte celular, podría servir como marcador de daño y muerte celular renal en pacientes con FRA, así como en situaciones de daño renal subclínico, como son la agresión quirúrgica en el TR o en la CCN con y sin isquemia.

2. OBJETIVOS

- Estudiar si la liberación de CypA al medio en cultivos de células tubulares renales es un marcador de una forma concreta de muerte celular.
- Estudiar si la uCypA (del inglés *“urinary CypA”*), como marcador de daño celular renal, permite identificar daño renal en la práctica clínica
- Evaluar el comportamiento e información ofrecida por la uCypA frente a la sCr y uNGAL.

Material y métodos

ESQUEMA GENERAL DEL TRABAJO

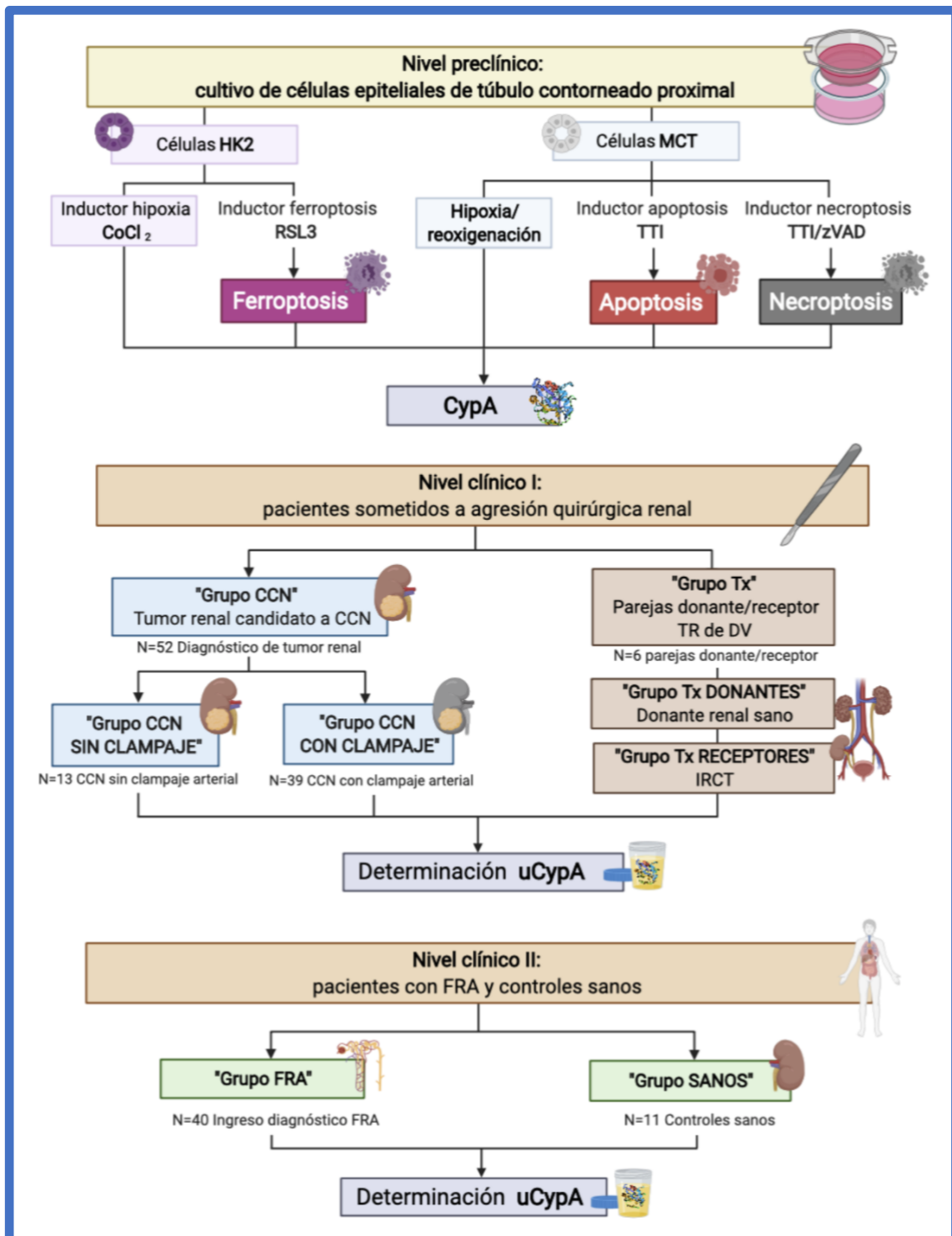


Ilustración 15. Esquema general de la investigación realizada.

1. NIVEL PRECLÍNICO: CULTIVOS CELULARES

1.1 CULTIVO *IN VITRO* DE CÉLULAS EPITELIALES DEL TÚBULO CONTORNEADO PROXIMAL

Estudio experimental en cultivos celulares *in vitro*, realizado en el laboratorio de Nefrología Experimental y Patología Vascular del Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD). La expresión de CypA en los diferentes tipos celulares presentes en el riñón se localizó en una sola base de datos de células transcriptómica (<http://humphreyslab.com/SingleCell/>).

1.1.1 LÍNEAS CELULARES

Se cultivaron dos tipos celulares, la línea de células tubulares proximales inmortalizadas humanas (HK2 del inglés “*Human Kidney cells*”) [213] y murinas (MCT del inglés “*Mouse Cortical Tubule cells*”) [214] (**Ilustración 15**). Para realizar los experimentos, ambas líneas celulares se cultivaron en las placas correspondientes y se dejaron toda la noche con medio al 10% de suero bovino fetal (SBF). Al día siguiente, el crecimiento de las células se detuvo añadiendo medio sin suero durante 24 horas antes de realizar los experimentos. Los experimentos *in vitro* se realizaron como mínimo tres veces.

1.1.1.1 LAS CÉLULAS HK2:

Las **células HK2** fueron obtenidas de ATCC (Manassas, VA, USA). Se cultivaron en RPMI 1640 (Ref. 31870074, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), con SBF de complementado al 10% (Ref. F7524-500ml, Sigma-Aldrich-Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), glutamina al 1% (Ref. 25030081, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), penicilina 100 U/ml (Ref. 15140122, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), estreptomycin 100 µg/ml (Ref. 15140122, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), insulina transferrina selenio (ITS) 5 µg/ml y 36 ng/ml de hidrocortisona, en atmósfera con CO₂ al 5% a 37°C.

Se estimularon durante 6, 18 y 24 horas con 500 μ M del inductor de **hipoxia química** CoCl_2 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) o 400 nM del inductor de **ferroptosis** **RSL3** (SelleckChem, Houston, TX, USA), dosis obtenidas de experimentos previos [106], [215].

1.1.1.2 LAS CÉLULAS MCT:

La línea de **células MCT** que utilizamos fue cedida por el Prof. Eric G. Neilson (Northwestern Memorial Hospital, IL, USA). Se cultivaron en RPMI 1640 (Ref. 31870074, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), suplementado con SBF al 10% (Ref. F7524-500ml, Sigma-Aldrich-Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), penicilina 100 U/ml (Ref. 15140122, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), estreptomycin 100 μ g/ml (Ref. 15140122, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) y L-glutamina 2mM (Ref. 25030081, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA).

Para realizar experimentos de **hipoxia-reoxigenación (H/R)**, las células MCTs se mantuvieron en medio RPMI sin suero y en una atmósfera hipóxica que contenía 1% de O_2 , 94% de N_2 , 5% de CO_2 (Air Liquide, Madrid, España) durante 24 horas. Después las células se mantuvieron en 21% de O_2 para la reoxigenación durante 4, 8 y 24 horas [216].

Por otro lado, se trataron durante 6, 18 y 24 horas con estímulos específicos de apoptosis o necroptosis [217]:

- Cóctel de citocinas **TTI (TWEAK (del inglés “Tumor necrosis factor-like Weak inducer of apoptosis”), $\text{TNF}\alpha$ e interferón γ (IFN γ))**, como inductor de **apoptosis**.

Las dosis de las citoquinas:

- **TWEAK** 100 ng/ml (Ref. GF102, Sigma-Aldrich-Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).
- **$\text{TNF}\alpha$** 30 ng/ml (Ref. 315-01, PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA)
- **IFN γ** 30 U/ml (Ref. 315-05, PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA)
- **TTI+zVAD** (inhibidor inespecífico de caspasas benizolixicarbonil-Val-Ala-DL-Asp-fluorometilcetona), como inductor de **necroptosis**. El **zVAD**, es un inhibidor de caspasas y se añaden 25 μ M una hora antes que el coctel de citoquinas (Ref. 4026865, Bachem, Bubendorf, Suiza).

1.1.2 PERIODO DE ESTUDIO

Los cultivos celulares *in vitro* se realizaron entre octubre de 2016 y septiembre 2020.

1.1.3 WESTERN BLOT

Una vez realizados los experimentos se recogieron los sobrenadantes celulares y las células se tripsinizaron, recolectaron y homogeneizaron en tapón de lisis compuesto por: TrisHCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, Triton X-100 al 0,2%, NP-40 al 0,3%, PMSF 1 mM y pepstatina 1µg/ml [218]. La concentración de proteínas se determinó mediante el método del BCA (Ref. 10741395, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). Los extractos celulares se centrifugaron a 2500 rpm, durante 20 min a 4°C para eliminar las células y los desechos, y se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 15% y se transfirieron a membranas de PVDF (Ref. IPVH00010, Millipore-Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Las membranas se bloquearon durante 1h a temperatura ambiente en tampón TBS-T (del inglés "*Tris Buffered Saline*") (1mM Tris pH 7,5m, 10mM NaCl y 0,1% Tween-20) con 5% de leche desnatada, para evitar uniones inespecíficas y se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente diluido en la solución de bloqueo y en agitación constante durante toda la noche a 4°C (**Tabla 4**).

Al día siguiente, las membranas se lavaron en TBS-T tres veces, durante al menos 10 minutos por lavado, para eliminar el exceso de anticuerpo primario. Tras esto, se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (1:5000 ó 1:10000), conjugado con peroxidasa durante 1h en agitación, a temperatura ambiente. Tras lavarlas de nuevo con la solución de lavado un mínimo de 3 veces, se revelaron mediante quimioluminiscencia usando el reactivo ECL (Ref. 11790644, Millipore-Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) en el sistema Amersham imager 600 (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). Las membranas se densitometraron con el software ImagenQuant LAS 4000 (GE

Healthcare, Chicago, IL, USA). La cuantificación se expresa como unidades densitométricas arbitrarias.

Como control de carga utilizamos, en los sobrenadantes celulares la tinción de rojo Ponceau (Ref. J60744, Alfa Aesar, Haverhill, MA, USA), y en los extractos celulares las proteínas α -tubulina (50 KDa) y GAPDH (30 KDa) (del inglés “*Glyceraldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase*”).

Anticuerpo primario	Casa comercial	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
CypA	Abcam (Ref. Ab58144)	1:500	IgG rabbit HRP	1:5000
HIF1α	Abcam (Ref. Ab16066)	1:2000	IgG mouse HRP	1:5000
α-Tubulina	Sigma (Ref. T5168)	1:10000	IgG mouse HRP	1:10000
GAPDH	Sigma (Ref. G9545)	1:5000	IgG mouse HRP	1:5000

Tabla 4. Western blot. Anticuerpos primarios y dilución utilizada.

1.1.4 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR

El ensayo de viabilidad celular colorimétrico (MTT) (Sigma-Aldrich-Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) se basa en el metabolismo del compuesto bromuro de tetrazolio por la enzima succinato deshidrogenasa de las mitocondrias. El metabolismo del compuesto producirá la formación de cristales en el interior celular, solubles en dimetilsulfóxido (DMSO), de tal manera que permite determinar la absorbancia. A mayor viabilidad celular, mayor cantidad de cristales solubles se formarán y mayor será la absorbancia.

Las células fueron sembradas en placas de 12 pocillos, con concentración $0,3 \times 10^5$ células/ml para las HK2 y de $0,2 \times 10^5$ células/ml para las MCT, y tras ser incubadas con los estímulos correspondientes, se añadió el bromuro de tetrazolio (Ref. M5655, Sigma-Aldrich-Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) a una concentración de 0,5mg/ml durante 1h a 37°C. Posteriormente se retiró el exceso de reactivo y se suspendió el precipitado generado en DMSO para leer la absorbancia a 570 nm.

1.1.5 ESTADÍSTICA

El análisis estadístico se realizó usando los softwares estadísticos SPSS 11.0 y GraphPad V.7.04. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar (DE) en células cultivadas. La significancia estadística a un nivel de $p < 0.05$ se estableció para 3 o más grupos utilizando ANOVA, con pruebas post-hoc de Tukey's. Para los pares de muestras los datos se analizaron mediante el test T-student.

2. NIVEL CLÍNICO:

2.1 NIVEL I: PACIENTES CON AGRESIÓN QUIRÚRGICA RENAL

Este estudio observacional prospectivo se realizó en el Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz (Madrid, España), sobre pacientes sometidos a una agresión quirúrgica renal de forma programada (**Ilustración 15**).

2.1.1 APROBACIÓN COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz y respaldado por el Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz, Madrid (IIS-FJD) (**Anexo I**).

2.1.2 ÁMBITO DEL ESTUDIO

Todos los datos fueron recolectados prospectivamente en 64 pacientes tratados en nuestra institución, recogidos en bases de datos aprobadas por el comité de revisión institucional y analizadas retrospectivamente.

Para todos los grupos: los datos analíticos basales se obtuvieron de los análisis de sangre preoperatorios. Las pruebas de laboratorio postoperatorias se registraron de los análisis realizados de forma rutinaria durante la hospitalización. Se anotó también el último análisis de sangre disponible durante el seguimiento.

Se obtuvieron muestras de orina de forma seriada. Antes de comenzar la cirugía, cuando se realizó el cateterismo vesical en el momento de la inducción de la anestesia

(*determinación basal, Pre-Qx*). Inmediatamente después de terminar la cirugía y antes de que el paciente fuera despertado de la anestesia (*determinación de 0h*). Y posteriormente en el postoperatorio, *el primer día (24h), segundo día (48h)* y cuando los pacientes aún estaban hospitalizados al *tercer día postoperatorio (72h)*.

Las muestras de orina se recogieron en condiciones estériles y luego se centrifugaron a 2500 rpm durante 20 min a 4°C para eliminar las células y los desechos. Los sobrenadantes clarificados se almacenaron a -80 °C hasta su análisis. Se midieron uCypA y uNGAL mediante inmunoabsorción ligada a enzimas ELISA, utilizando kits adquiridos de MyBiosource (San Diego, CA, USA) y Bioporto (Hellerup, Dinamarca), respectivamente, de acuerdo con las especificaciones del fabricante. La concentración de ambos se normalizó por los niveles de creatinina en orina.

2.1.2.1 BRAZOS DEL ESTUDIO

Consistió en dos brazos en el **nivel clínico I**, el primero con pacientes diagnosticados de tumor renal a los que se propuso una **CCN mediante abordaje laparoscópico** (n = 52) y el segundo, 6 pares de pacientes estudiados para **TR de DV** (nefrectomía laparoscópica y TR convencional) (n = 12) (**Ilustración 15**).

2.1.2.1.1 CCN.

Todos los pacientes incluidos en esta parte del estudio fueron diagnosticados de tumor renal localizado susceptible de CCN mínimamente invasiva y un riñón contralateral sano. Se registraron los antecedentes médicos y las características del tumor de cada paciente. Nuestra técnica de CCN mínimamente invasiva incluye abordaje laparoscópico y control arterial con torniquete.

Brazo del estudio observacional prospectivo de cohortes; pacientes sometidos a CCN con y sin isquemia arterial renal durante el procedimiento. Los pacientes se dividieron retrospectivamente en dos grupos: CCN "**Grupo SIN CLAMPAJE**" incluyó pacientes con CCN laparoscópica realizado sin clampaje vascular (n = 13), CCN "**Grupo CCN CON CLAMPAJE**" pacientes con CCN laparoscópica que precisaron clampaje arterial durante el procedimiento (n = 39).

2.1.2.1.2 TR.

Brazo del estudio observacional longitudinal prospectivo. Un grupo de 6 pacientes con ERCT que recibieron un TR de un DV en nuestra institución.

Los 6 donantes se estudiaron de acuerdo con los protocolos locales. Estaban sanos y se seleccionó el riñón izquierdo para la donación (“**Grupo Tx DONANTES**”). Los 6 receptores tenían ERCT y estaban en disposición de recibir un TR (“**Grupo Tx RECEPTORES**”). Los órganos se obtuvieron para su trasplante mediante un abordaje laparoscópico asistido por la mano. Se registraron los hallazgos quirúrgicos, el tiempo de IC e IF de cada paciente.

2.1.3 PERIODO DE ESTUDIO

El estudio fue realizado entre marzo de 2014 y junio de 2019.

2.1.4 ALEATORIZACIÓN DE LOS PACIENTES

No procede. El estudio no es aleatorizado.

2.1.5 OBTENCIÓN DE LOS DATOS

Se elaboraron a través de la información obtenida durante el ingreso hospitalario tras la agresión quirúrgica renal (CCN o TR).

Datos basales se obtuvieron de la analítica preoperatoria, la consulta de urología previa a la cirugía, el TAC realizado en el momento del diagnóstico. Los datos recogidos durante el ingreso se obtuvieron de muestras de orina y analíticas. En el seguimiento se registró la última analítica disponible con registro de la función renal estimada.

2.1.6 PROCESAMIENTO DE LOS DATOS

Los datos se registraron en una tabla de Excel, y analizados a través del programa informático SPSS© (IBM©, Armonk, NY, USA).

2.1.7 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

En las consultas médicas de Urología se identificaron aquellos pacientes con los criterios de inclusión fijados que podrían ser candidatos a la realización del estudio. Se les informaba de la posibilidad de participar y si estaban de acuerdo, firmaban los consentimientos informados (quirúrgico, cesión de muestras biológicas a BioBanco, participación en el estudio y de cesión de datos de carácter personal) (**Anexo II**). A continuación, se les realizaba la visita basal.

Los pacientes seleccionados deberían cumplir todos los siguientes criterios:

- Firma de los siguientes consentimientos informados.
 - Consentimiento del estudio.
 - Consentimiento de cesión de datos de carácter temporal.
 - Consentimiento informado de la cirugía.
 - Consentimiento de BioBanco.
- Edad igual o superior a 18 años.
- **“Grupo CCN”**: pacientes diagnosticados de un tumor renal subsidiario de tratamiento quirúrgico mediante CCN con un riñón contralateral sano.
- **“Grupo Tx”**: parejas de pacientes candidatos a TR de DV.

2.1.8 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

En caso de cumplimiento de alguno de los siguientes criterios de exclusión el paciente no podía ser incluido en el estudio:

- Negativa a participar en el estudio.
- Negativa a la intervención quirúrgica.
- Contraindicación de intervención quirúrgica según lo establecido en los protocolos de estudio preoperatorio.
- Ausencia de firma de consentimiento informado.
- No cumplimiento de algún criterio de inclusión del apartado anterior.

2.1.9 CRITERIOS DE RETIRADA

Los sujetos o el representante legal podrán interrumpir el estudio en cualquier momento si es su deseo por cualquier motivo o si el investigador lo considera necesario por razones médicas.

- Retirada del consentimiento.
- Incumplimiento o pérdida de seguimiento.
- Progresión de enfermedad/condición que requiere la interrupción de los resultados o la incapacidad de seguir cumpliendo con los procedimientos del estudio.
- A criterio del investigador.

2.1.10 RUTINA DEL ESTUDIO

En las consultas médicas del Servicio de urología del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, dentro de la actividad clínica del servicio se identificaron pacientes con diagnóstico de tumor renal localizado candidatos a CCN mediante abordaje laparoscópico y parejas de pacientes candidatos a TR de DV.

2.1.10.1 VISITA DE INCLUSIÓN

Se realizó una comprobación completa de los criterios de inclusión y de exclusión. En caso de que fuera candidato se le informaba de la posibilidad de participar de forma voluntaria en este estudio observacional. Si aceptaban, debían firmar los consentimientos informados (apartado 2.1.7) **(Anexo II)**.

2.1.10.2 VISITA BASAL

En el mismo momento se realizaba la visita basal, que incluye los siguientes apartados:

- Obtención de datos demográficos y filiación
- Antecedentes personales médicos
- Antecedentes personales quirúrgicos

-
- Tratamiento farmacológico habitual
 - Datos antropométricos
 - Hábitos tóxicos
 - Registros de datos relacionados con el brazo de estudio
 - CCN
 - Exploración física general y abdominal.
 - Datos y características de tumor renal.
 - Parámetros nefrométricos del tumor renal.
 - TR
 - Exploración física general y abdominal.
 - Causa de la IRCT en el **“Grupo Tx RECEPTORES”**.
 - Datos estudio previo a donación renal **“Grupo Tx DONANTES”**.
 - Comprobación de criterios de inclusión y exclusión.

2.1.10.3 INGRESO HOSPITALARIO Y CIRUGÍA

El día de la cirugía los pacientes ingresan en planta una hora antes del horario programado para la intervención, salvo que estuviera programada a primera hora de la mañana, situación en la que ingresan el día anterior. Acuden a la sala preoperatoria en el bloque quirúrgico, donde se administra el tratamiento antibiótico profiláctico según las indicaciones del protocolo de profilaxis del hospital 30 minutos antes de comenzar la cirugía y se realiza la comprobación quirúrgica *“checklist”*. Finalmente pasan a quirófano donde se lleva a cabo la intervención quirúrgica.

2.1.10.3.1 PROTOCOLO QUIRÚRGICO CCN.

La CCN por tumor renal es un procedimiento de cirugía mayor, realizado bajo anestesia general. A los pacientes anticoagulados (todos los pacientes anticoagulados del estudio lo estaban con acenocumarol) se les retiró 5 días antes esta medicación, sustituyendo por enoxaparina ajustada al peso y función renal cada 12h, administrando la última dosis 24h antes de la intervención.

Tras la inducción anestésica se coloca una sonda vesical, para control de diuresis, y medias de compresión con dispositivo neumático. Se posiciona al paciente en decúbito lateral, quedando el riñón a intervenir en la parte superior, y se procede al lavado del campo quirúrgico y aplicación de solución hidroalcohólica. Se despliega un campo quirúrgico estéril y desechable, adaptado para cirugía laparoscópica, y preparan la torre de video-laparoscopia, el insuflador y los generadores de luz y de energía.

La cirugía comienza realizando una minilaparotomía para colocar el trocar de Hasson, bajo visión directa, e iniciar el neumoperitoneo. Con presión establecida en el insuflador de 12-13mmHg, y una recuperación máxima de 30 ó 50 l/min según el modelo de insuflador utilizado. Tras inspeccionar la cavidad abdominal se colocan los trocares de trabajo.

La primera maniobra quirúrgica que se realiza es decolar, para acceder al retroperitoneo y al pedículo renal. Una vez localizado el pedículo se disecan los vasos, controlando la arteria renal mediante un torniquete de Rosales [219]. Se procede a localizar el tumor renal a tratar, disecar su superficie y el borde sano de parénquima, para asegurar una correcta visualización. Iniciamos la extirpación del tumor, marcando el límite con tijera monopolar para posteriormente enuclear con corte frío. Si el sangrado permite realizar esta maniobra con seguridad, a criterio del cirujano, se completa la resección del tumor sin clampar la arteria renal. En caso de un sangrado profuso, o de que este no permita ver con claridad el borde de resección, se procede a clampar de forma temporal la arteria renal cerrando el torniquete de Rosales. Enucleado el tumor, se realizan maniobras de hemostasia y sutura del lecho de resección mediante renorrafia profunda (sutura barbada continua de ácido glicólico reabsorbible 2'0) y/o superficial (puntos sueltos de sutura trenzada de glicolida 0) según la extensión y profundidad del defecto en el parénquima renal. Se desclampa la arteria liberando el torniquete, registrando el tiempo de IC, y se revisa la hemostasia. Tras embolsar la pieza y la grasa perirrenal adyacente se refuerza la hemostasia con agentes hemostáticos según la valoración del urólogo responsable de la intervención.

Finalizado el procedimiento se extrae la bolsa con la pieza para estudio anatomopatológico, colocamos un drenaje aspirativo, retiramos los trocares bajo visión

directa y para terminar se procede al cierre de las incisiones realizadas. Todos los pacientes del “**Grupo CCN**” se trasladan a la Unidad de Recuperación Postanestésica.

2.1.10.3.2 PROTOCOLO QUIRÚRGICO TR DE DV.

La nefrectomía laparoscópica y extracción renal para TR de DV es un procedimiento de cirugía mayor, realizado bajo anestesia general.

Tras la inducción anestésica se coloca una sonda vesical, para control de diuresis, y medias de compresión con dispositivo neumático. Se posiciona al paciente en decúbito lateral, quedando el riñón a intervenir en la parte superior, y se procede al lavado del campo quirúrgico y aplicación de solución hidroalcohólica. Se coloca un campo quirúrgico estéril y desechable, adaptado para cirugía laparoscópica, y preparan la torre de video-laparoscopia, el insuflador y los generadores de luz y de energía.

La cirugía comienza realizando una minilaparotomía para colocar el trocar de Hasson, bajo visión directa, e iniciar el neumoperitoneo. La presión establecida en el insuflador será de 12-13mmHg, con una recuperación máxima de 30 ó 50 l/min según el modelo de insuflador utilizado. Tras inspeccionar la cavidad abdominal se colocan los trocares de trabajo.

En nuestra serie se utilizó en todos los casos para TR el riñón izquierdo. La primera maniobra que realizamos es la decolación para acceder al retroperitoneo y al pedículo renal. Una vez localizado el pedículo, se disecan los vasos de forma extensa; arteria hasta el ostium de la misma y la vena hasta su cruce con la arteria aorta. Igualmente, se localiza el uréter y se disecciona por debajo del cruce de los vasos iliacos. Se completa la liberación de toda la superficie renal. Una vez el cirujano tiene el visto bueno del equipo médico del quirófano donde se prepara la cirugía del implante renal, procederá a la sección ureteral y a colocar el dispositivo para la cirugía manoasistida GelPort® (Applied Medical, California USA). Este dispositivo permite la introducción de la mano del cirujano antes de proceder al clipaje y sección de los vasos, así como extraer el riñón. Se toma registro del tiempo de IC hasta que el injerto es perfundido en la cirugía de banco por el cirujano responsable de la cirugía del TR con Custodiol (Dr F Köhler Chemie, Bensheim, Alemania) frío. Se inicia el tiempo de IF que se prolonga hasta el momento

de la reperfusión tras el implante. Se completa la cirugía de banco con ligadura de vasos colaterales venosos y linfáticos, así como liberación de grasa perirrenal remanente. Finalizado el procedimiento se coloca un drenaje aspirativo, retiramos los trocares bajo visión directa, el GelPort® y para terminar se procede al cierre de las incisiones realizadas.

Mientras en el quirófano contiguo se inicia la cirugía en el receptor. Tras la inducción anestésica, se procede a colocar una sonda vesical para control de diuresis y medias de compresión con dispositivo neumático. Se posiciona al paciente en decúbito supino. Se procede a realizar el lavado del campo quirúrgico y aplicación de solución hidroalcohólica en la pared abdominal. Se coloca un campo quirúrgico estéril y desechable adaptado para cirugía abierta, preparando la fosa iliaca elegida para el TR.

Se inicia la cirugía realizando una laparotomía extraperitoneal pararrectal. Tras la apertura por planos se prepara el campo quirúrgico en espera de realizar el TR.

Preparados los vasos renales y el uréter del injerto, se procede a realizar el TR. Anastomosis venosa mediante sutura continua 180° con polipropileno 5 ó 6'0 de vena iliaca externa o interna a vena renal. Tras comprobar su estanqueidad, dejando clamp de bulldog en la vena renal, se realiza la anastomosis arterial mediante sutura continua 180° polipropileno 5 ó 6'0 de arteria iliaca externa o interna a arteria renal. Se procede al desclampaje y reperfusión del injerto, finalizando el tiempo de IF. Para terminar el implante se realiza la ureteroneocistostomía, mediante implante ureteral directo con técnica antirreflujo y sutura monofilamento de polidioxanona 4'0, previa colocación de catéter doble jota temporal.

Finalizado el procedimiento se coloca un drenaje aspirativo y se procede al cierre de la herida y se trasladan a la Unidad de Recuperación Postanestésica los pacientes del **“Grupo Tx DONANTES”** de TR. En el caso de los pacientes del **“Grupo Tx RECEPTORES”** serán trasladado para su monitorización en las primeras 24h tras la cirugía a la Unidad de Cuidados Intensivos.

2.1.10.4 REGISTRO DE SEGUIMIENTO.

Posteriormente y sin necesidad de la presencia del paciente, se revisaba su historia clínica, registrando las variables a estudio (apartado 2.1.13).

2.1.11 CONFIDENCIALIDAD

Se protegerá el derecho a la intimidad personal reconocido en la Constitución Española y la Ley General de Sanidad; por ello, todas las partes implicadas en este estudio tienen el deber de guardar la más estricta confidencialidad de forma que no se viole la intimidad personal ni familiar de los sujetos participantes en el mismo (Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos Personales) [220]. Con el fin de garantizar la confidencialidad de los datos del estudio, sólo tuvieron acceso a los mismos, el investigador y su equipo de colaboradores, el Comité Ético de Investigación Clínica, las autoridades sanitarias pertinentes y los responsables del análisis de los mismos.

El tratamiento de los datos de carácter personal de los sujetos participantes en el ensayo se ajustó a lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos Personales [220].

Por todo ello y con el fin de garantizar la confidencialidad, cada paciente fue identificado con un número que en ningún caso incluía datos que permitan su identificación. Además, por medio de la fecha y firma del Consentimiento Informado del Estudio, los pacientes autorizaron a los investigadores al uso de sus datos de carácter personal para la elaboración del estudio sin cesión de los mismos a terceros (**Anexo II**).

El contenido del cuaderno de recogida de datos y los documentos donde se registró toda la información están protegidos de usos no permitidos por personas ajenas a la investigación y, por lo tanto, son considerados estrictamente confidenciales y no serán revelados a terceros excepto a los especificados en el párrafo anterior.

2.1.12 CONFLICTOS DE INTERÉS

No reportados.

2.1.13 DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES ESTUDIADAS

De cada uno de los pacientes incluidos se recogieron las siguientes variables para el estudio:

2.1.13.1 VARIABLES DEMOGRÁFICAS.

- Edad en años en el momento de la cirugía.
- Peso (kg).
- Talla (m).
- Índice de masa corporal (IMC) (según la fórmula $IMC = \text{peso (kg)} / \text{altura (m)}^2$).
- Raza.
- Sexo.
- En el “**Grupo Tx**”, relación entre donante y receptor.
- Tabaquismo.
 - No fumador.
 - Exfumador.
 - Fumador. En este caso se registró el número de cigarrillos día.
- Enfermedades médicas.
 - Hipertensión arterial.
 - Diabetes mellitus.
 - Dislipemia.
 - Enfermedad cardiovascular: cardiopatía isquémica, infarto agudo de miocardio, insuficiencia cardíaca, arritmia, vasculopatía periférica, claudicación intermitente, accidente isquémico transitorio, accidente cerebro vascular.
 - Enfermedad renal basal.
- Tratamiento habitual.
- Índice de comorbilidad de Charlson, ajustado a la edad [221].

2.1.13.2 DATOS DE LA CIRUGÍA.

Además de estos valores, se determinó:

- Riesgo ASA preoperatorio.
 - Fecha de la cirugía.
 - En el “**Grupo CCN**” pacientes con tumor renal:
 - Riñón afecto por el tumor: derecho o izquierdo.
 - Localización del tumor: polo superior, mesorrenal, polo inferior.
 - Diámetro máximo de la lesión medido por TAC.
 - Determinación de parámetros y cálculo nefrométricos:
 - RENAL.
 - PADUA.
 - C.INDEX.
 - DAP.
 - NePhRO.
 - ABC.
 - RPS.
 - Mayo fat score.
 - Tiempo de cirugía.
 - Sangrado estimado.
 - Clampaje vascular arterial, técnica y tiempo de clampaje.
 - Complicaciones intraoperatorias y postoperatorias.
 - Clasificación Clavien-Dindo [222].
 - Diuresis intraoperatoria, primeras 12h de la cirugía y primeras 24h de la cirugía.
 - Datos sobre tumor extirpado.
 - Histología del tumor.
 - Estadio del tumor.
 - Estado de márgenes de resección.
 - Situación oncológica.
 - Necesidad de transfusión durante y tras la cirugía.
 - Estado del paciente durante el seguimiento.
 - En el grupo de pacientes “**Grupo Tx**”:
 - Riñón utilizado: derecho o izquierdo.
 - Tiempo de IC e IF hasta reperfusión.
-

- Complicaciones intraoperatorias y postoperatorias.
 - Clasificación Clavien-Dindo [222].
- Diuresis intraoperatoria, primeras 12h de la cirugía y primeras 24h de la cirugía.

2.1.13.3 VARIABLES ANALÍTICAS.

Las siguientes variables se recogieron antes de la cirugía (analítica preoperatoria), en las analíticas perioperatorias realizadas durante el ingreso hospitalario, y en la última analítica registrada en su historia clínica durante el seguimiento:

- Hemoglobina (g/dl).
- Hematocrito (%).
- Creatinina (mg/dl).
- FG estimado (CKD-EPI) (ml/min/1,73m²).

2.1.14 ESTADÍSTICA

El análisis estadístico se realizó usando los softwares estadísticos SPSS 11.0 y GraphPad V.7.04.

Las variables cualitativas se han descrito con frecuencias y porcentajes y las cuantitativas con media \pm Error Estándar de la Media (EEM) o con mediana y rango intercuartil (indicado entre paréntesis). Las variables descritas con media y EEM son aquellas que siguen una distribución normal en los dos grupos comparados. Relación entre variables mediante el test de correlación de Pearson.

La significancia estadística a un nivel de $p < 0.05$ se estableció para 3 o más grupos utilizando ANOVA con prueba post-hoc de Tukey's. Para los pares de muestras los datos se analizaron mediante el test T-student.

2.2 NIVEL II: PACIENTES HOSPITALIZADOS CON FRA.

Este estudio observacional prospectivo de casos y controles se realizó en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander, España), sobre pacientes con diagnóstico de FRA durante un ingreso hospitalario (**Ilustración 15**).

2.2.1 APROBACIÓN COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética para la Investigación Clínica de Cantabria (CEIC) y respaldado por IDIVAL (Instituto De Investigación Sanitaria Hospital Marqués de Valdecilla, Cantrabria) (**Anexo I**).

2.2.2 ÁMBITO DEL ESTUDIO

Pacientes diagnosticados por Servicio de Nefrología de FRA tras ser interconsultados por otros Servicios del hospital (médicos y quirúrgicos).

El diagnóstico de FRA se definió y clasificó según los criterios KDIGO [11]. Se consideró la sCr pico al valor más alto de sCr después de establecido el diagnóstico. Se definió como recuperación, según establecen las guías ADQI [223], cuando la sCr $\leq 1,3$ mg/dl en pacientes sin ERC previa o retornó a los valores basales en caso de ERC.

Se obtuvieron muestras de orina de 40 pacientes con diagnóstico de FRA "**Grupo FRA**". Como grupo control se recogieron muestras de orina de 11 voluntarios sanos "**Grupo SANOS**" sin comorbilidades y función renal normal. Las muestras de orina se recogieron en condiciones estériles y luego se centrifugaron a 2500 rpm durante 20 min a 4°C para eliminar las células y los desechos. Los sobrenadantes clarificados se almacenaron a -80 °C hasta su análisis. Se midieron uCypA y uNGAL mediante inmunoabsorción ligada a enzimas ELISA, utilizando kits adquiridos de MyBiosource (San Diego, CA, USA) y Bioporto (Hellerup, Dinamarca), respectivamente, de acuerdo con las especificaciones del fabricante. La concentración de ambos se normalizó por los niveles de creatinina en orina.

2.2.3 PERIODO DEL ESTUDIO

El estudio fue realizado entre febrero de 2010 y agosto de 2012.

2.2.4 ALEATORIZACIÓN DE LOS PACIENTES

No procede. El estudio no es aleatorizado.

2.2.5 OBTENCIÓN DE LOS DATOS

Se elaboraron a través de la información obtenida durante el ingreso hospitalario, hasta el momento de recibir el alta por parte del servicio de Nefrología.

Durante el ingreso se obtuvieron muestras de orina y analíticas. Las muestras de orina de 40 pacientes con diagnóstico de FRA "**Grupo FRA**" se recogieron en tres momentos: en el momento del diagnóstico (*T1*), en los 3 ± 2 días del diagnóstico (*T2*), al alta de Nefrología (12 ± 9 días del diagnóstico) (*T3*). En el seguimiento se registró la última analítica disponible en el momento del alta por parte del servicio de Nefrología por FRA. Las muestras de orina de los 11 participantes sanos "**Grupo SANOS**", se recogieron en situación basal, tras revisar sus antecedentes personales y analíticas previas que documentaron función renal normal.

2.2.6 PROCESAMIENTO DE LOS DATOS

Los datos se registraron en una tabla de Excel, y analizados a través del programa informático SPSS© (IBM©, Armonk, NY, USA).

2.2.7 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Los pacientes seleccionados deberían cumplir todos los siguientes criterios:

- Pacientes ingresados con el diagnóstico de FRA definido y clasificado según los criterios KDIGO [11].
- Firma del consentimiento del estudio.
- Firma del consentimiento de cesión de datos de carácter temporal.
- Edad superior a 18 años.

2.2.8 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

En caso de encontrar alguno de los siguientes criterios de exclusión el paciente no podía ser incluido en el estudio:

- Negativa a participar en el estudio.
- Ausencia de firma de consentimiento informado.

- No cumplimiento de algún criterio de inclusión del apartado anterior.

2.2.9 CRITERIOS DE RETIRADA

Los sujetos o el representante legal podrán interrumpir el estudio en cualquier momento si es su deseo por cualquier motivo o si el investigador lo considera necesario por razones médicas.

- Retirada del consentimiento.
- Incumplimiento o pérdida de seguimiento.
- Progresión de enfermedad/condición que requiere la interrupción de los resultados o la incapacidad de seguir cumpliendo con los procedimientos del estudio.
- A criterio del investigador.

2.2.10 RUTINA DEL ESTUDIO

2.2.10.1 VISITA DE INCLUSIÓN

Durante el ingreso, en el momento en el que se estableció el diagnóstico de FRA por el servicio de Nefrología. Se realizó una comprobación completa de los criterios de inclusión y de exclusión. En caso de que fuera candidato se le informaba de la posibilidad de participar de forma voluntaria en este estudio observacional.

2.2.10.2 VISITA BASAL

Durante el ingreso, en el momento en el que se estableció el diagnóstico de FRA por el servicio de Nefrología **“Grupo FRA”**. En el **“Grupo SANOS”** se obtuvo muestra de orina una vez documentada ausencia de enfermedad renal.

2.2.10.3 INGRESO HOSPITALARIO

El tiempo de hospitalización hasta resolver su proceso agudo y recibir el alta.

2.2.10.4 REGISTRO DE SEGUIMIENTO

Durante el tiempo de ingreso.

2.2.11 CONFIDENCIALIDAD

Se protegerá el derecho a la intimidad personal reconocido en la Constitución Española y la Ley General de Sanidad; por ello, todas las partes implicadas en este estudio tienen el deber de guardar la más estricta confidencialidad de forma que no se viole la intimidad personal ni familiar de los sujetos participantes en el mismo (Ley Orgánica 15/1999, de 13 de Diciembre, de Protección de Datos Personales) [220]. Con el fin de garantizar la confidencialidad de los datos del estudio, sólo tuvieron acceso a los mismos, el investigador y su equipo de colaboradores, el Comité Ético de Investigación Clínica, las autoridades sanitarias pertinentes y los responsables del análisis de los mismos.

El tratamiento de los datos de carácter personal de los sujetos participantes en el ensayo se ajustó a lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de Diciembre, de Protección de Datos Personales [220].

Por todo ello y con el fin de garantizar la confidencialidad, cada paciente fue identificado con un número que en ningún caso incluía datos que permitan su identificación. Además, por medio de la fecha y firma del Consentimiento Informado del Estudio, los pacientes autorizaron a los investigadores al uso de sus datos de carácter personal para la elaboración del estudio sin cesión de los mismos a terceros.

El contenido del cuaderno de recogida de datos y los documentos donde se registró toda la información están protegidos de usos no permitidos por personas ajenas a la investigación y, por lo tanto, son considerados estrictamente confidenciales y no serán revelados a terceros excepto a los especificados en el párrafo anterior.

2.2.12 CONFLICTOS DE INTERÉS

No reportados.

2.2.13 DESCRIPCIÓN DE VARIABLES ESTUDIADAS

2.2.13.1 VARIABLES DEMOGRÁFICAS

Se registraron variables:

- Edad.
- Sexo.
- Comorbilidad: índice de Charlson.
- Motivo del ingreso: enfermedad médica o quirúrgica.
- Ingreso en Unidad de Cuidados Intensivos.
- Causa del FRA: prerrenal, parenquimatoso, obstructivo.
- Necesidad de tratamiento sustitutivo de la función renal.
- Oliguria (<400ml/24h diuresis).
- Estancia hospitalaria.

2.2.13.2 VARIABLES ANALÍTICAS.

- Pico de sCr.
- FRA KDIGO en el momento del diagnóstico: I, II ó III.

2.2.14 ESTADÍSTICA

El análisis estadístico se realizó usando los softwares estadísticos SPSS 11.0 y GraphPad V.7.04.

Las variables cualitativas se han descrito con frecuencias y porcentajes, y las cuantitativas con la media \pm EEM o con la mediana y rango intercuartil (indicado entre paréntesis). Las variables descritas con media y EEM son aquellas que siguen una distribución normal en los dos grupos comparados.

La significancia estadística a un nivel de $p < 0.05$ se estableció para 3 o más grupos utilizando ANOVA con prueba post-hoc de Tukey's para variables con distribución normal y mediante el test Kruskal Wallis con múltiple comparación de Dunn's para variables con distribución normal. Para los pares de muestras los datos se analizaron

mediante el test T-student para variables con distribución normal y mediante la prueba de Mann-Whitney para las variables de distribución no normal.

Resultados

1. NIVEL PRECLÍNICO:

Las células tubulares componen la mayor parte del riñón y su pérdida es clave en el FRA independientemente de la etiología de este. En esta primera parte vamos a analizar la liberación de CypA por las células tubulares renales sometidas a diferentes estímulos letales

1.1 EFECTO DE LA HIPOXIA SOBRE LA LIBERACIÓN DE CYP A EN CÉLULAS TUBULARES.

Una de las principales causas de FRA es el daño por IR, en la práctica clínica tiene gran importancia debido a su impacto sobre diferentes procesos quirúrgicos.

Hemos analizado in vitro el efecto de la hipoxia sobre la liberación de CypA en células tubulares humanas (HK2) y murinas (MCT).

1.1.1 HIPOXIA QUÍMICA EN CÉLULAS TUBULARES HUMANAS HK2

Las células tubulares humanas HK2 se estimularon durante 6, 18 y 24 horas con CoCl_2 , un inductor de hipoxia química que estabiliza la expresión de HIF-1 α y por lo tanto activa la expresión génica en respuesta a hipoxia (**Ilustración 16**).

En primer lugar, mediante ensayos de viabilidad por MTT corroboramos que en estas condiciones la hipoxia química provocada con CoCl_2 ocasiona una reducción de la viabilidad de las células HK2 frente al grupo control (**Ilustración 16, gráfica A**). La reducción de la viabilidad celular observada fue dependiente del tiempo de exposición, resultando más evidente a las 24 horas de tratamiento. Además, mediante western blot de los extractos celulares, corroboramos que el tratamiento con CoCl_2 inducía y estabilizaba la expresión de HIF-1 α (**Ilustración 16, gráfica B**).

Para determinar la liberación de la CypA al medio extracelular por las células HK2 en presencia de CoCl_2 analizamos mediante western blot sus niveles en los sobrenadantes celulares. En estos experimentos observamos liberación de la CypA a partir de las 18h de exposición a CoCl_2 (**Ilustración 16, gráfica C**). La liberación de la CypA al medio de cultivo aumentaba de forma progresiva, con el tiempo de exposición a CoCl_2

y en paralelo a la reducción de la viabilidad celular. Mientras, los niveles intracelulares de CypA en las células HK2 no se modificaron con la exposición a CoCl_2 frente al grupo control (**Ilustración 16, gráfica D**).

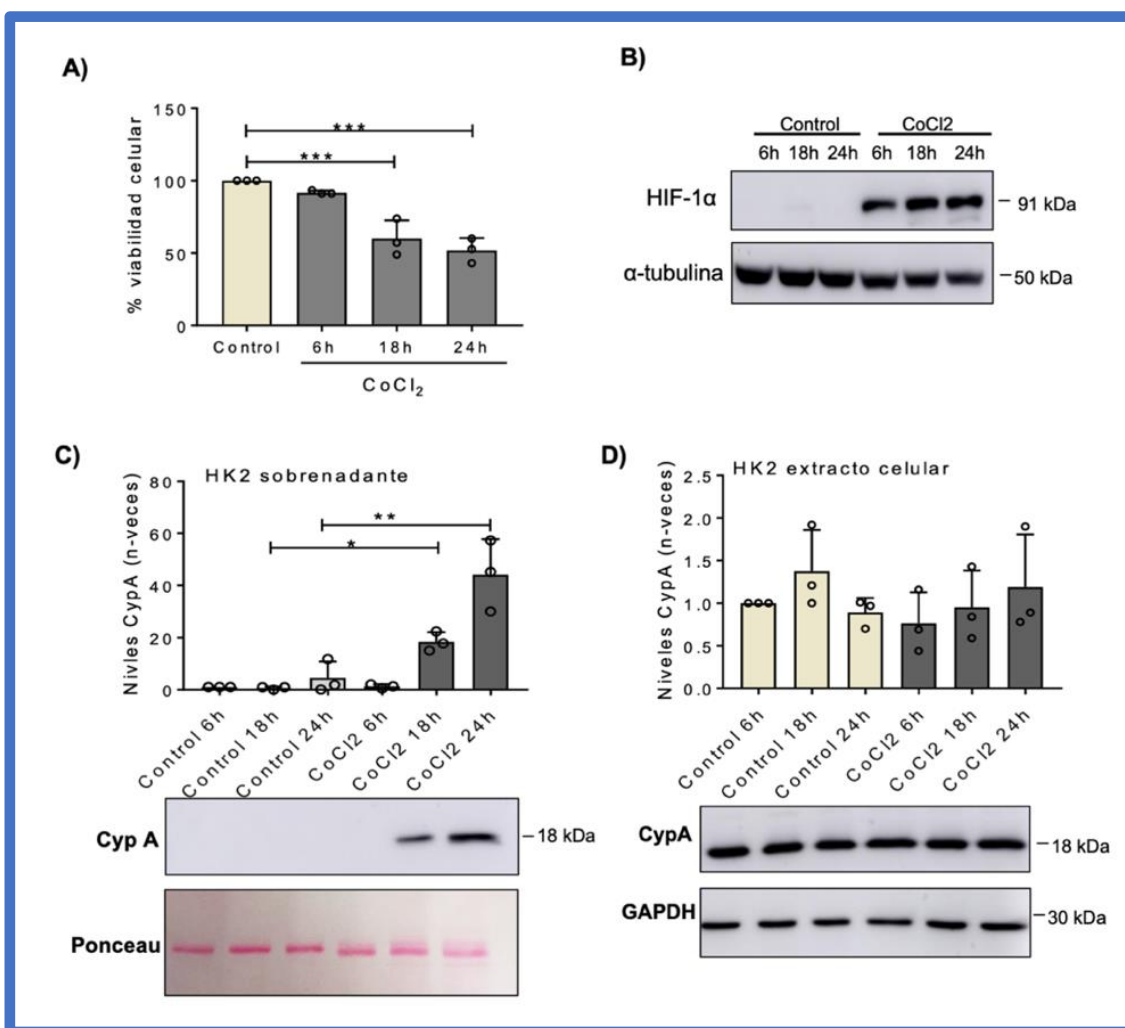


Ilustración 16. Liberación CypA en células HK2 sometidas CoCl_2 .

