

TESIS DOCTORAL

ACTIVACIÓN DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO EN LA INSUFICIENCIA RENAL AGUDA Y SU RELACION CON OTRAS VÍAS INFLAMATORIAS

Autora

Eva Rodríguez García

Directores

Dr. Julio Pascual Santos

Dra. Mercè Cladellas Capdevila

Dr. Julio Pascual Santos

Eva Rodríguez García

Dra Mercè Cladellas Capdevila

Programa de Doctorado en Medicina
Departamento de Medicina – Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Barcelona
Barcelona, Junio 2015

INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	6
ABREVIATURAS.....	8
I. INTRODUCCIÓN	10
EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO.....	11
PROTEÍNAS REGULADORAS DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO	14
PAPEL DEL FACTOR H EN LA REGULACIÓN DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO	16
MECANISMOS DE ACTIVACIÓN DEL COMPLEMENTO EN EL RIÑÓN Y ENFERMEDAD RENAL.	19
INSUFICIENCIA RENAL AGUDA MEDIADA POR EL COMPLEMENTO. Evidencias actuales.....	23
RELACIÓN ENTRE EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO Y OTRAS VÍAS DE INFLAMACIÓN	27
MOTIVOS PARA ESTUDIAR EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO EN LA IRA.....	30
2. HIPÓTESIS.....	32
3. OBJETIVOS	34
4. MATERIAL Y MÉTODOS.	36
4.1. POBLACION A ESTUDIO	36
4.2. DISEÑO DEL ESTUDIO Y SELECCIÓN DE PACIENTES.....	36
4.3. DEFINICIONES UTILIZADAS:.....	39
4.4. MUESTRAS DE PLASMA	40
4.5. DETERMINACIONES Y TÉCNICAS UTILIZADAS EN LAS MUESTRAS PLASMATICAS.....	40
4.6. MUESTRAS DE TEJIDO RENAL.....	41
4.6.2. Valoración de las muestras de tejido renal.....	43
4.7. SUBESTUDIO EN TRASPLANTE RENAL	43
4.8. ESTADISTICA.....	44
5.1. CARACTERÍSTICAS BASALES DE LA MUESTRA	46
5.2. DETERMINACIONES PLASMATICAS DEL COMPLEJO ATAQUE DE MEMBRANA.	49
5.2.1. Resultados plasmáticos de MAC en la muestra global.	53
5.2.2. Resultados plasmáticos MAC en el grupo de IRA 2º isquemia-reperusión	76

5.3. RESULTADOS INMUNOHISTOQUIMICA ENZIMATICA EN TEJIDO RENAL PROCEDENTE DE AUTOPSIA.	83
5.3.2. Tincion inmunohistoquímica factor H humano.	86
5.4. SUBESTUDIO EN SUBGRUPO DE PACIENTES CON TRASPLANTE RENAL.....	89
6. DISCUSION.....	95
6.1. RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS EN MUESTRAS PLASMATICAS.....	95
6.2. RESULTADOS DE TINCION INMUNOHISTOQUIMICA EN TEJIDO RENAL.....	106
6.3. RESULTADOS DEL SUBESTUDIO EN TRASPLANTE RENAL.....	108
7. CONCLUSIONES.....	110
8. LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS.....	112
9. BIBLIOGRAFIA.....	114

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

IRA: Insuficiencia Renal Aguda.

NTA: Necrosis Tubular Aguda.

MAC: Complejo Ataque de Membrana.

IL-6: interleuquina 6

IL-10: intereleuquina 10

NGAL: Lipocalina Asociada a Gelatinasa de Neutrófilos.

I/R: Isquemia/Reperfusión.

SIRS: Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica.

CARS: Síndrome de Respuesta Compensatoria Sistémica.

HTA: Hipertensión Arterial.

DM2: Diabetes mellitus tipo 2.

TRS: Tratamiento Renal Sustitutivo.

FRI: Función Renal Inmediata.

FRR: Función Renal Retardada.

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

Desde hace más de 30 años sabemos que el sistema del complemento está activado en distintas enfermedades renales. En 1989, Feutch et al¹ aislaron por primera vez C4 en el córtex renal de riñones humanos sanos, sustentando la hipótesis de que la presencia de componentes del sistema del complemento a nivel renal es un hallazgo inherente a la patología renal humana. Esto sucedió un año después de la publicación por Passwell et al² del hallazgo en el tejido renal de ratones con nefritis lúpica de una elevada expresión de RNA mensajero de C4, C2, C3 y factor B, todos ellos componentes del sistema del complemento. Más recientemente, el estudio con inmunofluorescencia del depósito de inmunocomplejos en biopsia renal de pacientes afectados de distintos tipos de glomerulonefritis mediadas por anticuerpos ha confirmado la activación de este sistema³. Actualmente, no hay dudas de que el sistema del complemento puede estar activado en el riñón por diferentes mecanismos y producirse en distintas localizaciones intra-renales⁴.