Liberación de CypA en células HK2, cultivadas y sometidas a hipoxia química ($500 \mu\text{M CoCl}_2$) durante diferentes periodos de tiempo (6, 18 y 24h). A) La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo MTT. B) Expresión de HIF-1 α mediante Western blot. C) Western blot de CypA en sobrenadantes celulares. D) Western Blot de CypA y GAPDH en extractos celulares. Cuantificación e imagen representativa. A), C) y D) Media \pm DE de tres experimentos independientes. * y ** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

1.1.2 HIPOXIA/REOXIGENACIÓN (H/R) EN CÉLULAS TUBULARES MURINAS MCT.

A continuación, pasamos a estudiar el efecto de la H/R en células tubulares murinas MCT (**Ilustración 17**). En primer lugar, analizamos el efecto de la H/R sobre la viabilidad celular, mediante ensayo de MTT, observando una fuerte reducción de ésta en comparación con las células cultivadas en normoxia. El efecto de la H/R sobre la viabilidad celular era dependiente del tiempo de reoxigenación, a tiempos más largos observábamos más daño (**Ilustración 17, gráfica A**).

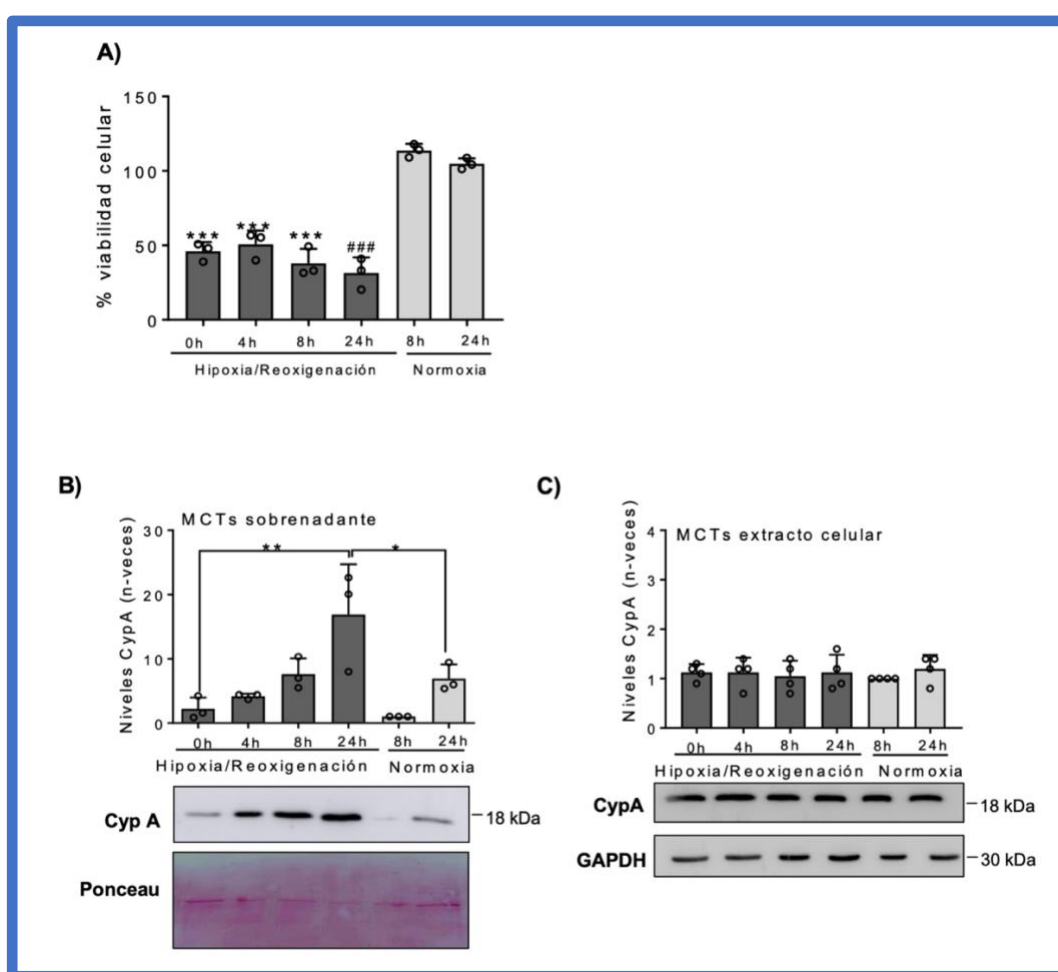


Ilustración 17. Liberación CypA en células MCT sometidas a H/R.

CypA es liberado por células MCT expuestas a H/R. Se cultivaron células MCT durante 24 h en una atmósfera hipóxica, luego se reoxigenaron durante los periodos de tiempo indicados. A) La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo MTT. Media \pm DE de tres experimentos independientes. *** $p < 0,001$ frente a normoxia 8 h; ### $p < 0,001$ frente a normoxia 24 h. B) y C) Western blot de CypA en sobrenadantes celulares B) CypA y GAPDH en extractos celulares C). Cuantificación e imagen representativa. Media \pm DE de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Una vez comprobado el efecto letal de la H/R sobre las células MCT pasamos a analizar la liberación de CypA. Observamos un incremento progresivo de sus niveles en el medio extracelular tras la reoxigenación (**Ilustración 17, gráfica B**). En las células en normoxia se ve un pequeño aumento de la liberación de CypA probablemente debido al efecto de la ausencia de suero en el medio de cultivo (**Ilustración 17, gráfica C**). Al igual que en las células HK2, en este caso tampoco aumentaban los niveles intracelulares de CypA (**Ilustración 16, gráfica D**).

1.2 LAS CÉLULAS TUBULARES RENALES LIBERAN CYP A EN RESPUESTA A LA ACTIVACIÓN DE MECANISMOS ESPECÍFICOS DE MUERTE CELULAR.

Durante la isquemia renal se pueden activar distintos mecanismos de muerte celular como la apoptosis, necroptosis y ferroptosis [76], [224]. Una vez determinado que las células tubulares liberan CypA en respuesta a hipoxia y a H/R pasamos a valorar el efecto de estas vías de muerte celular sobre la liberación de la CypA.

En primer lugar, indujimos **apoptosis** y **necroptosis** en las células tubulares MCT con el coctel de citoquinas TWEA/TNF α /IFN γ (TTI) o con TTI/zVAD respectivamente. El zVAD es un inhibidor de caspasas que en presencia de TTI provoca un cambio muerte celular por apoptosis a necroptosis [217], [225]. Mediante ensayos MTT observamos una reducción de la viabilidad celular con ambos tratamientos, aunque el efecto era más precoz y fuerte en células tratadas con el inductor de necroptosis TTI/zVAD (**Ilustración 18, gráfica A**). En cuanto a la liberación de la CypA obtuvimos resultados similares, ambos estímulos aumentaban los niveles de CypA en el medio de cultivo, sin embargo, con TTI no se observaba hasta las 18 horas mientras que con TTI/zVAD ya era evidente a las 6 horas, como esperábamos por las características de cada forma de muerte celular (**Ilustración 18, gráfica B**). Como en los casos anteriores, la determinación de CypA en extracto celular, no se altera, ni con la inducción de apoptosis, ni con la necroptosis frente al control. (**Ilustración 18, gráfica C**).

Por último, las células tubulares humanas HK2 se estimularon con el inductor de **ferroptosis** RSL3. Como en los casos anteriores comprobamos por MTT que el RSL3 reducía la viabilidad celular (**Ilustración 19, gráfica A**). Asimismo, también observamos que la inducción de ferroptosis con RSL3 promovía la liberación de CypA de forma

dependiente del tiempo, mientras que los niveles intracelulares se mantenían estables con el tratamiento (**Ilustración 19, gráficas B y C**).

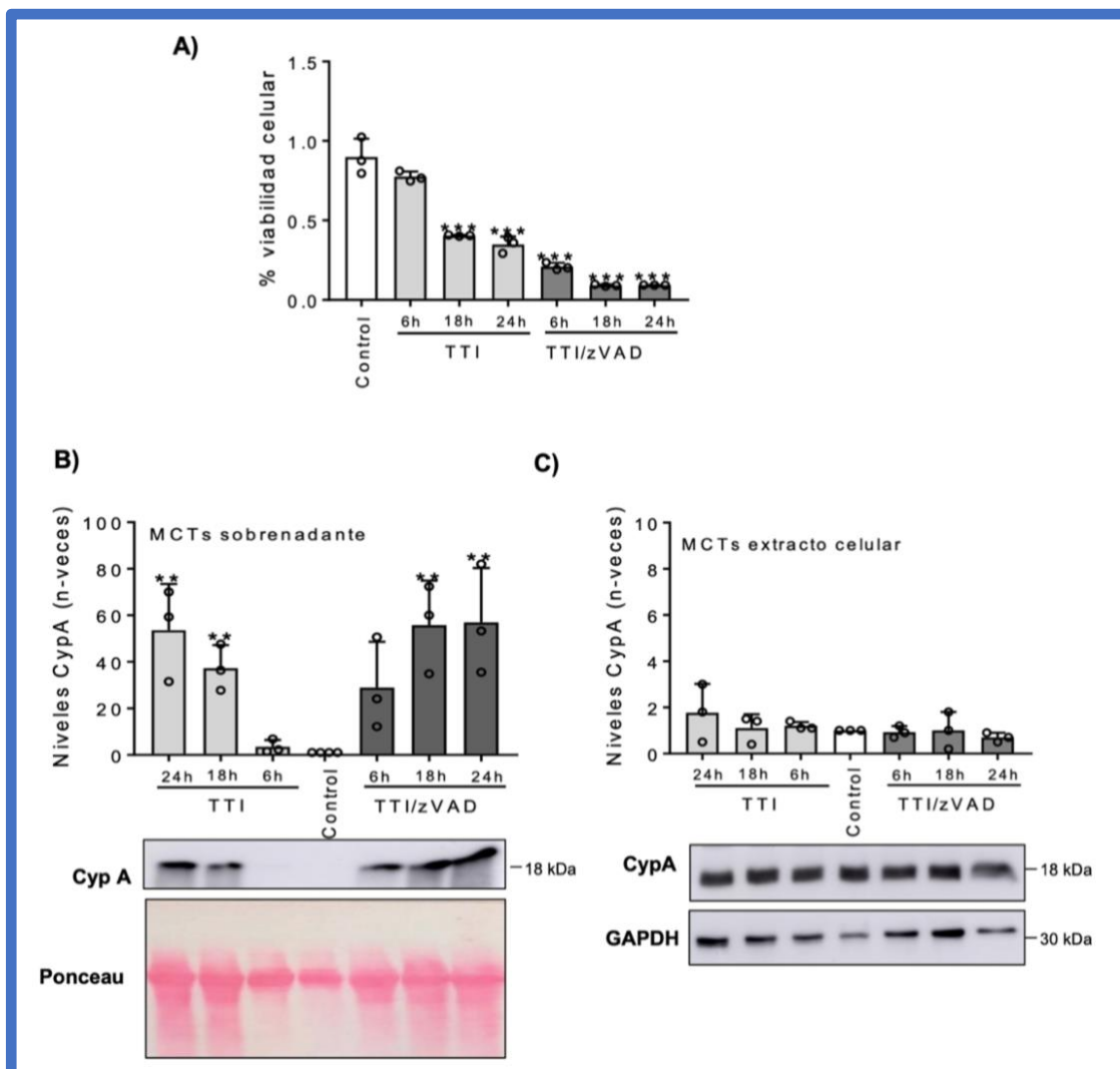


Ilustración 18. Liberación CypA en células MCT en respuesta al coctel de citoquinas pro-apoptótico TTI y en respuesta a la necroptosis inducida por TTI/zVAD.

La apoptosis y la necrosis inducen la liberación de CypA en células MCT. Las células MCT se expusieron al cóctel de citoquinas inductor de apoptosis TTI (TWEAK/TNF α /IFN γ), o al inductor de necroptosis TTI/zVAD durante los períodos de tiempo indicados. A) La viabilidad celular mediante el ensayo MTT. Media \pm DE de tres experimentos independientes. *** $p < 0,001$ frente al control. B) y C) Western blot de CypA en sobrenadantes celulares B). CypA y GAPDH en extractos celulares C). Téngase en cuenta que los controles están en medio de gel, y el curso del tiempo se representa desde allí, es decir, los puntos de tiempo posteriores para ambos estímulos están en sitio opuestos del gel y la figura. Cuantificación e imagen representativa. Media \pm DE de tres experimentos independientes. ** $p < 0,01$

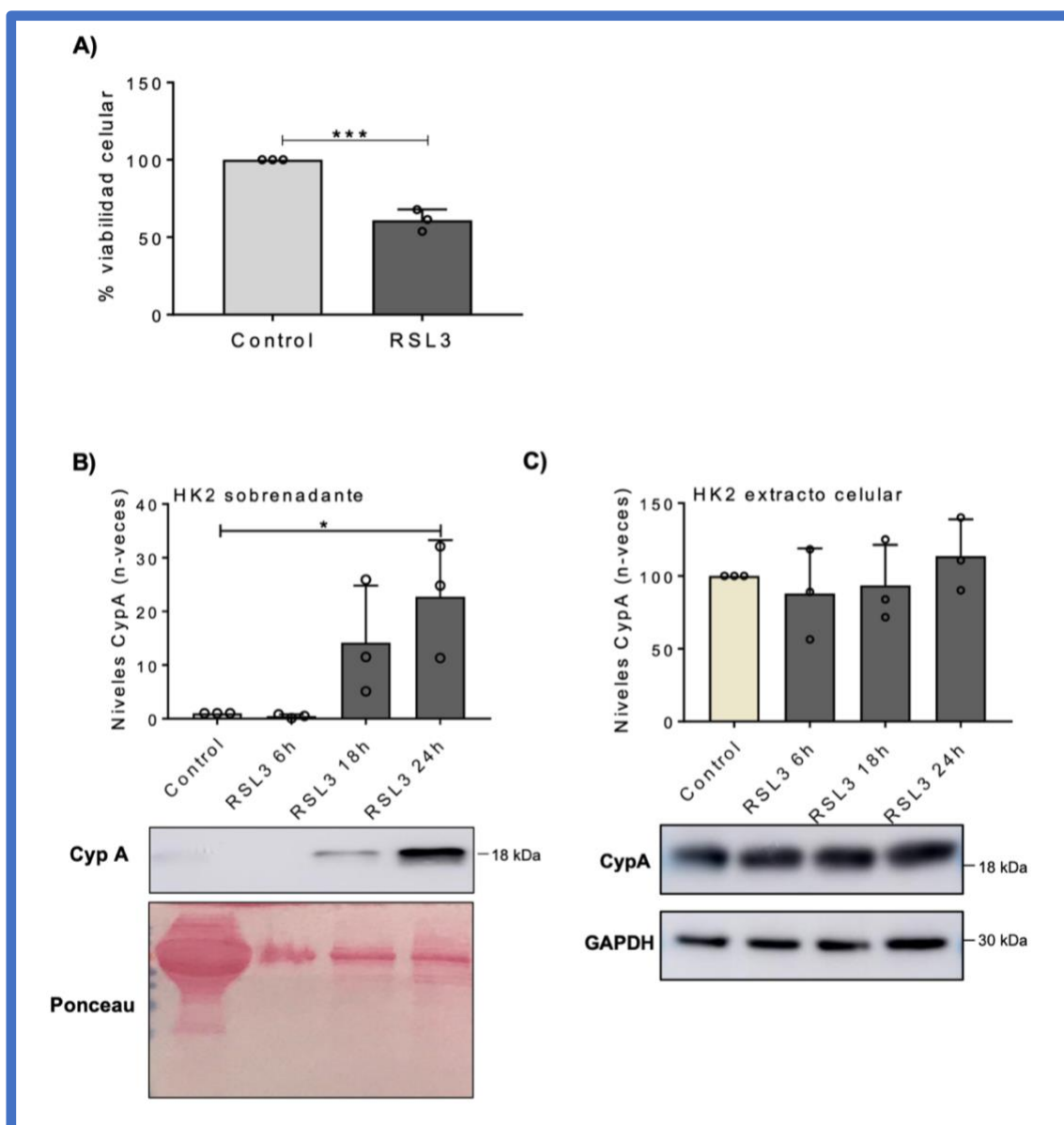


Ilustración 19. Liberación CypA en células HK2 en presencia del inductor de ferroptosis RSL3.

La ferroptosis provoca liberación de CypA de las células tubulares proximales humanas cultivadas (HK2). A) Las células HK2 se expusieron a RSL3 400 nM, un inductor de muerte celular vía ferroptosis, por un periodo de 24 h y se evaluó la viabilidad celular mediante ensayo MTT. Media \pm DE de tres experimentos independientes *** $p < 0,001$. B) Cultivo de células HK2 tratadas con el inductor de ferroptosis RSL3 con efecto letal a las 24h comprobado con ensayo MTT. Media \pm DE de tres experimentos independientes. * $p < 0,001$. B) y C) Se expusieron células HK2 a 400 nM de RSL3 durante los periodos de tiempo indicados, y se determinó CypA mediante transferencia Western blot en sobrenadantes celulares B). CypA y GAPDH en extractos celulares C). Cuantificación e imagen representativa. Media \pm DE de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$.

2. NIVEL CLÍNICO:

Los resultados obtenidos a nivel experimental demuestran que la CypA se libera por las células tubulares en respuesta a hipoxia y a diferentes formas de muerte celular asociadas al daño renal por IR, lo que nos sugiere que puede ser un potencial biomarcador de muerte celular tubular y de daño renal. Para abordar este objetivo medimos los niveles de CypA en orina de tres cohortes de pacientes.

2.1 NIVEL I PACIENTES CON AGRESIÓN QUIRÚRGICA RENAL

Este apartado del estudio clínico se desarrolló en dos escenarios clínicos asociados a daño renal por IR, la CCN (clampaje arterial frente a no clampaje) y el TR de DV.

2.1.1 CCN

En primer lugar, medimos los niveles de CypA en pacientes sometidos a CCN (“Grupo CCN”). Estratificamos la cohorte en dos grupos, según se realizara clampaje o no de la arteria renal durante la cirugía, con el objetivo de analizar el efecto de la IR sobre los niveles urinarios de CypA.

2.1.1.1 VARIABLES DESCRIPTIVAS DE LA SERIE

Variables demográficas y hábito tabáquico		“Grupo CCN CON CLAMPAJE” n=39	“Grupo CCN SIN CLAMPAJE” n=13	p
Edad+		60,3 ± 11,5	65,5 ± 8,97	0,155
Antropométricas+	Peso	79,9 ± 17,10	69,4 ± 10,90	0,051
	Talla	1,69 ± 0,10	1,65 ± 0,08	0,191
	IMC	27,8 ± 4,81	26,0 ± 4,09	0,254
Raza	Blanca	37 (94,8%)	13 (100%)	1,000
	Hispana	1 (2,5%)	0 (0,0%)	
	Indoasiática	1 (2,5%)	0 (0,0%)	
	Negra	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
Sexo hombre	Hombre ♂	29 (74,3%)	8 (61,5%)	0,278
	Mujer ♀	10 (25,6%)	5 (38,4%)	
Fumador	Nunca	19 (48,7%)	7 (53,8%)	0,213
	Sí	11 (28,2%)	1 (7,6%)	
	Exfumador	9 (23,0%)	5 (38,4%)	

Tabla 5. “Grupo CCN”. Variables demográficas y hábito tabáquico.

+ Media ± EEM

No se objetivaron diferencias entre los dos grupos en sus características demográficas o en relación con el consumo de tabaco (**Tabla 5**). La variable peso se aproxima a la significación estadística, en el “Grupo CCN CON CLAMPAJE” $79,9 \pm 17,10\text{Kg}$, frente al “Grupo CCN SIN CLAMPAJE” $69,4 \pm 10,90\text{Kg}$ ($p=0,051$).

Comorbilidad y enfermedad renal asociada		“Grupo CCN CON CLAMPAJE” n=39	“Grupo CCN SIN CLAMPAJE” n=13	p
HTA		18 (46,1%)	6 (46,1%)	0,989
DM		7 (17,9%)	3 (23,0%)	0,668
DL		14 (35,8%)	7 (53,8%)	0,182
Filtrado glomerular estimado preoperatorio	Sin daño renal IRC I FG >90	33 (84,6%)	11 (84,6%)	0,859
	IRC II FG 60-89	2 (5,1%)	0 (0%)	
	IRC IIIA FG 45-59	3 (7,6%)	1 (7,6%)	
	IRC IIIB FG 30-44	1 (2,5%)	1 (7,6%)	
	IRC IV FG 15-29	0 (0%)	0 (0%)	
	IRC V FG <15	0 (0%)	0 (0%)	
Enfermedad cardiovascular		4 (10,2%)	2 (15,3%)	0,584
Índice de Charlson	Charlson total	2,5 (2)	2 (1,25)	0,479
	Charlson edad	4,0 (3,0)	4 (1,25)	0,677

Tabla 6. “Grupo CCN”. Comorbilidad y enfermedad renal asociada.

En enfermedad cardiovascular se incluyeron antecedentes de cardiopatía isquémica, infarto agudo de miocardio, accidente cerebrovascular, accidente isquémico transitorio, vasculopatía periférica, claudicación intermitente, insuficiencia cardíaca, arritmia cardíaca. FG= filtrado glomerular según fórmula CKD-EPI ($\text{ml}/\text{min}/1,73\text{m}^2$).

No encontramos diferencias entre ambos grupos en relación con sus enfermedades asociadas o función renal estimada preoperatoria (**Tabla 6**).

Tratamiento habitual	“Grupo CCN CON CLAMPAJE” n=39	“Grupo CCN SIN CLAMPAJE” n=13	p
Bloqueadores sistema renina angiotensina aldosterona	15 (38,4%)	5 (38,4%)	1,00
Estatinas	12 (30,7%)	6 (46,1%)	0,294
Anticoagulante/antiagregante	11 (28,2%)	3 (23,0%)	0,480

Tabla 7. “Grupo CCN”. Tratamiento habitual de los pacientes.

No encontramos diferencias entre ambos grupos en relación con el tratamiento habitual que seguían hasta el momento de la cirugía (**Tabla 7**).

Variables relacionadas tumor al diagnóstico		“Grupo CCN CON CLAMPAJE” n=39	“Grupo CCN SIN CLAMPAJE” n=13	p	
Diámetro máximo de la lesión+ (Medido en TAC en mm)+		31,3 ± 8,93	22,5 ± 8,93	0,006	
Localización de la lesión	Polo superior	14 (35,8%)	0 (0,0%)	0,039	
	Mesorrenal	14 (35,8%)	8 (61,5%)		
	Polo inferior	11 (28,2%)	5 (38,4%)		
Unidad renal afecta	Derecho	19 (48,7%)	4 (30,7%)	0,235	
	Izquierdo	20 (51,2%)	9 (69,2%)		
Nefrometría	RENAL*	6,00 (2,00)	6,00 (1,00)	0,521	
	Padua*	8,00 (2,00)	7,00 (0,00)	0,071	
	C.Index+	2,52 ± 0,92	3,25 ± 1,47	0,141	
	DAP*	6,00 (2,00)	5,00 (2,00)	0,021	
	NePhRO*	8,00 (1,00)	6,00 (2,00)	0,011	
	ABC	Categoría 1	8 (20,5%)	5 (38,4%)	0,124
		Categoría 2	23 (58,9%)	7 (53,8%)	
		Categoría 3H	2 (5,1%)	1 (7,6%)	
		Categoría 3S	6 (15,3%)	0 (0,0%)	
	RPS	<50% extrarrenal	7 (17,9%)	3 (23,0%)	1,000
		>50% intrarrenal	32 (82,0%)	10 (76,9%)	
Mayo MAP fat*		3,00 (3,00)	3,00 (2,00)	0,468	

Tabla 8. “Grupo CCN”. Variables relacionadas con las características del tumor al diagnóstico.

* Mediana y (rango intercuartílico). + Media ± EEM

Objetivamos diferencias entre los dos grupos en las variables relacionadas con el tumor en el momento del diagnóstico (**Tabla 8**). El tamaño de la lesión fue superior en el “Grupo CCN CON CLAMPAJE” 31,3 ± 8,93mm, frente al “Grupo CCN SIN CLAMPAJE” 22,5 ± 8,93mm (p=0,006). También se apreciaron diferencias en la ubicación de la lesión a tratar: en “Grupo CCN SIN CLAMPAJE” no hubo lesiones en el polo superior, un 61,5% se ubicaron a nivel mesorrenal y un 38,4% en el polo inferior, frente al “Grupo CCN CON CLAMPAJE” en el que la lesión estaba en estas respectivas ubicaciones en el 35,8%, 35,8% y 28,2% de los casos (p=0,039). No encontraron diferencias en la unidad renal afecta entre los dos grupos.

Las únicas escalas nefrométricas que mostraron diferencias entre los dos grupos fueron la DAP, 6,00 puntos frente a 5,00 ($p=0,021$) y la NePhRO de 8,00 frente a 6,00 ($p=0,011$) respectivamente en **“Grupo CCN CON CLAMPAJE”** y **“Grupo CCN SIN CLAMPAJE”**. En el resto de escalas nefrométricas no se encontraron diferencias.

Variables intraoperatorias e ingreso		“Grupo CCN CON CLAMPAJE” n=39	“Grupo CCN SIN CLAMPAJE” n=13	p
ASA	I	3 (7,6%)	3 (23,0%)	0,048
	II	24 (61,5%)	7 (53,8%)	
	III	12 (30,7%)	2 (15,3%)	
	IV	0 (0,0%)	1 (7,6%)	
Tiempo de cirugía (min.)		206 ± 45,1	188 ± 43,0	0,251
Tiempo de clampaje (min.)		22,0 ± 8	0	-
Sangrado estimado (cc.)		200 (200)	100 (100)	0,222
Complicaciones intraoperatorias		1 (2,5%)	1 (7,6%)	0,426
Transfusión		2 (5,1%)	0 (0%)	1,000
Complicaciones postoperatorias		10 (25,6%)	3 (23,0%)	0,656

Tabla 9. “Grupo CCN”. Valores de riesgo ASA y tiempos de cirugía, clampaje y sangrado estimado.

Complicaciones intraoperatorias (hemodinámicas, cardiológicas, vasculares): para ambos grupos fue 1, hemodinámica. Complicaciones postoperatorias (fístula urinaria, infección respiratoria, relacionados con la herida, sangrado, otros): “Grupo CCN CON CLAMPAJE” 3 grado I, 4 grado II, 2 grado IIIB y 1 grado IV. En el “Grupo CCN SIN CLAMPAJE” 1 grado I, 1 grado II y 1 grado IIIB (Clavien-Dindo). Tiempo de cirugía y clampaje expresado en minutos (media ± EEM).

Entre las variables intraoperatorias y perioperatorias (**Tabla 9**), la única que llegó a mostrar una diferencia en la significación estadística entre los dos grupos fue la escala ASA de riesgo anestésico peroperatoria ($p=0,048$). No se objetivaron diferencias entre en el tiempo quirúrgico, el sangrado estimado, las complicaciones ni la tasa de transfusión.

El tiempo medio de clampaje, solo es aplicable al **“Grupo CCN CON CLAMPAJE”**, fue de 22,0 ± 8 min. de IC, no se realizó IF en ningún caso (**Tabla 9**).

No hubo diferencias entre ambos grupos en la diuresis registrada en las primeras 24h tras la cirugía. La variación de hemoglobina (Δ Hemoglobina) entre la analítica

preoperatoria y la registrada a las 24h de la cirugía resultó significativa **“Grupo CCN CON CLAMPAJE”** -2,6 (1,35) gr/dl frente al **“Grupo CCN SIN CLAMPAJE”** -1,8 (1,32) gr/dl ($p=0,011$). La variación de hematocrito (Δ Hematocrito) se aproxima a la significación sin llegar a alcanzarla **“Grupo CCN CON CLAMPAJE”** -7,75 (5,37) % frente al **“Grupo CCN SIN CLAMPAJE”** -5,75 (3,80) % ($p=0,058$) (Tabla 10).

El tiempo de seguimiento en ambos grupos superó los 1095 días (3 años) en ambos grupos (Tabla 10).

Variables analíticas		“Grupo CCN CON CLAMPAJE” n=39	“Grupo CCN SIN CLAMPAJE” n=13	p
Diuresis (cc.)	Intraoperatoria*	150 (140)	140 (116)	0,656
	Diuresis 1 ^{as} 12h*	900 (600)	948 (630)	0,915
	Diuresis 1 ^{as} 24h*	2125 (1011)	1655 (892)	0,095
Δ analítica preoperatoria/24h postoperatoria	Δ Hemoglobina*	-2,60 (1,35)	-1,80 (1,32)	0,011
	Δ Hematocrito*	-7,75 (5,37)	-5,75 (3,80)	0,058
	Δ Creatinina*	0,00 (0,20)	0,00 (0,25)	0,371
Criterio KDIGO de FRA por Δ Creatinina		4 (10,25%)	1 (7,69%)	0,613
Δ FG estimado pre/seguimiento+		6,5 \pm 11,9	10,2 \pm 11,9	0,367
FG estimado seguimiento*		81,2 (18,1)	80,5 (17,7)	0,922
Tiempo seguimiento*		1125 (909)	1185 (418)	0,912

Tabla 10. “Grupo CCN”. Variables analíticas y diuresis.

Δ = variación. Δ Hemoglobina = hemoglobina preoperatoria (gr/dl) – hemoglobina a las 24h de la cirugía. Δ Hematocrito= hematocrito preoperatorio (%) – hematocrito a las 24h de la cirugía. Δ Creatinina= creatinina preoperatoria (mg/dl) – creatinina a las 24h de la cirugía. FG= filtrado glomerular según fórmula CKD-EPI (ml/min/1,73m²). FG estimado seguimiento corresponde al FG estimado en la última analítica registrada durante el seguimiento. Tiempo de seguimiento en días. * Mediana y rango intercuartil. + Media \pm EEM.

Histología y situación oncológica		“Grupo CCN CON CLAMPAJE” n=39	“Grupo CCN SIN CLAMPAJE” n=13	p
Estadio TNM	pT1a	30 (76,9%)	13 (100%)	0,325
	pT1b	9 (23,0%)	0 (0%)	
Histología	Células claras	19 (48,7%)	3 (23,0%)	0,047
	Cromóforo	3 (7,6%)	0 (0%)	
	Oncocitoma	6 (15,3%)	2 (15,3%)	
	Papilar	8 (20,5%)	6 (46,1%)	
	Otros	3 (7,6%)	2 (15,3%)	
Grado Fuhrman*	I	1 (4,5%)	0 (0%)	1,000
	II	18 (81,8%)	3 (100%)	
	III	2 (9,0%)	0 (0%)	
	IV	1 (4,5%)	0 (0%)	
Márgenes	Negativos	32 (82,0%)	11 (84,6%)	1,000
	No valorables	3 (7,6%)	1 (7,6%)	
	Positivos	4 (10,2%)	1 (7,6%)	
Situación oncológica	Remisión	37 (94,8%)	13 (100%)	1,000
	Recidiva	2 (5,1%)	0 (0%)	

Tabla 11. “Grupo CCN”. Histología y situación oncológica al final del seguimiento.

*Grado Fuhrman solo registrado para las variantes de células claras y cromófora

En relación con las variables histológicas y la situación oncológica (**Tabla 11**), encontramos diferencias en relación con la variedad histológica del tumor extirpado entre los dos grupos ($p=0,047$).

Dentro del grupo de pacientes sometidos a CCN hubo 5 que cumplieron criterios KDIGO [11] de FRA, nivel I tras la cirugía. Fueron 4 pacientes (10,25%) en el “**Grupo CCN CON CLAMPAJE**” y 1 paciente (7,69%) en el “**Grupo CCN SIN CLAMPAJE**” ($p=0,613$) (**Tabla 10. Ilustración 20, gráfica A**).

2.1.1.2 ANÁLISIS DE UCYP A EN PACIENTES SOMETIDOS A CCN

El clampaje de la arteria renal durante la CCN está asociado con un incremento en los niveles de uCypA (**Ilustración 20**).

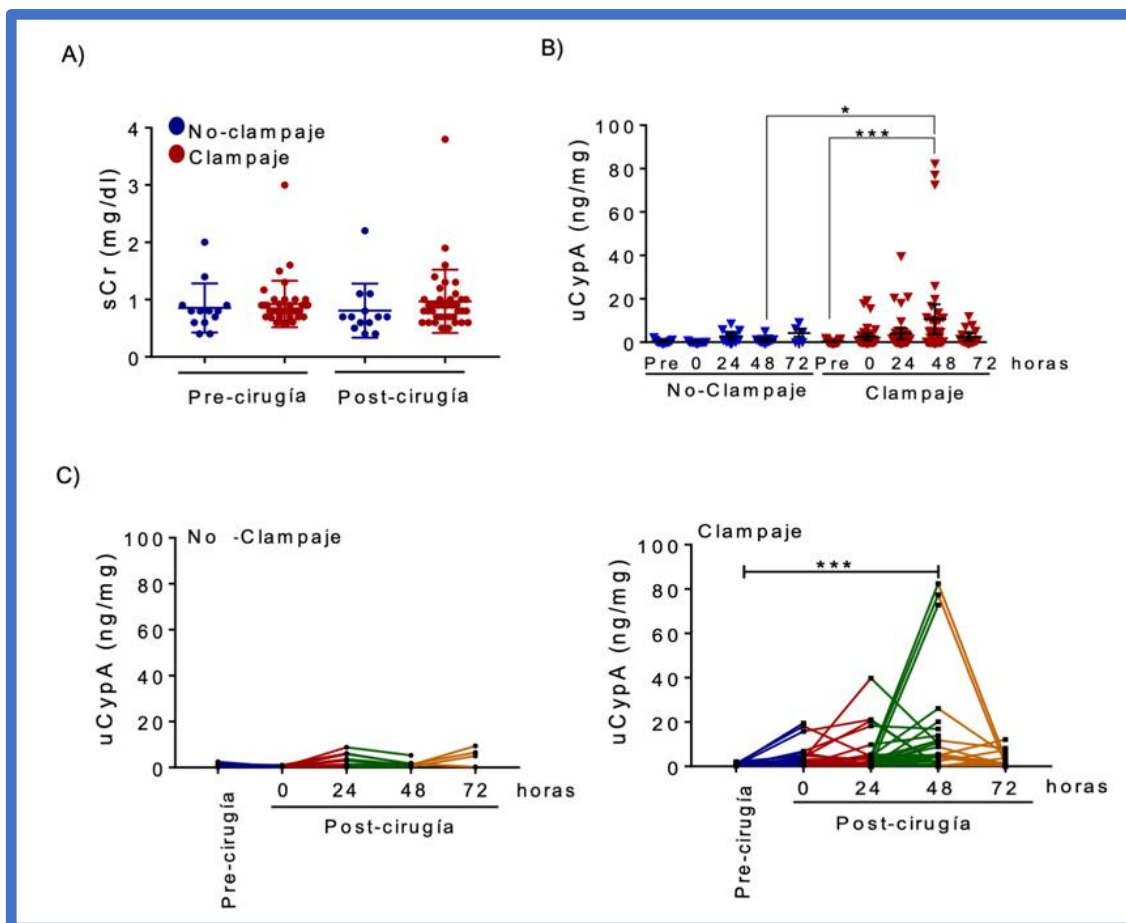


Ilustración 20. Niveles de uCypA en pacientes sometidos a CCN "Grupo CCN".

A) Los niveles de sCr no difirieron entre los pacientes del "Grupo CCN" con o sin clampaje arterial. B) Los niveles de uCypA aumentan tras la CCN en pacientes del "Grupo CCN CON CLAMPAJE". A y B) Valores representados como media \pm EEM * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. C) La evolución temporal de los niveles de uCypA, muestra un pico a las 24-48 h tras la cirugía en la mayoría de los pacientes "Grupo CCN CON CLAMPAJE", mientras que no se observó un pico claro en los del "Grupo CCN SIN CLAMPAJE". B) y C) uCypA se expresa como relación de uCypA y creatinina en orina.

Mediante ELISA analizamos los niveles de uCypA a distintos tiempos con respecto al momento de la cirugía: *basal Pre-cirugía, y postcirugía a 0h, 24h, 48h y 72h*. Los niveles de uCypA no aumentaron significativamente en los pacientes del "Grupo CCN SIN CLAMPAJE". Tampoco aumentaron por encima del valor inicial en el único paciente del "Grupo CCN SIN CLAMPAJE" que cumplió criterios de KDIGO de FRA. Por el contrario,

en los pacientes del grupo “**Grupo CCN CON CLAMPAJE**”, la uCypA se incrementó inmediatamente tras la cirugía (los valores de uCypA llegaron a ser entre 14 y 33 veces superiores al valor inicial en tres pacientes). En este grupo, los valores medios aumentaron aún más hasta las 48h tras la cirugía, momento en el que fueron significativamente mayores que el valor basal ($10,58 \pm 3,38$ frente a $0,39 \pm 0,08$ ng/mg, $p < 0,001$) (**Ilustración 20, gráfica B**). De forma individual, los pacientes a los que se realizó clampaje mostraron mayoritariamente un pico en los niveles de uCypA a las 24-48 h, mientras que no se observó un pico claro en pacientes que no precisaron clampaje (**Ilustración 20 gráfica C**). La uCypA aumentó respecto al valor inicial en los 4 pacientes con clampaje arterial que cumplieron los criterios KDIGO de FRA por elevación de sCr. Sin embargo, los pacientes que no tenían la sCr elevada también mostraron un aumento de la uCypA evidenciando daño renal en ausencia de una reducción evidente de la función renal evaluada por los niveles de sCr (**Ilustración 20, gráfica A**). La baja sensibilidad de los criterios KDIGO de FRA en este contexto clínico fue esperado dado que el riñón contralateral no fue afectado por la cirugía.

2.1.1.2.1 PUNTOS DE CORTE UCYP A PARA DEFINIR LESIÓN RENAL

Para definir los potenciales puntos de corte de los niveles de uCypA que podrían utilizarse para definir la existencia de lesión renal tras la cirugía, los valores se compararon con dos puntos de corte diferentes:

- El **primer punto de corte** se definió como el **valor de uCypA preoperatorio más elevado de la población en estudio**, se le denominó **valor basal**. Este punto de corte de uCypA se etiquetó como aumento por encima del valor basal ($> 2,5$ ng/mg) (**Ilustración 21, gráfica A**). Utilizando esta definición, se observó un aumento inmediato de los valores de uCypA en el 26% de los pacientes sometidos a CCN con clampaje arterial, pero en ninguno de los pacientes sin clampaje. Sin embargo, los hallazgos a las 24 horas sugirieron que la lesión tisular asociada a la cirugía, no relacionada con daño por IR, podría resultar en incrementos leves de uCypA en este mismo periodo del postoperatorio precoz. A las 48 horas, los valores de uCypA por encima del valor inicial fueron

mayoritariamente en el grupo sometido a clampaje (49%) (**Ilustración 21, gráfica A**).

- Un **segundo punto de corte** se definió como el **valor de uCypA más alto obtenido dentro de las 72 horas posteriores a la cirugía sin clampaje**, esto se consideró como el punto de corte del valor máximo de daño (>10 ng/mg) (**Ilustración 21, gráfica B**) y dará cuenta de la lesión tisular inducida por la propia cirugía, no relacionada con la IR. Utilizando esta definición, solo el clampaje de la arteria renal ocasionó valores de uCypA por encima del punto de corte. En concreto con este segundo punto de corte, un 8% de pacientes tendrían daño renal significativo potencialmente relacionado con daño de IR inmediatamente tras la cirugía, y un 28% a las 48 horas (**Ilustración 21, gráfica B**). Dentro del grupo de clampaje un total de 14 pacientes (36%) tuvieron un nivel de uCypA más alto del valor máximo de lesión en algún momento después de la CCN, que a su vez presentaban una cirugía más prolongada, un mayor sangrado durante la misma y un incremento de sCr tras la CCN (**Ilustración 21, gráfica C**), lo que sugiere que los niveles más elevados de uCypA están relacionados con una lesión renal mayor. En este sentido, los 4 pacientes con clampaje arterial y FRA clínico, tenían uCypA por encima del punto de corte del valor basal, y 3 de ellos por encima del punto de corte máximo de lesión.

Estos hallazgos sugieren la utilidad potencial de uCypA para detectar lesión renal por IR, cuando los parámetros clínicos que estiman la función renal no son fiables.

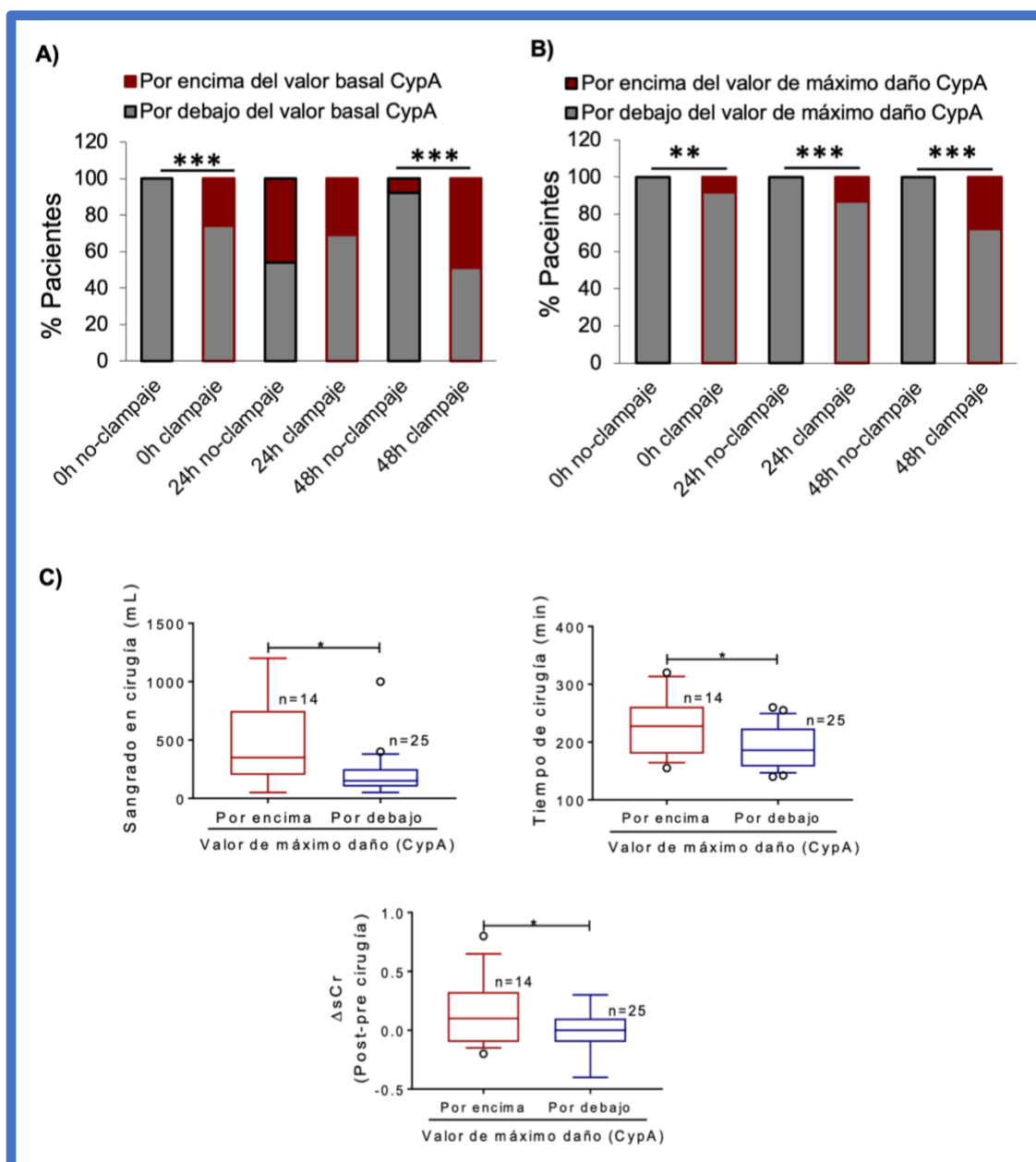


Ilustración 21. Puntos de corte de uCypA tras la CCN "Grupo CCN".

Porcentaje de pacientes con niveles elevados de uCypA tras la CCN, utilizando dos niveles de corte de uCypA diferentes para definir "uCypA elevado". A) Porcentaje de pacientes con valores postoperatorios de uCypA superiores al valor de uCypA preoperatorio más alto encontrado en la población del estudio, es decir, >2,5 ng/mg; *** p <0,001. B) Porcentaje de pacientes con valores de uCypA postquirúrgicos superiores más altos obtenidos en al CCN sin clampaje, es decir, >10 ng/mg; *** p <0,001. C) El tiempo y sangrado quirúrgico, así como la elevación de sCr son mayores en pacientes del "Grupo CCN CON CLAMPAJE" arterial y niveles uCypA por encima de los niveles máximos de lesión. Los datos se representan como diagramas de caja y muestran la media, percentiles 25/75 (caja) y percentiles 10/90 (barras). * p <0,05.

2.1.1.3 ANÁLISIS DE UNGAL EN PACIENTES SOMETIDOS A CCN

A continuación, en estos mismos pacientes medimos uNGAL, un biomarcador clásico de daño renal. Entre los 5 pacientes que cumplieron criterios de FRA (estadio I) según KDIGO por elevación de sCr tras la CCN, solo 1 (20%) perteneciente al grupo con clampaje presentó elevación de uNGAL por encima del valor inicial.

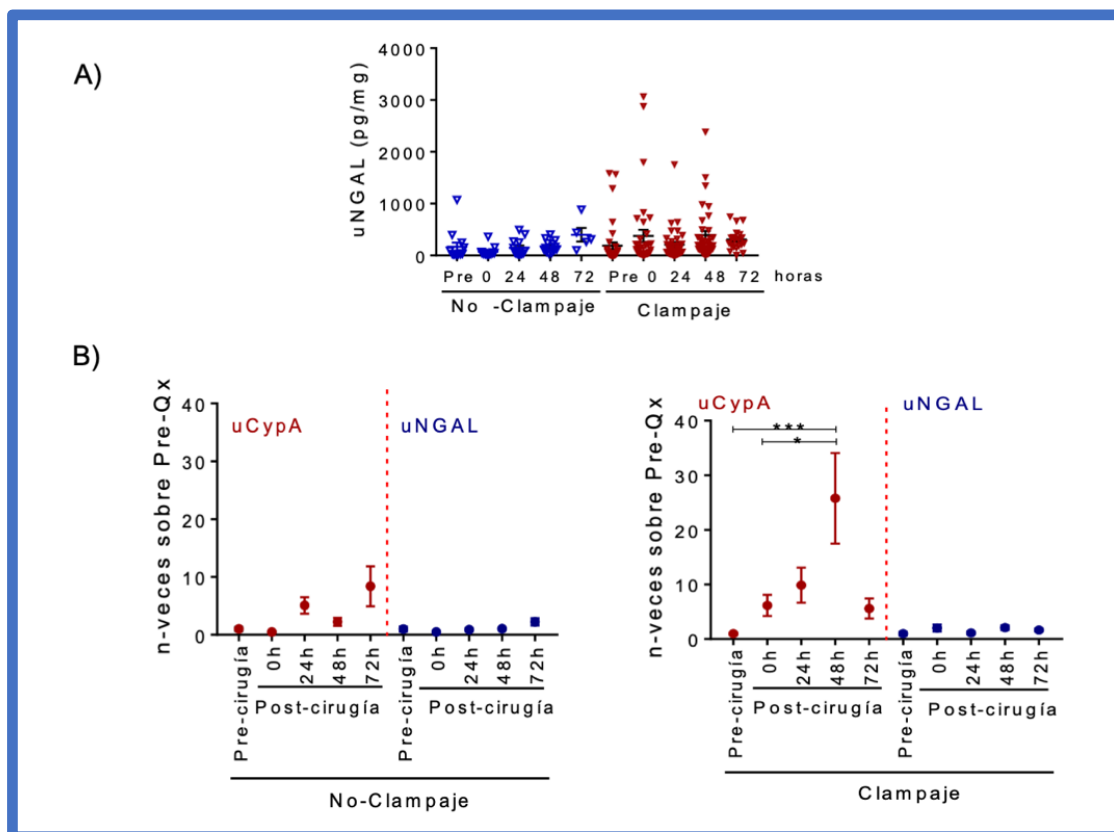


Ilustración 22. Niveles de uNGAL en pacientes sometidos a CCN "Grupo CCN".

A) Medimos los niveles de uNGAL antes y después de la cirugía. No se observaron cambios estadísticamente significativos. uNGAL se expresa como relación NGAL urinaria y creatinina en orina. Valores representados como media \pm EEM. B) Evolución temporal de los valores de uNGAL y uCypA expresados como "n-veces" sobre el valor medio basal previo a la cirugía. Solo se observaron aumentos estadísticamente significativos sobre el valor inicial para uCypA en pacientes con clampaje. Media \pm EEM. *p < 0,05; *** p < 0,001.

En relación con los niveles medios obtenidos de uNGAL, al igual que uCypA, el grupo con clampaje mostró valores más elevados a las 48 horas en comparación con el valor basal (392 ± 81 frente a 187 ± 66 pg/mg respectivamente), mientras que en el grupo sin clampaje no se observaba este aumento (167 ± 82 frente a 174 ± 32 pg/mg

respectivamente), sin embargo, estas diferencias no fueron significativas (**Ilustración 22, gráfica A**).

Además, cuando calculamos el aumento sobre la media de los valores pre-cirugía este fue inferior para uNGAL que para uCypA, y no se apreciaron diferencias significativas entre los grupos con y sin clampaje en relación con los valores de uNGAL (**Ilustración 22, gráfica B**). Esto difiere del aumento significativo (a las 48 horas frente a su nivel basal, $p < 0,001$) y mantenido entre 6,4 y 26,5 veces de los valores de uCypA, antes y después de la cirugía, en los pacientes del “**Grupo CCN CON CLAMPAJE**” (**Ilustración 22, gráfica B**).

2.1.1.3.1 PUNTOS DE CORTE UNGAL PARA DEFINIR LESIÓN RENAL

Para determinar los puntos de corte de uNGAL como se estableció previamente con uCypA, usamos las mismas definiciones (aumento por encima de los puntos de corte de nivel basal y de nivel máximo), pero en este caso no observamos una asociación clara entre uNGAL y la CCN con o sin clampaje para ninguna de las situaciones analizadas (**Ilustración 23, gráfica A**). Si bien la utilización del punto de lesión máxima como punto de corte (es decir, por encima del valor máximo postoperatorio del grupo sin clampaje), resultó en un porcentaje significativamente mayor de pacientes del grupo con clampaje con niveles elevados de uNGAL inmediatamente después de la cirugía, este porcentaje (12,5%) estaba en el rango basal observado para ambos grupos (con y sin clampaje) (**Ilustración 23, gráfica B**). Finalmente, al contrario de lo observado con uCypA, no hubo una clara asociación entre los valores de uNGAL por encima de punto de corte máximo de lesión y la duración de la cirugía o la elevación de la sCr tras la CCN, aunque si con el sangrado (**Ilustración 23, gráfica C**).

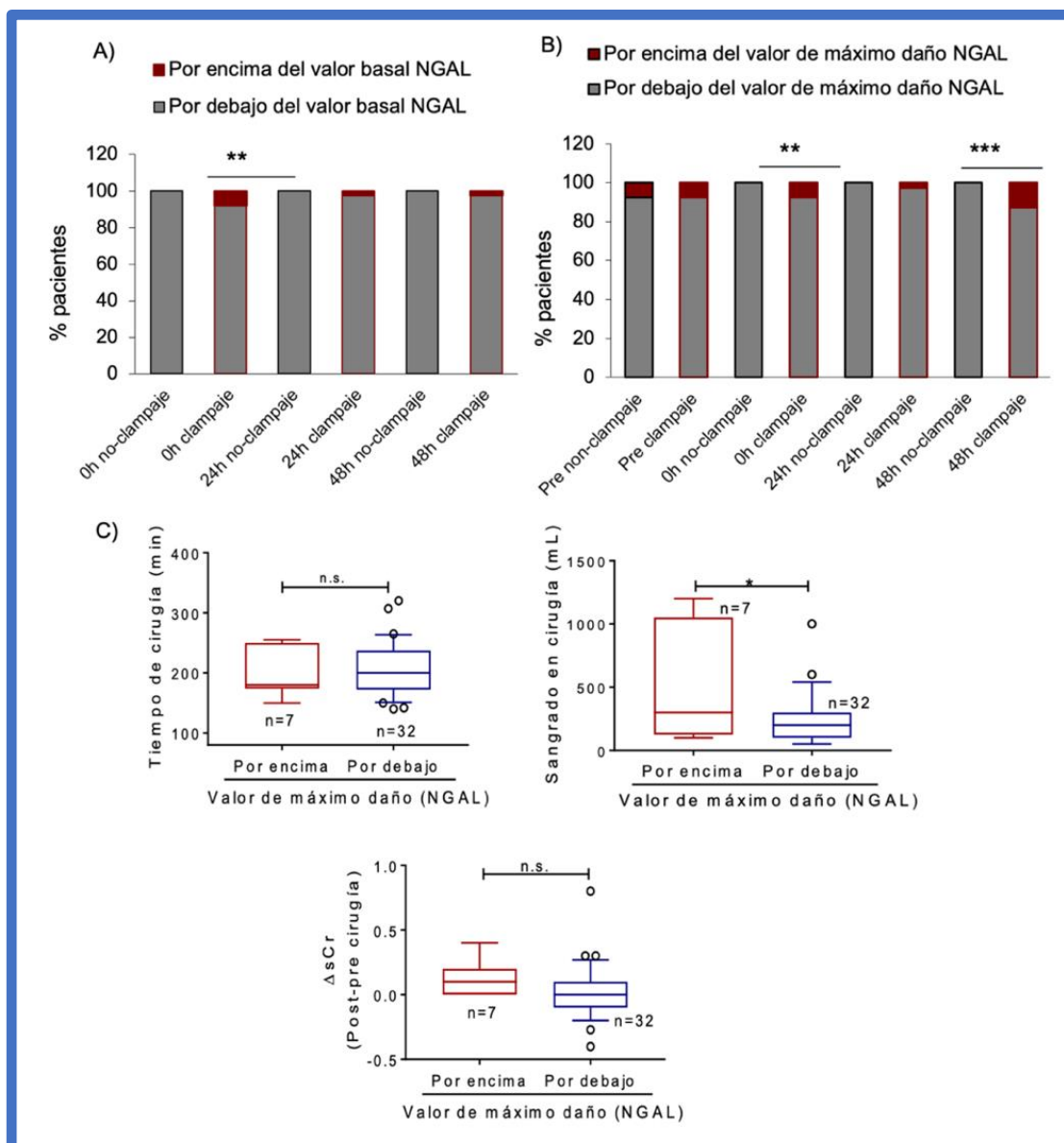


Ilustración 23. Puntos de corte de uNGAL tras la CCN "Grupo CCN".

A) Porcentaje de pacientes con valores de uNGAL tras la cirugía por encima del valor preoperatorio más alto encontrado en la población en estudio, es decir > 1600 pg/mg. B) Porcentaje de pacientes con valores de uNGAL tras la cirugía superiores a los valores postquirúrgicos más elevados obtenidos tras la CCN sin clampaje, es decir >900 pg/mg; $***p < 0,001$. C) Tiempo de cirugía, sangrado quirúrgico, aumento de sCr en pacientes con uNGAL por encima de los niveles máximos de lesión. Los datos se representan como diagramas de caja que muestran la media, percentiles 25/75 (caja) y percentiles 10/90 (barras). $*p < 0,05$.

2.1.1.4 CORRELACIÓN UCYP A Y UNGAL

La correlación entre uCypA y uNGAL fue pobre y solo estadísticamente significativa en pacientes del grupo con clampaje a las 48h (**Ilustración 24**).

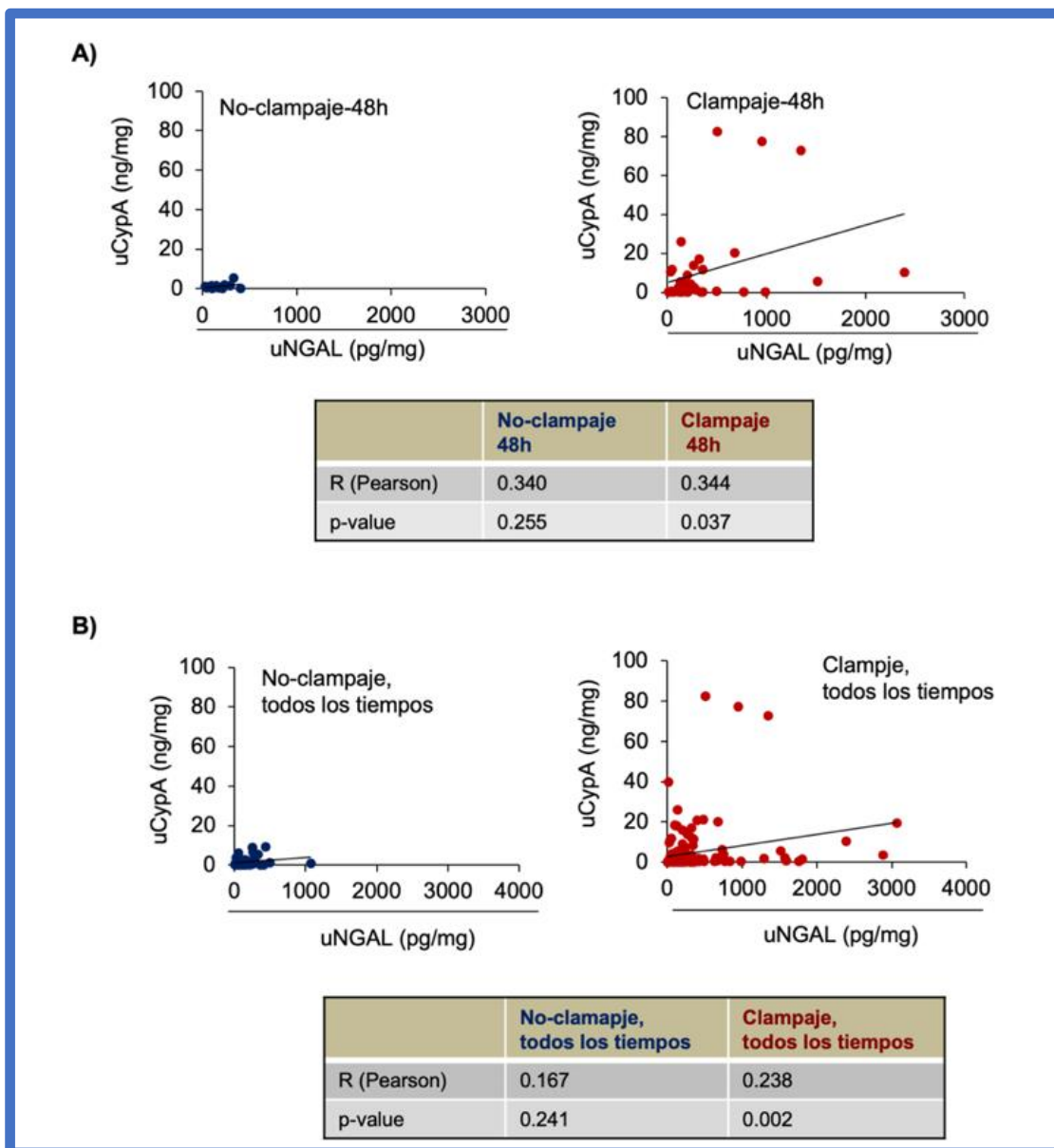


Ilustración 24. Correlación entre uCypA y uNGAL en pacientes sometidos a CCN "Grupo CCN".

A) A las 48 horas de la cirugía. B) En todas las muestras, incluidas las preoperatorias.

2.1.2 TR DE DV

En segundo lugar, medimos los niveles de uCypA en pacientes sometidos a TR de DV con diuresis inmediata y con progresiva normalización de la función renal en los receptores medida con los niveles de sCr (**Ilustración 25, gráfica A**).

2.1.2.1 VARIABLES DESCRIPTIVAS DE LA SERIE

El “**Grupo Tx**”, pacientes sometidos a nefrectomía laparoscópica para TR de DV consta de 6 parejas de pacientes con las siguientes variables descriptivas (**Tabla 12**).

Pareja donante y receptor		Edad	Sexo	Parentesco	FII	Tiempo IC (min.)	Tiempo IF (min.)
Pareja 1	Donante 1	51	♀	Hermanas	Sí	3	80
	Receptor 1	70	♀				
Pareja 2	Donante 2	65	♀	Pareja	Sí	2,53	78
	Receptor 2	74	♂				
Pareja 3	Donante 3	56	♀	Pareja	Sí	2	75
	Receptor 3	60	♂				
Pareja 4	Donante 4	64	♀	Madre e hijo	Sí	4	83
	Receptor 4	38	♂				
Pareja 5	Donante 5	63	♂	Pareja	Sí	5	95
	Receptor 5	61	♀				
Pareja 6	Donante 6	54	♂	Padre e hija	Sí	2,33	90
	Receptor 6	21	♀				

Tabla 12. “Grupo Tx”. Variables descriptivas

“Grupo Tx” donantes y receptores de TR. Datos demográficos, función inmediata del injerto (FII) y tiempos de isquemia (isquemia caliente (IC) e isquemia fría (IF) en minutos) de las parejas donante/receptor sometidas a nefrectomía laparoscópica y TR de DV. Complicaciones registradas: “Grupo Tx DONANTES” 1 grado II y 1 grado IIIB. “Grupo Tx RECEPTORES” 1 grado I, 2 grado II (Clavien-Dindo).

Entre las causas de la IRCT del “**Grupo Tx RECEPTORES**” encontramos: nefropatía diabética, 2 síndromes hemolíticos urémicos, nefropatía intersticial y 2 glomerulonefritis IgA.

Los tiempos medios de IC fueron de $3,06 \pm 1,14$ min. y de IF $83,5 \pm 7,6$ min. Todos los injertos presentaron FI con diuresis inmediata y mantenida ($>0,5$ ml/kg/h). La sCr en los receptores se redujo de forma inmediata y progresiva hasta su normalización antes de la primera semana del trasplante. Ningún receptor precisó tratamiento sustitutivo de la función renal tras la cirugía. El daño renal ocasionado durante la cirugía de extracción renal, la preservación en frío y la reperfusión permaneció subclínico.

2.1.2.2 ANÁLISIS DE UCYP A Y UNGAL EN PACIENTES SOMETIDOS A TR DE DV

Los niveles medios de uCypA en pacientes trasplantados aumentaron progresivamente desde el momento cero, en comparación con la orina basal (obtenida del donante), llegando a $20,82 \pm 6,8$ ng/mg y alcanzando significación estadística a las 48 y 72 horas (**Ilustración 25, gráficas B y C**). Por el contrario, el pico de uNGAL se observó en la primera determinación después de la cirugía, el único momento en el que fue significativamente más alto que en la orina del donante (3943 ± 940 pg/mg vs $139 \pm 28,5$ pg/mg) y a partir de entonces los niveles de NGAL disminuyeron (**Ilustración 25, gráficas D y E**). Los niveles de uNGAL en el grupo de receptores antes de la cirugía eran más altos que los de los donantes, en el rango de los encontrados inmediatamente después de la cirugía.

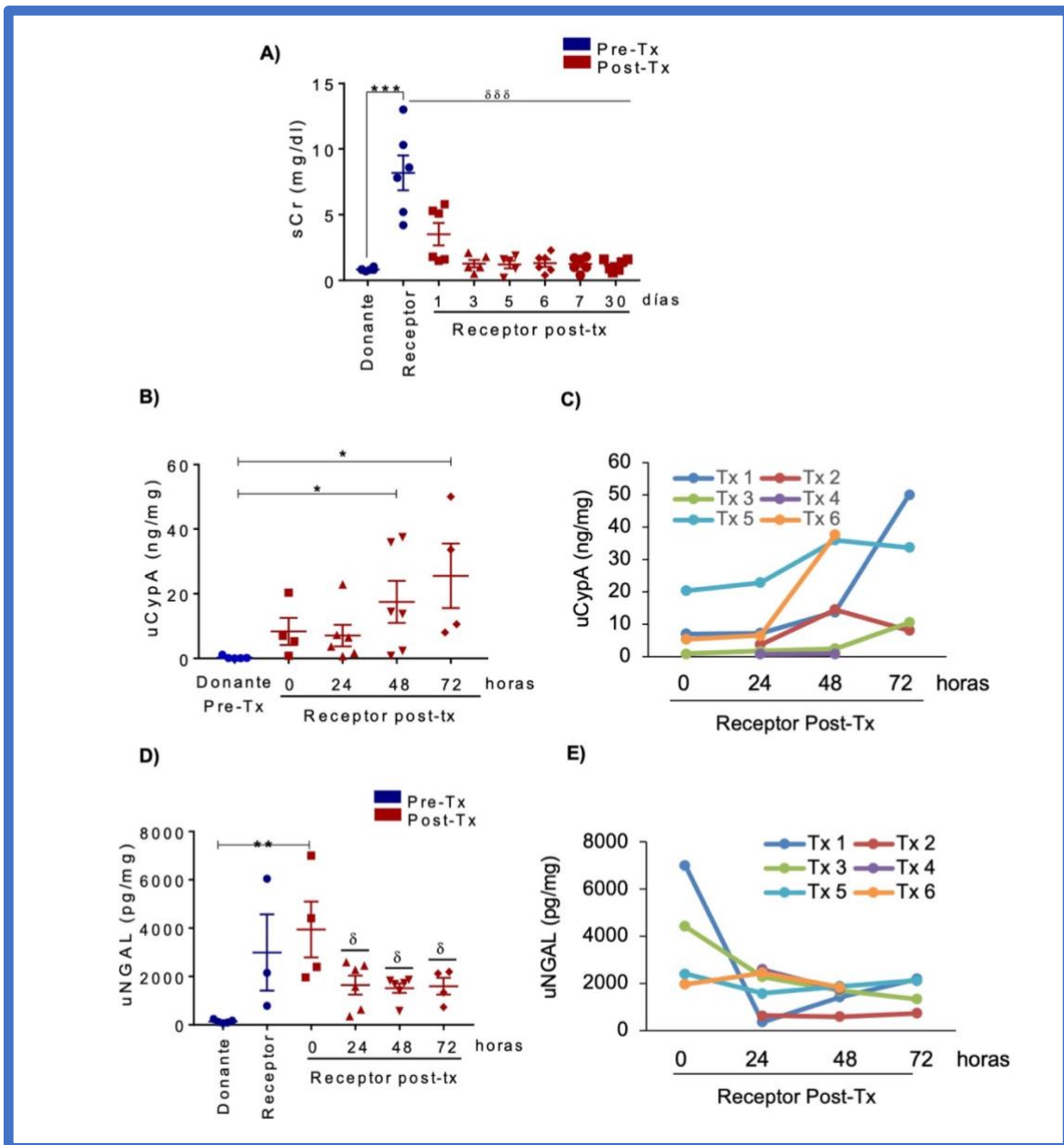


Ilustración 25. Niveles de uCypA y uNGAL en el grupo de pacientes sometidos a TR de DV "Grupo Tx".

Los niveles de uCypA aumentan tras la cirugía de TR de DV. A) Los niveles de sCr disminuyeron tras el TR. Valores representados como media \pm EEM. *** p < 0,05 Vs al donante; δδδ p < 0.001 Vs receptor antes del TR. B) Los niveles de uCypA aumentaron tras el TR en los receptores en comparación con la orina del donante. Valores representados como media \pm EEM. * p < 0,05. uCypA se expresa como CypA urinaria: cociente de creatinina en orina. C) La evolución temporal de los niveles de uCypA muestra un pico a las 24-48 horas después de la cirugía en la mayoría de los pacientes. D) Los niveles de uNGAL disminuyeron desde el momento cero de la cirugía, en los receptores de TR "Grupo Tx RECEPTORES". uNGAL se expresa como relación de NGAL urinaria: creatinina en orina. Valores representados como media \pm EEM. ** p < 0,01. E) La evolución temporal de los niveles de uNGAL muestra una disminución tras la cirugía en la mayoría de los pacientes.

2.2 NIVEL II PACIENTES HOSPITALIZADOS CON FRA.

Por último, medimos los niveles urinarios de CypA en pacientes con daño renal y criterios de FRA. Este apartado del estudio clínico se desarrolló en pacientes ingresados con FRA de diversa etiología.

2.2.1 VARIABLES DESCRIPTIVAS DE LA SERIE

Variables descriptivas "Grupo FRA" n= 40		
Edad*		66,8 ± 15,65
Sexo		29 ♂ (72,5%)
		11 ♀ (27,5%)
Servicio de ingreso	Servicio médico	27 (67,5%)
	Servicio quirúrgico	9 (22,5%)
	UCI	4 (10,0%)
Estancia hospitalaria*		11,15 ± 7,22
Causa FRA	Prerenal	20 (50,0%)
	Parenquimatosa	20 (50,0%)
	Obstructivo	0 (0%)
	Desconocida	0 (0%)
Tratamiento sustitutivo función renal	Sí	11 (27,5%)
	No	29 (72,5%)
Oligoanuria (<400ml/24h)		9 (22,5%)
Índice de Charlson		6 (3,52)
Mortalidad		9 (22,5%)
Pico de sCr*		7,49 ± 4,99
Clasificación FRA KDIGO al diagnóstico	I	6 (15,0%)
	II	6 (15,0%)
	III	28 (70,0%)

Tabla 13. "Grupo FRA" Variables descriptivas.

*Media ± EEM

Variables descriptivas "Grupo SANOS" n=11	
Edad	46,2 ± 14,45
Sexo	1♂ (9%)
	10 ♀ (91%)

Tabla 14. "Grupo SANOS" Variables descriptivas.

2.2.2 ANÁLISIS DE UCYP A Y UNGAL

Los niveles de uCypA y uNGAL aumentan en pacientes con daño renal y criterios de FRA frente al grupo control (**Ilustración 26, gráficas A y B**).

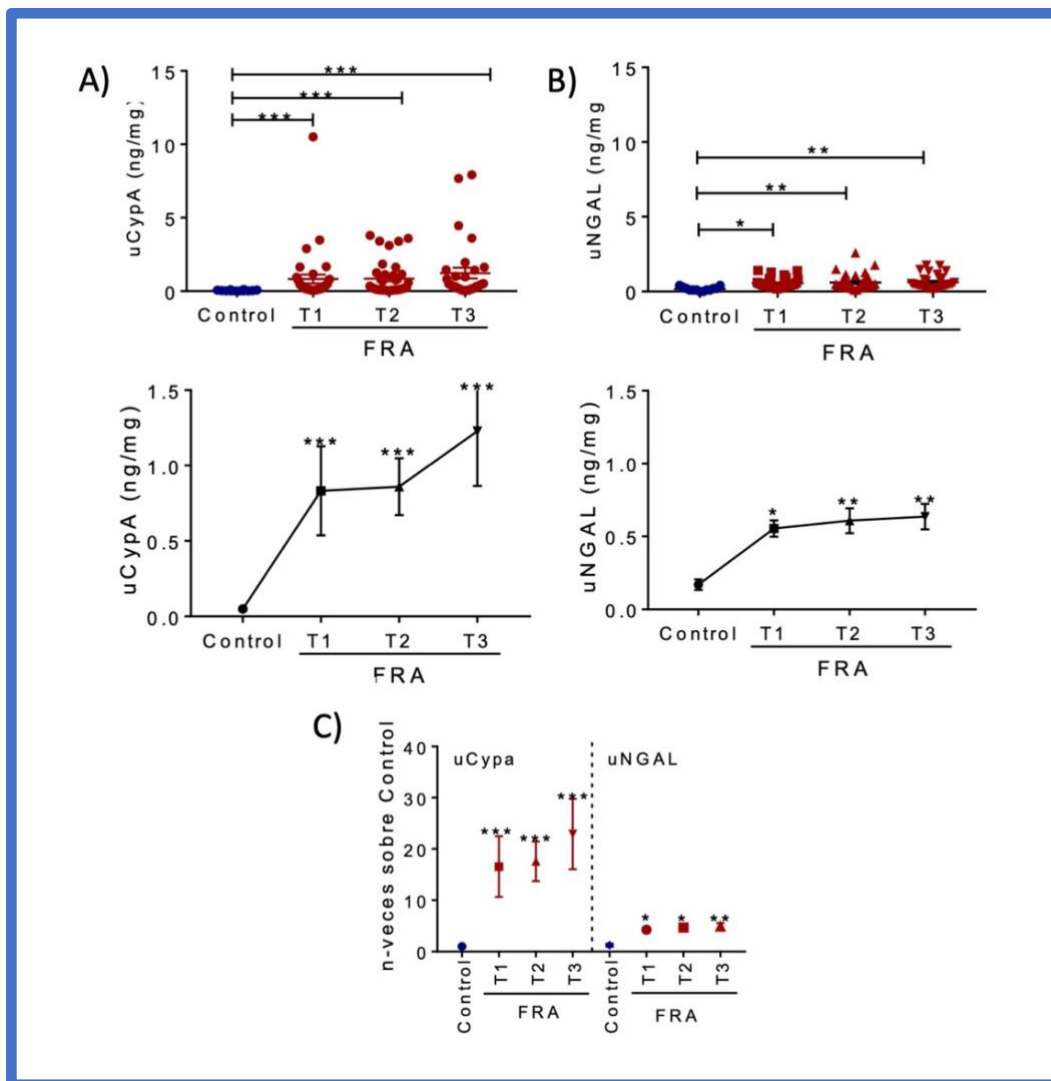


Ilustración 26. uCypA y uNGAL en "Grupo FRA" de pacientes diagnosticados FRA frente a "Grupo SANOS".

Los niveles de uCypA aumentan en pacientes con diagnóstico de FRA frente a controles sanos. T representa la determinación en el tiempo (T1 al diagnóstico, T2 a los 3 ± 2 días del diagnóstico, T3 al alta por Nefrología). A) Los niveles de uCypA aumentan en los pacientes con diagnóstico de FRA frente a los controles. Arriba diagrama de puntos, abajo diagrama de barras en patrón temporal. Valores representados como media \pm EEM *** $p < 0,001$. B) Los niveles de uNGAL aumentan en los pacientes con diagnóstico de FRA frente a los controles. Arriba diagrama de puntos, abajo diagrama de barras en patrón temporal. Valores representados como media \pm EEM. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. C) Evolución temporal de los valores de uCypA y uNGAL expresados como "n-veces" sobre el valor medio de los controles. Media \pm EEM. *** $p < 0,05$.

Los niveles de uCypA en pacientes con diagnóstico de FRA “Grupo FRA” aumentaron progresivamente desde el momento inicial, en comparación con la cohorte de controles “Grupo SANOS”, llegando a $1,22 \pm 0,36$ frente a $0,04 \pm 0,01$ ng/mg en la visita T3, y alcanzando significación estadística en todas las determinaciones (**Ilustración 26, gráfica A**). Igualmente, observamos elevación de uNGAL desde la primera determinación, llegando a $0,63 \pm 0,08$ frente a $0,16 \pm 0,03$ ng/mg, en la visita T3 (**Ilustración 26, gráfica B**).

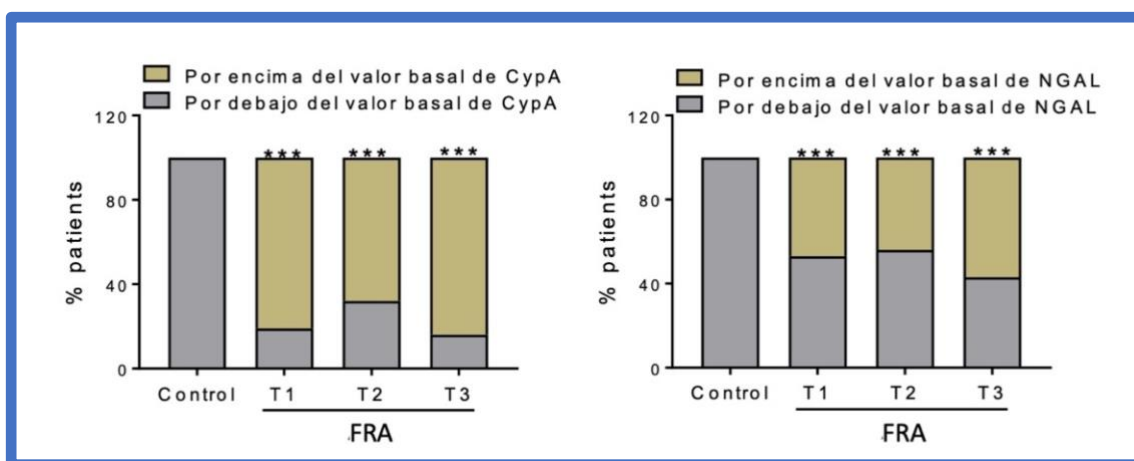


Ilustración 27. Porcentaje de pacientes “Grupo FRA” frente a “Grupo SANOS” con uCypA y uNGAL por encima y debajo de valor basal.

Media \pm EEM.. *** p <0,05.

Cuando comparamos el aumento frente a los controles sanos de los dos marcadores, observamos que la elevación de uCypA fue superior a la de uNGAL (**Ilustración 26, gráfica C**). Esto se aprecia, tanto en valores absolutos (**Ilustración 26, gráfica C**) como en el porcentaje de pacientes que muestran niveles mayores al valor basal (**Ilustración 27**).

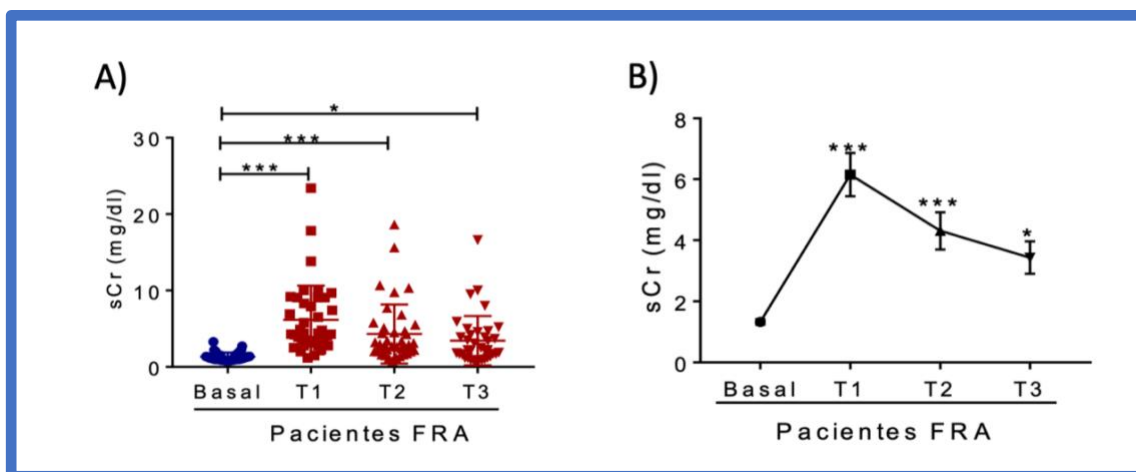


Ilustración 28 Nivel de sCr en los Grupos FRA y SANOS.

Media \pm EEM. * $p < 0,05$. *** $p < 0,01$.

Los niveles de sCr en pacientes con diagnóstico de FRA “**Grupo FRA**” fueron más elevados en el momento inicial, en comparación con la cohorte de controles “**Grupo SANOS**”, y fueron reduciéndose de forma progresiva. Llegaron a sCr de $7,49 \pm 4,99$ mg/dl y alcanzaron significación estadística en todas las determinaciones respecto al “**Grupo SANOS**” (Ilustración 28).

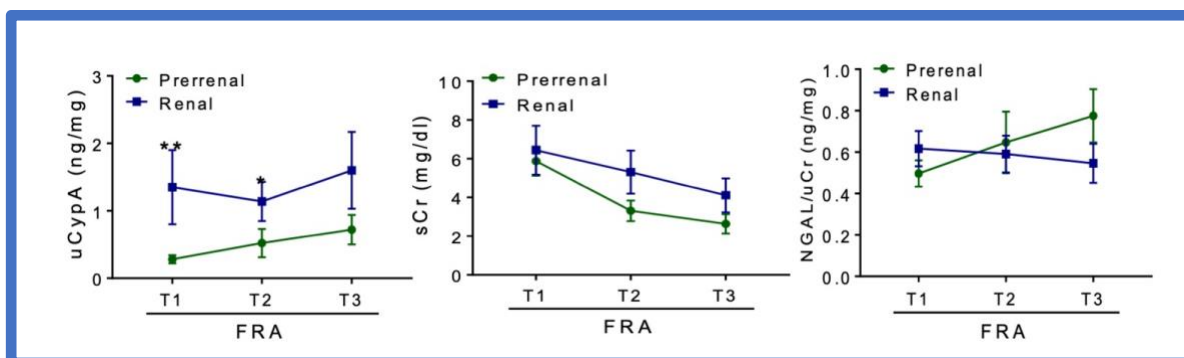


Ilustración 29. Pacientes con FRA etiología prerrenal y renal (parenquimatoso): uCypA, sCr y uNGAL.

Los niveles de uCypA aumentan en pacientes con FRA de origen renal (parenquimatoso) en las determinaciones T1 (** $p < 0,01$) y T2 (* $p < 0,05$) frente a el origen prerrenal. Mientras que la sCr y la uNGAL no permiten detectar diferencias entre las diferentes etiologías de FRA ($p = n.s.$).

En el “**Grupo FRA**” según la etiología del FRA en el momento del diagnóstico; prerrenal o renal (parenquimatoso), encontramos un comportamiento diferente de uCypA frente a sCr y uNGAL (**Ilustración 29**). Los resultados obtenidos muestran que la uCypA podría ayudar a discriminar el origen del FRA, situación que no ocurre con la sCr ni con la uNGAL.

Estos resultados nos sugieren que la uCypA podría ser un marcador de daño renal independiente de la sCr.

Discusión

INTRODUCCIÓN

El principal hallazgo de este trabajo es que la CypA se libera por las células tubulares cuando mueren tras agresión de hipoxia, H/R, y de forma no específica de ninguna de las formas de muerte celular estudiadas in vitro (apoptosis, necroptosis, ferroptosis), por lo que potencialmente podría ser un marcador de daño renal de diversas etiologías. Además, la determinación de uCypA aumenta en situaciones clínicas que ocasionan daño renal, como es el FRA de forma general o ante una lesión por IR.

Un ejemplo de agresión renal es la que ocurre durante la CCN, al interrumpir temporalmente el FSR, y en el TR. En la CCN, cuando es preciso el clampaje arterial durante la cirugía, la combinación de un riñón contralateral sano y un tiempo de isquemia corto, pueden tener como resultado una sCr estable y una diuresis mantenida, aún tras haber sufrido daño por IR. En el TR de DV, en caso de presentar FI, la lesión provocada por la IR también puede pasar desapercibida, ya que el injerto proporciona una mayor FG que los riñones nativos que no son funcionantes, con diuresis inmediata y reducción progresiva de la sCr. En este sentido, aprovechamos estas dos situaciones clínicas en las que la diuresis y la sCr no tienen utilidad para identificar daño renal, con el objetivo de identificar la CypA como marcador de daño independiente de la función renal.

1. NIVEL PRECLÍNICO

1.1 UNA AGRESIÓN POR HIPOXIA EN CULTIVO DE CÉLULAS DEL TÚBULO CONTORNEADO PROXIMAL PROVOCA LIBERACIÓN DE CYP A

Las células tubulares renales representan la masa celular más grande del riñón, y son la principal diana de daño celular durante la lesión por IR. Aplicamos diversas formas de hipoxia en cultivos celulares de células tubulares proximales humanas (HK2) o murinas (MCT), para evaluar la liberación de CypA.

En células HK2, la hipoxia química (CoCl₂) redujo la viabilidad celular progresivamente, reproduciendo resultados publicados previamente [226]–[228]. La activación de la respuesta a la hipoxia se confirmó por el aumento de los niveles

intracelulares de HIF1 α en el grupo sometido a hipoxia química frente al control [216],[229],[226],[227],[230]. La HIF es una proteína intracelular, con niveles indetectables en condiciones de normoxia, que regula la adaptación celular ante la falta de oxígeno [216]. La subunidad HIF α a nivel renal se expresa predominantemente en células tubulares y es sensible a oxígeno.

A partir de las 18h de exposición a CoCl₂ se objetivó la presencia extracelular de CypA. Su presencia en el sobrenadante sugiere lisis celular provocada por la hipoxia. La determinación de CypA en el extracto celular, células mejor preservadas (todavía adheridas a la placa), no demostró elevación en la expresión de esta proteína intracelular, tras la exposición a CoCl₂ frente al grupo control.

Tras someter a la línea celular MCT a agresión por H/R, se objetiva una reducción progresiva de la viabilidad celular, que aumenta de forma proporcional al tiempo de reoxigenación.

La determinación de CypA en el sobrenadante del cultivo celular MCT evidencia un incremento progresivo en su concentración tras la reoxigenación. Si la determinación de CypA se realiza en el extracto celular tras la agresión de H/R no se documenta incremento de su concentración frente al grupo control en normoxia. La liberación de CypA tras la H/R ya ha sido previamente observada en modelos experimentales con miocitos de rata, in vitro e in vivo [231].

1.2 LAS CÉLULAS TUBULARES RENALES LIBERAN CYP A EN RESPUESTA A LA ACTIVACIÓN DE MECANISMOS ESPECÍFICOS DE MUERTE CELULAR

Aplicamos diversos estímulos letales sobre las células epiteliales tubulares proximales humanas (HK2) o murinas (MCT), para evaluar la liberación de CypA, según su sensibilidad a diferentes formas de muerte celular. Nuestros hallazgos sugieren que la CypA es liberada por las células tubulares proximales expuestas a un estímulo letal, independientemente del mecanismo final de muerte celular.

Con el fin de determinar si la liberación de CypA está relacionada con alguna vía concreta de muerte celular sometemos a la línea MCT, a la inducción de apoptosis, con la adicción de TTI, y necroptosis con TTI/zVAD. La viabilidad celular respecto a grupo control se reduce en los grupos sometidos a inductores de muerte celular.

Tras la inducción de muerte celular aumenta la liberación al sobrenadante de CypA. El perfil temporal de esta liberación es diferente entre las células sometidas a apoptosis y las sometidas a necroptosis, como era previsible según las características de cada tipo de muerte celular [225]. Como en otras formas de NR, la necroptosis está caracterizada por la pérdida de la integridad de membrana celular de forma precoz y liberación del contenido celular. Las células que mueren por apoptosis, inicialmente no liberan su contenido, pero en un medio de cultivo al no ser fagocitadas por macrófagos o células adyacentes, se terminan por permeabilizar sus membranas plasmáticas [65]. Este detalle hace que no sorprenda la liberación más precoz de CypA por las células sometidas a necroptosis.

El mecanismo final que media en la liberación celular de la CypA no es conocido, tal vez pueda depender de la intensidad de la agresión [232], [233]. Nuestros hallazgos, nos permiten sugerir que la liberación de CypA depende de la pérdida de integridad de la membrana celular, al no evidenciarse en las etapas iniciales de la inducción de muerte celular por apoptosis.

La ferroptosis representa una forma única de NR. Se ha demostrado que está presente en algunas entidades patológicas como son; el daño renal por IR [94], [234], enfermedades neurodegenerativas [235], [236], la poliquistosis hepatorenal (PQHR) [237], o en la muerte de algunos tipos de células tumorales [104], [238], [239], aunque su papel en muchas otras enfermedades está por definir [105]. Documentar la presencia de ferroptosis resulta interesante ya que esta forma de NR puede inhibirse in vitro, a través de la ferrostatina-1 [94], [112].

Las células tubulares tienen un metabolismo oxidativo intenso, con gran producción de EROs, por lo que son más susceptibles a la muerte por ferroptosis [237]. Esta vía de NR contribuye al daño renal en modelos de FRA, aunque no se conoce el mecanismo específico. A fecha de hoy, no se han identificado receptores que provoquen

directamente esta forma de NR, la creencia más extendida es que se inicia ante la falta de defensa celular antioxidante dependiente de GSH. Esto define un tipo de muerte celular por necrosis asociada a la liberación de PMADs no específicos o neoepítomos específicos de lípidos peroxidados [85], [237].

En nuestro estudio, indujimos muerte celular por ferroptosis mediante exposición a RSL3 a la línea de células HK2. Objetivamos reducción de la viabilidad celular respecto a grupo control y con el paso del tiempo, tras la exposición a RSL3, se documenta un incremento en el sobrenadante del cultivo de CypA que no se objetiva en el grupo control. La presencia de CypA en el sobrenadante sugiere la lisis celular causada por la muerte celular. Mientras que la determinación de CypA en el extracto celular, células mejor preservadas (todavía adheridas a la placa), no demostró elevación en la expresión de esta proteína intracelular, tras la exposición a RSL3, frente a los controles.

2. NIVEL CLÍNICO

Tras la evidencia preclínica in vitro, que demuestra la elevación de CypA en respuesta a diferentes estímulos y formas de muerte celular, estudiamos su comportamiento in vivo en dos escenarios clínicos en los que existe agresión renal.

Una primera experiencia en una serie de pacientes sometidos a agresión quirúrgica renal y potencial daño por IR, una causa común de lesión renal y FRA, aunque esta pueda pasar desapercibida si no llega a alterar los parámetros de función renal. El otro escenario, en pacientes con FRA. Un síndrome muy prevalente que se presenta en hasta un 20-25% de los pacientes ingresados en un hospital, y llega a superar el 50% de aquellos que precisan atención en una Unidad de Cuidados Intensivos [20], [240], [241].

La secreción de CypA ya ha sido documentada en la muerte celular por NR [65], y hemos comprobado que esto también ocurre en cultivos de células tubulares in vitro. La CypA se filtra libremente por el glomérulo renal, su determinación en orina podría ser un marcador precoz del FRA o de la agresión renal subclínica [39], [60]. En el escenario clínico, se ha propuesto como un biomarcador para la detección precoz del FRA en el postoperatorio tras cirugía cardíaca [39].

2.1 NIVEL I: PACIENTES CON AGRESIÓN QUIRÚRGICA RENAL.

En los pacientes que sometemos a cirugía renal, es habitual ocasionar daño por IR, como ocurre al realizar una CCN con clampaje o un TR de DV. Estas dos situaciones suponen una agresión quirúrgica electiva, que puede no llegar a ocasionar un FRA evidente según los criterios de diagnóstico actuales.

En la CCN el riñón contralateral, que no se somete a agresión quirúrgica, puede proporcionar un volumen de diuresis o una TFG suficiente como para que no se produzca oliguria o elevación de la sCr, a pesar de que histológicamente el riñón intervenido presente necrosis tubular aguda tras la lesión por IR. En el TR a pesar de la inevitable agresión por IR y en caso de que el injerto tenga FI, la TFG que aporta será mayor que la de los riñones nativos, por lo que provocará diuresis y reducción progresiva de la sCr. En ambas situaciones evidenciamos un curso temporal similar de uCypA: elevación temprana, justo después de finalizar la cirugía, y un aumento progresivo a partir de ese momento.

La elevación de uCypA en este contexto, está justificada por la dinámica de muerte celular asociada al daño renal según nuestros conocimientos actuales [75]. La oleada inicial de muerte celular se produce en respuesta directa a la agresión quirúrgica. Una segunda oleada ocurre entre las 48-72 horas impulsada por la inflamación local y las citocinas liberadas en respuesta al daño ocasionado y a la primera ola de muerte celular proinflamatoria, es decir NR, según hemos documentado en trabajos previos de nuestro grupo de investigación [75], [217], [242]. El curso más limitado del aumento de uCypA en la CCN con clampaje arterial, puede representar la naturaleza más limitada de la agresión y, en consecuencia, de la lesión. En este sentido, la magnitud del cambio fue mayor en el **“Grupo Tx”**, quizás debido a una menor agresión por IR en el **“Grupo CCN CON CLAMPAJE”**.

2.1.1 CCN

En los pacientes sometidos a CCN el clampaje de la artera renal durante la cirugía, que ocasiona daño por IR, eleva los niveles de uCypA.

2.1.1.1 VARIABLES DESCRIPTIVAS DE LA SERIE

No encontramos diferencias entre las variables demográficas (edad, medidas antropométricas, raza y sexo) estudiadas entre la serie de pacientes sometidos a CCN. La variable “peso” se aproximó a la significación estadística, esto es fácilmente explicable al ser los pacientes de mayor peso los que, a priori, tienen mayor complejidad quirúrgica y por tanto precisarían con mayor probabilidad clampaje vascular durante la CCN.

Respecto a los antecedentes personales, hábito tabáquico, tratamiento habitual, FG estimado, enfermedad cardiovascular y comorbilidad, no encontramos diferencias en ninguna de las variables estudiadas entre ambos grupos.