El sistema del complemento es una parte esencial del sistema inmune innato, y constituye la primera línea de defensa del organismo frente a infecciones; actúa produciendo la eliminación de patógenos, y colabora en la reparación de tejidos en algunas situaciones especiales⁵. Por otra parte, existen múltiples estudios que demuestran que la activación incontrolada de este sistema es responsable del daño autólogo, existiendo múltiples líneas de evidencia que implican esta activación del sistema del complemento como la causa de daño renal en distintas enfermedades como detallaremos a continuación.

EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

En términos evolutivos, el sistema del complemento es uno de los más antiguos componentes del sistema inmune innato. Actúa como una primera línea de defensa frente a infecciones bacterianas, víricas y fúngicas⁶, y está formado por un conjunto de más de 30 proteínas que se activan rápidamente en forma de “cascada” y presentan una considerable variabilidad tanto a nivel genético como estructural^{7,8}. La activación del sistema del complemento es un proceso estrechamente regulado que requiere la activación secuencial y organizada de un conjunto de proteínas para activar el efector molecular involucrado en la defensa del huésped, el aclaramiento de patógenos y la modulación de la respuesta inflamatoria⁹. Esta compleja red de proteínas puede ser activada a través de tres vías diferentes: clásica, alternativa y vía de la lecitina, las cuales convergen en la formación de la fracción C3 y posteriormente en la formación de productos activados C3a, C3b, C5a, y el complejo ataque de membrana, formado por la unión de C5b-C9 (Figura 1).

La vía clásica se activa a través del reconocimiento de antígenos de proteínas de “vigilancia” como inmunoglobulinas (IgM o IgG) o proteína C-reactiva, que forman inmunocomplejos capaces de unirse a C1q. Posteriormente, C1q da lugar a las fracciones activadas C1r y C1s, las cuales son las responsables finales de la escisión de C4 y de la formación de C3 convertasa.

La vía de la lecitina se activa a través de la unión de los carbohidratos de las superficies o membranas de los patógenos y la lectina de unión a manosa (MBL) o ficolinas. Ambas, MBL y ficolinas circulan unidas a las proteínas-asociadas a MBL (MASPs), las cuales, tras ser activadas, permiten la formación y autoactivación de MASP2, proteína responsable de la escisión de C4 en la vía de la lecitina. Al igual que en la vía clásica, C4 divide C2 activando C3 convertasa (C4bC2a)¹⁰.

La vía alternativa se activa a través de la unión directa entre la fracción C3 hidrolizado y la superficie de membranas bacterianas. Existe un proceso fisiológico llamado “tick-over” consistente en un “loop” de amplificación de la vía alternativa, mediante el cual, y de manera fisiológica, siempre hay un cierto grado de activación de

la vía alternativa, es decir siempre hay C3b en plasma, a concentraciones bajas, lo que permite una defensa rápida de nuestro organismo un frente a patógenos.

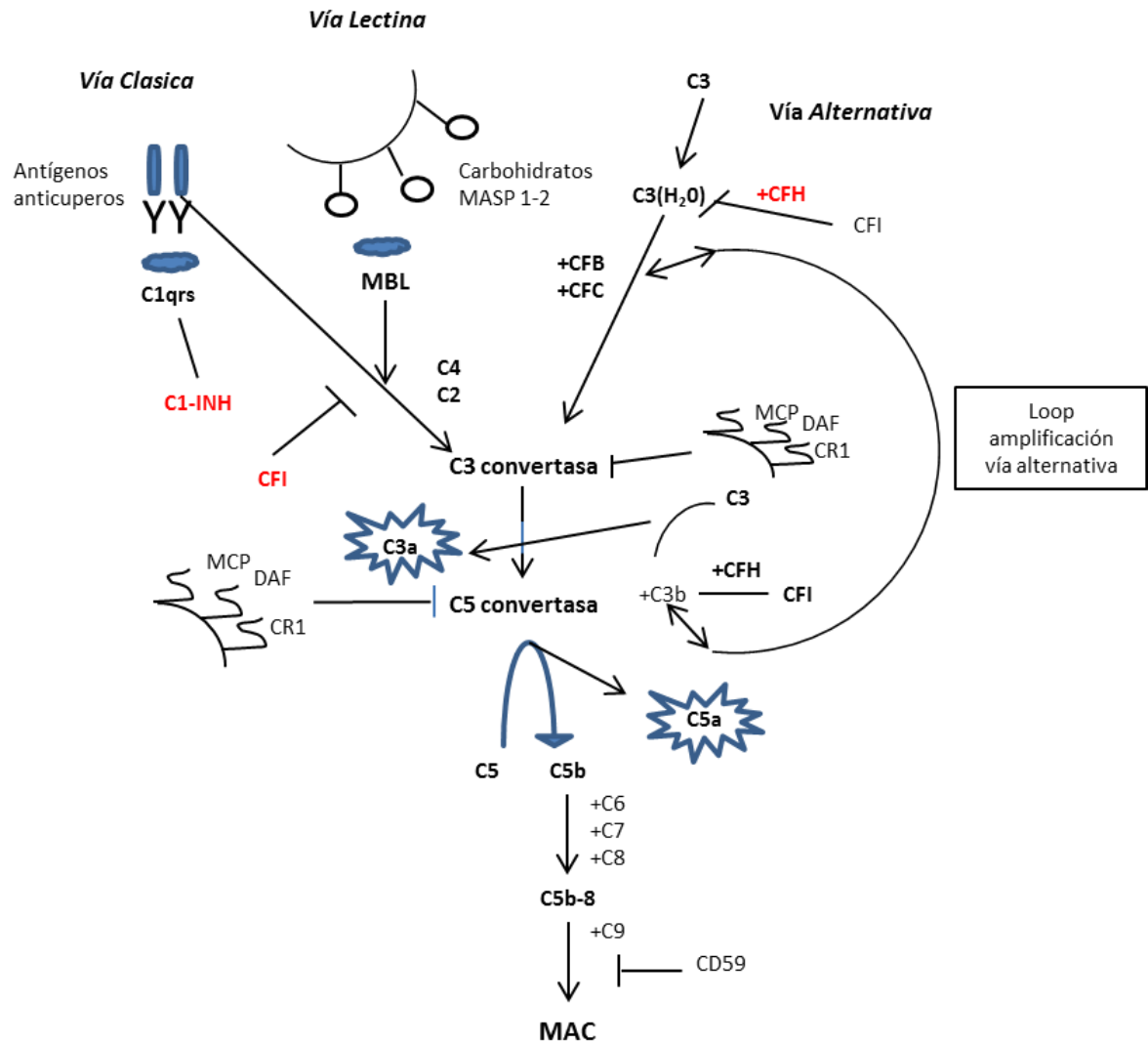


Figura 1. Sistema del Complemento.

C1-INH: inhibidor C1, **MASP:** proteínas asociadas a MBL; **MBL:** Lectina de unión a Manosa; **CFI:** cofactor Factor I; **CFH:** factor H; **MCP:** proteína cofactor de membrana; **DAF:** decay-accelerating factor; **CR1:** receptor C3b; **CFB:** Factor B, **CFD:** Fctor D

Las principales funciones del sistema del complemento son el reconocimiento selectivo de patógenos y de células autólogas dañadas; para ello utiliza las moléculas de reconocimiento de las 3 vías que forman el sistema del complemento. Aunque activadas por distintas interacciones moleculares, estas vías generan las mismas moléculas efectoras. Los efectos inflamatorios del complemento están principalmente mediados por C3a, C5a, C3b y C5b-C9.

C3a y C5a son moléculas solubles que actúan como ligando de receptores; C3b puede unirse covalentemente a superficies celulares y tisulares, actuando también como ligando de receptores. C5b-C9 es un complejo multimérico que forma poros en las membranas. Otro modo de explicarlo es que este sistema genera principalmente tres tipos de moléculas efectoras¹¹:

- (a) Anafilotoxinas (C3a y C5a): potentes moléculas proinflamatorias capaces de atraer y activar leucocitos a través de la interacción con sus receptores acoplados a proteínas G, receptor C3 (C3aR) y receptor C5a (C5aR).
- (b) Oponinas (C3b, iC3b y C3d) las cuales se fijan en las superficies objetivo (opsonizar) a través de enlaces covalentes para facilitar el transporte y la eliminación de las células o inmunocomplejos.
- (c) Complejo Ataque Membrana o C5b-C9 que directamente lisa las células marcadas u opsonizadas.