2.1.1.1.1 TAMAÑO Y UBICACIÓN DOS VARIABLES PARA TENER EN CUENTA

En las características del tumor en el momento del diagnóstico, el tamaño de la lesión fue superior en el “**Grupo CCN CON CLAMPAJE**”, frente al “**Grupo CCN SIN CLAMPAJE**”. También apreciamos diferencia en la ubicación de la lesión a tratar: en “**Grupo CCN SIN CLAMPAJE**” no hubo lesiones en el polo superior, un 61,5% se ubicaron a nivel mesorrenal y un 38,4% en el polo inferior, frente al “**Grupo CCN CON CLAMPAJE**” en el que la lesión estaba en estas respectivas ubicaciones en el 35,8%, 35,8% y 28,2% de los casos. Estas dos variables sugieren mayor complejidad de la cirugía en el grupo con clampaje por lo que no es de extrañar que para realizar la cirugía se precisara clampaje vascular, a pesar de que no revertir en un mayor estadio tumoral ni en aumento de complicaciones perioperatorias.

Las únicas escalas nefrométricas que objetivaron diferencias entre los dos grupos fueron la DAP, y la NePhRO. El resto de escalas nefrométricas no encontraron diferencias entre los dos grupos, tal vez motivado por el limitado número de casos recogidos.

El sistema DAP surge como una integración optimizada de los sistemas RENAL y C.Index. El DAP tiene una metodología simplificada, menor error de medición, mejor interpretabilidad y una clara asociación con la reducción de parénquima y función renal tras la CCN [171]. El sistema nefrométrico NePhRO está diseñado a modo de sistema de

puntuación numérico simplificado basado en las características del tumor y del riñón. También recoge las características de otros sistemas de puntuación nefrométrica. Se fundamenta en cuatro parámetros anatómicos, a los que se les asigna una puntuación de 1, 2, ó 3, y su suma se utiliza para clasificar la complejidad de los tumores renales. El sistema de puntuación se compone de (Ne) cercanía al sistema colector, (Ph) ubicación física del tumor, (R) radio tumoral, y (O) organización del tumor [172]. Se suman las cuatro variables y el número resultante se utiliza para predecir la complejidad de la CCN. Los tumores se estratifican en tres niveles, de bajo riesgo (NePhRO 4-6 puntos), intermedios (NePhRO 7-9 puntos) y alto riesgo (NePhRO 10-12 puntos).

Entre las variables intraoperatorias y perioperatorias, la única que llegó a mostrar una diferencia entre los dos grupos fue la escala ASA de riesgo anestésico perioperatoria. No se objetivaron diferencias entre los dos grupos en el tiempo quirúrgico, el sangrado estimado, las complicaciones ni la tasa de transfusión.

2.1.1.1.2 TIEMPO DE ISQUEMIA EN LA CCN

El tiempo medio de clampaje en el **“Grupo CCN CON CLAMPAJE”** fue de $22,0 \pm 8$ min. Todos los pacientes de este grupo sufrieron daño por IR en IC, no se realizó hipotermia en ningún caso.

La duración máxima de la IC en la CCN antes de que aparezca daño renal irreversible continúa siendo motivo de debate. Un pensamiento clásico en la CCN es que si la duración de la IC es <30 minutos apenas se produce lesión, y por lo tanto la probabilidad de ocasionar un daño permanente al riñón es baja [243]. Estos 30 minutos se han considerado durante mucho tiempo como un tiempo de IC “seguro”, aunque esta afirmación se basa esencialmente en la opinión de los expertos más que en datos científicos rigurosos [244]. El estudio de J.P. Ward de 1975 [243], se cita habitualmente como la referencia para establecer en 30 minutos el límite de tolerancia renal a la IC. Sin embargo, su estudio experimental en perros no fue diseñado específicamente para determinar el tiempo exacto en el que un riñón comienza a sufrir daño irreversible tras una lesión isquémica.

La búsqueda del tiempo de isquemia seguro ha continuado en el tiempo. Desai et al. [188], ponen de manifiesto que las secuelas clínicas que puede ocasionar un tiempo de IC de aproximadamente 30 minutos son mínimas. Parekh et al. [245] analizaron de forma prospectiva la respuesta renal al clampaje en pacientes sometidos a CCN con IC >30 minutos. Estos autores observaron que los cambios en la función renal no se correlacionaron con la duración de la IC, y los cambios estructurales fueron mucho menos severos que los reportados en modelos experimentales en animales expuestos a tiempos de IC similares. En su trabajo sugieren que los riñones humanos pueden tolerar con seguridad tiempos de isquemia de entre 30 y 60 minutos, si no tienen otras situaciones comórbidas. Estos mismos autores evaluaron el impacto de la isquemia en la función renal tras CCN con un seguimiento de 1 año. Objetivaron una pérdida estimada del 12,99% de función renal, sin encontrar relación entre esta pérdida y el tiempo de isquemia aplicado [246]. Bhayani et al. [247], evaluaron 118 pacientes que presentaban un tumor renal unilateral con un riñón contralateral normal, sometidos a CCN mediante abordaje laparoscópico. No apreciaron diferencias en las cifras de sCr media y ningún paciente progresó a ERC o precisó diálisis tras la CCN. Los autores concluyeron que el tiempo de IC de hasta 55 minutos no influyó en la función renal a largo plazo tras la CCN. Un estudio más moderno, diseñado a modo de revisión colaborativa de la literatura [182], mostró que el límite de 20 minutos puede representar el mejor punto de corte para evitar consecuencias adversas para el riñón, así como que la edad avanzada y la ERC preexistente son las dos variables relacionadas con una mayor disfunción renal isquémica, especialmente si la IC es >30 minutos.

No obstante, considerar de forma absoluta un periodo de IC como seguro tal vez resulte erróneo. Existe consenso en el hecho de que un aumento de tiempo de isquemia tiene como consecuencia un aumento del daño renal ocasionado. Hay autores que sugieren que el tiempo de IC se debería considerar como una variable continua, cada minuto que se prolonga añade más riesgo de ocasionar consecuencias sobre la función renal: *“cada minuto cuenta”* [248]. Cada minuto adicional de IC se ha relacionado con un aumento del 6% en la incidencia de ERC de novo, lo que sugiere una relación causa-efecto en pacientes monorrenos [248].

Con el conocimiento actual sobre los riesgos y consecuencias de la IC, se deben hacer esfuerzos para minimizar el tiempo de isquemia en el momento de realizar la planificación y estrategia quirúrgica, sobre todo en aquellos pacientes con indicación imperativa de CCN. Periodos breves de IC pueden provocar daño renal y síntomas de FRA, como la elevación sCr o la retención hídrica [9], [119], e incluso cambios en la histopatología renal, especialmente en el túbulo proximal [249]. Establecer el tiempo de IC en 20-25 minutos se ha relacionado como el mejor punto de corte para determinar el riesgo de FRA, o desarrollar una TFG <15 ml/min/1,73m² o incluso una ERCT tras la cirugía [181],[248].

Independientemente del tiempo que pudiera llegar a establecerse como seguro para la función renal, no podemos olvidar que en la CCN por muy breve que se establezca el clampaje, el riñón sufrirá daño por IR. Es posible que incluso los biomarcadores actualmente disponibles resulten falsamente tranquilizadores en la evaluación del impacto que ocasiona la isquemia en la función renal a largo plazo [250]. Desarrollar nuevos biomarcadores, como la uCypA, ayudará a profundizar el conocimiento de potenciales vías terapéuticas para amortiguar el daño renal ocasionado por la IR.

2.1.1.1.3 TÉCNICA DE RESECCIÓN TUMORAL

La nefrectomía radical pone en riesgo de padecer ERC en el futuro, por ello uno de los objetivos principales de la CCN, es preservar la mayor función renal posible. Más del 25% de los pacientes con un cáncer renal localizado tienen ERC de base y se beneficiarán de la preservación funcional que ofrece la CCN para evitar la progresión de su enfermedad renal [180]. En pacientes birrenos, la mayoría de las series muestran que la CCN preserva entre el 88% y el 91% de la función renal global, estableciéndose la pérdida de función global estimada en el 10% [183]. La CCN, de forma general, consigue preservar entre el 76 y el 86% de la función renal en el riñón que ha sido intervenido, con una reducción estimada de función de aproximadamente el 20% [183].

La técnica de resección tumoral durante la CCN está relacionada con la preservación del parénquima renal. Se clasifican en orden creciente respecto al margen de tejido sano resecado en *enucleación simple*, *enucleorresección* (mínimo margen de resección) y

resección en cuña (“clásica”) [251]. La técnica de resección tumoral utilizada en este trabajo fue la enucleación simple.

El volumen de parénquima renal “perdido” durante la CCN también está determinado por la cantidad de parénquima extirpado con el margen del tumor, junto con el tejido renal devascularizado. El parénquima adyacente sin vascularización está constituido por tejido renal isquémico próximo con falta de perfusión tisular secundaria a la compresión ejercida por la renorrafia o la electrocoagulación del lecho de resección durante la cirugía [251]. Se ha demostrado que un aumento del 5% en la cantidad de parénquima renal conservado se correlaciona con una reducción del 17% en el riesgo de ERCT de novo tras la cirugía [184].

2.1.1.1.4 VARIABLES PERIOPERATORIAS CCN

Los criterios KDIGO para la determinación de FRA se fundamentan en la variación de la sCr y la reducción de diuresis. El primer parámetro es fácilmente determinable mediante analíticas seriadas, del segundo resulta imposible obtener un registro fiable cuando el paciente se encuentra fuera de una Unidad de Cuidados Intensivos. En la serie de 52 pacientes sometidos a CCN, encontramos 5 que presentaron FRA en el postoperatorio inmediato según criterios de KDIGO (estadio I) [11]. Fueron 4 en el “**Grupo CCN CON CLAMPAJE**” (10,25%) y 1 en el “**Grupo CCN SIN CLAMPAJE**” (7,69%) (p 0,613). Ninguno de estos pacientes progresó a un FRA que precisara tratamiento sustitutivo de la función renal. Era de esperar la reducida utilidad de los criterios de FRA de KDIGO, para detectar “daño renal” en este escenario clínico, dado que el riñón contralateral se consideró sano antes en la evaluación previa a la cirugía y este no fue manipulado durante el procedimiento quirúrgico. No encontramos diferencias entre ambos grupos en las diuresis registradas en las primeras 24h tras la cirugía.

Respecto a las variables analíticas, la variación de hemoglobina (Δ Hemoglobina) entre la analítica preoperatoria y la registrada a las 24h de la cirugía resultó significativa, si bien este dato no resultó clínicamente relevante, ni en la magnitud de la anemia ni resultó en una mayor tasa de transfusión.

El tiempo de seguimiento medio en ambos grupos superó los 1095 días (3 años). No se objetivaron cambios en el FG estimado ni en la variación del FG estimado (Δ FG estimado pre/seguimiento) entre los dos grupos a lo largo del periodo estudiado. Durante el tiempo de seguimiento, solo un paciente empeoró su función renal precisando tratamiento sustitutivo mediante hemodiálisis. Este paciente padecía ERC antes de la cirugía (sCr basal 3mg/dl con FG estimado de 22ml/min), en el postoperatorio fue uno de los pacientes que cumplió criterios de FRA KDIGO. Evolucionó a ERCT con necesidad de tratamiento sustitutivo a los 37 meses de la cirugía.

2.1.1.1.5 HISTOLOGÍA Y CONTROL ONCOLÓGICO

En relación con el tipo histológico, encontramos un 23% de carcinoma de células claras en el **“Grupo CCN SIN CLAMPAJE”** frente al 48,7% en el **“Grupo CCN CON CLAMPAJE”** y un 46,1% de carcinoma papilar en el **“Grupo CCN SIN CLAMPAJE”** frente al 20,5% en el **“Grupo CCN CON CLAMPAJE”**. Según las “EAU Guidelines” los tumores de estirpe papilar tienen a ser exofíticos y suelen presentar pseudocápsula, lo que podría justificar que su enucleación fuera más fácilmente realizada sin clampaje arterial [164]. Si bien estas diferencias también podrían obedecer al tamaño muestral de la serie, más que a verdaderas diferencias entre ambos grupos.

No observamos diferencia en el estadio TNM ni en la afectación de los márgenes quirúrgicos en la pieza entre ambos grupos. La necesidad de clampaje arterial no parece por tanto tener impacto en el control del tumor a nivel local. Con un seguimiento medio de más de 3 años, no evidenciamos diferencias entre los dos grupos de CCN en el control oncológico.

2.1.1.2 EL CLAMPAJE ARTERIAL DURANTE LA CCN SE ASOCIA CON UN INCREMENTO DE UCYP A

Realizar clampaje arterial durante la CCN supone una agresión por IR. Medimos la uCypA en ambos grupos, y mientras en el **“Grupo CCN SIN CLAMPAJE”** los niveles no cambiaron significativamente en el tiempo, en el **“Grupo CCN CON CLAMPAJE”** algunos pacientes elevaron uCypA inmediatamente tras la cirugía (fueron entre 14 y 33 veces más altos que el valor inicial en tres pacientes en este momento), y la media de los

valores aumentó hasta las 48h de la cirugía, momento en el que estos niveles eran significativamente más altos que el valor inicial. Los pacientes incluidos en el “**Grupo CCN CON CLAMPAJE**” mostraron niveles máximos de uCypA a las 24-48 horas en la mayoría de los casos, mientras no observamos una elevación clara en pacientes del “**Grupo CCN SIN CLAMPAJE**”.

La uCypA puso de manifiesto la agresión renal en ausencia de una disminución clínicamente relevante de la función renal, evaluada mediante sCr y volumen de diuresis.

2.1.1.3 EL CLAMPAJE ARTERIAL DURANTE LA CCN SE ASOCIA CON UN INCREMENTO DE UNGAL

La uNGAL es un biomarcador de lesión renal, que ya se ha probado con anterioridad como marcador de daño por IR en pacientes sometidos a CCN [252], [253]. Mostró resultados contradictorios en los estudios publicados respecto a su utilidad como biomarcador de agresión renal por IR en pacientes con riñón contralateral sano sometidos a CCN [28]. Los niveles de uNGAL pueden elevarse tras la CCN, pero estos cambios no permitieron diferenciar entre los subgrupos que presentaron diferente función renal postoperatoria [254]. En un estudio reciente, Akpinar et al. [253], midieron la uNGAL en pacientes intervenidos mediante CCN de un tumor renal con un riñón contralateral sano, al comparar entre el grupo con y sin clampaje arterial, encontraron elevación significativa en el primero. También encontraron un mayor incremento de uNGAL en aquellos pacientes que presentaron FRA independientemente de que fueran del grupo con o sin clampaje.

2.1.1.4 CORRELACIÓN UCYPY Y UNGAL EN PACIENTES SOMETIDOS A CCN

La correlación entre uCypA y uNGAL fue pobre y solo estadísticamente significativa en pacientes del grupo con clampaje a las 48h (**Ilustración 24**). Sin embargo, cuando comparamos los datos de uCypA con los de uNGAL observamos un mayor aumento en términos relativos y un mayor porcentaje de pacientes por encima de los puntos de cortes en el caso de uCypA. Además, de entre los 4 pacientes sometidos a CCN con clampaje que presentaron criterios KDIGO de FRA (estadio I), los 4 (100%)

presentaban elevación de uCypA por encima del nivel basal y 3 (75%) por encima del valor máximo de daño mientras que en el caso de uNGAL solo 1 (25%), presentó elevación por encima del nivel basal y ninguno por encima del valor máximo de daño.

Estos resultados nos sugieren que la medición e uCypA puede ser más sensible que uNGAL para detectar el daño renal en ausencia de pérdida de función.

2.1.2 TR

En los pacientes sometidos a TR de DV con FI del injerto, se objetiva elevación de los niveles de uCypA.

2.1.2.1 LOS NIVELES DE UCYP A SE ELEVARON TRAS EL TR

El daño por IR es un fenómeno fisiopatológico complejo, inevitable en el TR, y uno de los principales responsables de la DPI (ya sea DLI, DRI o en casos graves la NFP del injerto) [89], [133], [204], [255].

La lesión por IR en el TR de DC, comienza con las circunstancias que rodean la muerte del donante y continua durante el proceso de la extracción renal y la cirugía de banco, prosigue durante la fase de preservación y transporte, finalizando en el proceso de implante con la reperusión [194]. Tras la reperusión, la restauración del FSR activa una secuencia de acontecimientos a nivel bioquímico y celular, que empeoran la lesión [196]. En el TR de DV, modelo estudiado en este trabajo, la agresión por IR al injerto aunque también presente es menor. En el TR de DV, si bien se somete al injerto a un tiempo de IC, las alteraciones relacionadas con la muerte del donante no están presentes y el tiempo de IF también es habitualmente más corto. Los riñones para TR de DV, incluidos los DV no emparentados independientemente de la compatibilidad HLA, tienen habitualmente FI del injerto con las tasas más bajas de DPI. No obstante, este hecho no significa que no estén expuestos a daño por la IR, según hemos documentado en nuestro estudio. Esto refleja principalmente una influencia positiva de tiempos más cortos de IC e IF en este grupo de TR DV, y la influencia negativa del tiempo de isquemia global prolongado en la donación tras muerte cerebral o a corazón parado.

En la lesión por IR se activan procesos de muerte celular a través de diversos mecanismos, como son la necrosis, apoptosis, NR y autofagia [89]. Son estas formas de muerte celular las responsables de la lisis celular y la elevación de la uCypA que hemos documentado en nuestro estudio.

En la actualidad carecemos de tratamiento específico para prevenir el daño de IR en el TR [255]. La principal estrategia para reducir el daño por IR es una atención adecuada del donante, evitando inestabilidad hemodinámica y administrar dosis elevadas de fármacos vasoactivos, rehuir de grandes variaciones electrolíticas, reducir el tiempo de IF y procurar una adecuada preservación del órgano [256].

Analizamos los niveles uCypA en el **“Grupo Tx RECEPTORES”**. Todos los pacientes tuvieron FI del injerto tras el TR, con diuresis, reducción y normalización progresiva de sCr. Los niveles medios de uCypA en pacientes trasplantados, **“Grupo Tx RECEPTORES”** aumentaron progresivamente desde el momento del implante renal en relación con la determinación basal preoperatoria en la orina del **“Grupo Tx DONANTES”** y alcanzando la significación estadística a las 48 y 72 horas. La progresiva elevación de uCypA en este grupo probablemente responda a la muerte celular provocada por la agresión de IR, aunque esta no tenga traducción en alguna de las manifestaciones clínicas del espectro de la DPI (DLI, DRI o NFP).

El periodo inmediato tras el TR con FI se caracteriza por una excreción de creatinina en orina muy alta, ya que no solo se elimina la que produce de forma continua el músculo, sino que además se excreta los niveles acumulados en plasma previos al TR. Por este motivo, la normalización de la uCypA con la creatinina en orina puede subestimar la magnitud del cambio producido. En pacientes con ERCT en tratamiento sustitutivo de la función renal, ya sea con hemodiálisis o diálisis peritoneal, los niveles elevados de CypA en plasma se han relacionado con la inflamación sistémica [257]. Esta situación hubiera justificado encontrar unos niveles iniciales de uCypA elevados con una progresiva disminución, mientras que en nuestra población la concentración fue elevándose hasta entre las 48 y 72 horas tras el TR, con todos los pacientes con FI del injerto y reducción de la sCr desde el primer momento de la cirugía. Este dato es igualmente consistente con los estudios previos realizados por nuestro grupo y la ya

mencionada segunda oleada de muerte celular, desencadenada por la agresión inicial que motivó la muerte celular proinflamatoria vía NR [75], [217], [242].

Los pacientes en ERCT tienen una función renal mínima o residual. Al recibir un TR, especialmente cuando este tiene FI, a pesar de que el injerto esté lesionado por el daño de IR, aportará un FG superior al de los riñones nativos del paciente. En nuestra serie de TR de DV, todos con FI tras la cirugía, tuvieron diuresis inmediata y reducción progresiva de la sCr. Este hecho pone en evidencia que en esta circunstancia la medición de sCr y diuresis no es un buen indicador de lesión renal.

Estos resultados respaldan la potencial utilidad de uCypA para detectar lesión renal por IR cuando los parámetros de función renal no son fiables.

2.1.2.2 LOS NIVELES DE UNGAL SE REDUCEN TRAS EL TR

La uNGAL se considera un marcador de daño del injerto inespecífico y no dependiente de la respuesta inmunitaria [212]. Ha sido utilizada como biomarcador para detectar de forma precoz, la DPI mostrando capacidad para discriminar entre los diferentes niveles de disfunción asociados al daño por IR (dentro del espectro de DPI: DLI, DRI o NFP) [258]. Se ha evaluado como un biomarcador precoz en el TR del FRA secundario a IR y DPI, ya que se eleva su concentración en orina horas antes de que se documente alteración en la sCr. También se ha evaluado como indicador de la potencial recuperación de la función del injerto [259], e incluso para diferenciar de entre los pacientes que durante el seguimiento elevan la sCr, si esta es secundaria a un rechazo o a alguna otra forma de FRA [260].

Las características del TR de DV frente al DC, en relación con el exhaustivo estudio preTR de donante y receptor, y ejecución de forma programada en el tiempo facilita eliminar potenciales factores de confusión que puedan motivar la elevación de la uNGAL, como son la infección y sepsis [25], [30], [42].

En nuestro estudio, los niveles basales de uNGAL fueron significativamente mayores en el **“Grupo Tx RECEPTORES”** a los del **“Grupo Tx DONANTES”**. El pico de uNGAL en el **“Grupo Tx RECEPTORES”** se observó en la determinación inicial, y los niveles fueron disminuyendo a partir de ese momento. Esto ya fue observado

previamente, en el estudio realizado por Hall et. al [259], al medir la uNGAL en una cohorte de TR de DC, en el que el grupo con FI la concentración de uNGAL se reducía, en el grupo de DLI se mantenía en *plateau*, mientras que en el grupo con DPI era progresivamente creciente tras el TR. Este hecho sugiere que en nuestra serie de TR de DV con FI que gran parte de la concentración de uNGAL proviene del receptor y no del daño por IR provocado al injerto renal durante el proceso de TR. Este hallazgo no resulta sorprendente, ya que la ERC se ha asociado con un aumento de la uNGAL [261].

2.1.2.3 CORRELACIÓN UCYP A Y UNGAL EN PACIENTES SOMETIDOS A TX DE DV

Los niveles de uCypA aumentan, mientras disminuyen los de uNGAL tras la cirugía en los receptores de TR de DV.

Los niveles medios de uCypA en pacientes trasplantados aumentaron progresivamente desde el momento cero, consecuencia del daño renal por IR ocasionado con el proceso de donación y TR. Por el contrario, el pico de uNGAL se observó en la primera determinación después de la cirugía, el único momento en el que fue significativamente más alto que en la orina del donante y a partir de entonces los niveles de uNGAL disminuyeron. Los niveles de uNGAL en el grupo de receptores antes de la cirugía eran más altos que los de los donantes, en el rango de los encontrados inmediatamente después de la cirugía, lo que sugiere que parte de la uNGAL podría provenir de los riñones del receptor. Los niveles elevados de NGAL ya se han observado previamente en el contexto de la ERC [261].

2.2 NIVEL II: PACIENTES HOSPITALIZADOS CON FRA

Una vez hemos documentado elevación de CypA en diferentes formas de muerte celular *in vitro* y su elevación en el contexto clínico de daño renal por IR, pretendemos evaluar su comportamiento en un contexto clínico general, como es escenario del FRA. Una situación que resulta un reto para el clínico tanto en diagnóstico precoz, el establecimiento de su etiología y tratamiento.

Existe gran interés en el desarrollo de nuevas terapias para la prevención y el tratamiento del FRA. La prevención parece un paso lógico para mejorar los malos resultados a largo plazo que provoca en los pacientes. No obstante, se precisan más

investigaciones, no solo para identificar actuaciones tempranas para su prevención y tratamiento, sino para determinar si tales estrategias son efectivas a largo plazo [241]. Hasta el día de hoy, el diagnóstico del FRA se fundamenta en indicadores de función renal, esencialmente la sCr y el volumen de diuresis, siendo ambos de utilidad limitada cuando se pretende establecer un diagnóstico precoz [25]. La lesión renal se puede producir incluso en ausencia de un incremento de sCr, situación que se conoce como FRA “subclínico”, y constituye una ventana de oportunidad para un diagnóstico temprano de la lesión renal [23].

El diagnóstico del FRA en fase precoz se está explorando a través de biomarcadores. Estos se pueden detectar tanto en sangre como en orina, sin embargo, se ha dado prioridad a la investigación de biomarcadores en orina al considerar que es un medio más próximo a la ubicación de la lesión y porque la sangre es un medio más complejo para su determinación [25]. Durante la última década, se han publicado más 3300 artículos, que analizan cientos de potenciales nuevos biomarcadores de daño estructural renal, un dato de la creciente preocupación por este tema de la comunidad científica [21]. No obstante, aún no se ha encontrado el biomarcador ideal, debido a la propia naturaleza del FRA, que resulta heterogénea y compleja. Un biomarcador a menudo funcionará bien en una población de pacientes y mal en otra [21]. No existe hoy en día respuesta al dilema clínico planteado para el diagnóstico precoz de la lesión renal. Se han propuesto utilizar varios biomarcadores de manera simultánea, o que estos sean más específicos de una determinada situación clínica, con el fin de que puedan identificar correctamente a los pacientes en riesgo de presentar un FRA antes de que este se produzca.

2.2.1 VARIABLES DESCRIPTIVAS DE LA SERIE

Los casos registrados de FRA fueron recogidos de servicios médicos (67,5%), quirúrgicos (22,5%) y de la Unidad de Cuidados Intensivos (10,0%). Estos porcentajes oscilan según las series, pero reflejan que cualquier servicio del hospital atiende pacientes con FRA [262]. Entre las causas del FRA observadas encontramos 50% de origen prerrenal y 50% parenquimatoso. La tasa de mortalidad fue del 22,5%, aunque

se ha relacionado con la necesidad de tratamiento sustitutivo de la función renal, en nuestra serie a solo un paciente fallecido se le administró hemodiálisis [13].

2.2.2 EN EL FRA SE OBJETIVA ELEVACIÓN DE UCYP A

Se ha estudiado el papel de la CypA como marcador en diversas patologías, como la enfermedad vascular periférica, deterioro neuronal, cáncer, sepsis, algunas infecciones víricas, procesos inflamatorios e incluso con el propio proceso de envejecimiento [46]. En estos procesos patológicos no se ha analizado la uCypA. Al explorar el FRA, la excreción urinaria de CypA resulta una forma sencilla, no invasiva y próxima al foco de estudio. Nuestra población **“Grupo FRA”** tiene una edad mayor y comorbilidad respecto al **“Grupo SANOS”**, este dato podría justificar una determinación basal de uCypA mayor, pero no la elevación progresiva de la misma que hemos documentado una vez establecido el diagnóstico de FRA durante el ingreso.

En nuestro estudio, en las muestras de orina de pacientes diagnosticados de FRA de diverso origen, se objetiva elevación de uCypA respecto a los controles sanos. La heterogeneidad en el origen de los casos de FRA estudiados, sugiere que la uCypA no es específica de ninguna causa de FRA. La seriación de determinaciones de orina en la secuencia realizada, y el heterogéneo diagnóstico del origen del FRA no permite establecer una curva temporal de elevación de la CypA ni por tanto determinar el momento en el que el FRA y la muerte celular subyacente condicionan el pico máximo de uCypA. Si bien, podría resultar prometedor para discriminar la etiología del FRA en el momento del diagnóstico; prerrenal o renal (parenquimatoso) (**Ilustración 29**). Este comportamiento no se observó con los otros dos marcadores analizados, la sCr y la uNGAL en este trabajo.

Por otro lado, este hallazgo podría abrir una nueva ventana terapéutica ya que la CypA puede inducir inflamación en diversos órganos incluido riñón [46], [58], [263]. En este sentido, recientemente se ha publicado que un inhibidor selectivo de Cyps tuvo un efecto protector en un modelo murino de FRA por IR [264], [265]. Aunque se precisan más estudios que profundicen en la potencial utilidad de este hallazgo, el bloqueo de la acción de la CypA podría ser una nueva estrategia terapéutica frente al FRA [266].

2.2.3 EN EL FRA SE OBJETIVA ELEVACIÓN DE UNGAL

La NGAL ha demostrado ser de utilidad en el diagnóstico y pronóstico del FRA [267]. También se estudia su utilidad formando parte de una batería de biomarcadores con el objetivo de estratificar el riesgo de mala evolución de los pacientes con FRA [268]. En este escenario, resulta paradójico que se relacione su elevación en pacientes con insuficiencia cardíaca complicada con FRA con una mayor tasa de recuperación de la función renal basal [40].

La uNGAL es resistente a la degradación por proteólisis y fácilmente determinable por técnicas básicas de laboratorio, lo que hace especialmente interesante su determinación en orina como biomarcador [260]. Si bien la concentración de uNGAL puede estar afectada por otras causas diferentes al FRA, como son la ERC, la glomerulonefritis IgA o la nefritis lúpica, así como las infecciones del tracto urinario [36].

En nuestro estudio, en las muestras de orina de pacientes diagnosticados de FRA de diverso origen, se objetiva elevación de uNGAL respecto a los controles sanos (**Ilustración 26**). La heterogeneidad en el origen de los casos de FRA estudiados, sugiere que la uNGAL no es específica de ninguna causa de FRA.

La seriación de determinaciones de orina en la secuencia realizada, y el heterogéneo origen del FRA no permite establecer una curva temporal de elevación de la NGAL. Tampoco nuestro estudio permite asociar la mayor o menor elevación de uNGAL en relación con un determinado diagnóstico clínico de FRA.

2.2.4 FRA: LA CORRELACIÓN ENTRE UCYP A Y UNGAL

Hemos relacionado los valores encontrados en ambas variables, evidenciando una mayor elevación en los valores de uCypA frente a los de uNGAL en términos de cambios respecto al grupo control (**Ilustración 26, gráfica C**). Como en los pacientes sometidos a CCN este hecho podría sugerir que la uCypA resulta más sensible o presenta cambios más evidentes ante la misma agresión que la uNGAL (**Ilustraciones 26 y 27**). La uCypA continúa elevándose, aún cuando los niveles de sCr comienzan a descender, comportamiento que no objetivamos con la uNGAL (**Ilustración 27**). No obstante, se precisan más estudios para poder determinar la relación o falta de ella entre ambas.

3. LIMITACIONES

Reconocemos limitaciones en nuestro estudio como son, la experiencia es limitada con la simulación de vías de muerte celular, la lesión por H/R y la determinación de CypA en cultivos celulares HK2 y MCT. Los puntos de corte utilizados en el presente estudio representan puntos de corte de trabajo que deberían definirse mejor en futuras investigaciones.

Por otro lado, la parte clínica de este trabajo ha sido desarrollada en una población pequeña, es necesario desarrollar estudios longitudinales prospectivos, con un mayor número de participantes para confirmar los resultados obtenidos y determinar el impacto de la uCypA como nuevo marcador del daño renal subclínico. Además, el estudio clínico no ha sido randomizado, por lo que el clampaje de la arteria renal durante la CCN se decidió en función de las condiciones de la cirugía y el criterio del cirujano. Generalmente se realizó en tumores más grandes, como lo demuestran el mayor tamaño tumoral de ese grupo y los datos de nefrometría DAP y NePhRO. Sin embargo, los datos de CCN y el TR fueron consistentes, y esto puede resultar de utilidad en el futuro para el diseño de estudios observacionales o intervencionistas. Respecto al grupo de pacientes con FRA, es preciso investigar en mayor profundidad el potencial papel de la uCypA, una vez muestra resultados esperanzadores a la hora de discriminar su origen.

4. ESQUEMA DE CONCEPTO CLÍNICO

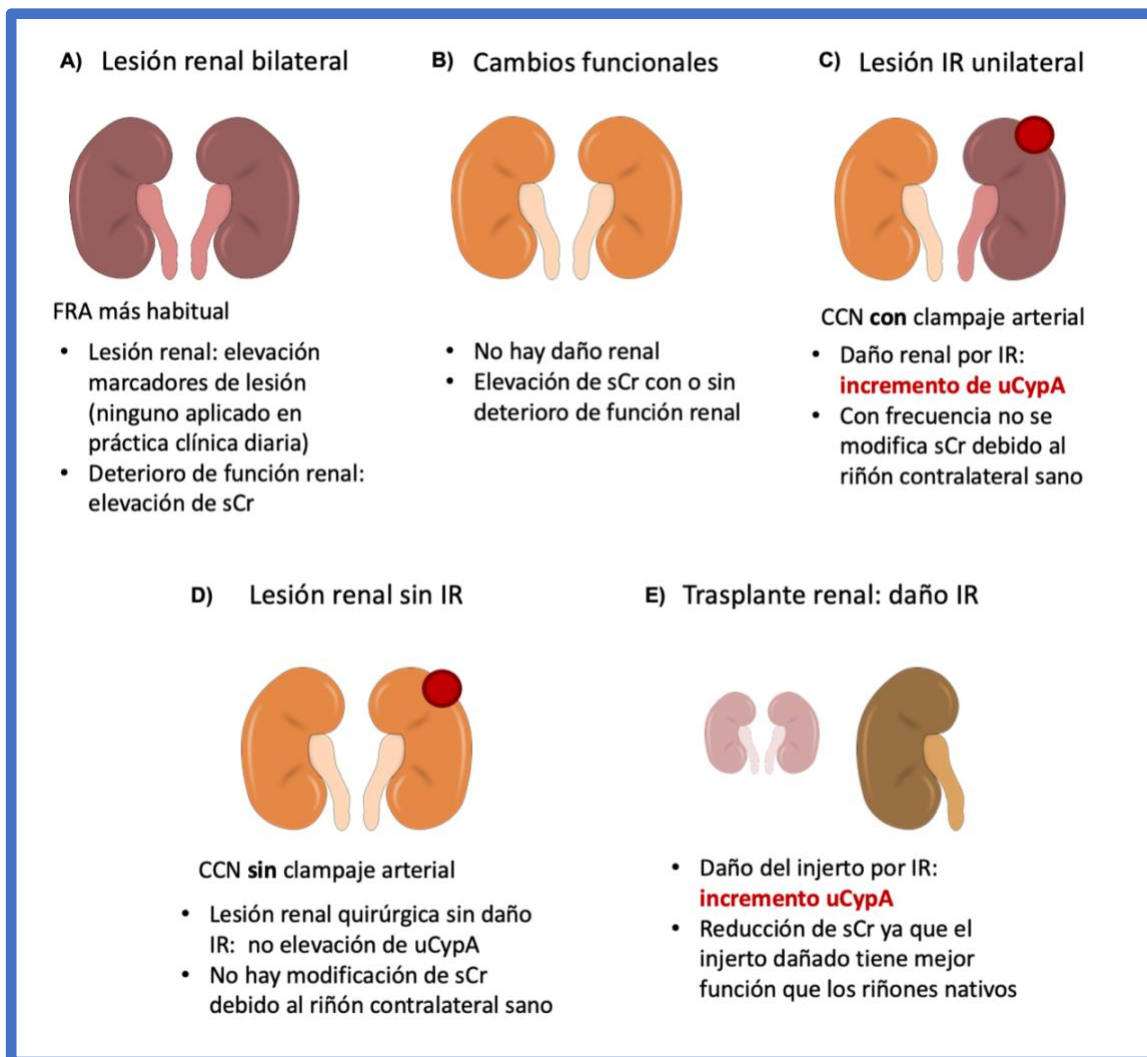


Ilustración 30. Resultados en esquema de concepto.

No existe un marcador de lesión de uso clínico y rutinario para determinar el FRA. El diagnóstico actual del FRA requiere de una función renal disminuida, que de forma secundaria ocasiona una elevación de la sCr, y/o una reducción de la diuresis. Además, la determinación de la situación oligoanúrica solo resulta fiable cuando el paciente está ingresado en una Unidad de Cuidados Intensivos, donde se puede establecer un control de diuresis estricto. A pesar de la “lesión” (“injury” del inglés “AKI, Acute Kidney injury”), el diagnóstico de FRA requiere de una lesión lo suficientemente grave como para provocar una disminución de la función renal, pasando por alto las formas más leves de

lesión y las etapas anteriores al FRA establecido, lo que afecta negativamente al manejo y resultados clínicos en el tratamiento de estos pacientes **(Ilustración 30, gráfica A)**.

La sCr puede aumentar debido a razones funcionales en ausencia de lesión renal. Como, por ejemplo, tras la administración de fármacos que disminuyen la secreción tubular de creatinina aumentará la sCr sin producir cambios en la TFG. Mientras, la depleción de volumen plasmático o los fármacos nefroprotectores que reducen la hiperfiltración pueden elevar la sCr sin ocasionar daño renal. Por estos motivos, se precisan marcadores específicos de lesión renal que reflejen la existencia de lesión, pero que no estén relacionados con la función **(Ilustración 30, gráfica B)**.

En busca de biomarcadores de lesión renal independientes de la función, utilizamos ejemplos clínicos en los que la función renal global suele estar preservada o es suficiente para evitar que se eleve la sCr, a pesar de la existencia de lesión renal. Un ejemplo de ello es la lesión renal unilateral por IR resultante del clampaje arterial durante la CCN. El riñón contralateral generalmente proporciona una función suficiente para evitar la elevación de la sCr, incluso cuando se produce daño por IR. En estas condiciones, observamos que la uCypA es un marcador de lesión renal inducida por IR, incluso en ausencia de elevación de sCr u otros biomarcadores clásicos de lesión como es NGAL. En la CCN sin clampaje arterial no existe el daño de IR. Utilizamos este modelo para considerar el impacto que la propia cirugía pueda tener en los biomarcadores analizados **(Ilustración 30, gráficas C y D)**.

El segundo modelo estudiado de daño por IR fue el TR de DV. En este escenario, los pacientes ya se encuentran en tratamiento sustitutivo de la función renal, debido a una ERC muy avanzada, con función renal muy baja o inexistente y una sCr muy elevada. A pesar del daño de IR, los injertos renales con FI proporcionan una TFG superior a la función renal residual del receptor, y esto se objetiva con una reducción progresiva de los niveles de sCr. Bajo estas circunstancias, la uCypA proporcionó evidencia de lesión renal a pesar de la disminución de la sCr y de la uNGAL **(Ilustración 30, gráfica E)**.

Identificar biomarcadores urinarios de lesión renal que identifiquen la lesión tisular, como la provocada en la CCN o el TR, incluso en ausencia de FRA, permitirá cuantificar correctamente el grado de daño renal y abrirá las puertas a futuros estudios

que evalúen su impacto a largo plazo sobre la función renal. Igualmente, permitirá abrir una ventana terapéutica a nuevas maniobras de nefroprotección dirigidas a minimizar la lesión durante la agresión quirúrgica. Se precisan más estudios que permitan determinar con mayor exactitud el papel de la uCypA, especialmente en otros escenarios clínicos, como podrían ser situaciones con daño renal subclínico o agresión de por IR de otra índole, en la detección de la lesión tisular antes de que se establezca el daño renal.

Conclusiones

CONCLUSIONES

- La CypA es liberada por las células tubulares proximales cultivadas expuestas a diferentes estímulos letales, de forma independiente del mecanismo de muerte celular (apoptosis, ferroptosis o necroptosis).
- Se encuentran niveles elevados de uCypA en diferentes situaciones clínicas de daño renal, especialmente en los pacientes expuestos a una agresión de mayor intensidad, aun en ausencia de criterios diagnósticos de FRA.
- La información ofrecida por uCypA difirió de la obtenida de la sCr y la uNGAL.
- En conjunto, estos datos sugieren que uCypA ofrece información sobre el daño renal que es complementaria a la información sobre función renal proporcionada por la sCr en situaciones de riesgo de FRA, lo que podría usarse para monitorizar su evolución.

Bibliografía

-
- [1] E. Olave, J. C. Torrez, N. Riquelme, L. Ibacache, and O. Binvignat, "Órganos Abdominales: Peso del Hígado, Bazo y Riñones en Relación a Sexo, Grupo Étnico, Edad e Índice de Masa Corporal en Individuos Chilenos," *Int. J. Morphol.*, vol. 32, no. 4, pp. 1311–1315, Dec. 2014, doi: 10.4067/S0717-95022014000400031.
- [2] T. Klatte *et al.*, "A Literature Review of Renal Surgical Anatomy and Surgical Strategies for Partial Nephrectomy," *Eur. Urol.*, vol. 68, no. 6, pp. 980–992, Dec. 2015, doi: 10.1016/j.eururo.2015.04.010.
- [3] F. H. Epstein, Y. Agmon, and M. Brezis, "Physiology of renal hypoxia," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 718, pp. 72–81; discussion 81-82, Apr. 1994, doi: doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb55706.x.
- [4] R. Munshi, C. Hsu, and J. Himmelfarb, "Advances in understanding ischemic acute kidney injury," *BMC Med.*, vol. 9, p. 11, Feb. 2011, doi: 10.1186/1741-7015-9-11.
- [5] N. Nourbakhsh and P. Singh, "Role of Renal Oxygenation and Mitochondrial Function in the Pathophysiology of Acute Kidney Injury," *Nephron Clin. Pract.*, vol. 127, no. 1–4, pp. 149–152, Sep. 2014, doi: 10.1159/000363545.
- [6] S. K. Verma and B. A. Molitoris, "Renal endothelial injury and microvascular dysfunction in acute kidney injury," *Semin. Nephrol.*, vol. 35, no. 1, pp. 96–107, Jan. 2015, doi: 10.1016/j.semnephrol.2015.01.010.
- [7] M. Brezis and S. Rosen, "Hypoxia of the renal medulla--its implications for disease," *N. Engl. J. Med.*, vol. 332, no. 10, pp. 647–655, Mar. 1995, doi: 10.1056/NEJM199503093321006.
- [8] T. Kalogeris, C. P. Baines, M. Krenz, and R. J. Korthuis, "Cell biology of ischemia/reperfusion injury," *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, vol. 298, pp. 229–317, 2012, doi: 10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7.
- [9] M. Brezis, S. Rosen, P. Silva, and F. H. Epstein, "Renal ischemia: a new perspective," *Kidney Int.*, vol. 26, no. 4, pp. 375–383, Oct. 1984, doi: 10.1038/ki.1984.185.
- [10] J. V. Bonventre, "Mechanisms of ischemic acute renal failure," *Kidney Int.*, vol. 43, no. 5, pp. 1160–1178, May 1993, doi: 10.1038/ki.1993.163.
- [11] A. Khwaja, "KDIGO clinical practice guidelines for acute kidney injury," *Nephron Clin. Pract.*, vol. 120, no. 4, pp. c179-184, 2012, doi: 10.1159/000339789.
-

[12] J. R. Rodríguez-Palomares, F. L. García, M. T. T. Cañamas, and G. de Arriba, "Fracaso renal agudo. Concepto, definición, epidemiología, etiopatogenia y clasificación, manifestaciones clínicas, complicaciones y diagnóstico diferencial," *Med. - Programa Form. Médica Contin. Acreditado*, vol. 11, no. 81, pp. 4842–4851, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.med.2015.06.002.

[13] F. Liaño, J. Pascual, and The Madrid Acute Renal Failure Study Group, "Epidemiology of acute renal failure: A prospective, multicenter, community-based study," *Kidney Int.*, vol. 50, no. 3, pp. 811–818, Sep. 1996, doi: 10.1038/ki.1996.380.

[14] S. G. Coca, S. Singanamala, and C. R. Parikh, "Chronic kidney disease after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis," *Kidney Int.*, vol. 81, no. 5, pp. 442–448, Mar. 2012, doi: 10.1038/ki.2011.379.

[15] S. G. Coca, B. Yusuf, M. G. Shlipak, A. X. Garg, and C. R. Parikh, "Long-term Risk of Mortality and Other Adverse Outcomes After Acute Kidney Injury: A Systematic Review and Meta-analysis," *Am. J. Kidney Dis.*, vol. 53, no. 6, pp. 961–973, Jun. 2009, doi: 10.1053/j.ajkd.2008.11.034.

[16] C. Hsu, G. M. Chertow, C. E. McCulloch, D. Fan, J. D. Ordoñez, and A. S. Go, "Nonrecovery of Kidney Function and Death after Acute on Chronic Renal Failure," *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 4, no. 5, pp. 891–898, May 2009, doi: 10.2215/CJN.05571008.

[17] G. Fortrie, H. R. H. de Geus, and M. G. H. Betjes, "The aftermath of acute kidney injury: a narrative review of long-term mortality and renal function," *Crit. Care*, vol. 23, no. 1, p. 24, Jan. 2019, doi: 10.1186/s13054-019-2314-z.

[18] C. Hsu, "Yes, AKI truly leads to CKD," *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*, vol. 23, no. 6, pp. 967–969, Jun. 2012, doi: 10.1681/ASN.2012030222.

[19] Z. Harel and C. T. Chan, "Predicting and preventing acute kidney injury after cardiac surgery:," *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, vol. 17, no. 6, pp. 624–628, Nov. 2008, doi: 10.1097/MNH.0b013e32830f4590.

[20] O. Rewa and S. M. Bagshaw, "Acute kidney injury—epidemiology, outcomes and economics," *Nat. Rev. Nephrol.*, vol. 10, no. 4, pp. 193–207, Apr. 2014, doi: 10.1038/nrneph.2013.282.

[21] B. R. Griffin, K. M. Gist, and S. Faubel, "Current Status of Novel Biomarkers for the Diagnosis of Acute Kidney Injury: A Historical Perspective," *J. Intensive Care Med.*, vol. 35, no. 5,

pp. 415–424, May 2020, doi: 10.1177/0885066618824531.

[22] U. Erdbruegger and M. D. Okusa, “Investigational biomarkers and the evaluation of acute kidney injury - UpToDate,” *UpToDate*. https://www.uptodate-com.m-fjd.a17.csinet.es/contents/investigational-biomarkers-and-the-evaluation-of-acute-kidney-injury?search=investigational%20biomarkers&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1 (accessed May 08, 2020).

[23] D. G. Moledina and C. R. Parikh, “Phenotyping of Acute Kidney Injury: Beyond Serum Creatinine,” *Semin. Nephrol.*, vol. 38, no. 1, pp. 3–11, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.semnephrol.2017.09.002.

[24] M. Andreucci, T. Faga, A. Pisani, M. Perticone, and A. Michael, “The ischemic/nephrotoxic acute kidney injury and the use of renal biomarkers in clinical practice,” *Eur. J. Intern. Med.*, vol. 39, pp. 1–8, Apr. 2017, doi: 10.1016/j.ejim.2016.12.001.

[25] N. Srisawat and J. A. Kellum, “The Role of Biomarkers in Acute Kidney Injury,” *Crit. Care Clin.*, vol. 36, no. 1, pp. 125–140, 2020, doi: 10.1016/j.ccc.2019.08.010.

[26] R. Bellomo, C. Ronco, J. A. Kellum, R. L. Mehta, P. Palevsky, and Acute Dialysis Quality Initiative workgroup, “Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group,” *Crit. Care Lond. Engl.*, vol. 8, no. 4, pp. R204–212, Aug. 2004, doi: 10.1186/cc2872.

[27] R. L. Mehta *et al.*, “Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury,” *Crit. Care*, vol. 11, no. 2, p. R31, 2007, doi: 10.1186/cc5713.

[28] A. Antonelli *et al.*, “The Predictive Role of Biomarkers for the Detection of Acute Kidney Injury After Partial or Radical Nephrectomy: A Systematic Review of the Literature,” *Eur. Urol. Focus*, vol. 6, no. 2, pp. 344–353, 2020, doi: 10.1016/j.euf.2018.09.020.