El MAC es un complejo multimérico que forma una estructura en forma de poro capaz de depositarse en las membranas celulares “perforándolas” (Figura 2). El tamaño de estos poros es aproximadamente 10 nm de diámetro, aunque pueden variar. Según la concentración de estos poros en la membrana celular, pueden causar, o bien lisis celular directa si la concentración es elevada o lítica, o activación celular, si la concentración de MAC es sublítica¹². A concentraciones sublíticas, se induce daño celular con activación de interleuquinas inflamatorias, reclutamiento de neutrófilos y activación de vías específicas de señalización que incluyen proteína quinasas, fosfolipasas, especies reactivas de oxígeno (ROS), factores de transcripción, factores de crecimiento, proteinasas y vías de stress¹³.

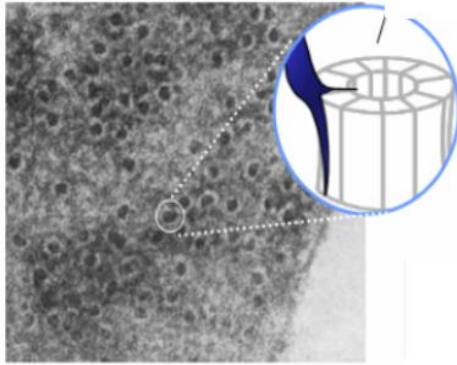


Figura 2. Poros por depósito de MAC en membrana eritrocitaria.

Como resultado, estas vías influyen sobre vías metabólicas, la estructura y función de los lípidos y del citoesqueleto, actúan sobre la capacidad de filtración de la hendidura diafragmática podocitaria y sobre otros compartimentos renales^{14 15 16}.

PROTEÍNAS REGULADORAS DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

Una de las funciones más importantes del sistema del complemento es discriminar entre células patógenas y huéspedes para evitar el daño autólogo mediado por complemento; y para ello, además de estas proteínas involucradas en la activación de la cascada del complemento, el sistema está formado por una serie de proteínas solubles (Factor H, C4BP e inhibidor-C1) y proteínas de membrana (CD35 ó CR1, CD46 ó MCP CD55 y CD59 ó DAF) que actúan como proteínas reguladoras para prevenir la excesiva activación de la vía del complemento¹⁷ (Tabla 1).

Estos reguladores del sistema del complemento actúan bien como cofactores del Factor I en la proteólisis de las convertasas C3 y C5 o bien directamente acelerando la escisión-activación de ambas convertasas.

El receptor 1 del complemento (CR1, CD35), que es el receptor de C3b, se encuentra en la superficie de eritrocitos, neutrófilos, células dendríticas y linfocitos T y B, controla la activación del complemento actuando como cofactor del Factor I o

inhibiendo directamente las convertasas de las vías clásica y alternativa. De igual manera, CD46 (MCP, proteína cofactor de membrana) tiene un papel dual actuando como cofactor del Factor I y promoviendo la degradación C3, mientras que CD55 (decay-accelerating factor) solo parece estar implicado en acelerar la fragmentación de C3 convertasa. CD59 (protectina) actúa a través de la unión al complejo C5b-C8 inhibiendo el ensamble del complejo ataque de membrana (MAC o C5b-C9)¹⁷.

Las proteínas reguladoras solubles C4BP y Factor H ejercen su acción reguladora sirviendo como cofactores del Factor I y acelerando la fragmentación de la convertasa^{18 19}. Por último, el inhibidor circulante C1 (C1-INH) es una serinoproteína que inactiva las proteasas C1r, C1s, MASP1 y MASP2 previniendo principalmente la activación de la cascada a través de la vía clásica y de la lecitina, aunque recientes evidencias sugieren que podría ejercer alguna actividad inhibitoria sobre la vía alternativa²⁰.

Proteína Reguladora	Función	Localización
C1 inhibidor	Inactiva C1s, C1r, MASP-1, MASP-2	Plasma
MCP	Cofactor de FI para escisión de C3b y Ca4b	Proteína de membrana
DAF	Desestabiliza convertasas C3 y C5 ; Factor acelerador de la degradación	Proteína de membrana
CR1	Cofactor de FI para escisión de C3b y Ca4b	Proteína de membrana
C4BP	Unión a C4, factor acelerador de la degradación y cofactor de actividad	Plasma
Factor H	Acelerador de la degradación convertasa C3 y C5 vía alternativa; cofactor de actividad	Plasma
Trombomodulina	Aumenta la actividad cofactor de FH	Proteína de membrana
Factor I	Degrada C3b y C4b	Plasma
CD59	Bloquea la unión C9 a C5b-C8, impide formación C5b-C9	Proteína de membrana
Vitronectina	Une C5b-C7, inhibe polimerización C9	Plasma
Clusterina	Une C5b-C7, inhibe la formación de C5b-C9	Plasma

Tabla 1. Proteínas reguladoras del Sistema del Complemento.

La importancia de la alteración del Factor H es cada vez mayor en la patología de las enfermedades ligadas o relacionadas con el sistema del complemento como detallaremos a continuación.

PAPEL DEL FACTOR H EN LA REGULACIÓN DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

El Factor H es una abundante glicoproteína sérica que se sintetiza a nivel hepático^{21 22} y puede ser expresada localmente por una gran variedad de tipos celulares, incluyendo células epiteliales retinianas²³, células endoteliales²⁴, células epiteliales²⁵, plaquetas²⁶ y células mesenquimales²⁷, entre otras. Tiene una concentración en plasma aproximada de 500 μ /mL aunque estas concentraciones pueden presentar variaciones importantes según factores genéticos y ambientales^{28 29}. La función principal del Factor H es acelerar la descomposición de la vía alternativa a nivel de la C3 convertasa y actúa además, como cofactor de Factor I en la inactivación de C3b³⁰. En ausencia de Factor H, se produce una activación espontánea del complemento en plasma, lo que da lugar al consumo de componentes del complemento como C3b y Factor B³¹. El factor H reconoce marcadores específicos en las células huésped para controlar la activación del complemento en sus superficies. La vía alternativa puede activar y amplificar de manera eficiente el sistema del complemento en cualquier superficie que no esté adecuadamente “protegida” por una de las proteínas de membrana del grupo de reguladores del complemento. Para este mecanismo de “reconocimiento reverso”, es esencial el correcto funcionamiento del Factor H³², porque reconoce y se une a los depósitos iniciales de C3b en combinación con marcadores específicos de la célula huésped y esto inhibe la acción lítica del complemento. En caso de que el Factor H no reconozca o bien no se produzca una unión eficiente con C3b en la membrana de la célula huésped, se producirá activación de la vía alternativa del complemento que conducirá a la lisis de la célula por depósito de MAC³³ (Figura 3.)

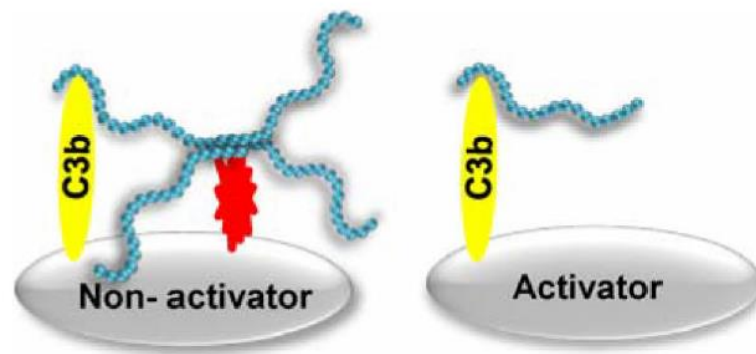


Figura 3. Mecanismo de reconocimiento del Factor H. Las células humanas poseen estructuras poliónicas en la membrana (rojo) con elevada afinidad por el Factor H, al cual se unen formando tetrámero; los patógenos carecen de esta estructura por lo cual el Factor H no se une y como resultado C3b puede activarse. Modificado de Ferreira et al.³²

La naturaleza química de los “marcadores” de las células huésped no está bien determinada, aunque existen evidencias de que pueda tratarse de sustancias poliónicas; por ejemplo, en las células de carnero que fijan Factor H y están protegidas frente a la acción del sistema del complemento humano, éste puede activarse a través de la vía alternativa, en caso de extraer el ácido siálico de la superficie celular³⁴. También sabemos que otras estructuras de características poliónicas, como el sulfato de heparina y los glucosaminoglicanos de las cadenas de proteoglicanos (heparan y dermatan sulfatos), son capaces de aumentar o amplificar el control de la activación del complemento a través del Factor H³⁵.