[29] M. Haase, J. A. Kellum, and C. Ronco, “Subclinical AKI—an emerging syndrome with important consequences,” *Nat. Rev. Nephrol.*, vol. 8, no. 12, pp. 735–739, Dec. 2012, doi: 10.1038/nrneph.2012.197.

[30] K. Kashani, W. Cheungpasitporn, and C. Ronco, “Biomarkers of acute kidney injury: the pathway from discovery to clinical adoption,” *Clin Chem Lab Med*, vol. 55, no. 8, pp. 1074–1089, 2017, doi: 10.1515/cclm-2016-0973.

[31] C. Ronco, J. A. Kellum, and M. Haase, "Subclinical AKI is still AKI," *Crit. Care*, vol. 16, no. 3, p. 313, 2012, doi: 10.1186/cc11240.

[32] P. T. Murray *et al.*, "Potential use of biomarkers in acute kidney injury: report and summary of recommendations from the 10th Acute Dialysis Quality Initiative consensus conference," *Kidney Int.*, vol. 85, no. 3, pp. 513–521, Mar. 2014, doi: 10.1038/ki.2013.374.

[33] R. Chu, C. Li, S. Wang, W. Zou, G. Liu, and L. Yang, "Assessment of KDIGO Definitions in Patients with Histopathologic Evidence of Acute Renal Disease," *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 9, no. 7, pp. 1175–1182, Jul. 2014, doi: 10.2215/CJN.06150613.

[34] Biomarkers Definitions Working Group., "Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework," *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 69, no. 3, pp. 89–95, Mar. 2001, doi: 10.1067/mcp.2001.113989.

[35] M. Ostermann *et al.*, "Recommendations on Acute Kidney Injury Biomarkers From the Acute Disease Quality Initiative Consensus Conference: A Consensus Statement," *JAMA Netw. Open*, vol. 3, no. 10, p. e2019209, Oct. 2020, doi: 10.1001/jamanetworkopen.2020.19209.

[36] P. Devarajan, "Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a promising biomarker for human acute kidney injury," *Biomark. Med.*, vol. 4, no. 2, pp. 265–280, Apr. 2010, doi: 10.2217/bmm.10.12.

[37] S. S. Waikar, R. A. Betensky, S. C. Emerson, and J. V. Bonventre, "Imperfect gold standards for kidney injury biomarker evaluation," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 23, no. 1, pp. 13–21, Jan. 2012, doi: 10.1681/ASN.2010111124.

[38] N. Paragas *et al.*, "The Ngal reporter mouse detects the response of the kidney to injury in real time," *Nat. Med.*, vol. 17, no. 2, Art. no. 2, 2011, doi: 10.1038/nm.2290.

[39] C.-C. Lee *et al.*, "Diagnostic Performance of Cyclophilin A in Cardiac Surgery-Associated Acute Kidney Injury," *J. Clin. Med.*, vol. 9, no. 1, p. 108, 2019, doi: 10.3390/jcm9010108.

[40] V. S. Rao *et al.*, "Renal Effects of Intensive Volume Removal in Heart Failure Patients With Preexisting Worsening Renal Function," *Circ. Heart Fail.*, vol. 12, no. 6, Jun. 2019, doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.118.005552.

[41] J. Mårtensson and R. Bellomo, "The rise and fall of NGAL in acute kidney injury," *Blood Purif.*, vol. 37, no. 4, pp. 304–310, 2014, doi: 10.1159/000364937.

- [42] C. Albert *et al.*, "Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Measured on Clinical Laboratory Platforms for the Prediction of Acute Kidney Injury and the Associated Need for Dialysis Therapy: A Systematic Review and Meta-analysis," *Am. J. Kidney Dis.*, vol. 76, no. 6, pp. 826-841.e1, 2020, doi: 10.1053/j.ajkd.2020.05.015.
- [43] F. Hong *et al.*, "Transgenic mice overexpressing cyclophilin A are resistant to cyclosporin A-induced nephrotoxicity via peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 316, no. 4, pp. 1073–1080, 2004, doi: 10.1016/j.bbrc.2004.02.160.
- [44] S. Kumari, S. Roy, P. Singh, S. L. Singla-Pareek, and A. Pareek, "Cyclophilins," *Plant Signal. Behav.*, vol. 8, no. 1, p. e22734, Jan. 2013, doi: 10.4161/psb.22734.
- [45] B. Steinmann, P. Bruckner, and A. Superti-Furga, "Cyclosporin A slows collagen triple-helix formation in vivo: indirect evidence for a physiologic role of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase," *J. Biol. Chem.*, vol. 266, no. 2, pp. 1299–1303, Jan. 1991.
- [46] P. Nigro, G. Pompilio, and M. C. Capogrossi, "Cyclophilin A: a key player for human disease," *Cell Death Dis.*, vol. 4, p. e888, 2013, doi: 10.1038/cddis.2013.410.
- [47] P. Wang and J. Heitman, "The cyclophilins," *Genome Biol.*, vol. 6, no. 7, p. 226, 2005, doi: 10.1186/gb-2005-6-7-226.
- [48] B. Ryffel, G. Woerly, B. Greiner, B. Haendler, M. J. Mihatsch, and B. M. Foxwell, "Distribution of the cyclosporine binding protein cyclophilin in human tissues," *Immunology*, vol. 72, no. 3, pp. 399–404, 1991.
- [49] A. R. Marks, "Cellular functions of immunophilins," *Physiol. Rev.*, vol. 76, no. 3, pp. 631–649, Jul. 1996, doi: 10.1152/physrev.1996.76.3.631.
- [50] M. Arevalo-Rodriguez, X. Wu, S. D. Hanes, and J. Heitman, "Prolyl isomerases in yeast," *Front. Biosci. J. Virtual Libr.*, vol. 9, pp. 2420–2446, Sep. 2004, doi: 10.2741/1405.
- [51] J. M. Damsker, M. I. Bukrinsky, and S. L. Constant, "Preferential chemotaxis of activated human CD4⁺ T cells by extracellular cyclophilin A," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 82, no. 3, pp. 613–618, Sep. 2007, doi: 10.1189/jlb.0506317.
- [52] J. Dornan, P. Taylor, and M. Walkinshaw, "Structures of Immunophilins and their Ligand Complexes," *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 3, no. 12, pp. 1392–1409, 2003, doi: 10.2174/15680260333451899.

- [53] W. Willenbrink, J. Halaschek, S. Schuffenhauer, J. Kunz, and A. Steinkasserer, "Cyclophilin A, the Major Intracellular Receptor for the Immunosuppressant Cyclosporin A, Maps to Chromosome 7p11.2-p13: Four Pseudogenes Map to Chromosomes 3, 10, 14, and 18," *Genomics*, vol. 28, no. 1, pp. 101–104, Jul. 1995, doi: 10.1006/geno.1995.1112.
- [54] A. C. S. Saphire, "Host cyclophilin A mediates HIV-1 attachment to target cells via heparans," *EMBO J.*, vol. 18, no. 23, pp. 6771–6785, Dec. 1999, doi: 10.1093/emboj/18.23.6771.
- [55] R. E. Handschumacher, M. W. Harding, J. Rice, R. J. Drugge, and D. W. Speicher, "Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A," *Science*, vol. 226, no. 4674, pp. 544–547, Nov. 1984, doi: 10.1126/science.6238408.
- [56] J. Colgan *et al.*, "Cyclophilin A regulates TCR signal strength in CD4+ T cells via a proline-directed conformational switch in Itk," *Immunity*, vol. 21, no. 2, pp. 189–201, 2004, doi: 10.1016/j.immuni.2004.07.005.
- [57] J. W. Dear *et al.*, "Cyclophilin A Is a Damage-Associated Molecular Pattern Molecule That Mediates Acetaminophen-Induced Liver Injury," *J Immunol*, vol. 187, no. 6, pp. 3347–3352, 2011, doi: 10.4049/jimmunol.1100165.
- [58] X. Qu, C. Wang, J. Zhang, G. Qie, and J. Zhou, "The Roles of CD147 and/or Cyclophilin A in Kidney Diseases," *Mediators Inflamm.*, vol. 2014, pp. 1–10, 2014, doi: 10.1155/2014/728673.
- [59] B. Sherry, N. Yarlett, A. Strupp, and A. Cerami, "Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages.," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 89, no. 8, pp. 3511–3515, 1992, doi: 10.1073/pnas.89.8.3511.
- [60] J. W. Dear *et al.*, "Liver proteomics for therapeutic drug discovery: Inhibition of the cyclophilin receptor CD147 attenuates sepsis-induced acute renal failure," *Crit. Care Med.*, vol. 35, no. 10, pp. 2319–2328, 2007, doi: 10.1097/01.CCM.0000281858.44387.A2.
- [61] Z.-G. Jin *et al.*, "Cyclophilin A Is a Secreted Growth Factor Induced by Oxidative Stress," *Circ. Res.*, vol. 87, no. 9, pp. 789–796, Oct. 2000, doi: 10.1161/01.RES.87.9.789.
- [62] J. Suzuki, Z.-G. Jin, D. F. Meoli, T. Matoba, and B. C. Berk, "Cyclophilin A Is Secreted by a Vesicular Pathway in Vascular Smooth Muscle Cells," *Circ. Res.*, vol. 98, no. 6, pp. 811–817, Mar. 2006, doi: 10.1161/01.RES.0000216405.85080.a6.
- [63] K. Arora *et al.*, "Extracellular Cyclophilins Contribute to the Regulation of Inflammatory Responses," *J. Immunol.*, vol. 175, no. 1, pp. 517–522, 2005, doi: 10.4049/jimmunol.175.1.517.

[64] W. M. Gwinn *et al.*, "Novel Approach to Inhibit Asthma-Mediated Lung Inflammation Using Anti-CD147 Intervention," *J. Immunol.*, vol. 177, no. 7, pp. 4870–4879, Oct. 2006, doi: 10.4049/jimmunol.177.7.4870.

[65] D. E. Christofferson and J. Yuan, "Cyclophilin A release as a biomarker of necrotic cell death," *Cell Death Differ.*, vol. 17, no. 12, pp. 1942–1943, 2010, doi: 10.1038/cdd.2010.123.

[66] J. M. Damsker, I. Okwumabua, T. Pushkarsky, K. Arora, M. I. Bukrinsky, and S. L. Constant, "Targeting the chemotactic function of CD147 reduces collagen-induced arthritis," *Immunology*, vol. 126, no. 1, pp. 55–62, Jan. 2009, doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.02877.x.

[67] F. Song *et al.*, "Cyclophilin A (CyPA) Induces Chemotaxis Independent of Its Peptidylprolyl Cis-Trans Isomerase Activity: DIRECT BINDING BETWEEN CyPA AND THE ECTODOMAIN OF CD147," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 10, pp. 8197–8203, Mar. 2011, doi: 10.1074/jbc.C110.181347.

[68] V. Yurchenko *et al.*, "Active Site Residues of Cyclophilin A Are Crucial for Its Signaling Activity via CD147," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 25, pp. 22959–22965, Jun. 2002, doi: 10.1074/jbc.M201593200.

[69] C. Biswas *et al.*, "The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily," *Cancer Res.*, vol. 55, no. 2, pp. 434–439, Jan. 1995.

[70] P. Seizer *et al.*, "EMMPRIN and its ligand Cyclophilin A as novel diagnostic markers in inflammatory cardiomyopathy," *Int. J. Cardiol.*, vol. 163, no. 3, pp. 299–304, Mar. 2013, doi: 10.1016/j.ijcard.2011.06.049.

[71] M. Demeule, A. Laplante, A. Sepehr-Araé, G. M. Murphy, R. M. Wenger, and R. Béliveau, "Association of cyclophilin A with renal brush border membranes: Redistribution by cyclosporine A," *Kidney Int.*, vol. 57, no. 4, pp. 1590–1598, Apr. 2000, doi: 10.1046/j.1523-1755.2000.00003.x.

[72] M. Shimada *et al.*, "Extracellular matrix metalloproteinase inducer is expressed in the proximal tubular epithelial cells of the human kidney," *Nephrology*, vol. 14, no. 2, pp. 171–178, Mar. 2009, doi: 10.1111/j.1440-1797.2008.01033.x.

[73] S.-F. Tsai *et al.*, "Urinary Cyclophilin A as a New Marker for Diabetic Nephropathy: A Cross-Sectional Analysis of Diabetes Mellitus," *Medicine (Baltimore)*, vol. 94, no. 42, p. e1802, 2015, doi: 10.1097/MD.0000000000001802.

[74] G. Priante, L. Giancesello, M. Ceol, D. Del Prete, and F. Anglani, "Cell Death in the Kidney," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 14, Jul. 2019, doi: 10.3390/ijms20143598.

[75] D. Martin-Sanchez *et al.*, "Targeting of regulated necrosis in kidney disease," *Nefrología*, vol. 38, no. 2, pp. 125–135, 2018, doi: 10.1016/j.nefro.2017.04.004.

[76] A. Pefanis, F. L. Ierino, J. M. Murphy, and P. J. Cowan, "Regulated necrosis in kidney ischemia-reperfusion injury," *Kidney Int.*, vol. 96, no. 2, pp. 291–301, 2019, doi: 10.1016/j.kint.2019.02.009.

[77] Y. Fuchs and H. Steller, "Programmed cell death in animal development and disease," *Cell*, vol. 147, no. 4, pp. 742–758, Nov. 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.10.033.

[78] L. Galluzzi *et al.*, "Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015," *Cell Death Differ.*, vol. 22, no. 1, pp. 58–73, Jan. 2015, doi: 10.1038/cdd.2014.137.

[79] T. Bergsbaken, S. L. Fink, and B. T. Cookson, "Pyroptosis: host cell death and inflammation," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 7, no. 2, pp. 99–109, Feb. 2009, doi: 10.1038/nrmicro2070.

[80] D. E. Christofferson and J. Yuan, "Necroptosis as an alternative form of programmed cell death," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 22, no. 2, pp. 263–268, Apr. 2010, doi: 10.1016/j.ceb.2009.12.003.

[81] N. N. Danial and S. J. Korsmeyer, "Cell death: critical control points," *Cell*, vol. 116, no. 2, pp. 205–219, Jan. 2004, doi: 10.1016/s0092-8674(04)00046-7.

[82] B. R. S. Broughton, D. C. Reutens, and C. G. Sobey, "Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia," *Stroke*, vol. 40, no. 5, pp. e331-339, May 2009, doi: 10.1161/STROKEAHA.108.531632.

[83] G. Kroemer, L. Galluzzi, and C. Brenner, "Mitochondrial membrane permeabilization in cell death," *Physiol. Rev.*, vol. 87, no. 1, pp. 99–163, Jan. 2007, doi: 10.1152/physrev.00013.2006.

[84] R. S. Whelan, V. Kaplinskiy, and R. N. Kitsis, "Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance," *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 72, pp. 19–44, 2010, doi: 10.1146/annurev.physiol.010908.163111.

[85] A. Belavgeni, C. Meyer, J. Stumpf, C. Hugo, and A. Linkermann, "Ferroptosis and Necroptosis in the Kidney," *Cell Chem. Biol.*, vol. 27, no. 4, pp. 448–462, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.chembiol.2020.03.016.

[86] A. B. Sanz, B. Santamaría, M. Ruiz-Ortega, J. Egido, and A. Ortiz, "Mechanisms of renal apoptosis in health and disease," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 19, no. 9, pp. 1634–1642, Sep. 2008, doi: 10.1681/ASN.2007121336.

[87] L. Benítez-Bribiesca, M. Gómez-Camarillo, E. Castellanos-Juárez, E. Mravko, and P. Sánchez-Suárez, "Morphologic, biochemical and molecular mitochondrial changes during reperfusion phase following brief renal ischemia," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 926, pp. 165–179, 2000, doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb05610.x.

[88] R. S. Hotchkiss, A. Strasser, J. E. McDunn, and P. E. Swanson, "Cell death," *N. Engl. J. Med.*, vol. 361, no. 16, pp. 1570–1583, Oct. 2009, doi: 10.1056/NEJMra0901217.

[89] G. J. Nieuwenhuijs-Moeke *et al.*, "Ischemia and Reperfusion Injury in Kidney Transplantation: Relevant Mechanisms in Injury and Repair," *J. Clin. Med.*, vol. 9, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.3390/jcm9010253.

[90] D. Kanduc *et al.*, "Cell death: apoptosis versus necrosis (review)," *Int. J. Oncol.*, vol. 21, no. 1, pp. 165–170, Jul. 2002, doi: 10.3892/ijo.21.1.165.

[91] A. Havasi and S. C. Borkan, "Apoptosis and acute kidney injury," *Kidney Int.*, vol. 80, no. 1, pp. 29–40, Jul. 2011, doi: 10.1038/ki.2011.120.

[92] A. Linkermann, G. Chen, G. Dong, U. Kunzendorf, S. Krautwald, and Z. Dong, "Regulated cell death in AKI," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 25, no. 12, pp. 2689–2701, Dec. 2014, doi: 10.1681/ASN.2014030262.

[93] S. Wang, C. Zhang, L. Hu, and C. Yang, "Necroptosis in acute kidney injury: a shedding light," *Cell Death Dis.*, vol. 7, p. e2125, Mar. 2016, doi: 10.1038/cddis.2016.37.

[94] A. Linkermann *et al.*, "Synchronized renal tubular cell death involves ferroptosis," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 47, pp. 16836–16841, Nov. 2014, doi: 10.1073/pnas.1415518111.

[95] A. Linkermann *et al.*, "Rip1 (receptor-interacting protein kinase 1) mediates necroptosis and contributes to renal ischemia/reperfusion injury," *Kidney Int.*, vol. 81, no. 8, pp. 751–761, Apr. 2012, doi: 10.1038/ki.2011.450.

[96] S. Jouan-Lanhouet, F. Riquet, L. Duprez, T. Vanden Berghe, N. Takahashi, and P. Vandenabeele, "Necroptosis, in vivo detection in experimental disease models," *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 35, pp. 2–13, Nov. 2014, doi: 10.1016/j.semcdb.2014.08.010.

[97] K. Newton and G. Manning, "Necroptosis and Inflammation," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 85, no. 1, pp. 743–763, Jun. 2016, doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014830.

[98] O. Krysko *et al.*, "Necroptotic cell death in anti-cancer therapy," *Immunol. Rev.*, vol. 280, no. 1, pp. 207–219, 2017, doi: 10.1111/imr.12583.

[99] I. Jorgensen, M. Rayamajhi, and E. A. Miao, "Programmed cell death as a defence against infection," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 17, no. 3, pp. 151–164, Mar. 2017, doi: 10.1038/nri.2016.147.

[100] E. S. Mocarski, J. W. Upton, and W. J. Kaiser, "Viral infection and the evolution of caspase 8-regulated apoptotic and necrotic death pathways," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 12, no. 2, pp. 79–88, Dec. 2011, doi: 10.1038/nri3131.

[101] A. Linkermann and D. R. Green, "Necroptosis," *N. Engl. J. Med.*, vol. 370, no. 5, pp. 455–465, Jan. 2014, doi: 10.1056/NEJMra1310050.

[102] K. Newton *et al.*, "Cleavage of RIPK1 by caspase-8 is crucial for limiting apoptosis and necroptosis," *Nature*, vol. 574, no. 7778, pp. 428–431, 2019, doi: 10.1038/s41586-019-1548-x.

[103] L. Cao and W. Mu, "Necrostatin-1 and necroptosis inhibition: Pathophysiology and therapeutic implications," *Pharmacol. Res.*, vol. 163, p. 105297, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.phrs.2020.105297.

[104] S. J. Dixon *et al.*, "Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death," *Cell*, vol. 149, no. 5, pp. 1060–1072, May 2012, doi: 10.1016/j.cell.2012.03.042.

[105] B. R. Stockwell *et al.*, "Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease," *Cell*, vol. 171, no. 2, pp. 273–285, Oct. 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.09.021.

[106] J. P. Friedmann Angeli *et al.*, "Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice," *Nat. Cell Biol.*, vol. 16, no. 12, pp. 1180–1191, Dec. 2014, doi: 10.1038/ncb3064.

[107] W. S. Yang *et al.*, "Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4," *Cell*, vol. 156, no. 1–2, pp. 317–331, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.cell.2013.12.010.

[108] F. Ursini, M. Maiorino, M. Valente, L. Ferri, and C. Gregolin, "Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides," *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.*, vol. 710, no. 2, pp. 197–211, Feb. 1982, doi: 10.1016/0005-2760(82)90150-3.

[109] T. Müller *et al.*, "Necroptosis and ferroptosis are alternative cell death pathways that operate in acute kidney failure," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 74, no. 19, pp. 3631–3645, Oct. 2017, doi: 10.1007/s00018-017-2547-4.

[110] A. Seiler *et al.*, "Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death," *Cell Metab.*, vol. 8, no. 3, pp. 237–248, Sep. 2008, doi: 10.1016/j.cmet.2008.07.005.

[111] W. S. Yang and B. R. Stockwell, "Synthetic Lethal Screening Identifies Compounds Activating Iron-Dependent, Nonapoptotic Cell Death in Oncogenic-RAS-Harboring Cancer Cells," *Chem. Biol.*, vol. 15, no. 3, pp. 234–245, Mar. 2008, doi: 10.1016/j.chembiol.2008.02.010.

[112] R. Skouta *et al.*, "Ferrostatis inhibit oxidative lipid damage and cell death in diverse disease models," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 136, no. 12, pp. 4551–4556, Mar. 2014, doi: 10.1021/ja411006a.

[113] S. Swaminathan, "Iron Homeostasis Pathways as Therapeutic Targets in Acute Kidney Injury," *Nephron*, vol. 140, no. 2, pp. 156–159, 2018, doi: 10.1159/000490808.

[114] M. Schumer *et al.*, "Morphologic, biochemical, and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia," *Am. J. Pathol.*, vol. 140, no. 4, pp. 831–838, Apr. 1992.

[115] P. Saikumar, Z. Dong, J. M. Weinberg, and M. A. Venkatachalam, "Mechanisms of cell death in hypoxia/reoxygenation injury," *Oncogene*, vol. 17, no. 25, pp. 3341–3349, Dec. 1998, doi: 10.1038/sj.onc.1202579.

[116] A. Linkermann, F. De Zen, J. Weinberg, U. Kundendorf, and S. Krautwald, "Programmed necrosis in acute kidney injury," *Nephrol. Dial. Transplant.*, vol. 27, no. 9, pp.

3412–3419, Sep. 2012, doi: 10.1093/ndt/gfs373.

[117] A. Lau *et al.*, “RIPK3-Mediated Necroptosis Promotes Donor Kidney Inflammatory Injury and Reduces Allograft Survival: RIPK3-Mediated Necroptosis and Renal Allograft Injury,” *Am. J. Transplant.*, vol. 13, no. 11, pp. 2805–2818, Nov. 2013, doi: 10.1111/ajt.12447.

[118] D. Martin-Sanchez *et al.*, “Ferroptosis and kidney disease,” *Nefrología*, vol. 40, no. 4, pp. 384–394, Jul. 2020, doi: 10.1016/j.nefro.2020.03.005.

[119] W. S. McDougal, “Renal perfusion/reperfusion injuries,” *J. Urol.*, vol. 140, no. 6, pp. 1325–1330, Dec. 1988, doi: 10.1016/s0022-5347(17)42037-4.

[120] N. Chatauret, L. Badet, B. Barrou, and T. Hauet, “Ischemia-reperfusion: From cell biology to acute kidney injury,” *Prog. En Urol.*, vol. 24 Suppl 1, pp. S4-12, Jun. 2014, doi: 10.1016/S1166-7087(14)70057-0.

[121] N. Ueda and S. V. Shah, “Role of endonucleases in renal tubular epithelial cell injury,” *Exp. Nephrol.*, vol. 8, no. 1, pp. 8–13, Feb. 2000, doi: 10.1159/000020642.

[122] P. H. Maxwell, C. W. Pugh, and P. J. Ratcliffe, “Inducible operation of the erythropoietin 3' enhancer in multiple cell lines: evidence for a widespread oxygen-sensing mechanism,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 90, no. 6, pp. 2423–2427, Mar. 1993, doi: 10.1073/pnas.90.6.2423.

[123] M.-Y. Wu *et al.*, “Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury,” *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 46, no. 4, pp. 1650–1667, 2018, doi: 10.1159/000489241.

[124] R. H. Kessler, “Effects of Ischemia on the Concentration of Adenine Nucleotides in the Kidney of Anesthetized Dogs,” *Exp. Biol. Med.*, vol. 134, no. 4, pp. 1091–1095, Sep. 1970, doi: 10.3181/00379727-134-34950.

[125] M. T. Vogt and E. Farber, “On the molecular pathology of ischemic renal cell death. Reversible and irreversible cellular and mitochondrial metabolic alterations,” *Am. J. Pathol.*, vol. 53, no. 1, pp. 1–26, Jul. 1968.

[126] M. Kosieradzki and W. Rowiński, “Ischemia/Reperfusion Injury in Kidney Transplantation: Mechanisms and Prevention,” *Transplant. Proc.*, vol. 40, no. 10, pp. 3279–3288, Dec. 2008, doi: 10.1016/j.transproceed.2008.10.004.

- [127] F. Di Lisa, M. Canton, R. Menabò, N. Kaludercic, and P. Bernardi, "Mitochondria and cardioprotection," *Heart Fail. Rev.*, vol. 12, no. 3–4, pp. 249–260, Dec. 2007, doi: 10.1007/s10741-007-9028-z.
- [128] S. Sugiyama, Y. Hanaki, T. Ogawa, N. Hieda, K. Taki, and T. Ozawa, "The effects of sun 1165, a novel sodium channel blocker, on ischemia-induced mitochondrial dysfunction and leakage of lysosomal enzymes in canine hearts," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 157, no. 2, pp. 433–439, Dec. 1988, doi: 10.1016/S0006-291X(88)80267-5.
- [129] K. Kako, M. Kato, T. Matsuoka, and A. Mustapha, "Depression of membrane-bound Na⁺-K⁺-ATPase activity induced by free radicals and by ischemia of kidney," *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.*, vol. 254, no. 2, pp. C330–C337, Feb. 1988, doi: 10.1152/ajpcell.1988.254.2.C330.
- [130] M. Kato and K. J. Kako, "Effects of N-(2-mercaptopropionyl)glycine on ischemic-reperfused dog kidney in vivo and membrane preparation in vitro," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 78, no. 2, Dec. 1987, doi: 10.1007/BF00229689.
- [131] J. Insete, V. Hernando, and D. Garcia-Dorado, "Contribution of calpains to myocardial ischaemia/reperfusion injury," *Cardiovasc. Res.*, vol. 96, no. 1, pp. 23–31, Oct. 2012, doi: 10.1093/cvr/cvs232.
- [132] S. Sanada, I. Komuro, and M. Kitakaze, "Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures," *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 301, no. 5, pp. H1723-1741, Nov. 2011, doi: 10.1152/ajpheart.00553.2011.
- [133] M. Salvadori, G. Rosso, and E. Bertoni, "Update on ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: Pathogenesis and treatment," *World J. Transplant.*, vol. 5, no. 2, p. 52, 2015, doi: 10.5500/wjt.v5.i2.52.
- [134] T.-I. Peng and M.-J. Jou, "Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload: Peng & Jou," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1201, no. 1, pp. 183–188, Jul. 2010, doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05634.x.
- [135] S. Javadov, J. C. Hunter, G. Barreto-Torres, and R. Parodi-Rullan, "Targeting the mitochondrial permeability transition: cardiac ischemia-reperfusion versus carcinogenesis," *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, vol. 27, no. 3–4, pp. 179–190, 2011, doi: 10.1159/000327943.

- [136] A. B. Gustafsson and R. A. Gottlieb, "Heart mitochondria: gates of life and death," *Cardiovasc. Res.*, vol. 77, no. 2, pp. 334–343, Sep. 2007, doi: 10.1093/cvr/cvm005.
- [137] L. B. Becker, "New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology," *Cardiovasc. Res.*, vol. 61, no. 3, pp. 461–470, Feb. 2004, doi: 10.1016/j.cardiores.2003.10.025.
- [138] M. S. Alkaitis and M. J. Crabtree, "Recoupling the Cardiac Nitric Oxide Synthases: Tetrahydrobiopterin Synthesis and Recycling," *Curr. Heart Fail. Rep.*, vol. 9, no. 3, pp. 200–210, Sep. 2012, doi: 10.1007/s11897-012-0097-5.
- [139] C. Li and R. M. Jackson, "Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury," *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.*, vol. 282, no. 2, pp. C227–C241, Feb. 2002, doi: 10.1152/ajpcell.00112.2001.
- [140] S. Simone *et al.*, "Complement-dependent NADPH oxidase enzyme activation in renal ischemia/reperfusion injury," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 74, pp. 263–273, Sep. 2014, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.003.
- [141] G. L. Wang and G. L. Semenza, "General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 90, no. 9, pp. 4304–4308, May 1993, doi: 10.1073/pnas.90.9.4304.
- [142] M. Z. Akhtar, A. I. Sutherland, H. Huang, R. J. Ploeg, and C. W. Pugh, "The role of hypoxia-inducible factors in organ donation and transplantation: the current perspective and future opportunities," *Am. J. Transplant.*, vol. 14, no. 7, pp. 1481–1487, Jul. 2014, doi: 10.1111/ajt.12737.
- [143] K. Sethi, K. Rao, D. Bolton, O. Patel, and J. Ischia, "Targeting HIF-1 α to Prevent Renal Ischemia-Reperfusion Injury: Does It Work?," *Int. J. Cell Biol.*, vol. 2018, p. 9852791, 2018, doi: 10.1155/2018/9852791.
- [144] C. Rosenberger *et al.*, "Up-regulation of HIF in experimental acute renal failure: Evidence for a protective transcriptional response to hypoxia," *Kidney Int.*, vol. 67, no. 2, pp. 531–542, Feb. 2005, doi: 10.1111/j.1523-1755.2005.67110.x.
- [145] H. Wang, N. Liu, R. Li, J. Tian, W. Hu, and J. Zhang, "Nephroprotecting effect of hypoxia-inducible factor 1 α in a rat model of ischaemic/reperfusion acute kidney injury," *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, vol. 45, no. 10, pp. 1076–1082, 2018, doi: 10.1111/1440-1681.12947.

- [146] O. Bayrak *et al.*, “Nigella sativa protects against ischaemia/reperfusion injury in rat kidneys,” *Nephrol. Dial. Transplant.*, vol. 23, no. 7, pp. 2206–2212, May 2008, doi: 10.1093/ndt/gfm953.
- [147] J. L. Martin, A. V. Gruszczuk, T. E. Beach, M. P. Murphy, and K. Saeb-Parsy, “Mitochondrial mechanisms and therapeutics in ischaemia reperfusion injury,” *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.*, vol. 34, no. 7, pp. 1167–1174, 2019, doi: 10.1007/s00467-018-3984-5.
- [148] E. T. Chouchani *et al.*, “Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS,” *Nature*, vol. 515, no. 7527, pp. 431–435, Nov. 2014, doi: 10.1038/nature13909.
- [149] R. A. Gottlieb, “Cell death pathways in acute ischemia/reperfusion injury,” *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.*, vol. 16, no. 3–4, pp. 233–238, Dec. 2011, doi: 10.1177/1074248411409581.
- [150] T. L. Vanden Hoek, Z. Shao, C. Li, R. Zak, P. T. Schumacker, and L. B. Becker, “Reperfusion injury on cardiac myocytes after simulated ischemia,” *Am. J. Physiol.*, vol. 270, no. 4 Pt 2, pp. H1334–1341, Apr. 1996, doi: 10.1152/ajpheart.1996.270.4.H1334.
- [151] K. Solez, L. Morel-Maroger, and J. D. Sraer, “The morphology of ‘acute tubular necrosis’ in man: analysis of 57 renal biopsies and a comparison with the glycerol model,” *Medicine (Baltimore)*, vol. 58, no. 5, pp. 362–376, Sep. 1979.
- [152] J. V. Bonventre and L. Yang, “Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury,” *J. Clin. Invest.*, vol. 121, no. 11, pp. 4210–4221, 2011, doi: 10.1172/JCI45161.
- [153] A. A. Sharfuddin and B. A. Molitoris, “Pathophysiology of ischemic acute kidney injury,” *Nat. Rev. Nephrol.*, vol. 7, no. 4, pp. 189–200, 2011, doi: 10.1038/nrneph.2011.16.
- [154] N. Lameire, W. V. Biesen, and R. Vanholder, “Acute kidney injury,” *Lancet*, vol. 372, no. 9653, pp. 1863–1865, Nov. 2008, doi: 10.1016/S0140-6736(08)61794-8.
- [155] M. Rosner and M. Okusa, “Pathogenesis and etiology of ischemic acute tubular necrosis - UpToDate,” *UpToDate*. https://www.uptodate.com.m-fjd.a17.csinet.es/contents/pathogenesis-and-etiology-of-ischemic-acute-tubular-necrosis?search=necroptosis&source=search_result&selectedTitle=2~2&usage_type=default&display_rank=2 (accessed May 05, 2020).
- [156] A. M. Ramos *et al.*, “Designing drugs that combat kidney damage,” *Expert Opin.*

Drug Discov., vol. 10, no. 5, pp. 541–556, May 2015, doi: 10.1517/17460441.2015.1033394.

[157] M. Meersch *et al.*, “Prevention of cardiac surgery-associated AKI by implementing the KDIGO guidelines in high risk patients identified by biomarkers: the PrevAKI randomized controlled trial,” *Intensive Care Med.*, vol. 43, no. 11, pp. 1551–1561, Nov. 2017, doi: 10.1007/s00134-016-4670-3.

[158] O. Kwon, S.-M. Hong, and G. Ramesh, “Diminished NO generation by injured endothelium and loss of macula densa nNOS may contribute to sustained acute kidney injury after ischemia-reperfusion,” *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 296, no. 1, pp. F25–33, Jan. 2009, doi: 10.1152/ajprenal.90531.2008.

[159] S. Bier, S. Aufderklamm, T. Todenhöfer, S. Kruck, K. Schuster, and S. Rausch, “Prediction of Postoperative Risks in Laparoscopic Partial Nephrectomy Using RENAL, Mayo Adhesive Probability and Renal Pelvic Score,” *Anticancer Res.*, vol. 37, no. 3, pp. 1369–1374, Mar. 2017, doi: 10.21873/anticancer.11457.

[160] B. R. Lane *et al.*, “Factors Predicting Renal Functional Outcome After Partial Nephrectomy,” *J. Urol.*, vol. 180, no. 6, pp. 2363–2369, Dec. 2008, doi: 10.1016/j.juro.2008.08.036.

[161] A. Benigni, M. Morigi, and G. Remuzzi, “Kidney regeneration,” *Lancet*, vol. 375, no. 9722, pp. 1310–1317, Apr. 2010, doi: 10.1016/S0140-6736(10)60237-1.

[162] J. S. Duffield and B. D. Humphreys, “Origin of new cells in the adult kidney: results from genetic labeling techniques,” *Kidney Int.*, vol. 79, no. 5, pp. 494–501, Mar. 2011, doi: 10.1038/ki.2010.338.

[163] R. Thadhani, M. Pascual, and J. V. Bonventre, “Acute renal failure,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 334, no. 22, pp. 1448–1460, May 1996, doi: 10.1056/NEJM199605303342207.

[164] B. Ljungberg, L. Albiges, K. Bensalah, A. Bex, R. Giles, and M. Hora, *EAU Guidelines on Renal Cell Carcinoma*. European Association of Urology, 2020. [Online]. Available: <https://uroweb.org/guideline/renal-cell-carcinoma/>

[165] A. J. Hung, J. Cai, M. N. Simmons, and I. S. Gill, “‘Trifecta’ in partial nephrectomy,” *J. Urol.*, vol. 189, no. 1, pp. 36–42, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.juro.2012.09.042.

[166] H. Zargar *et al.*, “Trifecta and optimal perioperative outcomes of robotic and laparoscopic partial nephrectomy in surgical treatment of small renal masses: a multi-

institutional study," *BJU Int.*, vol. 116, no. 3, pp. 407–414, 2015, doi: <https://doi.org/10.1111/bju.12933>.

[167] M. N. Simmons, "Morphometric characterization of kidney tumors:," *Curr. Opin. Urol.*, vol. 21, no. 2, pp. 99–103, 2011, doi: 10.1097/MOU.0b013e32834208d6.

[168] A. Kutikov and R. G. Uzzo, "The R.E.N.A.L. Nephrometry Score: A Comprehensive Standardized System for Quantitating Renal Tumor Size, Location and Depth," *J. Urol.*, vol. 182, no. 3, pp. 844–853, 2009, doi: 10.1016/j.juro.2009.05.035.

[169] V. Ficarra *et al.*, "Preoperative Aspects and Dimensions Used for an Anatomical (PADUA) Classification of Renal Tumours in Patients who are Candidates for Nephron-Sparing Surgery," *Eur. Urol.*, vol. 56, no. 5, pp. 786–793, 2009, doi: 10.1016/j.eururo.2009.07.040.

[170] M. N. Simmons, C. B. Ching, M. K. Samplaski, C. H. Park, and I. S. Gill, "Kidney Tumor Location Measurement Using the C Index Method," *J. Urol.*, vol. 183, no. 5, pp. 1708–1713, 2010, doi: 10.1016/j.juro.2010.01.005.

[171] M. N. Simmons, S. P. Hillyer, B. H. Lee, A. F. Fergany, J. Kaouk, and S. C. Campbell, "Diameter-Axial-Polar Nephrometry: Integration and Optimization of R.E.N.A.L. and Centrality Index Scoring Systems," *J. Urol.*, vol. 188, no. 2, pp. 384–390, 2012, doi: 10.1016/j.juro.2012.03.123.

[172] T. S. Hakky *et al.*, "Zonal NePhRO Scoring System: A Superior Renal Tumor Complexity Classification Model," *Clin. Genitourin. Cancer*, vol. 12, no. 1, pp. e13–e18, 2014, doi: 10.1016/j.clgc.2013.07.009.

[173] S. Leslie *et al.*, "Renal Tumor Contact Surface Area: A Novel Parameter for Predicting Complexity and Outcomes of Partial Nephrectomy," *Eur. Urol.*, vol. 66, no. 5, pp. 884–893, Nov. 2014, doi: 10.1016/j.eururo.2014.03.010.

[174] A. J. Davidiuk *et al.*, "Mayo adhesive probability score: an accurate image-based scoring system to predict adherent perinephric fat in partial nephrectomy," *Eur. Urol.*, vol. 66, no. 6, pp. 1165–1171, 2014, doi: 10.1016/j.eururo.2014.08.054.

[175] M. Spaliviero *et al.*, "An Arterial Based Complexity (ABC) Scoring System to Assess the Morbidity Profile of Partial Nephrectomy," *Eur. Urol.*, vol. 69, no. 1, pp. 72–79, 2016, doi: 10.1016/j.eururo.2015.08.008.

[176] J. J. Tomaszewski *et al.*, "Internal validation of the renal pelvic score: a novel

marker of renal pelvic anatomy that predicts urine leak after partial nephrectomy," *Urology*, vol. 84, no. 2, pp. 351–357, 2014, doi: 10.1016/j.urology.2014.05.001.

[177] K. Yasuyuki *et al.*, "Evaluation of renal function after laparoscopic partial nephrectomy with renal scintigraphy using 99mtechnetium-mercaptoacetyltriglycine," *Int. J. Urol.*, vol. 13, no. 11, pp. 1371–1374, 2006, doi: 10.1111/j.1442-2042.2006.01579.x.

[178] O. Yossepowitch *et al.*, "Temporary renal ischemia during nephron sparing surgery is associated with short-term but not long-term impairment in renal function," *J. Urol.*, vol. 176, no. 4 Pt 1, pp. 1339–1343; discussion 1343, Oct. 2006, doi: 10.1016/j.juro.2006.06.046.

[179] M. C. Mir, N. Pavan, and D. J. Parekh, "Current Paradigm for Ischemia in Kidney Surgery," *J. Urol.*, vol. 195, no. 6, pp. 1655–1663, 2016, doi: 10.1016/j.juro.2015.09.099.

[180] W. C. Huang *et al.*, "Chronic kidney disease after nephrectomy in patients with renal cortical tumours: a retrospective cohort study," *Lancet Oncol.*, vol. 7, no. 9, pp. 735–740, Sep. 2006, doi: 10.1016/S1470-2045(06)70803-8.

[181] A. Volpe *et al.*, "Renal Ischemia and Function After Partial Nephrectomy: A Collaborative Review of the Literature," *Eur. Urol.*, vol. 68, no. 1, pp. 61–74, Jul. 2015, doi: 10.1016/j.eururo.2015.01.025.

[182] F. Becker *et al.*, "Assessing the impact of ischaemia time during partial nephrectomy," *Eur. Urol.*, vol. 56, no. 4, pp. 625–634, Oct. 2009, doi: 10.1016/j.eururo.2009.07.016.

[183] M. C. Mir *et al.*, "Decline in renal function after partial nephrectomy: etiology and prevention," *J. Urol.*, vol. 193, no. 6, pp. 1889–1898, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.juro.2015.01.093.

[184] R. H. Thompson *et al.*, "Renal Function After Partial Nephrectomy: Effect of Warm Ischemia Relative to Quantity and Quality of Preserved Kidney," *Urology*, vol. 79, no. 2, pp. 356–360, Feb. 2012, doi: 10.1016/j.urology.2011.10.031.

[185] B. R. Lane *et al.*, "Comparison of Cold and Warm Ischemia During Partial Nephrectomy in 660 Solitary Kidneys Reveals Predominant Role of Nonmodifiable Factors in Determining Ultimate Renal Function," *J. Urol.*, vol. 185, no. 2, pp. 421–427, Feb. 2011, doi: 10.1016/j.juro.2010.09.131.

[186] M. C. Mir *et al.*, "Parenchymal Volume Preservation and Ischemia During Partial

Nephrectomy: Functional and Volumetric Analysis,” *Urology*, vol. 82, no. 2, pp. 263–269, Aug. 2013, doi: 10.1016/j.urology.2013.03.068.

[187] F. P. Secin, “Importance and Limits of Ischemia in Renal Partial Surgery: Experimental and Clinical Research,” *Adv. Urol.*, vol. 2008, p. e102461, 2008, doi: <https://doi.org/10.1155/2008/102461>.

[188] M. M. Desai, I. S. Gill, A. P. Ramani, M. Spaliviero, L. Rybicki, and J. H. Kaouk, “The impact of warm ischaemia on renal function after laparoscopic partial nephrectomy,” *BJU Int.*, vol. 95, no. 3, pp. 377–383, Feb. 2005, doi: 10.1111/j.1464-410X.2005.05304.x.

[189] E. M. Gong, K. C. Zorn, M. A. Orvieto, A. Lucioni, L. P. Msezane, and A. L. Shalhav, “Artery-only occlusion may provide superior renal preservation during laparoscopic partial nephrectomy,” *Urology*, vol. 72, no. 4, pp. 843–846, Oct. 2008, doi: 10.1016/j.urology.2008.05.020.

[190] K.-H. Song and W.-S. Jang, “Comparison of Hilar Clamping Techniques in Partial Nephrectomy: Is Artery Only Clamping Beneficial?,” *Indian J. Surg. Oncol.*, vol. 11, no. 2, pp. 325–328, Jun. 2020, doi: 10.1007/s13193-020-01064-z.

[191] G. Verhoest *et al.*, “Predictive factors of chronic kidney disease stage V after partial nephrectomy in a solitary kidney: a multi-institutional study,” *Urol. Oncol.*, vol. 32, no. 1, p. 28.e21–26, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.urolonc.2012.10.003.

[192] C.-C. Chen, W. C. Chapman, and D. W. Hanto, “Ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation,” *Front. Biosci. Elite Ed.*, vol. 7, pp. 117–134, Jan. 2015, doi: 10.2741/722.

[193] S. F. Smith, S. A. Hosgood, and M. L. Nicholson, “Ischemia-reperfusion injury in renal transplantation: 3 key signaling pathways in tubular epithelial cells,” *Kidney Int.*, vol. 95, no. 1, pp. 50–56, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.kint.2018.10.009.

[194] M. Cavaillé-Coll *et al.*, “Summary of FDA Workshop on Ischemia Reperfusion Injury in Kidney Transplantation: FDA IRI Workshop,” *Am. J. Transplant.*, vol. 13, no. 5, pp. 1134–1148, May 2013, doi: 10.1111/ajt.12210.

[195] C. Rosenberger and K.-U. Eckardt, “Oxygenation of the Transplanted Kidney,” *Semin. Nephrol.*, vol. 39, no. 6, pp. 554–566, 2019, doi: 10.1016/j.semnephrol.2019.10.005.

[196] H. Zhao, A. Alam, A. P. Soo, A. J. T. George, and D. Ma, “Ischemia-Reperfusion Injury Reduces Long Term Renal Graft Survival: Mechanism and Beyond,” *EBioMedicine*, vol. 28,

pp. 31–42, Feb. 2018, doi: 10.1016/j.ebiom.2018.01.025.

[197] F. O. Belzer and J. H. Southard, “Principles of solid-organ preservation by cold storage,” *Transplantation*, vol. 45, no. 4, pp. 673–676, Apr. 1988, doi: 10.1097/00007890-198804000-00001.

[198] A. K. Salahudeen, “Cold ischemic injury of transplanted kidneys: new insights from experimental studies,” *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.*, vol. 287, no. 2, pp. F181–F187, Aug. 2004, doi: 10.1152/ajprenal.00098.2004.

[199] A. Breda, K. Budde, A. Figueiredo, E. Lledó, J. Olsburgh, and H. Regele, *EAU Guidelines on Renal Transplantation*. European Association of Urology, 2020. [Online]. Available: <https://uroweb.org/guideline/renal-transplantation/>

[200] J. Barba *et al.*, “¿Existe un intervalo de tiempo de isquemia fría seguro para el injerto renal?,” *Actas Urol. Esp.*, vol. 35, no. 8, pp. 475–480, Sep. 2011, doi: 10.1016/j.acuro.2011.03.005.

[201] O. K. Serrano *et al.*, “The Relationships Between Cold Ischemia Time, Kidney Transplant Length of Stay, and Transplant-related Costs,” *Transplantation*, vol. 103, no. 2, pp. 401–411, Feb. 2019, doi: 10.1097/TP.0000000000002309.

[202] C. M. Lee *et al.*, “The Effect of Age and Prolonged Cold Ischemia Times on the National Allocation of Cadaveric Renal Allografts,” *J. Surg. Res.*, vol. 91, no. 1, pp. 83–88, Jun. 2000, doi: 10.1006/jsre.2000.5921.

[203] A. K. Salahudeen, M. Joshi, and J. K. Jenkins, “Apoptosis versus necrosis during cold storage and rewarming of human renal proximal tubular cells,” *Transplantation*, vol. 72, no. 5, pp. 798–804, Sep. 2001, doi: 10.1097/00007890-200109150-00010.

[204] B. Schröppel and C. Legendre, “Delayed kidney graft function: from mechanism to translation,” *Kidney Int.*, vol. 86, no. 2, pp. 251–258, Aug. 2014, doi: 10.1038/ki.2014.18.

[205] S. G. Yarlagadda, S. G. Coca, R. N. Formica, E. D. Poggio, and C. R. Parikh, “Association between delayed graft function and allograft and patient survival: a systematic review and meta-analysis,” *Nephrol. Dial. Transplant.*, vol. 24, no. 3, pp. 1039–1047, Oct. 2008, doi: 10.1093/ndt/gfn667.

[206] I. E. Hall, M. D. Doshi, E. D. Poggio, and C. R. Parikh, “A comparison of alternative serum biomarkers with creatinine for predicting allograft function after kidney transplantation,”

Transplantation, vol. 91, no. 1, pp. 48–56, Jan. 2011, doi: 10.1097/TP.0b013e3181fc4b3a.

[207] N. Perico, D. Cattaneo, M. H. Sayegh, and G. Remuzzi, “Delayed graft function in kidney transplantation,” *Lancet*, vol. 364, no. 9447, pp. 1814–1827, Nov. 2004, doi: 10.1016/S0140-6736(04)17406-0.

[208] M. G. J. Snoeijs, L. W. E. van Heurn, and W. A. Buurman, “Biological modulation of renal ischemia-reperfusion injury,” *Curr. Opin. Organ Transplant.*, vol. 15, no. 2, pp. 190–199, Apr. 2010, doi: 10.1097/MOT.0b013e32833593eb.

[209] W. W. Williams, D. Taheri, N. Tolckoff-Rubin, and R. B. Colvin, “Clinical role of the renal transplant biopsy,” *Nat. Rev. Nephrol.*, vol. 8, no. 2, pp. 110–121, Feb. 2012, doi: 10.1038/nrneph.2011.213.

[210] S. C. Kim, E. K. Page, and S. J. Knechtle, “Urine proteomics in kidney transplantation,” *Transplant. Rev. Orlando Fla*, vol. 28, no. 1, pp. 15–20, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.trre.2013.10.004.

[211] S. Olsen, J. F. Burdick, P. A. Keown, A. C. Wallace, L. C. Racusen, and K. Solez, “Primary Acute Renal Failure (‘Acute Tubular Necrosis’) in the Transplanted Kidney: Morphology and Pathogenesis,” *Medicine (Baltimore)*, vol. 68, no. 3, p. 173, May 1989, doi: 10.1097/00005792-198905000-00005.

[212] S. Herath, J. Erlich, A. Y. M. Au, and Z. H. Endre, “Advances in Detection of Kidney Transplant Injury,” *Mol. Diagn. Ther.*, vol. 23, no. 3, pp. 333–351, Jun. 2019, doi: 10.1007/s40291-019-00396-z.

[213] J. Poveda *et al.*, “p-cresyl sulphate has pro-inflammatory and cytotoxic actions on human proximal tubular epithelial cells,” *Nephrol. Dial. Transplant.*, vol. 29, no. 1, pp. 56–64, 2014, doi: 10.1093/ndt/gft367.

[214] T. P. Haverty *et al.*, “Characterization of a renal tubular epithelial cell line which secretes the autologous target antigen of autoimmune experimental interstitial nephritis,” *J. Cell Biol.*, vol. 107, no. 4, pp. 1359–1368, 1988, doi: 10.1083/jcb.107.4.1359.

[215] H. Song *et al.*, “The NADPH oxidase inhibitor DPI can abolish hypoxia-induced apoptosis of human kidney proximal tubular epithelial cells through Bcl2 up-regulation via ERK activation without ROS reduction,” *Life Sci.*, vol. 126, pp. 69–75, Apr. 2015, doi: 10.1016/j.lfs.2015.02.004.

- [216] E. Conde *et al.*, "Hypoxia inducible factor 1-alpha (HIF-1 alpha) is induced during reperfusion after renal ischemia and is critical for proximal tubule cell survival," *PLoS One*, vol. 7, no. 3, p. e33258, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0033258.
- [217] D. Martin-Sanchez *et al.*, "TWEAK and RIPK1 mediate a second wave of cell death during AKI," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 115, no. 16, pp. 4182–4187, 2018, doi: 10.1073/pnas.1716578115.
- [218] M. Fontecha-Barriuso *et al.*, "Molecular pathways driving omeprazole nephrotoxicity," *Redox Biol.*, vol. 32, p. 101464, 2020, doi: 10.1016/j.redox.2020.101464.
- [219] A. Rosales, J. Salvador, N. De Graeve, O. Angerri, and H. Villavicencio, "Clamping of the renal artery in laparoscopic partial nephrectomy: an old device for a new technique," *Eur. Urol.*, vol. 47, no. 1, pp. 98–101, Jan. 2005, doi: 10.1016/j.eururo.2004.08.021.
- [220] "Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal.," *www.boe.es*, Dec. 13, 1999. <https://www.boe.es/eli/es/lo/1999/12/13/15/con>
- [221] M. E. Charlson, P. Pompei, K. L. Ales, and C. R. MacKenzie, "A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation," *J. Chronic Dis.*, vol. 40, no. 5, pp. 373–383, 1987, doi: 10.1016/0021-9681(87)90171-8.
- [222] D. Dindo, N. Demartines, and P.-A. Clavien, "Classification of Surgical Complications: A New Proposal With Evaluation in a Cohort of 6336 Patients and Results of a Survey," *Ann. Surg.*, vol. 240, no. 2, pp. 205–213, Aug. 2004, doi: 10.1097/01.sla.0000133083.54934.ae.
- [223] L. S. Chawla *et al.*, "Acute kidney disease and renal recovery: consensus report of the Acute Disease Quality Initiative (ADQI) 16 Workgroup," *Nat. Rev. Nephrol.*, vol. 13, no. 4, Art. no. 4, Apr. 2017, doi: 10.1038/nrneph.2017.2.
- [224] Q. Wei, G. Dong, J.-K. Chen, G. Ramesh, and Z. Dong, "Bax and Bak have critical roles in ischemic acute kidney injury in global and proximal tubule-specific knockout mouse models," *Kidney Int.*, vol. 84, no. 1, pp. 138–148, Jul. 2013, doi: 10.1038/ki.2013.68.
- [225] P. Justo *et al.*, "Cytokine cooperation in renal tubular cell injury: The role of TWEAK," *Kidney Int.*, vol. 70, no. 10, pp. 1750–1758, 2006, doi: 10.1038/sj.ki.5001866.
- [226] Y. Fang, H. Zhang, Y. Zhong, and X. Ding, "Prolyl hydroxylase 2 (PHD2) inhibition protects human renal epithelial cells and mice kidney from hypoxia injury," *Oncotarget*, vol. 7,

no. 34, pp. 54317–54328, Aug. 2016, doi: 10.18632/oncotarget.11104.

[227] M. Guo, L.-P. Song, Y. Jiang, W. Liu, Y. Yu, and G.-Q. Chen, “Hypoxia-mimetic agents desferrioxamine and cobalt chloride induce leukemic cell apoptosis through different hypoxia-inducible factor-1 α independent mechanisms,” *Apoptosis*, vol. 11, no. 1, pp. 67–77, Jan. 2006, doi: 10.1007/s10495-005-3085-3.

[228] X. Wan *et al.*, “All-trans retinoic acid protects renal tubular epithelial cells against hypoxia induced injury in vitro,” *Transplant. Proc.*, vol. 45, no. 2, pp. 497–502, Mar. 2013, doi: 10.1016/j.transproceed.2012.02.030.

[229] G. L. Semenza, “HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia,” *J. Appl. Physiol.*, vol. 88, no. 4, pp. 1474–1480, Apr. 2000, doi: 10.1152/jappl.2000.88.4.1474.

[230] L. Xi, M. Taher, C. Yin, F. Salloum, and R. C. Kukreja, “Cobalt chloride induces delayed cardiac preconditioning in mice through selective activation of HIF-1 α and AP-1 and iNOS signaling,” *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 287, p. 7, 2004, doi: <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00422.2004>.

[231] Y. Seko, T. Fujimura, H. Taka, R. Mineki, K. Murayama, and R. Nagai, “Hypoxia followed by reoxygenation induces secretion of cyclophilin A from cultured rat cardiac myocytes,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 317, no. 1, pp. 162–168, Apr. 2004, doi: 10.1016/j.bbrc.2004.03.021.

[232] Z. Su *et al.*, “The Release of Cyclophilin A from Rapamycin-Stimulated Vascular Smooth Muscle Cells Mediated by Myosin II Activation: Involvement of Apoptosis but Not Autophagy,” *J. Vasc. Res.*, vol. 57, no. 5, pp. 254–260, 2020, doi: 10.1159/000506685.

[233] P.-J. Kuo *et al.*, “Fibroblast-enhanced cyclophilin A releasing from U937 cell upregulates MMP-2 in gingival fibroblast,” *J. Periodontal Res.*, vol. 55, no. 5, pp. 705–712, Oct. 2020, doi: 10.1111/jre.12759.

[234] T. Eleftheriadis, G. Pissas, G. Antoniadis, V. Liakopoulos, and I. Stefanidis, “Cell Death Patterns Due to Warm Ischemia or Reperfusion in Renal Tubular Epithelial Cells Originating from Human, Mouse, or the Native Hibernator Hamster,” *Biology*, vol. 7, no. 4, Nov. 2018, doi: 10.3390/biology7040048.

[235] Q. Li *et al.*, “Inhibition of neuronal ferroptosis protects hemorrhagic brain,” *JCI*

Insight, vol. 2, no. 7, p. e90777, 06 2017, doi: 10.1172/jci.insight.90777.

[236] Q.-Z. Tuo *et al.*, "Tau-mediated iron export prevents ferroptotic damage after ischemic stroke," *Mol. Psychiatry*, vol. 22, no. 11, pp. 1520–1530, 2017, doi: 10.1038/mp.2017.171.

[237] S. Tang and X. Xiao, "Ferroptosis and kidney diseases," *Int. Urol. Nephrol.*, vol. 52, no. 3, pp. 497–503, Mar. 2020, doi: 10.1007/s11255-019-02335-7.

[238] S. Ma *et al.*, "Ferroptosis and autophagy induced cell death occur independently after siramesine and lapatinib treatment in breast cancer cells," *PLoS One*, vol. 12, no. 8, p. e0182921, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0182921.

[239] Y. Kinowaki *et al.*, "Glutathione peroxidase 4 overexpression inhibits ROS-induced cell death in diffuse large B-cell lymphoma," *Lab. Invest. J. Tech. Methods Pathol.*, vol. 98, no. 5, pp. 609–619, 2018, doi: 10.1038/s41374-017-0008-1.

[240] C. Ronco, R. Bellomo, and J. A. Kellum, "Acute kidney injury," *The Lancet*, vol. 394, no. 10212, pp. 1949–1964, Nov. 2019, doi: 10.1016/S0140-6736(19)32563-2.

[241] M. T. James, M. Bhatt, N. Pannu, and M. Tonelli, "Long-term outcomes of acute kidney injury and strategies for improved care," *Nat. Rev. Nephrol.*, vol. 16, no. 4, pp. 193–205, Apr. 2020, doi: 10.1038/s41581-019-0247-z.

[242] D. Martin-Sanchez *et al.*, "Ferroptosis, but Not Necroptosis, Is Important in Nephrotoxic Folic Acid-Induced AKI," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 28, no. 1, pp. 218–229, 2017, doi: 10.1681/ASN.2015121376.

[243] J. P. Ward, "Determination of the Optimum Temperature for Regional Renal Hypothermia during Temporary Renal Ischaemia," *Br. J. Urol.*, vol. 47, no. 1, pp. 17–24, Feb. 1975, doi: 10.1111/j.1464-410X.1975.tb03913.x.

[244] Nguyen Mike M. and Gill Inderbir S., "Halving Ischemia Time During Laparoscopic Partial Nephrectomy," *J. Urol.*, vol. 179, no. 2, pp. 627–632, Feb. 2008, doi: 10.1016/j.juro.2007.09.086.

[245] D. J. Parekh *et al.*, "Tolerance of the human kidney to isolated controlled ischemia," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 24, no. 3, pp. 506–517, Feb. 2013, doi: 10.1681/ASN.2012080786.

- [246] G. J. S. Kallingal, J. M. Weinberg, I. M. Reis, A. Nehra, M. A. Venkatachalam, and D. J. Parekh, "Long-term response to renal ischaemia in the human kidney after partial nephrectomy: results from a prospective clinical trial," *BJU Int.*, vol. 117, no. 5, pp. 766–774, May 2016, doi: 10.1111/bju.13192.
- [247] S. B. Bhayani *et al.*, "Laparoscopic partial nephrectomy: effect of warm ischemia on serum creatinine," *J. Urol.*, vol. 172, no. 4 Part 1, pp. 1264–1266, Oct. 2004, doi: 10.1097/01.ju.0000138187.56050.20.
- [248] R. H. Thompson *et al.*, "Every minute counts when the renal hilum is clamped during partial nephrectomy," *Eur. Urol.*, vol. 58, no. 3, pp. 340–345, Sep. 2010, doi: 10.1016/j.eururo.2010.05.047.
- [249] B. Glaumann, H. Glaumann, I. K. Berezsky, and B. F. Trump, "Studies on the pathogenesis of ischemic cell injury. II. Morphological changes of the pars convoluta (P1 and P2) of the proximal tubule of the rat kidney made ischemic in vivo," *Virchows Arch. B Cell Pathol.*, vol. 19, no. 4, pp. 281–302, Dec. 1975.
- [250] D. E. Soranno *et al.*, "Matching Human Unilateral AKI, a Reverse Translational Approach to Investigate Kidney Recovery after Ischemia," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 30, no. 6, pp. 990–1005, Jun. 2019, doi: 10.1681/ASN.2018080808.
- [251] L. Marconi, M. M. Desai, V. Ficarra, F. Porpiglia, and H. Van Poppel, "Renal Preservation and Partial Nephrectomy: Patient and Surgical Factors," *Eur. Urol. Focus*, vol. 2, no. 6, pp. 589–600, Dec. 2016, doi: 10.1016/j.euf.2017.02.012.
- [252] P. C. Sprenkle *et al.*, "Urine Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (uNGAL) as a Marker for Acute Kidney Injury in Kidney Surgery Patients," *J. Urol.*, vol. 190, no. 1, pp. 159–164, Jul. 2013, doi: 10.1016/j.juro.2013.01.101.
- [253] C. Akpınar *et al.*, "The evaluation of acute kidney injury due to ischemia by urinary neutrophil gelatinase-induced lipocalin (uNGAL) measurement in patients who underwent partial nephrectomy," *Int. Urol. Nephrol.*, vol. 53, no. 3, pp. 393–400, Mar. 2021, doi: 10.1007/s11255-020-02660-2.
- [254] K. C. Koo *et al.*, "Accuracy of Urinary Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin in Quantifying Acute Kidney Injury after Partial Nephrectomy in Patients with Normal Contralateral Kidney," *PLOS ONE*, vol. 10, no. 7, p. e0133675, Jul. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0133675.

- [255] C. Ponticelli, "Ischaemia-reperfusion injury: a major protagonist in kidney transplantation," *Nephrol. Dial. Transplant.*, vol. 29, no. 6, pp. 1134–1140, Jun. 2014, doi: 10.1093/ndt/gft488.
- [256] L. R. Requião-Moura, M. de S. Durão Junior, A. C. C. de Matos, and A. Pacheco-Silva, "Ischemia and reperfusion injury in renal transplantation: hemodynamic and immunological paradigms," *Einstein São Paulo*, vol. 13, no. 1, pp. 129–135, Mar. 2015, doi: 10.1590/S1679-45082015RW3161.
- [257] K. Jin and N. D. Vaziri, "Elevated Plasma Cyclophilin A in Hemodialysis and Peritoneal Dialysis Patients," *Iran J. Kidney Dis.*, vol. 11, no. 1, pp. 44–49, 2017.
- [258] C. R. Parikh *et al.*, "Urine NGAL and IL-18 are predictive biomarkers for delayed graft function following kidney transplantation," *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.*, vol. 6, no. 7, pp. 1639–1645, Jul. 2006, doi: 10.1111/j.1600-6143.2006.01352.x.
- [259] I. E. Hall *et al.*, "IL-18 and urinary NGAL predict dialysis and graft recovery after kidney transplantation," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 21, no. 1, pp. 189–197, Jan. 2010, doi: 10.1681/ASN.2009030264.
- [260] N. Heyne, S. Kemmner, C. Schneider, S. Nadalin, A. Königsrainer, and H.-U. Häring, "Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin accurately detects acute allograft rejection among other causes of acute kidney injury in renal allograft recipients," *Transplantation*, vol. 93, no. 12, pp. 1252–1257, Jun. 2012, doi: 10.1097/TP.0b013e31824fd892.
- [261] E. Castillo-Rodriguez *et al.*, "Kidney Injury Marker 1 and Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin in Chronic Kidney Disease," *Nephron*, vol. 136, no. 4, pp. 263–267, 2017, doi: 10.1159/000447649.
- [262] A. Wonnacott, S. Meran, B. Amphlett, B. Talabani, and A. Phillips, "Epidemiology and Outcomes in Community-Acquired Versus Hospital-Acquired AKI," *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 9, no. 6, pp. 1007–1014, Jun. 2014, doi: 10.2215/CJN.07920713.
- [263] M. Bukrinsky, "Extracellular cyclophilins in health and disease," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1850, no. 10, pp. 2087–2095, Oct. 2015, doi: 10.1016/j.bbagen.2014.11.013.
- [264] K. G. Leong *et al.*, "Cyclophilin Inhibition Protects Against Experimental Acute Kidney Injury and Renal Interstitial Fibrosis," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 1, Dec. 2020, doi:

10.3390/ijms22010271.

[265] K. G. Leong, E. Ozols, J. Kanellis, D. J. Nikolic-Paterson, and F. Y. Ma, "Cyclophilin A Promotes Inflammation in Acute Kidney Injury but Not in Renal Fibrosis," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 10, p. 3667, May 2020, doi: 10.3390/ijms21103667.

[266] N. Kato *et al.*, "The E-Selectin Ligand Basigin/CD147 Is Responsible for Neutrophil Recruitment in Renal Ischemia/Reperfusion," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 20, no. 7, pp. 1565–1576, Jul. 2009, doi: 10.1681/ASN.2008090957.

[267] M. Haase, R. Bellomo, P. Devarajan, P. Schlattmann, A. Haase-Fielitz, and NGAL Meta-analysis Investigator Group, "Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis," *Am. J. Kidney Dis.*, vol. 54, no. 6, pp. 1012–1024, Dec. 2009, doi: 10.1053/j.ajkd.2009.07.020.

[268] S. G. Coca *et al.*, "Urinary Biomarkers of AKI and Mortality 3 Years after Cardiac Surgery," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 25, no. 5, pp. 1063–1071, May 2014, doi: 10.1681/ASN.2013070742.

Anexos

ANEXO I: AUTORIZACIÓN COMITÉS INVESTIGACIÓN CLÍNICA



INFORME DEL COMITE DE ÉTICA DE LA INVESTIGACION

Dra. Lucía Llanos Jiménez, Secretaria Técnica del COMITE DE ÉTICA DE LA INVESTIGACION DE LA FUNDACION JIMENEZ DIAZ

CERTIFICA:

Que en las reuniones del CEIm-FJD que tuvieron lugar el 15 de Diciembre de 2020 (acta nº 22/20) y 16 de Enero de 2021 (01/21) se evaluó el estudio referido y, ha decidido, una vez aceptadas las respuestas a las aclaraciones solicitadas:

A P R O B A R

La propuesta para que se realice el estudio titulado **“Determinación de biomarcadores de daño renal mediante ELISA, Western blot o proteómica en muestras de orina de pacientes que se someten a nefrectomía parcial o trasplante de vivo”**. Versión 3 de 17/02/2021

1. En dicha reunión se cumplieron los requisitos establecidos en la legislación vigente –Real decreto 1090/2015 y Decreto 39/94 de la CAM– para que la decisión del citado CEIm sea válida.
2. El Estudio reúne las normas éticas estándar de nuestra Institución para la realización de este tipo de estudios.
3. Se cumplen los preceptos éticos formulados en la Orden SAS 3470/2009 y la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica mundial sobre principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos y en sus posteriores revisiones, así como aquellos exigidos por la normativa aplicable en función de las características del estudio.
4. El CEImFJD, tanto en su composición como en sus procedimientos, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y con la legislación vigente que regula su funcionamiento, y que la composición del CEIm FJD es la indicada en el anexo I, teniendo en cuenta que en el caso de que algún miembro participe en el estudio o declare algún conflicto de interés no habrá participado en la evaluación ni en el dictamen.
5. Asimismo, hacemos constar que no existe contraprestación económica para el centro y los investigadores.
6. Además, este comité recuerda la obligación de realizar el seguimiento del estudio de acuerdo a la legislación vigente.

Lo que firmo en Madrid a 22 de febrero de 2021



Dra. Lucía Llanos Jiménez
Secretaria Técnica CEImFJD



EO233-20_FJD

C/ Isaac Peral, 42 Oficinas, . Oficina 1. 28015-Madrid
Teléfono: 91 5443720 - e-mail: ceic@fjd.es

Autorización Comité Ético de Investigación clínica. Hospital Universitario Fundación Jiménez
Díaz. Madrid. Nivel I: pacientes sometidos a agresión quirúrgica renal.



FUNDACIÓN MARQUÉS DE VALDECILLA
IFIMAV



M^a Blanca Sánchez Santiago, Secretaria del **COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DE CANTABRIA**

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta del Investigador Principal del estudio:

TÍTULO: Análisis de Expresión Génica de Biomarcadores diagnósticos y pronósticos de la insuficiencia renal aguda

Proyecto de Investigación (FIS)

y considera que:

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, teniendo en cuenta los beneficios esperados.
- Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado
- La capacidad del investigador y sus colaboradores, y las instalaciones y medios disponibles, tal y como ha sido informado, son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Este CEIC, resuelve **AUTORIZAR** que dicho estudio sea realizado en el HUMV, actuando como investigadora principal la Dr. José Antonio Arias Rodríguez

Lo que firmo en Santander, a 16 de Abril de 2010


M^a Blanca Sánchez Santiago
Secretaria del CEIC



Escuela Universitaria de Enfermería, 5ª Planta · Avda. Valdecilla, s/n · 39008 SANTANDER (Cantabria)
Tfno.: 942 331 077 · Fax: 942 344 000 · e-mail: fmdv@fmdv.org · http://www.fmdv.org

ANEXO II: CONSENTIMIENTOS INFORMADOS

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA NEFRECTOMÍA PARCIAL LAPAROSCÓPICA

D./dña: _____ con DNI/Nº _____

D./dña: _____ con DNI/Nº _____

En calidad de _____ de _____

DECLARO

Que el Doctor/a Don/Doña: _____ me ha explicado que es conveniente proceder en mi situación a una NEFRECTOMÍA PARCIAL LAPAROSCÓPICA.

1.- Mediante este procedimiento se pretende la extirpación de la parte enferma del riñón.

El médico me ha explicado que la utilización de la laparoscopia persigue un menor dolor postoperatorio, una más rápida recuperación y menores lesiones cicatriciales. La realización del procedimiento puede ser filmada con fines científicos o didácticos.

2.- El médico me ha explicado que el procedimiento es una cirugía importante que requiere la administración de anestesia y que es posible que durante o después de la intervención sea necesaria la utilización de sangre y/o hemoderivados, de cuyos riesgos me informarán los servicios de anestesia y hematología.

3.- Mediante esta técnica se extirpa parcialmente el riñón enfermo a través de pequeños orificios por los cuales se introduce una pequeña cámara endoscópica, así como instrumentos de corte y coagulación, todo ello bajo anestesia general, provocando la insuflación abdominal mediante la introducción de CO₂ en el peritoneo o en el retroperitoneo.

En la llamada "cirugía laparoscópica ayudada por la mano" uno de los orificios de entrada se amplía hasta un diámetro suficiente para que el cirujano pueda introducir una mano dentro de la cavidad abdominal para facilitar la disección y posterior extracción de lesiones tumorales o de mayor tamaño.

4.- Comprendo que a pesar de la adecuada elección de la técnica y de su correcta realización pueden presentarse efectos indeseables, tanto los comunes derivados de toda intervención y que pueden afectar a todos los órganos y sistemas, como otros específicos del procedimiento como no conseguir la extirpación parcial del riñón por esta vía y tener que realizar una cirugía convencional; la persistencia de la sintomatología previa total o parcialmente; infección urinaria por sondaje vesical; hemorragias incoercibles tanto durante el acto quirúrgico como en el postoperatorio cuyas consecuencias son muy diversas dependiendo del tipo de tratamiento que haya de necesitarse, oscilando desde una mínima gravedad hasta la posibilidad cierta de muerte, bien por efecto del sangrado o por efecto secundario de los tratamientos empleados; lesiones de vísceras adyacentes (intestino, bazo, hígado, etc.) con las mismas consecuencias de la complicación hemorrágica, así como peritonitis, shock séptico y posible muerte; complicaciones secundarias a la apertura del tórax, como neumonía, hemotórax, hernia diafragmática, pitorax e infección masiva de la cavidad torácica, parálisis diafragmática e insuficiencia respiratoria; complicaciones derivadas de las heridas quirúrgicas, infección, dehiscencia de suturas, herniación de un asa intestinal por algún orificio, fistula, defecto estético por deficiente cicatrización, intolerancia al material de sutura, dolores persistentes en alguna de las cicatrices; enfisema subcutáneo o paso del CO₂ al tejido celular subcutáneo.

El médico me ha explicado que estas complicaciones habitualmente se resuelven con tratamiento médico (medicamentos, sueros...) pero pueden llegar a requerir una reintervención, generalmente de urgencia, incluyendo un riesgo de mortalidad.

5.- El médico me ha explicado que para la realización de esta técnica puede ser necesaria una preparación previa, en ocasiones con peculiaridades como _____

_____ aunque puede ser posible su realización sin una preparación completa.

También me ha explicado la necesidad de advertir de mis posibles alergias medicamentosas, alteraciones de la coagulación, enfermedades cardiopulmonares, existencia de prótesis, marcapasos, medicaciones actuales o cualquier otra circunstancia.

Por mi situación actual (diabetes, obesidad, hipertensión, anemia, edad avanzada...) puede aumentar la frecuencia o la gravedad de riesgos o complicaciones como: _____

6.- El médico me ha explicado que otra alternativa es, aparte de la abstención terapéutica, la cirugía convencional, pero que en mi caso la mejor alternativa es la nefrectomía parcial laparoscópica.

He comprendido las explicaciones que se me han facilitado en un lenguaje claro y sencillo, y el facultativo que me ha atendido me ha permitido realizar todas las observaciones y me ha aclarado todas las dudas que le he planteado.

También comprendo que, en cualquier momento y sin necesidad de dar ninguna explicación, puedo revocar el consentimiento que ahora presto.

Por ello, manifiesto que estoy satisfecho con la información recibida y que comprendo el alcance y los riesgos del tratamiento.

Y en tales condiciones:

CONSENTIMIENTO

Que se me realice la NEFRECTOMÍA PARCIAL LAPAROSCÓPICA.

En _____ a _____ de _____ de _____

Fdo: El/a Médico Fdo: El Paciente Fdo: El representante legal, familiar o allegado

REVOCACIÓN

Don/Doña _____ con D.N.I. nº _____

Don/Doña _____ con D.N.I. nº _____

en calidad de _____ de _____

REVOCO el consentimiento prestado en fecha _____, y no deseo proseguir el tratamiento, que doy con esta fecha por finalizado.

En _____ (Lugar y fecha)

Fdo: El/a Médico Fdo: El Paciente Fdo: El representante legal, familiar o allegado

Consentimiento Informado. Cirugía: Nefrectomía parcial laparoscópica

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA NEFRECTOMÍA DE DONANTE VIVO PARA TRASPLANTE RENAL

Nº Historia: _____
D./Doña.: _____ Edad _____
Con domicilio: _____

DECLARO

Que el Doctor/a _____ me ha explicado que es conveniente proceder en mi situación a una NEFRECTOMÍA DE DONANTE VIVO PARA TRASPLANTE RENAL.

1.- **Objetivo:** Mediante esta intervención se realiza la extracción de un riñón sano de un donante vivo voluntario. Con este procedimiento se pretende conseguir un riñón para implantárselo a un paciente con insuficiencia renal crónica, para mejorar su calidad de vida y su supervivencia. Aunque el trasplante es la mejor opción para el receptor, la donación renal no garantiza el funcionamiento correcto del injerto, ya sea por problemas relacionados con la técnica quirúrgica, por episodios de rechazo agudo o crónico o por la posibilidad de que reaparezca la enfermedad que inicialmente causó la insuficiencia renal en el receptor y que podría también afectar al riñón trasplantado.

La realización del procedimiento puede ser filmada con fines científicos o didácticos

2.- El médico me ha explicado que el procedimiento requiere la administración de anestesia y que es posible que durante o después de la intervención sea necesaria la utilización de sangre y/o hemoderivados, de cuyos riesgos me informarán los servicios de anestesia y hematología.

3.- **Beneficios y Técnica Quirúrgica:** En primer lugar, la persona que desea donar un riñón debe someterse inicialmente a una serie de estudios para saber si puede donar ese órgano. Estas pruebas consisten en diversos análisis de sangre, electrocardiograma, radiografías, ecografías y, a veces, pruebas con contraste algunas de las cuales pueden implicar algún riesgo para el donante.

Una vez estudiado el caso en su conjunto, será analizado por el Comité de ética del Hospital y la Dirección del Centro deberá autorizar este procedimiento emitiendo el correspondiente informe que junto con la documentación requerida será remitida al juez del registro civil para su aprobación.

La intervención consiste en la extracción de uno de los dos riñones del donante junto con el uréter. Esta intervención se realiza mediante una incisión quirúrgica que identificará el riñón seleccionado, seccionando uréter, arteria y venas renales para su posterior extracción por la misma incisión efectuada previamente.

Sé que, durante el acto quirúrgico a la vista de los hallazgos, el cirujano puede tomar la decisión de no realizarla por dificultades técnicas o por considerar el riñón no apto para trasplante.

4.- **Riesgos:** Cualquier actuación médica tiene riesgos. La mayor parte de las veces los riesgos no se materializan, y la intervención no produce daños o efectos indeseables. Pero es importante que usted conozca los riesgos que pueden aparecer en este proceso o intervención y en un futuro. El disponer de un solo riñón no es un factor determinante de aparición de insuficiencia renal clínicamente significativa en un futuro. Sin embargo, determinadas enfermedades, como la diabetes, la hipertensión arterial mal controladas que aparezcan o se agraven posteriormente a la cirugía podrían afectar de forma importante a la función renal. Por otro lado la aparición de tumores, litiasis o el hecho de sufrir un traumatismo abdominal con compromiso renal tendrán consecuencia más graves al don disponer del riñón contralateral para suplir la función del riñón en caso de enfermar. Comprendo que a pesar de la adecuada elección de la técnica y de su correcta realización pueden presentarse efectos indeseables, tanto los comunes derivados de toda intervención y que pueden afectar a todos los órganos y sistemas, como otros específicos del procedimiento como son:

- Sangrado intraoperatorio.
- Complicaciones abdominales derivadas de la movilización intestinal (parálisis intestinal pasajera o persistente, obstrucción intestinal, lesión eléctrica de un asa de intestino delgado o del grueso que pueden

manifestarse inmediata o tardíamente según la intensidad de la lesión que precise la práctica de intervenciones con resultados imprevisibles, peritonitis o infección de la cavidad intestinal).

- Complicaciones derivadas de las heridas quirúrgicas, tales como infección, dehiscencia de suturas, herniación de un asa intestinal, fistula, defecto estético por deficiente cicatrización, intolerancia al material de sutura y dolores persistentes en alguna de las cicatrices.
- Trombo embolismo venoso profundo o pulmonar.
- Infecciones de orina en relación con la sonda vesical que se coloca de forma temporal en el quirófano para controlar la diuresis en el postoperatorio inmediato.
- Siendo muy poco frecuente existe el riesgo de que durante el procedimiento quirúrgico de la extracción del riñón este sea lesionado en diversos grados. Según el grado de la lesión se procederá a evaluar a criterio del equipo médico la idoneidad de continuar con el proceso de extracción y/o trasplante, reparando o desechando el riñón si la lesión pudiera comprometer la viabilidad del órgano, la salud del donante o el éxito del trasplante.

El médico me ha explicado que estas complicaciones habitualmente se resuelven con tratamiento médico (medicamentos, sueros...) pero pueden llegar a requerir una reintervención, generalmente de urgencia, incluyendo un riesgo de mortalidad.

Riesgos más frecuentes: Infecciones de heridas quirúrgicas.

Riesgos más graves: Sangrado intraoperatorio, que pueden obligar a reintervenir para solucionar la hemorragia. Lesiones de intestino delgado o grueso, que inevitablemente necesitarán intervención quirúrgica urgente o diferida. Trombo-embolismos venosos.

5.- El médico me ha explicado que para la realización de esta técnica puede ser necesaria una preparación previa, en ocasiones con peculiaridades, aunque puede ser posible su realización sin una preparación completa.

También me ha explicado la necesidad de advertir de mis posibles alergias medicamentosas, alteraciones de la coagulación, enfermedades cardiopulmonares, existencia de prótesis, marcapasos, medicaciones actuales o cualquier otra circunstancia.

Por mi situación actual (diabetes, obesidad, hipertensión, anemia, edad avanzada...) puede aumentar la frecuencia o la gravedad de riesgos o complicaciones, por lo que se evaluará cada caso de forma independiente antes de tener el visto bueno para la donación.

El Paciente expuesto a esta intervención, sobre la base de sus circunstancias y antecedentes personales que se conocen: NO presenta riesgos sobreañadidos en la realización de la misma.

SI presenta riesgos sobreañadidos, consistiendo en _____

Contraindicaciones si las hubiera: _____

6.- **Alternativas razonables a este procedimiento:** El receptor puede incluirse en lista de espera para el trasplante renal de cadáver, alternativa válida y que evitaría la necesidad de su donación y, por lo tanto, de la intervención quirúrgica a la que se ha de someterse y de sus posibles complicaciones. Sin embargo, en este caso, usted, su nefrólogo y su urólogo, han decidido que mejor alternativa es la donación y la realización de la NEFRECTOMÍA DE DONANTE VIVO PARA TRASPLANTE RENAL.

He comprendido las explicaciones que se me han facilitado en un lenguaje claro y sencillo, y el facultativo que me ha atendido me ha permitido realizar todas las observaciones y me ha aclarado todas las dudas que le he planteado.

También comprendo que, en cualquier momento y sin necesidad de dar ninguna explicación, puedo revocar el consentimiento que ahora presto.

Por ello, manifiesto que estoy satisfecho con la información recibida y que comprendo el alcance y los riesgos del tratamiento.

Y en tales condiciones

CONSENTIO

Que se me realice la NEFRECTOMÍA DE DONANTE VIVO PARA TRASPLANTE RENAL.

En Lugar y fecha: _____

Fdo: El/la Médico

Fdo: El Paciente

Fdo: El representante legal, familiar o allegado

RENUNCIA AL DERECHO DE INFORMACIÓN

Manifiesto que por razones personales, renuncio al derecho de información que me corresponde como paciente y expreso mi deseo de **no recibir información**, en el momento actual, sobre el proceso de mi enfermedad sin que ello implique que no pueda dar mi consentimiento para someterme a la realización de esta intervención, tal como he prestado y firmado en el apartado anterior.

En Lugar y fecha _____

Fdo.: El/La Paciente

REVOCACIÓN

Don/Doña: _____ de _____ años de edad,

con domicilio en: _____ y D.N.I. nº: _____

Don/Doña: _____ de _____ años de edad,

con domicilio en: _____ y D.N.I. nº: _____

en calidad de Representante legal, familiar o allegado de: _____, y no deseo proseguir el tratamiento, que doy con esta fecha por finalizado.

REVOCO el consentimiento prestado en fecha: _____, y no deseo proseguir el tratamiento, que doy con esta fecha por finalizado.

En Lugar y fecha _____

Fdo: El/la Médico

Fdo: El Paciente

Fdo: El representante legal, familiar o allegado

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA TRASPLANTE RENAL

D./ña.: con DNI nº

D./ña.: con DNI nº
En calidad de de

DECLARO

Que el Doctor/a Don/Doña: me ha explicado que es conveniente proceder en mi situación a un TRASPLANTE RENAL.

1.- Mediante este procedimiento se pretende mejorar mi calidad de vida eliminando las restricciones en la movilidad de las juntas de diálisis, mejorar la rehabilitación y procurando menor ansiedad y un menor grado de depresión en aquellos pacientes que han sido tratados con hemodíalisis.

La realización del procedimiento puede ser filmada con fines científicos o didácticos.

2.- El médico me ha explicado que el procedimiento requiere la administración de anestesia y que es posible que durante o después de la intervención sea necesaria la utilización de sangre y/o hemoderivados, de cuyos riesgos me informarán los servicios de anestesia y hematología.

3.- Mediante esta técnica se implanta un riñón, generalmente de cadáver, aunque en algunas ocasiones es de un familiar en primer grado, para que supla las funciones de los riñones propios enfermos. La intervención se realiza con anestesia general y mediante una incisión en el abdomen. Generalmente se sitúa retroperitoneal e implantando los vasos del riñón a los vasos ilíacos del paciente, llevando el uréter a la vejiga.

El médico me ha explicado que he sido seleccionado como receptor en el trasplante tras un proceso complejo en el que se han tenido en cuenta varios factores y se han hecho estudios tanto inmunológicos como no inmunológicos (grupo sanguíneo, compatibilidad HLA, compatibilidades con el donante de trasplantes previos, prueba cruzada, presencia de anticuerpos citotóxicos, mi edad y peso y la edad y el peso del donante, el tiempo de diálisis y la patología asociada).

El médico me ha advertido que durante el postoperatorio inmediato puedo tener que llevar un drenaje cercano a la herida y una sonda vesical, durante varios días y que también en el postoperatorio inmediato el riñón trasplantado puede iniciar la producción de orina, o tardar varios días, incluso semanas, o en determinados casos no hacerlo nunca por problemas asociados.

4.- Comprendo que a pesar de la adecuada elección de la técnica y de su correcta realización pueden presentarse efectos indeseables, tanto los comunes derivados de toda intervención y que pueden afectar a todos los órganos y sistemas, como otros específicos del procedimiento como no conseguir la realización del implante renal por problemas técnicos durante la intervención; complicaciones alérgicas a los medicamentos que puedo precisar durante la intervención o en el postoperatorio, el curso de las cuales es impredecible; hemorragia incoercible, tanto durante el acto quirúrgico como en el postoperatorio cuyas consecuencias son muy diversas dependiendo del tipo de tratamiento que haya de necesitarse, oscilando desde una gravedad mínima hasta la posibilidad cierta de muerte, como consecuencia directa del sangrado o por efectos secundarios de los tratamientos empleados; complicaciones abdominales como consecuencia de la apertura del abdomen (parálisis intestinal pasajera o persistente, perforación intestinal, obstrucción intestinal que precise la práctica de intervenciones con resultados imprevisibles, peritonitis o infección de la cavidad intestinal) con resultados imprevisibles; problemas y complicaciones derivadas de la herida quirúrgica (infección con diferente gravedad, dehiscencia de sutura -agujetas-, salida del paquete intestinal, eversión (herida de la herida) que pueden requerir nuevas intervenciones, fistulas permanentes o temporales, defectos estéticos derivados de algunas de las complicaciones anteriores o

procesos cicatriciales anormales, intolerancia a los materiales de sutura que puede llegar incluso a la necesidad de reintervención para su extracción, neuralgias -dolores nerviosos-, hiperestesia -aumento de la sensibilidad- o hipoestesia -disminución de la sensibilidad-; impotencia coeundi (imposibilidad física de erección penénea); retención urinaria, en algún caso, ya sea transitoria o permanente; problemas derivados de la linfadenopatía (lesiones vasculares severas de las arterias aorta, ilíacas, hipogástricas, lesiones venosas de las venas cava e ilíacas que pueden dar lugar a consecuencias imprevisibles, incluso la muerte, lesiones uretrales, lesión nerviosa, fibrosis reactiva y estenosis del uréter y de los vasos tanto arteriales como venosos a largo plazo, linfocel, que requiere frecuentemente la realización de manipulaciones posteriores e incluso nueva intervención quirúrgica; infección urinaria, neumonía por distintos microorganismos de gravedad variable, pero a veces intensa, por las características del paciente (inmunosupresión); complicaciones vasculares (trombosis de vasos renales, estenosis de la arteria renal, estenosis y/o trombosis de la arteria ilíaca con efectos secundarios sobre las piernas); complicaciones urológicas (hematuria -orina en sangre-, fistulas urinarias -fuga de orina-, obstrucción a cualquier nivel del tracto urinario); estas complicaciones pueden poner en peligro la funcionalidad del riñón, haciendo necesarias otras intervenciones para su solución, pudiendo ser necesario, incluso extirpar dicho riñón; tromboembolismos venosos profundos o pulmonares cuya gravedad depende de la intensidad del proceso; hemorragias digestivas que son infrecuentes pero presentes aunque se tomen medidas profilácticas y cuya gravedad depende de su intensidad.

El médico me ha explicado que estas complicaciones habitualmente se resuelven con tratamiento médico (medicamentos, sueros...) pero pueden llegar a requerir una reintervención, generalmente de urgencia, incluyendo un riesgo de mortalidad.

Además de estas complicaciones, el médico me ha informado que en el trasplante puede aparecer otra:

Transmitidas por el riñón trasplantado: Aunque al cadáver, antes y durante la intervención de extracción de los órganos, se le hacen los estudios necesarios para confirmar la normalidad del riñón y evitar la transmisión de enfermedades, existe la posibilidad remota de que no fuese detectado previamente algún tipo de infección o tumor y se transmitiera al receptor. Esta posibilidad obliga a diversas actuaciones posteriores.

Isquémicas (necrosis tubular aguda): Es una complicación que se caracteriza por la ausencia de función renal inmediata (el riñón trasplantado no produce orina) o si existe es insuficiente, obligando a realizar al paciente trasplante diálisis durante un periodo variable de tiempo.

Inmunológicas (rechazo): El rechazo agudo es la causa más frecuente de pérdida del injerto en el periodo inicial del trasplante, mientras que a largo plazo es la nefropatía crónica del injerto (rechazo crónico). El rechazo se puede presentar durante o inmediatamente tras el implante, en las primeras semanas a lo largo de toda evolución y varía en intensidad. El diagnóstico del mismo puede llevar consigo la realización de biopsias renales. Pese a los tratamientos inmunosupresores, el riñón puede no mejorar perdiendo la función, precisando la reinclusión en diálisis. En algunas ocasiones, previamente es preciso realizar la extirpación del riñón.

Infecciosas: En el paciente trasplantado son habituales las infecciones por gérmenes oportunistas y más frecuentes las infecciones por gérmenes habituales.

Hepáticas: Las enfermedades del hígado constituyen una de las complicaciones más frecuentes en el trasplante renal. Puede ser hepatopatía aguda, crónica, por toxicidad de medicación inmunosupresora (azatioprina, ciclosporina) y tumores.

Gastrointestinales: Úlcera gastroduodenal, pancreatitis, colicistitis, las diverticulitis y perforación de colon.

Cardiovasculares: Incluyendo el infarto de miocardio, la insuficiencia cardíaca y los accidentes cerebrovasculares, son los más frecuentes.

Hematológicas: La eritrocitosis (aumento de los hematíes) que puede obligar a realizar sangrías terapéuticas. Anemia, leucopenia (número bajo de leucocitos), plaquetopenia o trombocitopenia (número bajo de plaquetas) habitualmente secundario a infecciones (CMV) o por toxicidad de la medicación inmunosupresora. Síndrome hemolítico urémico (anemia, trombocitopenia y deterioro de la función renal).

Otras: Recidiva de glomerulonefritis, las más frecuentes son las glomerulonefritis membranoproliferativa y la esclerosante segmentaria y focal. Glomerulonefritis de novo. La más frecuente es la membranosa. La glomerulonefritis membranoproliferativa es la más habitual cuando aparece una glomerulonefritis en un paciente con virus de la hepatitis C. Hipertensión arterial. Es una de las complicaciones más frecuentes, pudiendo llegar hasta el 80% de los pacientes trasplantados. Hipercalcemia e hipertriglicéidemia (aumento del colesterol y de los triglicéridos). Se presentan en una frecuencia superior al 50%. Arteriosclerosis. La edad, el sexo (varón), la diabetes, el tabaco, la hipercolesterolemia, la hipertensión arterial y las altas dosis de corticoides son los factores que más contribuyen a la presencia de arteriosclerosis en los pacientes trasplantados. Complicaciones óseas. Hipercalcemia (calcio elevado), la necrosis aséptica de la cabeza de fémur y una mayor predisposición a las fracturas y lesiones en los tendones son complicaciones posibles en el paciente trasplantado. Tumores. Las posibilidades de presentar una tumoración maligna tras el trasplante renal y la inmunosupresión es superior a la presentada por la población general. Los cánceres de piel son los más frecuentes.

Medicación inmunosupresora: La indicación de la medicación inmunosupresora es la prevención del rechazo agudo. Entre la medicación inmunosupresora empleada en la actualidad se encuentran los corticoides, la azatioprina (Imurel®), la ciclosporina neoral (Sandimmun Neoral®), el tacrolimus (Prograf®), micofenolato mofetil (Cell Cept®), el basiliximab (Simlect®), los anticuerpos monoclonales (OKT3) y policlonales. En el diseño del protocolo inmunosupresor se tiene en cuenta las características del receptor y donante, la evolución clínica inicial y la evolución.

Estos medicamentos pueden conllevar efectos secundarios indeseables, entre los que cabe destacar:

Corticoides: Aumento de la susceptibilidad a las infecciones, obesidad, osteonecrosis aséptica, hiperglucemia, hipertensión arterial, dislipemia, úlcera péptica, labilidad emocional, hirsutismo (exceso de pelo) y facies cushingoides (redondez de la cara). A largo plazo suele aparecer miopatía, osteoporosis, arteriosclerosis, cataratas y atrofia cutánea.

Ciclosporina: Renales (nefrototoxicidad aguda y crónica, síndrome hemolítico-urémico, hipertensión, hipomagnesemia, acidosis metabólica hiperclorémica e hipertensión arterial, neurológicos (temblor, cefalea, parestias y crisis convulsivas), digestivos (hepatotoxicidad, colestasis, pancreatitis), metabólicos (hipercalcemia e hiperglucemia), dermatológicos (hipercitosis -aumento de vello- e hiperplasia gingival -aumento del tamaño de las encías-), tumores (los más frecuentes linfomas y sarcoma de Kaposi).

Azatioprina: Depresión de la médula ósea (leucopenia -leucocitos bajos-, trombopenia -plaquetas bajas-, anemia). Alteración de la función hepática con colostasis e ictericia (enfermedad veno-oclusiva hepática). Favorece las infecciones en general y en particular por virus (citomegalovirus, herpes simple, zóster), así como el aumento de tumores.

Tacrolimus: Son parecidos a los de la ciclosporina, destacando: la nefrototoxicidad, la intolerancia hidrocárbica (hiperglucemia y diabetes) y las alteraciones neurológicas.

Al igual que los otros inmunosupresores, los pacientes tratados con tacrolimus presentan mayor susceptibilidad a las infecciones al desarrollo de tumores.

Micofenolato mofetil: Alteraciones gastrointestinales: dolor abdominal, náuseas, vómitos, diarrea y, ocasionalmente, hemorragia digestiva; alteraciones hematológicas: leucopenia, anemia y trombopenia. Una mayor incidencia de infecciones, sepsis (generalmente vírica por CMV) y tumores que en la población general.

Anticuerpos policlonales: La mayoría de los efectos secundarios se deben a las proteínas heterólogas (proteínas de individuos de especie diferente) presentes en estas preparaciones o a un efecto inmunodepresor excesivo. Entre ellos destacan la fiebre, escalofríos, artalgias y, ocasionalmente, reacciones anafilácticas (hipotensión, distress respiratorio, dolor torácico, urticaria, púrpura), enfermedad del suero, trombopenia y leucopenia. Predisponen a la aparición de infecciones por gérmenes oportunistas y tumores. **Anticuerpos monoclonales:** Los efectos secundarios más característicos aparecen tras la administración de la primera dosis y se manifiestan con fiebre, escalofríos, dolores musculares y articulares, dolor de cabeza, náuseas, vómitos, dolor torácico y taquipnea (aumento de la respiración). Complicaciones pulmonares y cardíacas con edema agudo de pulmón, broncoespasmo (estrechamiento de los bronquios de forma generalizada) hiper e hipotensión arterial y trombosis. Reacciones en el SNC produciendo meningitis aséptica, convulsiones, encefalopatía y psicosis. Infecciones y tumores, que son

facilitados por la sobreinmunosupresión. Sensibilización (el OKT3 estimula la producción de anticuerpos anti-OKT3).

EL NO CUMPLIMIENTO del tratamiento inmunosupresor puede asociarse a la presencia de rechazo, pérdida de función del riñón y reinclusión en diálisis.

5.- El médico me ha explicado que para la realización de esta técnica puede ser necesaria una preparación previa, en ocasiones con peculiaridades como aunque puede ser posible su realización sin una preparación completa.

También me ha explicado la necesidad de advertir de mis posibles alergias medicamentosas, alteraciones de la coagulación, enfermedades cardiopulmonares, existencia de prótesis, marcapasos, medicaciones actuales o cualquier otra circunstancia.

Por mi situación actual (diabetes, obesidad, hipertensión, anemia, edad avanzada...) puede aumentar la frecuencia o la gravedad de riesgos o complicaciones como

6.- El médico me ha explicado que otras alternativas son la diálisis peritoneal y la hemodiálisis, pero que en mi caso la mejor alternativa terapéutica es el trasplante renal.

He comprendido las explicaciones que se me han facilitado en un lenguaje claro y sencillo, y el facultativo que me ha atendido me ha permitido realizar todas las observaciones y me ha aclarado todas las dudas que le he planteado.

También comprendo que, en cualquier momento y sin necesidad de dar ninguna explicación, puedo rescindir el consentimiento que ahora presto.

Por ello, manifiesto que estoy satisfecho con la información recibida y que comprendo el alcance y los riesgos del tratamiento.

Y en tales condiciones: **CONSENTIMIENTO**

Que se me realice el TRASPLANTE RENAL
En de de
Fdo: El/a Médico Fdo: El Paciente Fdo: El representante legal, familiar o allegado

REVOCACIÓN

Don/Doña con D.N.I. nº
Don/Doña con D.N.I. nº
en calidad de de

REVOCO el consentimiento prestado en fecha y no deseo proseguir el tratamiento, que doy con esta fecha por finalizado.

En (Lugar y fecha)
Fdo: El/a Médico Fdo: El Paciente Fdo: El representante legal, familiar o allegado

DOCUMENTO DE INFORMACIÓN AL DONANTE PARA LA DONACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS AL BIOBANCO DE LA FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ

Solicitamos su autorización para incorporar al Biobanco de la FJD el material biológico sobrante de las pruebas que, como parte del actual proceso asistencial, se le han realizado o se le van a realizar en este centro, con el fin de que puedan ser utilizadas en investigación biomédica.

Siguiendo lo establecido por la Ley 14/2007, de Investigación Biomédica, la Ley Orgánica 15/1999, de Protección de Datos Personales, y sus normas de desarrollo, le solicitamos que lea detenidamente este documento de información y el consentimiento informado que se le adjunta al final para su firma, si está de acuerdo en participar en esta propuesta.

¿Qué es un biobanco?: Institución para favorecer la investigación y la salud.

Un biobanco es una institución, regulada por leyes específicas, que facilita la investigación biomédica, es decir, aquella dirigida a promover la salud de las personas. El biobanco custodia muestras biológicas en las condiciones y garantías de calidad y seguridad que exige la legislación anteriormente referida y los códigos de conducta aprobados por los Comités de Ética. Las muestras incluidas en un biobanco pueden ser cedidas para investigación en Medicina, siempre bajo la supervisión de Comités de Ética y Científico. Las muestras se podrán ceder con información personal asociada siempre de forma codificada y preservando su identidad.

Muestras biológicas e información asociada: en ningún caso se le practicarán más pruebas de las imprescindibles para su adecuada atención médica.

Se guardará y dispondrá del material biológico sobrante que se le extraiga durante el proceso asistencial (muestras de sangre, líquidos biológicos y/o tejidos) sin que este hecho le cause molestias adicionales. La donación de muestras excedentes de este proceso asistencial no impedirá que usted o su familia puedan usarlas, cuando sea necesario por motivos de salud, siempre que estén disponibles. Las muestras y la información asociada a las mismas se custodiarán y/o guardarán en el Biobanco de la Fundación Jiménez Díaz (BFJD) hasta su extinción. Este biobanco es un establecimiento autorizado, sin ánimo de lucro, e inscrito en el Registro Nacional de Biobancos dependiente del Instituto de Salud Carlos III con la referencia B.0000647.

Protección de datos y confidencialidad: las muestras se conservarán codificadas.

Los datos personales que se recojan serán obtenidos, tratados y almacenados cumpliendo en todo momento el deber de secreto, de acuerdo con la legislación vigente en materia de protección de datos de carácter personal. La identificación de las muestras biológicas del Biobanco será sometida a un proceso de codificación. A cada muestra se le asigna un código de identificación, que será el utilizado por los investigadores y únicamente el personal autorizado por el biobanco podrá relacionar su identidad con los citados códigos. Sus muestras y los datos clínicos asociados a las mismas, pasarán a formar parte del fichero del Biobanco, inscrito en la Agencia de Protección de datos. La persona responsable de la custodia es el Director del Biobanco.

Destino y cesión de la muestra a proyectos de investigación:

Firmando el consentimiento, usted autoriza a que las muestras conservadas puedan ser cedidas para la realización de proyectos de investigación biomédica, también puede expresar aquellas excepciones, respecto al objetivo y métodos de las investigaciones, a las cuales no autoriza la cesión de sus muestras. Se le garantiza que la cesión a proyectos de investigación de sus muestras y datos asociados será evaluada y aprobada por el Comité de Ética de la FJD y el Comité Científico del BFJD, cumpliendo las exigencias ético-legales. En este caso, el BFJD únicamente transferirá a

DOCUMENTO DE INFORMACIÓN AL DONANTE PARA LA DONACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS AL BIOBANCO DE LA FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ

Solicitamos su autorización para incorporar al Biobanco de la FJD el material biológico sobrante de las pruebas que, como parte del actual proceso asistencial, se le han realizado o se le van a realizar en este centro, con el fin de que puedan ser utilizadas en investigación biomédica.

Siguiendo lo establecido por la Ley 14/2007, de Investigación Biomédica, la Ley Orgánica 15/1999, de Protección de Datos Personales, y sus normas de desarrollo, le solicitamos que lea detenidamente este documento de información y el consentimiento informado que se le adjunta al final para su firma, si está de acuerdo en participar en esta propuesta.

¿Qué es un biobanco?: Institución para favorecer la investigación y la salud.

Un biobanco es una institución, regulada por leyes específicas, que facilita la investigación biomédica, es decir, aquella dirigida a promover la salud de las personas. El biobanco custodia muestras biológicas en las condiciones y garantías de calidad y seguridad que exige la legislación anteriormente referida y los códigos de conducta aprobados por los Comités de Ética. Las muestras incluidas en un biobanco pueden ser cedidas para investigación en Medicina, siempre bajo la supervisión de Comités de Ética y Científico. Las muestras se podrán ceder con información personal asociada siempre de forma codificada y preservando su identidad.

Muestras biológicas e información asociada: en ningún caso se le practicarán más pruebas de las imprescindibles para su adecuada atención médica.

Se guardará y dispondrá del material biológico sobrante que se le extraiga durante el proceso asistencial (muestras de sangre, líquidos biológicos y/o tejidos) sin que este hecho le cause molestias adicionales. La donación de muestras excedentes de este proceso asistencial no impedirá que usted o su familia puedan usarlas, cuando sea necesario por motivos de salud, siempre que estén disponibles. Las muestras y la información asociada a las mismas se custodiarán y/o guardarán en el Biobanco de la Fundación Jiménez Díaz (BFJD) hasta su extinción. Este biobanco es un establecimiento autorizado, sin ánimo de lucro, e inscrito en el Registro Nacional de Biobancos dependiente del Instituto de Salud Carlos III con la referencia B.0000647.

Protección de datos y confidencialidad: las muestras se conservarán codificadas.

Los datos personales que se recojan serán obtenidos, tratados y almacenados cumpliendo en todo momento el deber de secreto, de acuerdo con la legislación vigente en materia de protección de datos de carácter personal. La identificación de las muestras biológicas del Biobanco será sometida a un proceso de codificación. A cada muestra se le asigna un código de identificación, que será el utilizado por los investigadores y únicamente el personal autorizado por el biobanco podrá relacionar su identidad con los citados códigos. Sus muestras y los datos clínicos asociados a las mismas, pasarán a formar parte del fichero del Biobanco, inscrito en la Agencia de Protección de datos. La persona responsable de la custodia es el Director del Biobanco.

Destino y cesión de la muestra a proyectos de investigación:

Firmando el consentimiento, usted autoriza a que las muestras conservadas puedan ser cedidas para la realización de proyectos de investigación biomédica, también puede expresar aquellas excepciones, respecto al objetivo y métodos de las investigaciones, a las cuales no autoriza la cesión de sus muestras. Se le garantiza que la cesión a proyectos de investigación de sus muestras y datos asociados será evaluada y aprobada por el Comité de Ética de la FJD y el Comité Científico del BFJD, cumpliendo las exigencias ético-legales. En este caso, el BFJD únicamente transferirá a

los investigadores la muestra y los datos asociados, incluidos los datos clínicos relevantes, de manera codificada.

Beneficios.

La donación de muestras para el BFJD es voluntaria y altruista y no representará ningún coste para usted. Las muestras recogidas no podrán ser objeto directo de actividades con ánimo de lucro. No habrá beneficios directos para usted como resultado de la investigación realizada con el material obtenido de la muestra ni le aportará información clínica. Un posible beneficio indirecto es que su participación puede ayudar a predecir qué futuros pacientes podrán responder favorablemente a los tratamientos o podrá ayudar a desarrollar métodos de diagnósticos temprano o nuevos tratamientos.

Participación voluntaria. Su negativa NO repercutirá en su asistencia médica, presente o futura
Su participación es totalmente voluntaria. Si firma el consentimiento informado, confirmará que desea participar. Puede negarse a participar o retirar su consentimiento en cualquier momento posterior a la firma sin tener que explicar los motivos y esto no repercutirá negativamente en su asistencia médica, presente o futura.

Revocación del consentimiento

Si en un futuro usted quisiera anular su consentimiento, sus muestras biológicas serían destruidas y los datos asociados a las mismas serían retirados del Biobanco. Si deseara anular su consentimiento, deberá solicitarlo por escrito al Director del Biobanco, en la dirección indicada a continuación.

Usted podrá ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación y objeción, así como obtener información sobre el uso de sus muestras y datos asociados, dirigiéndose a:

Biobanco de la Fundación Jiménez Díaz
Dirección Postal: Avda. Reyes Católicos nº2 28040
Tel.: 91 5504804
E-mail: biobancofjd@fjd.es

Por favor, pregunte al personal sanitario que le ha comunicado esta información sobre cualquier duda que pueda tener, ahora o en el futuro, en relación con este consentimiento. Asimismo, puede comentar sus dudas con su médico, quien le pondrá en contacto con el personal sanitario autorizado.

SENTIMIENTO INFORMADO PARA LA DONACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS AL BIOBANCO DE LA FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ

Copia para el interesado

Nombre y apellidos del donante.....
nº Historia.....
Persona del centro que informa.

Si ha comprendido la información que se le ha proporcionado, ha resuelto cualquier duda que pudiese tener y decide colaborar con el Biobanco de la Fundación Jiménez Díaz en los términos antes explicados, por favor, lea y firme a continuación.

El abajo firmante autoriza a la Fundación Jiménez Díaz a que el material biológico sobrante de las pruebas que se le han realizado o se le van a realizar como parte del actual proceso asistencial sean incorporadas al Biobanco de la Fundación Jiménez Díaz, y que sea cedido desde el mismo con la finalidad de llevar a cabo proyectos de investigación biomédica, siempre que éstos cuenten con la obligada aprobación del Comité de Ética de Investigación competente. Esta autorización la concede tras haber sido informado verbalmente y haber leído la información adjunta.

_____ Firma del Médico	_____ Nombre en mayúsculas	_____ Fecha
_____ Firma del Paciente	_____ Nombre en mayúsculas	_____ Fecha
_____ Firma del Testigo	_____ Nombre en mayúsculas	_____ Fecha

He expresado mi deseo de que se respeten las siguientes excepciones respecto al objetivo y métodos de las investigaciones:

.....
.....

HOJA DE INFORMACIÓN PARA EL POSIBLE PARTICIPANTE

Título: "Determinación de biomarcadores de daño renal mediante ELISA, Western Blot o proteómica en muestras de orina de pacientes que se someten a nefrectomía parcial o trasplante de vivo".

Objetivo y propósito del estudio: analizar la utilidad de diferentes biomarcadores en orina como indicadores de daño renal ante una agresión quirúrgica, por daño de isquemia-reperusión (daño derivado del cese temporal y posterior restauración del flujo sanguíneo) al parénquima renal.

Metodología: Se tomarán muestras de orina de dos grupos de pacientes:

- Sometidos a nefrectomía parcial laparoscópica como tratamiento de un tumor renal localizado
- Sometidos a un trasplante renal de donante vivo.

¿Qué tiene que realizar?: Este estudio no precisa ninguna acción por parte del paciente participante diferente a las realizadas en el proceso quirúrgico habitual de tratamiento.

- Antes de la cirugía:** se confirmará que usted cumple todos los criterios para poder participar y se le informará del estudio. Si está de acuerdo firmará los consentimientos informados.
- Durante el ingreso:** se realizará la cirugía según lo previsto por su urólogo, la participación en el estudio no supone alteración alguna de la indicación y procedimiento previsto según su situación clínica. Se tomarán muestras de orina de forma seriada, y las determinaciones analíticas sanguíneas serán las indicadas por su médico (el estudio no precisa ninguna determinación adicional).

Beneficios: no existen beneficios personales directos. La información recogida en el estudio ayudará a los médicos a conocer más sobre el daño renal causado por la agresión de isquemia-reperusión.

Acontecimientos adversos: al tratarse de un estudio observacional, no tendrá acontecimientos adversos, añadidos a su tratamiento o su enfermedad.

Tratamientos alternativos: puede no acceder a la intervención propuesta, u optar por otra técnica. Estas podrían ser la vigilancia expectante o la termoblación percutánea del tumor renal. O en el caso de la insuficiencia renal crónica, continuar en tratamiento sustitutivo de la función renal (hemodiálisis o diálisis peritoneal) u optar a un trasplante renal de donante cadáver.

Voluntariedad: su participación en este estudio depende enteramente de usted. Si es necesario puede consultar a sus familiares o conocidos acerca de este estudio.

CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE POR ESCRITO DE INCLUIÓN EN EL ESTUDIO

Título del estudio: "Determinación de biomarcadores de daño renal mediante ELISA, Western Blot o proteómica en muestras de orina de pacientes que se someten a nefrectomía parcial o trasplante de vivo".

Yo, _____, con DNI _____, declaro:

- El Dr. _____ me ha informado del presente estudio.
- Soy mayor de edad.
- He leído la hoja de información que se me ha entregado.
- He podido hacer preguntas sobre el estudio.
- He recibido respuestas satisfactorias a mis preguntas.
- He recibido suficiente información sobre el estudio.
- Comprendo que mi participación es voluntaria.
- Comprendo que puedo retirarme del estudio:
 - Cuando quiera.
 - Sin tener que dar explicaciones.
 - Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.
 - Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

En Madrid, a _____ de _____ de 201__

Nombre, firma y número de colegiado del médico investigador:	Firma del participante:	Firma del representante legal:
--	-------------------------	--------------------------------

Puede retirarse en cualquier momento sin que se altere la relación con su médico ni produzca perjuicio en su tratamiento.

Confidencialidad: todos los datos obtenidos sobre usted serán recogidos de forma anónima y tendrán acceso solo los médicos responsables del estudio. Los resultados obtenidos del análisis de estos datos podrán ser publicados en revistas nacionales e internacionales, congresos u otros métodos de divulgación científica. Se protegerá el derecho a la intimidad personal reconocido en la Constitución Española, en la Ley General de Sanidad; por ello, todas las partes implicadas en este estudio guardarán la más estricta confidencialidad de forma que no se viole la intimidad personal ni familiar de los sujetos participantes en el mismo (Ley Orgánica 15/1999). Asimismo, se tomarán las medidas apropiadas para evitar el acceso de personas no autorizadas a los datos del estudio. El tratamiento de los datos de carácter personal de los sujetos participantes en el estudio se ajustará a lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999, de Regulación del tratamiento y protección de los datos de carácter personal, en especial en lo que al consentimiento del afectado se refiere.

Investigador responsable del estudio: Ana Beién Sanz Bartolomé. En caso de duda podrá contactar a través del teléfono 915504800, extensión 2181.

Compensación económica en caso de daño o lesión: dado que este estudio es observacional, y no le va a producir daños o desviación de su proceso de tratamiento, no existe compensación económica.

Otros: será informado en todo momento si se dispone de nueva información que pueda ser relevante para la decisión del sujeto de continuar participando en el estudio.

Revocación de consentimiento

Don/Doña _____ con

DNI _____ revoco mi consentimiento prestado en Madrid, a ___/___/___

y no deseo proseguir en el estudio, que doy con esta fecha por finalizado.

En Madrid, a _____ de _____ de 201__

Nombre, firma y número de colegiado del médico investigador:	Firma del participante:	Firma del representante legal:
--	-------------------------	--------------------------------

CESIÓN DE DATOS DE CARÁCTER PERSONAL

Mediante este documento, autorizo al IIS-Fundación Jiménez Díaz, a ser depositario de mis datos personales y mi historial clínico electrónico de acuerdo con la Ley General de Protección de Datos Personales (Ley Orgánica 15/1999, 13 de Diciembre) y a su uso para el desarrollo del estudio **“Determinación de biomarcadores de daño renal mediante ELISA, Western Blot o proteómica en muestras de orina de pacientes que se someten a nefrectomía parcial o trasplante de vivo”**.

Don/Doña _____
con DNI _____ doy mi **consentimiento**.

En Madrid, a _____, de _____, de 201__

Nombre, firma y número de colegiado del médico investigador:	Firma del participante:	Firma del representante legal:
--	-------------------------	--------------------------------

Revocación de consentimiento

Don/Doña _____
con DNI _____ **revoco mi consentimiento** prestado en Madrid, a ____/____/____ y no deseo proseguir en el estudio, que doy con esta fecha por finalizado.

En Madrid, a _____, de _____, de 201__

Nombre, firma y número de colegiado del médico investigador:	Firma del participante:	Firma del representante legal:
--	-------------------------	--------------------------------



Article

Urinary Cyclophilin A as Marker of Tubular Cell Death and Kidney Injury

Ramio Cabello ¹, Miguel Fontecha-Barruso ^{2,3}, Diego Martin-Sanchez ^{2,3}, Ana M. Lopez-Diaz ², Susana Carrasco ^{2,3}, Ignacio Mahillo ⁴, Carmen Gonzalez-Enguita ¹, Maria D. Sanchez-Niño ^{2,3,5}, Alberto Ortiz ^{2,3,6,*} and Ana B. Sanz ^{2,3,*}

¹ Department of Urology, Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, 28040 Madrid, Spain; rcabello@fdj.es (R.C.); cenguita@fdj.es (C.G.-E.)

² Research Institute-Fundación Jiménez Díaz, Autonoma University, 28040 Madrid, Spain; miguel.fontecha@quironsalud.es (M.F.-B.); diego.martin@fdj.es (D.M.-S.); anam.lopezd@quironsalud.es (A.M.L.-D.); scarrasco@fdj.es (S.C.); mdsanchez@fdj.es (M.D.S.-N.)

³ Department of Medicine, School of Medicine, Autonoma University, 28029 Madrid, Spain

⁴ Department of Epidemiology and Biostatistics. Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, 28040 Madrid, Spain; Imahillo@fdj.es

⁵ Department of Pharmacology, Autonoma University, 28029 Madrid, Spain

⁶ IRSIN (Instituto Reina Sofía de Investigación en Nefrología), 28003 Madrid, Spain

* Correspondence: aortiz@fdj.es (A.O.); asanz@fdj.es (A.B.S.)

Citation: Cabello, R.; Fontecha-Barruso, M.; Martin-Sanchez, D.; Lopez-Diaz, A.M.; Carrasco, S.; Mahillo, I.; Gonzalez-Enguita, C.; Sanchez-Niño, M.D.; Ortiz, A.; Sanz, A.B. Urinary CypA as Marker of Tubular Cell Death and Kidney Injury. *Biomedicines* **2021**, *9*, 217. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9020217>

Academic Editor: Paola Pontrelli

Received: 15 January 2021

Accepted: 17 February 2021

Published: 20 February 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: **Background:** Despite the term acute kidney injury (AKI), clinical biomarkers for AKI reflect function rather than injury and independent markers of injury are needed. Tubular cell death, including necroptotic cell death, is a key feature of AKI. Cyclophilin A (CypA) is an intracellular protein that has been reported to be released during necroptosis. We have now explored CypA as a potential marker for kidney injury in cultured tubular cells and in clinical settings of ischemia-reperfusion injury (IRI), characterized by limitations of current diagnostic criteria for AKI. **Methods:** CypA was analyzed in cultured human and murine proximal tubular epithelial cells exposed to chemical hypoxia, hypoxia/reoxygenation (H/R) or other cell death (apoptosis, necroptosis, ferroptosis) inducers. Urinary levels of CypA (uCypA) were analyzed in patients after nephron sparing surgery (NSS) in which the contralateral kidney is not disturbed and kidney grafts with initial function. **Results:** Intracellular CypA remained unchanged while supernatant CypA increased in parallel to cell death induction. uCypA levels were higher in NSS patients with renal artery clamping (that is, with NSS-IRI) than in no clamping (NSS-no IRI), and in kidney transplantation (KT) recipients (KT-IRI) even in the presence of preserved or improving kidney function, while this was not the case for urinary Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Furthermore, higher uCypA levels in NSS patients were associated with longer surgery duration and the incidence of AKI increased from 10% when using serum creatinine (sCr) or urinary output criteria to 36% when using high uCypA levels in NSS clamping patients. **Conclusions:** CypA is released by kidney tubular cells during different forms of cell death, and uCypA increased during IRI-induced clinical kidney injury independently from kidney function parameters. Thus, uCypA is a potential biomarker of kidney injury, which is independent from decreased kidney function.

Keywords: acute kidney injury; tubular cell death; kidney transplantation; kidney cancer; ischemia-reperfusion

1. Introduction

Acute kidney injury (AKI) is a multifactorial and multiphasic kidney disease characterized by a rapid decline in kidney function, resulting in the accumulation of metabolic waste and toxins [1]. The main causes of parenchymal AKI include ischemia-reperfusion injury (IRI) and endogenous, as well as exogenous, nephrotoxins. Notwithstanding advances in preventive strategies and support measures, AKI continues to be associated

with high morbidity and mortality. Despite its name, which includes the term “injury” rather than “failure”, current diagnostic criteria for AKI rely on evidence of decreased kidney function and not on evidence of kidney injury [1]. Decreased urine output or increased serum creatinine (sCr) may be observed in functional situations in the absence of kidney injury. As examples, sCr may increase, due to functional reasons, in the absence of injury when drugs that decrease the tubular secretion of creatinine are prescribed or when nephroprotective drugs decrease hyperfiltration, without concomitant kidney injury. Thus, biomarkers of actual kidney damage (injury) are needed for early diagnosis (before kidney function decreases), differential diagnosis (injury versus functional changes in the absence of injury) and the staging (e.g., is injury ongoing or not) of kidney injury that allows for early intervention and the adequate selection of therapeutic agents to improve outcomes.

Tubular cell death is a hallmark of parenchymal AKI [2–5]. Both apoptosis and regulated necrosis (RN) may contribute to tubular cell death and may be modulated therapeutically [4,5]. RN pathways include necroptosis, ferroptosis, mitochondria permeability transition-regulated necrosis, and pyroptosis, the latter been a form of cell death in macrophages [3]. Tubular cell death is usually an early event during AKI that is followed by tubular regeneration. However, RN may trigger kidney inflammation that drives a second wave of tubular cell death, that contributes to maintaining decreased kidney function [6]. Indeed, we recently identified necroptosis as a key mode of cell death in experimental AKI and set out to explore potential biomarkers of necroptosis in the clinical setting. For that we identified a clinical scenario in which a highly controlled ischemia injury to the kidney occurred and in which traditional methods to assess kidney injury (based on functional changes) may not be informative, i.e., a clinical setting in which information provided by a marker of injury (rather than of function) may be clinically relevant.

Elective surgical aggression to the kidney, such as nephron sparing surgery (NSS) with renal artery clamping and tumor resection, or kidney transplantation (KT) with anoxia, hypothermia and reperfusion represent clinical practice models of kidney IRI that may or may not result in clinical AKI as per the current consensus definition based on functional assessment [7]. Thus, in NSS, the contralateral kidney is not disturbed and may provide sufficient urine volume or glomerular filtration rate (GFR) to limit or prevent a decrease in diuresis or increase in sCr, despite histological tubular necrosis related to ischemia, and thus, patients may not fulfill current (functional) criteria to diagnose AKI. In KT, despite ischemic injury to the graft, the injured graft may still provide better GFR than the non-functioning native kidneys, and diuresis and decreasing sCr may be observed in the presence of histological kidney injury, unless the graft injury is severe, leading to primary non-function. The ability to assess AKI by noninvasive tools before kidney function declines, with the accurate categorization of severity and the possibility to identify different causes may improve the functional outcome after kidney surgery.

Cyclophilin A (CypA) is the most abundant and ubiquitous member of the cyclophilin family of four proteins (A, B, C, and D) [8,9]. CypA is an 18 kDa intracellular protein with roles in protein folding, trafficking, and T-cell activation [8,10–12]. CypA has been reported to be actively released to the extracellular milieu by injured cells and extracellular CypA could activate inflammation and proliferation [13]. Specifically, cytosolic CypA is released early in necroptosis, and has been proposed to be a biomarker for this type of cell death when the integrity of the plasma membrane is compromised [14]. High levels of CypA are found in the kidney [15,16]. Stressed proximal tubular cells release CypA; however, the relationship of this release to tubular cell death was not previously studied. In this regard, urinary CypA (uCypA) was reported to be increased in diabetic kidney disease, a condition associated with tubular cell death, increased glomerular permeability and proximal tubular dysfunction [17,18]. CypA can be freely filtered by kidney glomeruli; therefore, higher levels in urine samples may reflect an increase in serum levels or elevated excretion by injured kidney tubular cells. In this regard, both serum and urine

CypA were higher in patients with postoperative AKI after cardiac surgery and, thus, increased serum CypA appears to be a biomarker of decreased kidney function [19].

Thus, we set out to explore whether uCypA could be a marker of tubular cell necrosis in the clinic. Now, we report that CypA is released by proximal tubular kidney cells exposed to different lethal stimuli that induce diverse forms of cell death. Moreover, uCypA increased in clinical situations of kidney injury even when there was no associated functional impairment and it better associated with clinical evidence of more severe kidney insult than the more classical biomarker NGAL. We, therefore, identify uCypA as a potential biomarker of kidney injury independent from reduced kidney function.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Culture

Two tubular cell lines were studied, human (HK-2) [20] and murine (MCT) [21] immortalized proximal tubular epithelial cell lines. HK-2 cells were grown in RPMI 1640 (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), 10% decomplexed fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich-Merck KGaA, Darmstadt, Germany), 1% glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 5 µg/mL Insulin Transferrin Selenium (ITS) and 36 ng/mL hydrocortisone in 5% CO₂ at 37 °C. MCTs were grown in RPMI 1640, 10% FBS, 100 µg/mL streptomycin, 2 mM glutamine, and 100 U/mL penicillin. At 60–70% of confluence, cells were growth-arrested in serum-free medium for 24 h before the experiments.

HK2 were exposed to the chemical hypoxia inducer CoCl₂ (Merck, Darmstadt, Germany) at 500 µM and to the ferroptosis inducer RSL3 (SelleckChem, Houston, TX, USA) at 400 nM. MCT cells were exposed to lethal cytokine cocktail that induces apoptosis (TTI), consisting of 100 ng/mL TWEAK (Merck), 30 ng/mL TNFα (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) and 30 U/mL interferonγ (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA), to which 25 µM pancaspase inhibitor carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone (TTI+zVAD) (Bachem, Bubendorf, Switzerland) may be added to switch the mode of cell death to necroptosis [6,22]. To perform hypoxia/reoxygenation (H/R) experiments, MCT cells were cultured for 24 h in a hypoxic atmosphere containing 1% O₂, 94% N₂, 5% CO₂ (Air Liquide, Madrid, Spain) in serum-free RPMI medium, after cells were maintained in 21% O₂ for reoxygenation for indicated periods of time [23].

2.2. Western Blot

After the removal of cell culture media, cells were trypsinized, collected and homogenized in lysis buffer (50 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 0.2% Triton X-100, 0.3% NP-40, 1 mM PMSF and 1 µg/mL pepstatin A) [24]. Protein concentration was measured with the BCA (bicinchoninic acid) assay (Thermo Fisher, Waltham, MA). Cell supernatants were centrifuged at 2500 rpm, for 20 min at 4 °C to remove cells and debris, and then stored at −80 °C until analysis. Equal amounts of protein were loaded in 15% SDS gels, separated by electrophoresis and transferred to PVDF membranes (polyvinylidene difluoride, Millipore, Darmstadt, Germany). The membranes were blocked with 5% TBS/0.5% *v/v* Tween-20 skim milk and incubated with anti-cyclophilin A (1:500, Abcam) and anti-HIF-1α (1:2000, Abcam) antibodies dissolved in 5% milk TBS/Tween for 1 h at room temperature. They were then washed with TBS/Tween and incubated with the secondary antibodies against rabbit IgG (1:5000) or mouse IgG (1:5000) from GE Healthcare. After washing with TBS/Tween, blots were developed with the chemiluminescence method (ECL; Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and probed with mouse monoclonal anti-α-tubulin antibody (1:10,000; Sigma-Aldrich KGaA, Darmstadt, Germany) for HIF membranes or anti-GAPDH (1:5000, Sigma-Aldrich) for CypA membranes, as these markers were allowed to run the gels to optimally separate the bands, given the different molecular weights of the proteins. Levels of expression were corrected for minor differences in loading. Cell supernatants were corrected with red ponceau staining.

2.3. Cell Viability Assay

Cell viability was estimated using the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma Aldrich-Merck KGaA, Darmstadt, Germany) colorimetric assay. Following stimulation, culture medium was removed, and cells were incubated with 0.5 mg/mL MTT in PBS for 1 h at 37 °C. The resulting formazan crystals were dried and dissolved in DMSO. Absorbance (indicative of cell viability) was measured at 570 nm.

2.4. NSS and KT Patients

This observational study prospectively collected urinary samples and clinical data at the Fundación Jiménez Díaz University Hospital biobank between March 2014 and June 2019. The IIS-FJD institutional review board approved the study and patients signed and informed consent, approval date: 20 February 2019. A total of 64 patients were studied: 52 patients with a localized kidney tumor to whom a laparoscopic NSS was proposed and 6 donor-recipient pairs of living KT patients (laparoscopic living donor nephrectomy and conventional KT). Patients were retrospectively divided into 3 groups: laparoscopic NSS patients without ($n = 13$) or with ($n = 39$) arterial clamping during the procedure, and transplant ($n = 6$) patients with end-stage kidney disease who received a KT after laparoscopic nephrectomy of a living related donor.

NSS patients had a healthy contralateral kidney. Medical background, tumor characteristics, surgical findings, warm ischemia time (WIT) when applied and postoperative evolution were recorded. Minimally invasive NSS involves laparoscopic approach and arterial control with a tourniquet. The final decision on clamping the renal artery was made by the surgeon according to the surgical situation (tumor limit visualization, bleeding or expected WIT). Diuretics, such as furosemide and mannitol, were not used.

Kidney donor candidates were studied according to local protocols and donated the left kidney. Kidneys were retrieved for transplantation by a laparoscopic hand-assisted approach. WIT and cold ischemia time (CIT) were recorded.

Basal analytical data were obtained from preoperative blood testing. Postoperative lab tests were obtained from routine clinical lab testing during hospitalization. The last blood test available was also recorded during follow up. Urine samples were obtained serially: before surgery, upon bladder catheterization at the time of anesthesia induction (baseline determination, Pre-Qx), immediately after surgery, before patients were woken up from anesthesia (0 h determination), the day after surgery (24 h) and daily thereafter (48 h, 72 h) up to 72 h while they were hospitalized.

2.5. Urine Samples Collection and ELISA

Urine samples were collected in sterile containers and centrifuged at 2500 rpm for 20 min at 4 °C to remove cells and debris. Supernatants were stored at -80 °C until analysis. uCypA and urinary NGAL (uNGAL) were measured by an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA, MyBiosource, San Diego, CA, USA and Bioporto, Hellerup, Denmark, respectively), according to the manufacturer specification. uCypA and uNGAL were adjusted to urine creatinine levels and expressed per mg of urinary creatinine, as is routinely done for other urinary analysis, such as albuminuria and proteinuria to account for potential physiological differences in urine dilution.

2.6. Statistics

Results are expressed as mean \pm SD in cultured cells and as mean \pm SEM or median (interquartile range) for patient data. Differences between groups were evaluated using one-way ANOVA with Tukey's post hoc tests using the Prism software (Graphpad 7.04). For pairs of samples, data were analyzed using Student's *t* test. Differences between non-clamping and clamping NSS patients were assessed by Student's *t* test for normally dis-

tributed variables or by Wilcoxon rank test for non-normally distributed variables. Differences between categorical values were assessed by Fisher's exact test. A p -value < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Lethal Stimuli Promote CypA Release from Cultured Kidney Tubular Cells

Tubular cells represent that largest cell mass in the kidney and are key targets in parenchymal AKI during IRI. We focused on proximal tubular cells for cell culture studies to assess CypA release to cell culture media following exposure to lethal stimuli. Lethal stimuli were tested in cultured human or murine cells according to their sensitivity to specific modes of death.

Hypoxic conditions were simulated by the exposure of human proximal tubular cells (HK-2) to 500 μM CoCl_2 for different periods of time. CoCl_2 decreased cell viability (Figure 1A) and increased the hypoxia marker HIF-1 α , as assessed by Western blot (Figure 1B) in a time-dependent manner. Under these conditions, CypA released into the cell culture media increased in a time-dependent manner, in parallel to the decreased cell viability (Figure 1C), while intracellular levels of CypA in adherent cells remained unchanged (Figure 1D). Murine proximal tubular cells (MCT cells) were exposed to H/R resulting in a time-dependent decreased cell viability, as confirmed by MTT assay (Figure 2A), which was paralleled by a progressive increase in extracellular CypA (Figure 2B), again without changes in intracellular CypA (Figure 2C).

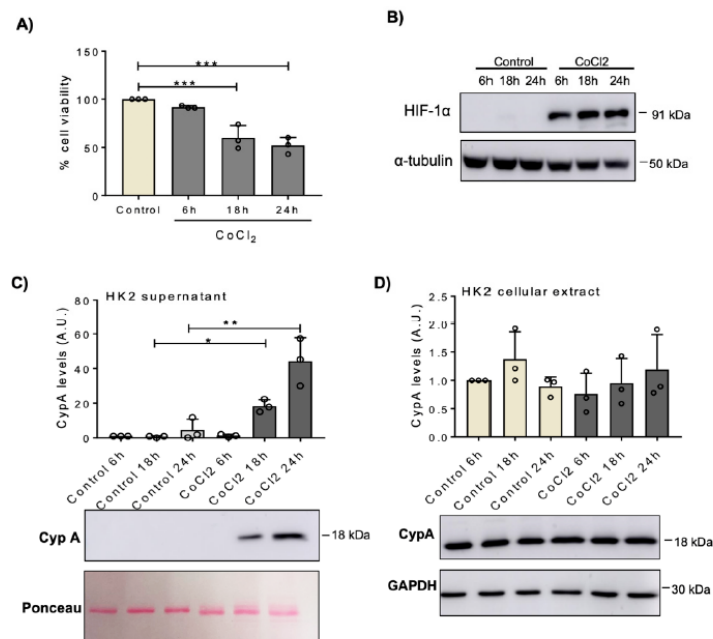


Figure 1. CypA is released by cultured human proximal tubular HK2 cells under chemical hypoxia. HK2 cells were exposed to 500 μM CoCl_2 for the indicated periods of time. (A) Cell viability was assessed by the MTT assay. (B) HIF-1 α expression, a marker of hypoxia, was assessed by Western blot. (C,D) Western blot of CypA in cell supernatants (C) and in cellular extracts (D). Quantification and representative image. (A,C,D) Mean \pm SD of three independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Uncropped gel scans shown in Figure S1A.

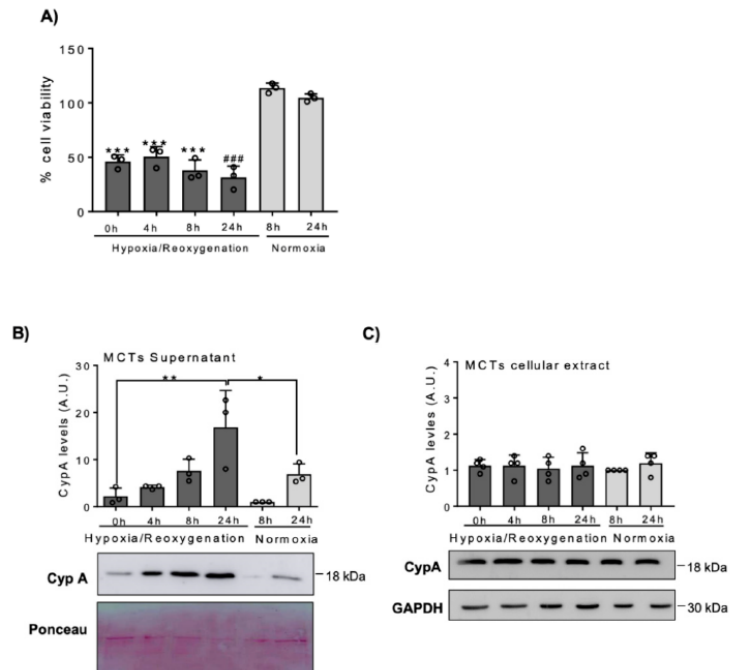


Figure 2. CypA is released by cultured murine proximal tubular MCT cells under hypoxia/reoxygenation. MCT cells were cultured for 24 h in a hypoxic atmosphere, and then cells were reoxygenated for the indicated periods of time (A) Cell viability was assessed by the MTT assay. Mean \pm SD of three independent experiments. *** $p < 0.001$ vs. normoxia 8 h; ### $p < 0.001$ vs. normoxia 24 h. (B,C) Western blot of CypA in cell supernatants (B) and in cellular extracts (C). Quantification and representative image. Mean \pm SD of three independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Uncropped gel scans shown in Figure S1B.

To address whether CypA release is linked to any specific pathways of cell death, tubular cells were exposed to specific inducers of different cell death pathways. Ferroptosis was induced in HK-2 by exposure to RSL3, which resulted in decreased cell viability by 24 h, as tested by the MTT assay (Figure 3A). RSL3 also increased CypA release to the cell culture media (Figure 3B), without changes in intracellular CypA (Figure 3C). Apoptosis and necroptosis were induced in MCT cells by exposure to TTI and TTI/zVAD, respectively. Both stimuli reduced cell viability (Figure 4A), and increased CypA release (Figure 4B), without changes in intracellular CypA (Figure 4C). However, the temporal pattern of CypA release differed between apoptosis and necroptosis, as expected from the specific characteristics of each form of cell death [22]. Thus, as other forms of RN, necroptosis is characterized by loss of cell membrane integrity and release of intracellular contents, and this was consistent with an earlier release of CypA (Figure 4B). By contrast, apoptotic cells do not initially release cellular contents, but in culture they are not engulfed by macrophages or adjacent uninjured cells, and eventually the plasma membrane becomes permeabilized.

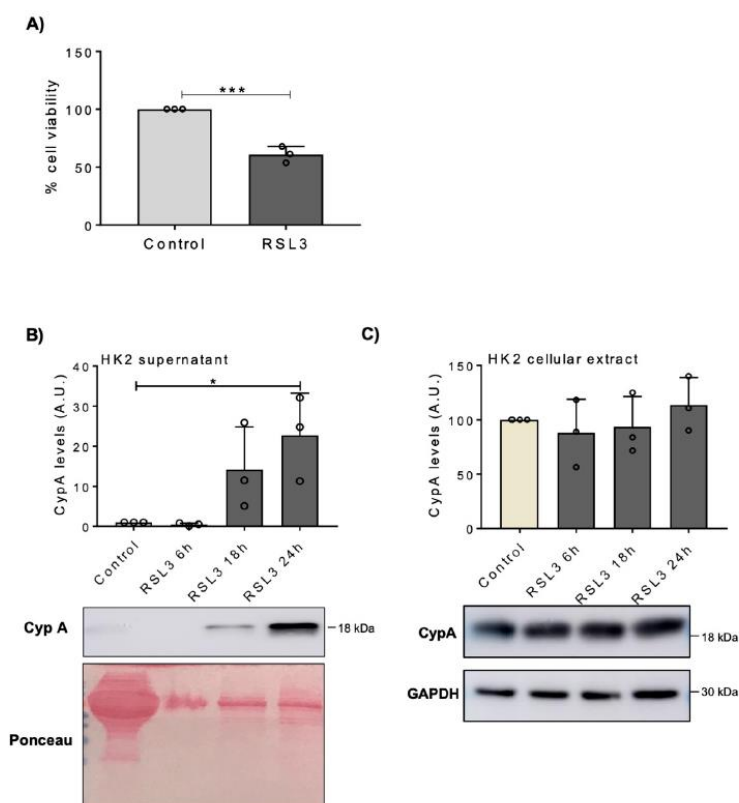


Figure 3. Ferroptosis leads to CypA release in human proximal tubular HK2 cells. (A) HK2 cells were exposed to 400 nM RSL3, a ferroptosis inducer, for 24 h and cell viability was assessed by the MTT assay. Mean \pm SD of three independent experiments. *** $p < 0.001$. (B,C) HK2 cells were exposed to 400 nM RSL3 for indicated periods of times and CypA was measured by Western blot in cellular supernatants (B) and in cellular extracts (C). Quantification and representative image. Mean \pm SD of three independent experiments. * $p < 0.05$. Uncropped gel scans shown in Figure S2A.

Overall, these results suggest that CypA is released by kidney tubular cells exposed to lethal stimuli and CypA release is independent of the mechanism of cell death.

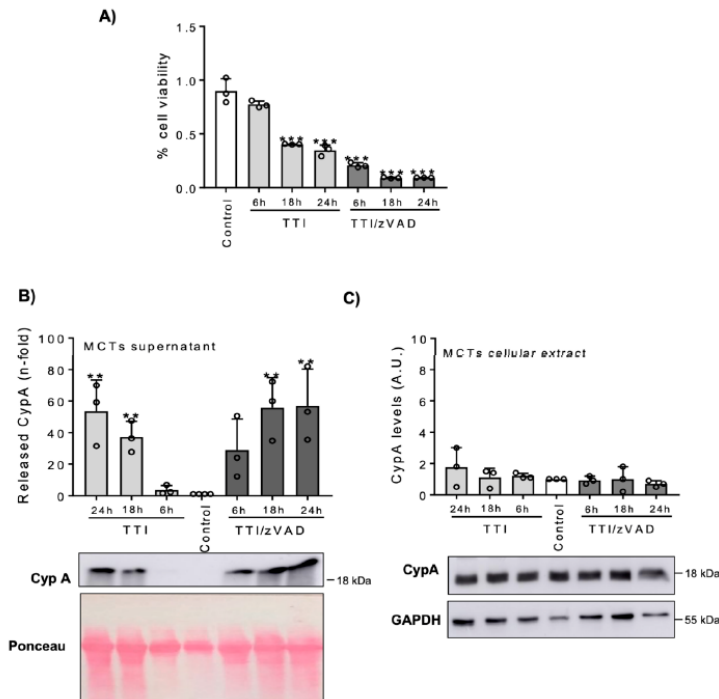


Figure 4. MCT cells were exposed to the apoptosis inducer cytokine cocktail TWEAK/TNF α /interferon- γ (TTI) or to the necroptosis inducer TTI/zVAD for the indicated periods of time. (A) Cell viability was assessed by the MTT assay. Mean \pm SD of three independent experiments. *** $p < 0.001$ vs. control. (B,C) Western blot of CypA in cell supernatants (B) and in cellular extracts (C). Note that controls are in the middle of the gel and the time course is represented from there, i.e., later time points for both stimuli are at opposite sites of the gel and figure. Quantification and representative image. Mean \pm SD of three independent experiments. ** $p < 0.01$ vs. control. Uncropped gel scans shown in Figure S2B.

3.2. Clinical Study: Patient Characteristics

The clinical study was performed in two different clinical settings, both characterized by limitations in the current KDIGO definition of AKI to identify kidney injury: 52 patients undergoing NSS (13 with no-clamping and 39 with clamping of renal artery) and 6 living donor-kidney transplant recipient pairs.

Among NSS patients (Table 1), no significant differences were found between patients with or without renal artery clamping regarding age, gender, body mass index, cardiovascular risk factors, cardiovascular events, kidney function or the nephrometric scores RENAL, PADUA, C. Index, ABC, RPS, or Mayo (Supplementary Table S1). However, tumor size (22.5 ± 8.93 mm vs. 31.3 ± 8.93 mm, $p = 0.006$), DAP (5 (2.00) vs. 6 (2.00), $p = 0.021$) and NePhRO (6 (2.00) vs. 8 (2.00), $p = 0.011$) scores were higher in the NSS patients with renal artery clamping. The WIT in NSS patients with arterial clamping was 23.83 ± 8.38 min.

Table 2 summarizes the characteristics of 6 pairs of KT donors and recipients. Donor laparoscopic hand-assisted left nephrectomy was followed by uneventful graft transplantation in the right iliac fossa, immediate diuresis and no need for postoperative dialysis.

Table 1. Characteristics of NSS patients without and with arterial clamping.

	NSS without Arterial Clamp (n = 13)	NSS with Arterial Clamp (n = 39)	p Value
Age (years, mean ± SD)	65.50 ± 8.97	60.30 ± 11.50	0.155
Female sex	5 (38.4%)	10 (25%)	0.278
Right kidney tumor	4 (30.7%)	19 (48.7%)	0.235
Tumor size* (mm, mean ± SD)	22.5 ± 8.93	31.3 ± 8.93	0.006
Nephrometric scores			
RENAL (median (IQR)) [25]	6 (1.00)	6 (2.00)	0.521
PADUA (median (IQR)) [26]	7 (0.00)	8 (2.00)	0.071
C.INDEX (mean ± SD) [27]	3.25 ± 1.47	2.52 ± 0.92	0.141
DAP (median (IQR)) [28]	5 (2.00)	6 (2.00)	0.021
NePhRO (median (IQR)) [29]	6 (2.00)	8 (2.00)	0.011
ABC category [30]			
1	5 (38.4%)	8 (20.5%)	0.124
2	7 (53.8%)	23 (58.9%)	
3H	1 (7.6%)	2 (5.1%)	
3S	0	6 (15.3%)	
RPS [31] <50%	3 (23%)	7 (17.9%)	1.000
Mayo score (median (IQR)) [32]	3 (2.00)	3 (3.00)	0.468
Ischemia time WIT (min, mean ± SD)	0	23.83 ± 8.38	
KDIGO criteria for AKI	1 (7.69%)	4 (10.25%)	0.613

* Maximum diameter measured by CT scan. To see full characteristics of NSS patients see Supplementary Table S1.

Table 2. Characteristics of KT patients without and with arterial clamping.

	Kidney Donors (n = 6)	Kidney Recipients (n = 6)
Age (years)	58.83 ± 5.91	54.00 ± 20.43
Female sex	4 (66.6%)	3 (50%)
Renal ischemia		
CIT (min)	83.50 ± 7.60	
WIT (min)	3.17 ± 1.27	

CIT: cold ischemia time. WIT: warm ischemia time. To see full characteristics of KT patients see Supplementary Table S2.

3.3. Renal Artery Clamping during NSS Is Associated with Increased uCypA

Among NSS patients, five met the increased sCr KDIGO diagnostic criterion for AKI stage I after surgery, 4 (10.25%) in the clamping group and 1 (7.69%) in the non-clamping group (p ns) (Table 1, Figure 5A).

Next, we measured uCypA levels and stratified NSS patients according to renal artery clamping, which represents a kidney IRI. uCypA levels did not significantly change over time in non-clamping patients and did not increase above baseline in the single non-clamping patient that fulfilled AKI KDIGO criteria. By contrast, uCypA was already increased immediately after surgery (uCypA values were between 14-fold and 33-fold higher than baseline in three patients at this point) in some clamping patients and mean values further increased up to 48 h after surgery, at which point they were significantly higher than at baseline (10.58 ± 3.38 vs. 0.39 ± 0.08 ng/mg, $p < 0.001$) (Figure 5B). Individual clamping patients usually showed peak uCypA levels at 24–48 h, while no clear peak was observed in non-clamping patients (Figure 5C). uCypA increased from baseline in the four clamping patients who fulfilled the KDIGO AKI sCr criterion and, additionally in 15 further patients for whom increased uCypA provided evidence of kidney injury in the absence of clinically relevant decrease in kidney function, as assessed by sCr levels. The low

sensitivity of KDIGO AKI criteria to detect AKI in this clinical setting was expected, given that the contralateral kidney was not disturbed by surgery.

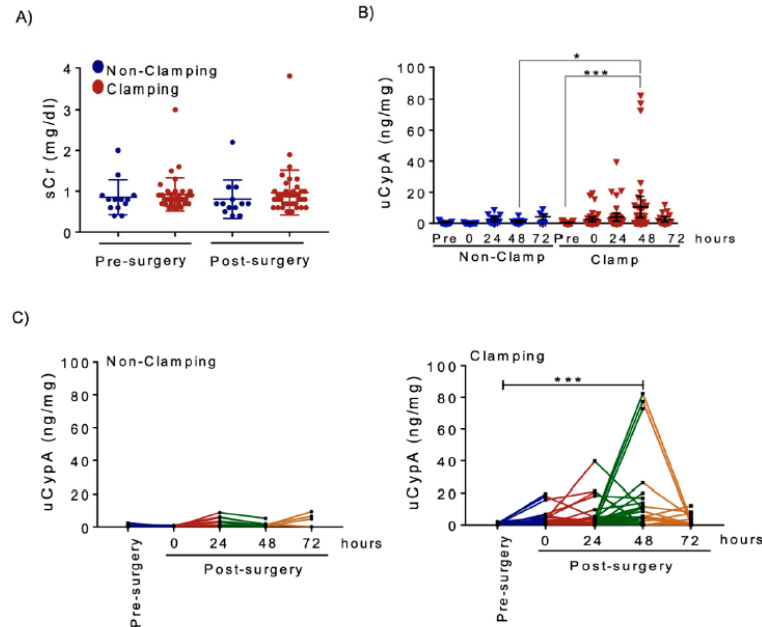


Figure 5. uCypA levels are increased in NSS patients with renal artery clamping but not in patients without clamping. (A) sCr levels after surgery did not differ between clamping and non-clamping patients. (B) uCypA levels are increased after surgery in NSS patients with clamping. Bars represent mean \pm SEM. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. (C) Time course of uCypA levels in individual patients shows a peak at 24–48 h after surgery in most clamping patients, while no clear peak was observed in non-clamping patients. (B,C) uCypA is expressed as urinary CypA: urinary creatinine ratio.

To gain insight into potential cut-off points of uCypA that may be used to define the occurrence of kidney injury, post-surgery uCypA values were compared to two different cut-off points. Clamping resulted in a higher percentage of patients above both cut-off points (Figure 6A,B). First, the cut-off point for uCypA was defined as post-surgery values above the highest pre-surgery uCypA value found in the study population. This uCypA cut-off point was labeled as an increase above baseline value (>2.5 ng/mg, Figure 6A). Using this definition, an immediate increase in uCypA values was observed in 26 % of clamping patients but in none of the no-clamping patients (Figure 6A). However, by 24 h, increased uCypA was observed in 31 % and 46 % of clamping and no-clamping patients and this difference was not statistically significant. By 48 h, uCypA values above the baseline value cut-off point were observed almost exclusively in clamping patients (49 %). However, 24-h findings suggested that surgery-associated tissue injury, unrelated to kidney IRI, could result in mild increases in uCypA in the early post-surgery period. Thus, a second uCypA cut-off point was defined as post-surgery values above the highest uCypA values obtained within 72 h of surgery without clamping, this was named the maximum injury value cut-off point (i.e., >10 ng/mg, Figure 6B) and accounted for non-specific surgery-induced tissue injury, unrelated to IRI. Using this definition, only clamping resulted in uCypA values above the cut-off point and the percentage of patients with significant

kidney injury potentially linked to IRI increased from 8% immediately post-surgery to 28% at 48 h (Figure 6B). A total of 14 (36%) patients had a higher uCypA at some point after surgery. Moreover, patients with uCypA above the maximum injury cut-off point showed longer surgery duration, and higher surgical bleeding and increase in sCr after surgery (Figure 6C), suggesting that high levels of CypA are related to more severe kidney injury. In this regard, the four clamping patients with clinical AKI had uCypA above baseline value cut-off point and three of them went above the maximum injury cut-off point.

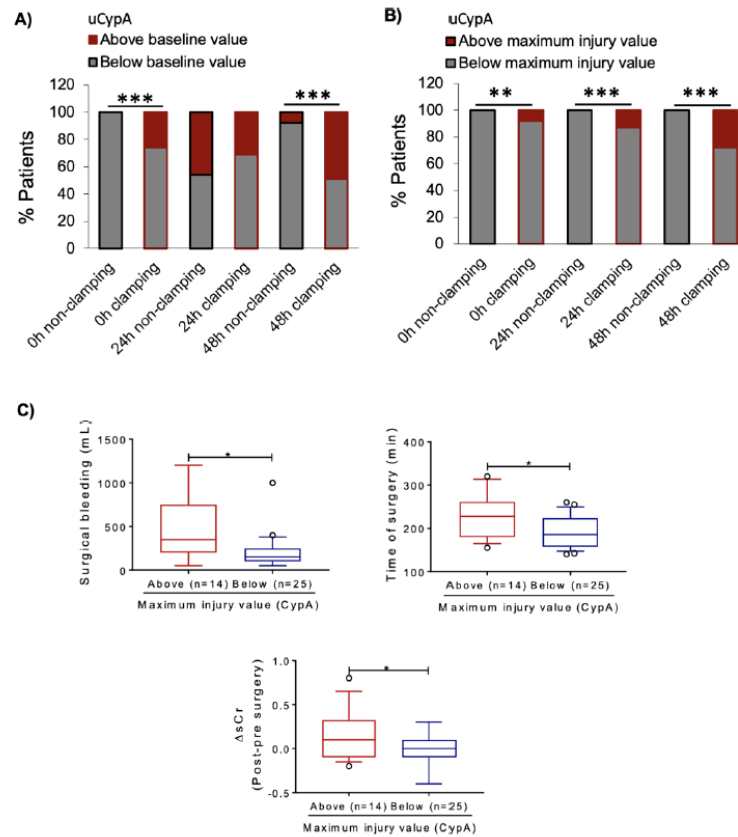


Figure 6. Percentage of patients with high uCypA levels after NSS using two different uCypA cut-off levels to define “high uCypA”. (A) Percentage of patients with post-surgery uCypA values above the highest pre-surgery uCypA value, found in the study population, i.e., >25 ng/mg; *** $p < 0.001$. (B) Percentage of patients with post-surgery uCypA values above the highest post-surgery uCypA values obtained in NSS without clamping, i.e., >100 ng/mg; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (C) Time of surgery, surgical bleeding and increase in sCr are higher in clamping patients with CypA above maximum injury levels. Data are presented as box plots that show the mean, 25/75 percentiles (box), and 10/90 percentiles (bars). * $p < 0.05$.

Overall, these findings suggest the potential usefulness of uCypA to detect IRI kidney injury when function parameters are unreliable.

3.4. Urine NGAL in NSS Patients

Next, we assessed a conventional kidney injury biomarker, uNGAL, in NSS patients. Among the five NSS patients meeting the increased sCr KDIGO diagnostic criterion for AKI stage I after surgery, only one (20%), belonging to the clamping group, had an increase in uNGAL above baseline.

As for uCypA, clamping resulted in numerically higher mean uNGAL values at 48 h when compared to baseline (392 ± 81 vs. 187 ± 66 pg/mg) than in non-clamping compared to baseline (167 ± 82 vs. 174 ± 32 pg/mg); however, these differences were not statistically significant (Figure 7A). Indeed, the fold-change over the mean baseline values was lower for uNGAL than for uCypA and no statistically significant differences were observed in uNGAL in either clamping or non-clamping patients (Figure 7B). This differs from the significant (48 h $p < 0.001$) and sustained mean 6.4- to 26.5-fold increase in uCypA versus pre-surgery values in clamping patients (Figure 7B).

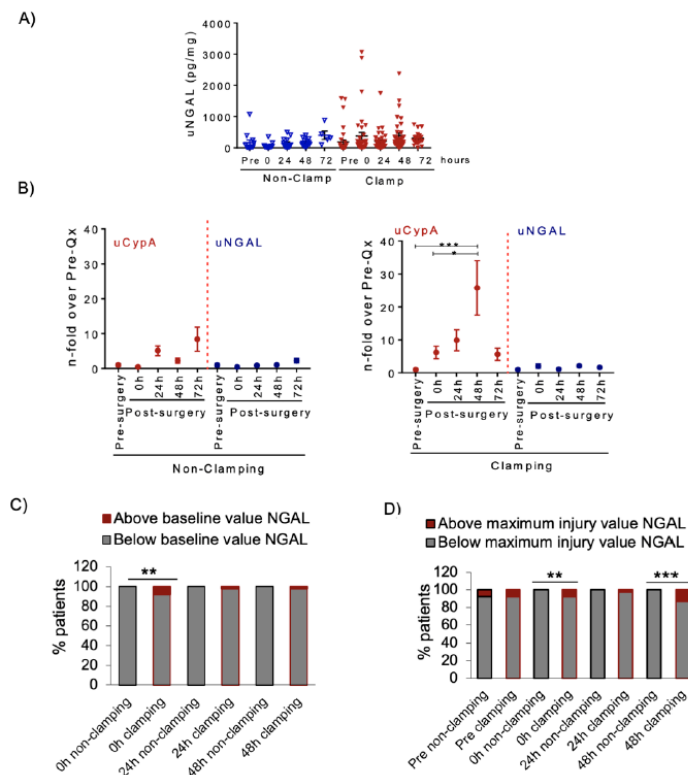


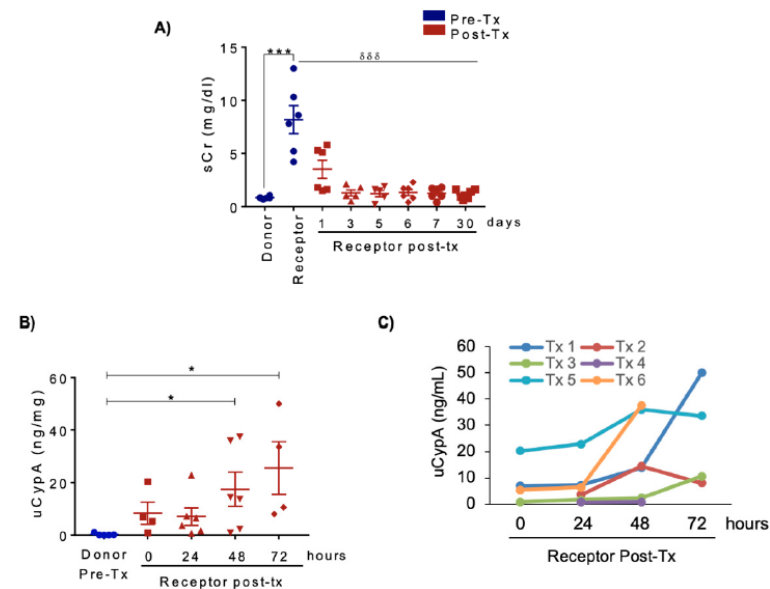
Figure 7. uNGAL levels in NSS patients. (A) uNGAL levels were measured in NSS patients before and after surgery and no statistically significant changes were observed. uNGAL is expressed as urinary NGAL: urinary creatinine ratio. Bars represent mean \pm SEM. (B) Time-course of uNGAL and uCypA values expressed as fold-change over mean baseline pre-surgery values. Statistically significant increases over baseline were only observed for uCypA in clamping patients. Mean \pm SEM, * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. (C) Percentage of patients with post-surgery uNGAL values above the highest pre-surgery uNGAL value found in the study population, i.e., >16 pg/mg. (D) Percentage of patients with post-surgery uNGAL values above the highest post-surgery uNGAL values obtained in NSS without clamping, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Use of the same definitions (increase above baseline cut-off and maximum injury cut-off values) for high uNGAL levels as previously used for uCypA did not disclose a clear association of high uNGAL levels with either surgery or clamping for any of the definitions (Figure 7C). While using the above maximum injury cut-off (i.e., above peak post-surgery value in non-clamping cut-off value) resulted in a significantly higher percentage of clamping patients with high uNGAL levels, this percentage (12.5 %) was in the range observed at baseline for both clamping and non-clamping patients (Figure 7D). Finally, contrary to uCypA, there was no clear association between uNGAL values above the maximum injury cut-off point with surgery duration or increased sCr after surgery (Figure S3).

The correlation between uCypA and uNGAL was poor and only statistically significant for clamping patients (Figure S4). Overall, these results suggest that uNGAL appears less sensitive than uCypA to detect IRI-induced kidney injury.

3.5. Urine CypA Levels Following Living Donor KT

We next analyzed uCypA in KT patients after living kidney donation with immediate diuresis and kidney function and progressive normalization of sCr in recipients (Figure 8A). Mean uCypA levels in transplanted patients increased progressively from time zero as compared with donor urine, reaching statistical significance at 48 and 72 h (Figure 8B,C). In contrast, peak uNGAL was observed at time zero, the only time point in which it was significantly higher than in donor urine, and uNGAL decreased thereafter (Figure 8D,E). In this regard, pre-surgery uNGAL values in KT recipients were above those in donors and in the range found in recipient urine at time zero, suggesting that part of this uNGAL originated from the recipient kidneys. This is not surprising, since CKD has been associated with increased uNGAL [33].



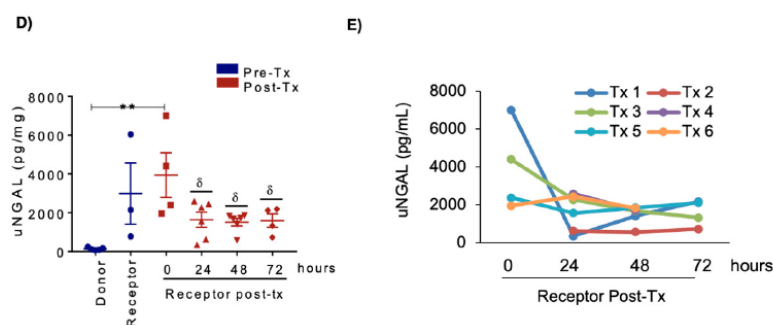


Figure 8. uCypA levels are increased after living KT. (A) sCr levels decreased following KT. Bars represent mean \pm SEM. *** $p < 0.05$ vs. donor; $\delta\delta\delta p < 0.001$ vs. receptor pre-transplant. (B) By contrast, uCypA levels increased following KT in recipients compared with donor urine. Bars represent mean \pm SEM. * $p < 0.05$. uCypA is expressed as urinary CypA: urinary creatinine ratio. (C) Time-course of uCypA levels in individual patients shows a peak at 24–48 h after surgery in most patients. (D) uNGAL levels decreased from time zero after surgery in KT recipients. uNGAL is expressed as urinary NGAL: urinary creatinine ratio. Bars represent mean \pm SEM. ** $p < 0.01$. (E) Time-course of uNGAL levels in individual patients shows a decrease after surgery in most patients.

Overall, these results further support the potential usefulness of uCypA to detect IRI kidney injury when function parameters are unreliable.

4. Discussion

The main findings are that CypA is released by dying tubular cells and the release is not specific for any form of cell death (apoptosis, necroptosis, ferroptosis), thus, potentially identifying the ongoing kidney injury of diverse etiology. In this regard, using clinical situations in which sCr or diuresis do not adequately represent underlying IRI-induced kidney injury, we have identified uCypA as a marker of clinical IRI kidney injury more sensitive than the classical markers uNGAL or sCr to detect unilateral kidney injury in presence of a functional contralateral kidney or when kidney injury nonetheless results in better kidney function than in the baseline situation, as is the case for KT (Figure 9). While these clinical situations allowed us to identify the role of uCypA as a marker of kidney injury, it is likely that uCypA also provides similar information in other clinical situations.

Currently, the diagnosis of AKI is based on indicators of kidney function, including sCr and urine output [34]. However, kidney injury can occur in the absence of an increase in sCr, which represents an emerging condition, called subclinical AKI, an early step in the spectrum of kidney injury [35]. However, no injury biomarker is currently in clinical use, and there is an unmet medical need. NGAL is one of the best characterized AKI biomarkers. It is a 25 kDa protein expressed by many cells and is secreted in the kidney by distal tubular cells in response to ischemic or toxic injury [36], in a “severity-dependent” manner. uNGAL may increase from 3 h after the tubular insult, peaking at 6 to 12 h depending on the intensity of the insult [34,37]. Clinical studies have presented NGAL as a biomarker to predict AKI, and for early diagnosis, duration and short- and long-term outcome predictors and recovery predictors [34]. Specifically, uNGAL has been proposed as a suitable biomarker for early detection of AKI in patients undergoing cardiac surgery [19]. However, the diagnostic cut-off values for urinary or plasma NGAL are yet unclear [38].

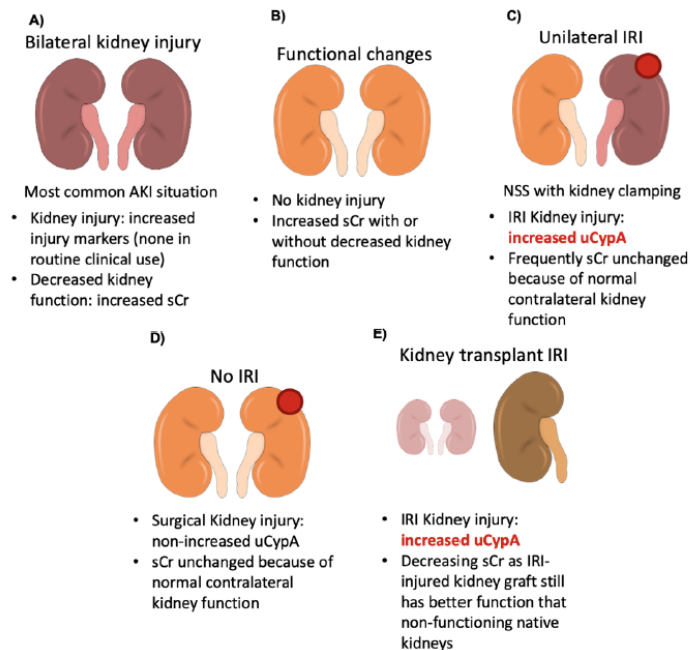


Figure 9. Conceptual figure: current issues in AKI diagnosis and contribution of uCypA. (A) Current AKI diagnosis. (B) sCr may increase due to functional reasons, in the absence of injury. (C) Unilateral IRI resulting from clamping of renal artery in NSS. Increased uCypA in IRI kidney injury. uCypA was a more sensitive marker of IRI-induced kidney injury than sCr or classical markers of injury such as NGAL. (D) In NSS without clamping, there is no IRI. (E) In KT patients, kidney graft IRI is usually associated with decreasing sCr levels. Increased uCypA in IRI kidney injury. Again, uCypA provided evidence of kidney injury despite decreasing sCr and non-informative uNGAL.

CypA is an abundant intracellular protein expressed by numerous tissues that could be released by different cell types in response to diverse stimuli. In fact, the release of CypA has been observed in vascular smooth muscle cells (VSMCs) in response to oxidative stress and rapamycin, in macrophages treated with LPS or high glucose, in myocytes in response to hypoxia/reoxygenation and in activated platelets [39–43]. The cellular mechanism that induced CypA release seems to be associated to cell death, but whether it may represent specific forms of cell death is unclear. In Jurkat cells, CypA release was reported as a marker of necroptosis [14], an observation that triggered the present research. More recently, it was also linked to apoptosis in VSMCs [40]. The kidney has relatively high levels of CypA, especially in proximal tubule epithelial cells [15,16] and we now report that CypA is released by tubular cells in response to hypoxia and different lethal stimuli, but it does not seem to be specific of a unique cell death pathway. Recently, it was described that tubular cells release other proteins when exposed to cell death inducers, such as HMGB1 and IL-33 [44,45], but their clinical relevance is unknown. The cellular processes that mediate CypA release are unclear and may depend on the stimulus, as observed for VSMCs, and differ for sublethal or lethal stimuli [39,40]. Our experiments also suggest that CypA release is dependent of the loss of membrane integrity since it was not observed at early time points during apoptosis induced by TTI. In this regard, we hypothesize that intracellular CypA levels remained constant while extracellular CypA levels increased because of the presence of two-cell populations; cells that remain alive and attached to the

plate, which do not release CypA and, thus, intracellular CypA levels remain stable, and dying cells that detach from the plate and release CypA.

CypA can be freely filtered by glomeruli, so increased urinary levels could reflect increased serum levels or increased excretion from injured tubular cells [19]. In this regard, uCypA could be an early AKI marker [19,46]. We now observed that uCypA increased in clinical situations characterized by kidney IRI, such as renal artery clamping during IRI-NSS and living donor IRI-KT. We took advantage of clinical situations in which urine output and sCr may not represent kidney injury to characterize uCypA as a marker of AKI independent from kidney function. Thus, in NSS, the combination of a healthy kidney and limited ischemia usually results in stable sCr and diuresis, while in living donor transplantation, any ischemia-induced kidney dysfunction is obscured by the fact that even when injured, the kidney graft provides higher glomerular filtration than non-functioning native kidneys. Both clinical situations displayed a similar uCypA time-course, characterized by a very early increase (just after surgery was completed) and a progressive increase thereafter that is consistent with our current understanding of cell death dynamics in AKI [6]. Thus, an immediate wave of cell death in direct response to the insult may be followed by a second wave of cell death at 48–72 h fueled by local inflammation and lethal cytokines produced in response to the original insult and to the first wave of proinflammatory cell death, i.e., by RN [3,6,45]. The more limited time-course of increased uCypA in NSS with arterial clamp may represent the more limited nature of the insult, and, consequently, of kidney injury. In this regard, the magnitude of the change was larger in KT patients than in NSS with clamping (20.82 ± 6.8 vs. 10.58 ± 3.2 ng/mg at 48 h). The early post-transplant period is characterized by very high urine creatinine excretion, as not only the ongoing production of creatinine by muscle is excreted, but additionally the very high pre-transplant levels of creatinine are excreted. Thus, the normalization of uCypA by urinary creatinine may underestimate the magnitude of the change. In patients under renal replacement treatment (hemodialysis and peritoneal dialysis) elevated plasma CypA levels have been linked with systemic inflammation [43]. If, in the transplant situation, uCypA originated mainly from the circulation, this would have resulted in higher initial uCypA levels and a progressive reduction thereafter. However, in our KT population, uCypA increased progressively up to 48 to 72 h after KT, while kidneys had immediate function and sCr decreased after surgery. This is again consistent with the second wave of cell death triggered by the initial insult induction of proinflammatory RN cell death.

As increased uCypA has been observed in diabetic nephropathy. An interesting question is whether pre-existing conditions are also associated with increased uCypA [17]. This is the case for putative markers of AKI, such as NGAL and KIM-1 [33], as we confirmed in the present report for NGAL. Indeed, this might also be the case for uCypA, although we could not observe it. In any case, diabetic nephropathy is recognized to be associated with an increased rate of cell death [18,47], thus supporting a potential association of uCypA with tubular cell death.

The description of urinary markers of kidney injury that respond to NSS and KT insults, even in the absence of clinical evidence of AKI, opens the door to quantification of kidney injury in these scenarios and to future studies assessing the long-term outcome impact on kidney function of different degrees of injury. Additionally, it will allow for the assessment of the impact of different nephroprotective maneuvers aimed at decreasing kidney injury during surgery or in the immediate post-surgery period.

Some limitations should be acknowledged. The sample size was relatively small, and long-term outcomes were not evaluated. In this regard, the cut-off points used in the present study represent working cut-off points that should be better defined in future studies. Additionally, the study was not randomized. Thus, clamping was usually decided based on surgical conditions and was usually performed in larger tumors, as evidenced by larger tumor size and higher DAP and NePhRO nephrometry data. However, NSS and KT data were consistent, and this information may guide the design of future observational or interventional studies.

5. Conclusions

CypA is released by kidney tubular cells exposed to diverse lethal stimuli inducing different forms of cell death, suggesting that it may clinically be useful in diverse conditions associated with AKI. In this regard, increased uCypA levels were found in clinical situations of IRI-induced kidney injury in which the functional impact of kidney injury could not be reliably assessed, and provided information different from uNGAL, uCypA appearing more sensitive to IRI (Figure 9). Thus, current AKI diagnosis requires a decreased kidney function, resulting in increased sCr or decreased urinary output (Figure 9A). However, sCr may increase for functional reasons, in the absence of kidney injury (Figure 9B). By contrast, in unilateral IRI resulting from clamping of renal artery in NSS, the contralateral kidney provides still enough kidney function to minimize changes in sCr despite injury to the clamped kidney (Figure 9C). Under these conditions, we observed that uCypA was a more sensitive marker of IRI-induced kidney injury than sCr or classical markers of injury, such as NGAL. In NSS without clamping there is no IRI and no IRI-related changes in uCypA (Figure 9D). In KT, due to the virtually inexistent kidney function at baseline, graft IRI is associated with decreasing sCr levels, despite graft kidney injury, as injured kidneys still have better function than native kidneys (Figure 9E). Again, uCypA provided evidence of kidney injury despite decreasing sCr and non-informative uNGAL. Thus, uCypA is a potential biomarker of kidney injury even in patients not meeting current diagnostic criteria for AKI, that are based on functional impact.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/2227-9059/9/2/217/s1, Figure S1: Uncropped gel scans, Figure S2: Uncropped gel scans, Figure S3: Conceptual figure.

Author Contributions: Conceptualization, R.C., A.B.S. and A.O.; methodology, M.F.-B., D.M.-S., S.C., and A.M.L.-D.; software, M.F.-B. and D.M.-S.; validation, I.M.; formal analysis, I.M. investigation, M.F.-B. and D.M.-S.; resources, A.M.L.-D. and M.D.S.-N.; data curation, A.B.S. writing—original draft preparation, R.C., A.B.S. and A.O.; writing—review and editing, R.C., A.B.S., C.G.-E., A.O.; visualization, C.G.-E. supervision, A.O.; project administration, A.O. and A.B.S.; funding acquisition, A.O. and A.B.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Research by the authors was funded by FIS/ FEDER funds (PI17/00257, PI18/01386, PI19/00588, PI19/00815, DTS18/00032, ERA-PerMed-JTC2018 (KIDNEY ATTACK AC18/00064 and PERSTIGAN AC18/00071, ISCIII-RETIC REDinREN RD016/0009), Sociedad Española de Nefrología, FRIAT, Comunidad de Madrid en Biomedicina B2017/BMD-3686 CIFRA2-CM. Salary support: ISCIII Miguel Servet to A.B.S., MICIN Ramon y Cajal to M.D.S.-N., REDinREN RD016/0009 to M.F.-B., SENEPRO to D.M.-S. and Consejería de Educación, Juventud y Deporte (Comunidad de Madrid/FSE) to A.M.L.-D.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Ethics Committee of Fundación Instituto Investigación Sanitaria FJD (protocol code EO233-20-FJD).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. Written informed consent has been obtained from the patient(s) to publish this paper.

Data Availability Statement: The HK2 cell line was obtained from ATTC, and The MTC cell line were obtained from Dr Eric G. Neilson.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Khwaja, A. KDIGO Clinical Practice Guidelines for Acute Kidney Injury. *Nephron* **2012**, *120*, c179–c184, doi:10.1159/000339789.
2. Pefanis, A.; Ierino, F.L.; Murphy, J.M.; Cowan, P.J. Regulated necrosis in kidney ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int.* **2019**, *96*, 291–301, doi:10.1016/j.kint.2019.02.009.
3. Martin-Sanchez, D.; Poveda, J.; Fontecha-Barriuso, M.; Ruiz-Andres, O.; Sanchez-Niño, M.D.; Ruiz-Ortega, M.; Ortiz, A.; Sanz, A.B. Targeting of regulated necrosis in kidney disease. *Nefrología* **2018**, *38*, 125–135, doi:10.1016/j.nefro.2017.04.004.
4. Bonventre, J.V.; Yang, L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J. Clin. Investig.* **2011**, *121*, 4210–4221, doi:10.1172/jci45161.

5. Sharfuddin, A.A.; Molitoris, B.A. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nat. Rev. Nephrol.* **2011**, *7*, 189–200, doi:10.1038/nrneph.2011.16.
6. Martín-Sánchez, D.; Fontecha-Barriuso, M.; Carrasco, S.; Sánchez-Niño, M.D.; Von Mässenhausen, A.; Linkermann, A.; Cannata-Ortiz, P.; Ruiz-Ortega, M.; Egido, J.; Ortiz, A.; et al. TWEAK and RIPK1 mediate a second wave of cell death during AKI. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 4182–4187, doi:10.1073/pnas.1716578115.
7. Antonelli, A.; Allinovi, M.; Cocci, A.; Russo, G.I.; Schiavina, R.; Rocco, B.; Giovannalberto, P.; Celia, A.; Galfano, A.; Varca, V.; et al. The Predictive Role of Biomarkers for the Detection of Acute Kidney Injury After Partial or Radical Nephrectomy: A Systematic Review of the Literature. *Eur. Urol. Focus* **2020**, *6*, 344–353, doi:10.1016/j.euf.2018.09.020.
8. Hong, F.; Lee, J.; Piao, Y.J.; Jae, Y.K.; Kim, Y.-J.; Oh, C.; Seo, J.-S.; Yun, Y.S.; Yang, C.W.; Ha, J.; et al. Transgenic mice overexpressing cyclophilin A are resistant to cyclosporin A-induced nephrotoxicity via peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *316*, 1073–1080, doi:10.1016/j.bbrc.2004.02.160.
9. Kumari, S.; Roy, S.; Singh, P.; Singla-Pareek, S.L.; Pareek, A. Cyclophilins: Proteins in search of function. *Plant Signal. Behav.* **2013**, *8*, e22734, doi:10.4161/psb.22734.
10. Colgan, J.; Asmal, M.; Neagu, M.; Yu, B.; Schneidkraut, J.; Lee, Y.; Sokolskaja, E.; Andreotti, A.; Luban, J. Cyclophilin A Regulates TCR Signal Strength in CD4+ T Cells via a Proline-Directed Conformational Switch in Itk. *Immunol.* **2004**, *21*, 189–201, doi:10.1016/j.immuni.2004.07.005.
11. Nigro, P.; Pompilio, G.; Capogrossi, M.C. Cyclophilin A: A key player for human disease. *Cell Death Dis.* **2013**, *4*, e888, doi:10.1038/cddis.2013.410.
12. Dornan, J.; Taylor, P.; Walkinshaw, M.D. Structures of immunophilins and their ligand complexes. *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, *3*, 1392–1409, doi:10.2174/1568026033451899.
13. Dear, J.W.; Simpson, K.J.; Nicolai, M.P.J.; Catterson, J.H.; Street, J.; Huizinga, T.; Craig, D.G.; Dhaliwal, K.; Webb, S.; Bateman, D.N.; et al. Cyclophilin A Is a Damage-Associated Molecular Pattern Molecule That Mediates Acetaminophen-Induced Liver Injury. *J. Immunol.* **2011**, *187*, 3347–3352, doi:10.4049/jimmunol.1100165.
14. Christofferson, D.E.; Yuan, J. Cyclophilin A release as a biomarker of necrotic cell death. *Cell Death Differ.* **2010**, *17*, 1942–1943, doi:10.1038/cdd.2010.123.
15. Ryffel, B.; Woerly, G.; Greiner, B.; Haendler, B.; Mihatsch, M.J.; Foxwell, B.M. Distribution of the cyclosporine binding protein cyclophilin in human tissues. *Immunol.* **1991**, *72*, 399–404.
16. Demeule, M.; Laplante, A.; Sepehr-Araé, A.; Murphy, G.M.; Wenger, R.M.; Béliveau, R. Association of cyclophilin A with renal brush border membranes: Redistribution by cyclosporine A. *Kidney Int.* **2000**, *57*, 1590–1598, doi:10.1046/j.1523-1755.2000.00003.x.
17. Tsai, S.-F.; Su, C.-W.; Wu, M.-J.; Chen, C.-H.; Fu, C.-P.; Liu, C.-S.; Hsieh, M. Urinary Cyclophilin A as a New Marker for Diabetic Nephropathy. *Med.* **2015**, *94*, e1802, doi:10.1097/md.0000000000001802.
18. Ortiz, A.; Ziyadeh, F.N.; Neilson, E.G. Expression of apoptosis-regulatory genes in renal proximal tubular epithelial cells exposed to high ambient glucose and in diabetic kidneys. *J. Investig. Med.* **1997**, *45*, 50–56.
19. Lee, C.-C.; Chang, C.-H.; Cheng, Y.-L.; Kuo, G.; Chen, S.-W.; Li, Y.-J.; Chen, Y.-T.; Tian, Y.-C.; Chen Diagnostic Performance of Cyclophilin A in Cardiac Surgery-Associated Acute Kidney Injury. *J. Clin. Med.* **2019**, *9*, 108, doi:10.3390/jcm9010108.
20. Poveda, J.; Sánchez-Niño, M.D.; Glorieux, G.; Sanz, A.B.; Egido, J.; Vanholder, R.; Ortiz, A. p-Cresyl sulphate has pro-inflammatory and cytotoxic actions on human proximal tubular epithelial cells. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2014**, *29*, 56–64, doi:10.1093/ndt/gft367.
21. Haverty, T.P.; Kelly, C.J.; Hines, W.H.; Amenta, P.S.; Watanabe, M.; Harper, R.A.; Kefalides, N.A.; Neilson, E.G. Characterization of a renal tubular epithelial cell line which secretes the autologous target antigen of autoimmune experimental interstitial nephritis. *J. Cell Biol.* **1988**, *107*, 1359–1368, doi:10.1083/jcb.107.4.1359.
22. Justo, P.; Sanz, A.; Sánchez-Niño, M.D.; Winkles, J.; Lorz, C.; Egido, J.; Ortiz, A.; Arduan, A.O.; Sánchez-Niño, M.D. Cytokine cooperation in renal tubular cell injury: The role of TWEAK. *Kidney Int.* **2006**, *70*, 1750–1758, doi:10.1038/sj.ki.5001866.
23. Conde, E.; Alegre, L.; Blanco-Sánchez, I.; Sáenz-Morales, D.; Aguado-Fraile, E.; Ponte, B.; Ramos, E.; Saiz, A.; Jiménez, C.; Ordoñez, A.; et al. Hypoxia Inducible Factor 1-Alpha (HIF-1 Alpha) Is Induced during Reperfusion after Renal Ischemia and Is Critical for Proximal Tubule Cell Survival. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e33258, doi:10.1371/journal.pone.0033258.
24. Fontecha-Barriuso, M.; Martín-Sánchez, D.; Martínez-Moreno, J.M.; Cardenas-Villacres, D.; Carrasco, S.; Sánchez-Niño, M.D.; Ruiz-Ortega, M.; Ortiz, A.; Sanz, A.B. Molecular pathways driving omeprazole nephrotoxicity. *Redox Biol.* **2020**, *32*, 101464, doi:10.1016/j.redox.2020.101464.
25. Kutikov, A.; Uzzo, R.G. The RENAL Nephrometry Score: A Comprehensive Standardized System for Quantitating Renal Tumor Size, Location and Depth. *J. Urol.* **2009**, *182*, 844–853, doi:10.1016/j.juro.2009.05.035.
26. Ficarra, V.; Novara, G.; Secco, S.; Macchi, V.; Porzionato, A.; De Caro, R.; Artibani, W. Preoperative Aspects and Dimensions Used for an Anatomical (PADUA) Classification of Renal Tumours in Patients who are Candidates for Nephron-Sparing Surgery. *Eur. Urol.* **2009**, *56*, 786–793, doi:10.1016/j.eururo.2009.07.040.
27. Simmons, M.N.; Ching, C.B.; Samplaski, M.K.; Park, C.H.; Gill, I.S. Kidney Tumor Location Measurement Using the C Index Method. *J. Urol.* **2010**, *183*, 1708–1713, doi:10.1016/j.juro.2010.01.005.
28. Simmons, M.N. Morphometric characterization of kidney tumors. *Curr. Opin. Urol.* **2011**, *21*, 99–103, doi:10.1097/mou.0b013e32834208d6.

29. Hakky, T.S.; Baumgarten, A.S.; Allen, B.; Lin, H.-Y.; Ercole, C.E.; Sexton, W.J.; Spiess, P.E. Zonal NePhRO Scoring System: A Superior Renal Tumor Complexity Classification Model. *Clin. Genitourin. Cancer* **2014**, *12*, e13–e18, doi:10.1016/j.clgc.2013.07.009.
30. Spaliviero, M.; Poon, B.Y.; Karlo, C.A.; Guglielmetti, G.B.; Di Paolo, P.L.; Corradi, R.B.; Martin-Malburet, A.G.; Campos-Juanatey, F.; Escudero-Fontano, E.; Sjoberg, D.D.; et al. An Arterial Based Complexity (ABC) Scoring System to Assess the Morbidity Profile of Partial Nephrectomy. *Eur. Urol.* **2016**, *69*, 72–79, doi:10.1016/j.eururo.2015.08.008.
31. Tomaszewski, J.J.; Smaldone, M.C.; Cung, B.; Li, T.; Mehrazin, R.; Kutikov, A.; Canter, D.J.; Viterbo, R.; Chen, D.Y.; Greenberg, R.E.; et al. Internal validation of the renal pelvic score: A novel marker of renal pelvic anatomy that predicts urine leak after partial nephrectomy. *Urol.* **2014**, *84*, 351–357, doi:10.1016/j.urology.2014.05.001.
32. Davidiuk, A.J.; Parker, A.S.; Thomas, C.S.; Leibovich, B.C.; Castle, E.P.; Heckman, M.G.; Custer, K.; Thiel, D.D. Mayo Adhesive Probability Score: An Accurate Image-based Scoring System to Predict Adherent Perinephric Fat in Partial Nephrectomy. *Eur. Urol.* **2014**, *66*, 1165–1171, doi:10.1016/j.eururo.2014.08.054.
33. Castillo-Rodriguez, E.; Fernandez-Prado, R.; Martin-Cleary, C.; Pizarro-Sánchez, M.S.; Sanchez-Niño, M.D.; Sanz, A.B.; Fernandez-Fernandez, B.; Ortiz, A. Kidney Injury Marker 1 and Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin in Chronic Kidney Disease. *Nephron* **2016**, *136*, 263–267, doi:10.1159/000447649.
34. Srisawat, N.; Kellum, J.A. The Role of Biomarkers in Acute Kidney Injury. *Crit. Care Clin.* **2020**, *36*, 125–140, doi:10.1016/j.ccc.2019.08.010.
35. Moledina, D.G.; Parikh, C.R. Phenotyping of Acute Kidney Injury: Beyond Serum Creatinine. *Semin. Nephrol.* **2018**, *38*, 3–11, doi:10.1016/j.semnephrol.2017.09.002.
36. Paragas, N.; Qiu, A.; Zhang, Q.; Samstein, B.; Deng, S.-X.; Schmidt-Ott, K.M.; Viltard, M.; Yu, W.; Forster, C.S.; Gong, G.; et al. The Ngal reporter mouse detects the response of the kidney to injury in real time. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 216–222, doi:10.1038/nm.2290.
37. Kashani, K.; Cheungpasitporn, W.; Ronco, C. Biomarkers of acute kidney injury: The pathway from discovery to clinical adoption. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2017**, *55*, 1074–1089, doi:10.1515/cclm-2016-0973.
38. Albert, C.; Zapf, A.; Haase, M.; Röver, C.; Pickering, J.W.; Albert, A.; Bellomo, R.; Breidthardt, T.; Camou, F.; Chen, Z.; et al. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Measured on Clinical Laboratory Platforms for the Prediction of Acute Kidney Injury and the Associated Need for Dialysis Therapy: A Systematic Review and Meta-analysis. *Am. J. Kidney Dis.* **2020**, *76*, 826–841.e1, doi:10.1053/j.ajkd.2020.05.015.
39. Suzuki, J.; Jin, Z.-G.; Meoli, D.F.; Matoba, T.; Berk, B.C. Cyclophilin A Is Secreted by a Vesicular Pathway in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circ. Res.* **2006**, *98*, 811–817, doi:10.1161/01.res.0000216405.85080.a6.
40. Su, Z.; Lin, M.; Zhang, H.; Li, J.; Wu, M.; Lv, H.; Wang, J.; Xie, S. The Release of Cyclophilin A from Rapamycin-Stimulated Vascular Smooth Muscle Cells Mediated by Myosin II Activation: Involvement of Apoptosis but Not Autophagy. *J. Vasc. Res.* **2020**, *57*, 254–260, doi:10.1159/000506685.
41. Kuo, P.; Lin, C.; Chen, T.; Hung, T.; Lin, H.; Chiu, H.; Chiang, C.; Lin, F.; Fu, E. Fibroblast-enhanced cyclophilin A releasing from U937 cell upregulates MMP-2 in gingival fibroblast. *J. Periodontal Res.* **2020**, *55*, 705–712, doi:10.1111/jre.12759.
42. Ramachandran, S.; Venugopal, A.; Charles, S.; Chandran, N.P.; Mullassari, A.; Pillai, M.R.; Kartha, C.C. Proteomic profiling of high glucose primed monocytes identifies cyclophilin A as a potential secretory marker of inflammation in type 2 diabetes. *Proteom.* **2012**, *12*, 2808–2821, doi:10.1002/pmic.201100586.
43. Seko, Y.; Fujimura, T.; Taka, H.; Mineki, R.; Murayama, K.; Nagai, R. Hypoxia followed by reoxygenation induces secretion of cyclophilin A from cultured rat cardiac myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *317*, 162–168, doi:10.1016/j.bbrc.2004.03.021.
44. Jun, J.H.; Song, J.W.; Shin, E.-J.; Kwak, Y.-L.; Choi, N.; Shim, J.-K. Ethyl pyruvate is renoprotective against ischemia-reperfusion injury under hyperglycemia. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **2018**, *155*, 1650–1658, doi:10.1016/j.jtcvs.2017.10.069.
45. Martin-Sanchez, D.; Ruiz-Andres, O.; Poveda, J.; Carrasco, S.; Cannata-Ortiz, P.; Sanchez-Niño, M.D.; Ortega, M.R.; Egado, J.; Linkermann, A.; Ortiz, A.; et al. Ferroptosis, but Not Necroptosis, Is Important in Nephrotoxic Folic Acid-Induced AKI. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2016**, *28*, 218–229, doi:10.1681/asn.2015121376.
46. Dear, J.W.; Leelahavanichkul, A.; Aponte, A.; Hu, X.; Constant, S.L.; Hewitt, S.M.; Yuen, P.S.; Star, R.A. Liver proteomics for therapeutic drug discovery: Inhibition of the cyclophilin receptor CD147 attenuates sepsis-induced acute renal failure*. *Crit. Care Med.* **2007**, *35*, 2319–2328, doi:10.1097/01.ccm.0000281858.44387.a2.
47. Sanchez-Niño, M.-D.; Benito-Martin, A.; Ortiz, A.; Arduan, A.O. New paradigms in cell death in human diabetic nephropathy. *Kidney Int.* **2010**, *78*, 737–744, doi:10.1038/ki.2010.270.

- Martín-Sánchez D; Fontecha-Barriuso M; Sánchez-Niño MD; Ramos AM; **Cabello R**; González-Enguita C; Linkermann A; Sanz AB; Ortiz A. Cell death-based approaches in treatment of the urinary tract-associated diseases: a fight for survival in the killinf fields. *Cell death & disease*. 01/2018. doi: 10.1038/s41419-017-0043-2. PubMed PMID: 29371637.
- Fontecha-Barriuso M; Martín-Sánchez D; Martínez-Moreno JM; Carrasco S; Ruiz-Andrés O; Monsalve M; Sánchez-Ramos C; Gómez MJ; Ruiz-Ortega M; Sánchez-Niño MD; Cannata-Ortiz P; **Cabello R**; González-Enguita C; Ortiz A; Sanz AB. PGC-1 alpha deficiency causes spontaneous kidney inflammation and increases the severity of nephrotoxic AKI. *Journal Of Pathology*. 09/2019.doi: 10.1002/path.5282. PubMed PMID: 30982966.