Otro mecanismo a través del cual el Factor H colabora en el normal reconocimiento de las células huésped es participando en la función de “muerte programada celular”. Durante este proceso, el Factor H es capaz de reconocer y unirse a marcadores expuestos en la superficie celular de células en apoptosis³⁶. El objetivo de la participación del sistema del complemento en este proceso de muerte celular es conseguir una correcta opsonización y extracción eficiente de las células muertas, limitando la excesiva activación del complemento durante este proceso³⁷.

Se ha descrito que algunas células huésped como los neutrófilos, linfocitos B, monocitos y plaquetas, expresan en su superficie receptores de Factor H, pudiendo estar relacionado en mecanismos como la adhesión celular y la inducción de citoquinas³⁸.

Es importante resaltar que la acción normal del Factor H reconociendo células huésped no solo controla la activación del complemento durante la homeostasis normal, sino que cobra especial relevancia en proteger y limitar el daño mediado por complemento a nivel celular y tisular en procesos patológicos mediados por esta vía.

Existen evidencias clínicas que indican que las mutaciones alélicas que afectan a los dominios del Factor H implicados en el reconocimiento celular son responsables de un “inadecuado reconocimiento” por parte del Factor H. Este mecanismo alterado constituye la etiopatogenia de una serie de enfermedades “mediadas por complemento”, como son el Síndrome Hemolítico Urémico Atípico (SHUa²⁹), la degeneración macular relacionada con la edad³⁹ y la recientemente “redefinida” Nefropatía C3⁴⁰.

La activación inapropiada del sistema del complemento o su “disregulación” dará lugar a daño tisular autólogo. Este es el mecanismo recientemente descubierto de la etiopatogenia del SHUa⁴¹, en el que más del 60% de los afectados presentan mutaciones genéticas de algunas de las proteínas reguladoras del complemento, especialmente relacionadas con el Factor H, aunque también se han descrito asociadas a MCP, CFI o la presencia de anticuerpos anti-FH⁴². Se han descrito familias con afectaciones de dos ó más genes relacionados, lo que explica formas clínicas más complejas y graves⁴³.

MECANISMOS DE ACTIVACIÓN DEL COMPLEMENTO EN EL RIÑÓN Y ENFERMEDAD RENAL

Existen estudios en modelos animales y algunos en humanos que muestran que en el riñón, el complemento puede activarse a través de las tres vías, dando lugar a una serie de patologías específicas.

- ***Vía Clásica del Complemento***

Los anticuerpos e inmunocomplejos activan la vía clásica del complemento en las enfermedades mediadas por inmunocomplejos, prototipo de las cuales es el Lupus Eritematoso Sistémico (LES). La proteína C4 forma parte de este sistema y su depósito en las biopsias de estos pacientes se detecta de manera rutinaria en la práctica clínica. Otra patología en la que la valoración de los depósitos de C4d se ha integrado en el diagnóstico y constituye un criterio diagnóstico es en el rechazo del aloinjerto mediado por anticuerpos⁴⁴ donde el depósito peritubular de C4d representa la activación del sistema a través de la unión entre anticuerpos y antígenos endoteliales.

- ***Vía de Lectina unida a Manosa del Complemento***

En los últimos años distintos estudios han sugerido la implicación de esta vía en la fisiopatología de diferentes enfermedades renales⁴⁵, especialmente la nefropatía IgA, en la que la inmunoglobulina IgA es capaz de activar la vía directamente⁴⁶, o bien a través de la unión con neoepítomos generados en el tejido renal dañado⁴⁷.

- ***Vía Alternativa del Complemento***

Como se ha comentado anteriormente, uno de los más importantes avances en los últimos años sobre este tema, es el descubrimiento de que tanto el SHUa como la recientemente descrita nefropatía C3, son enfermedades debidas a disregulación en la vía alternativa del complemento^{40 29}. Además, estudios en modelos animales sugieren que esta vía contribuye al daño renal en las vasculitis asociadas ANCA y en la hialinosis focal y segmentaria^{48 49}, que causa daño tubular en enfermedades renales crónicas proteinúricas⁵⁰ y que podría estar implicada en el daño renal por isquemia aguda⁵¹.

- **La activación del Complemento como fenómeno patogénico primario o secundario en las enfermedades renales.**

Además de que existen enfermedades renales cuya fisiopatología se debe a la disregulación del sistema del complemento como fenómeno primario, existen una serie de enfermedades renales, en cuya etiopatogenia la activación del complemento parece que juega un papel secundario, como serían las enfermedades mediadas por inmunocomplejos, la nefropatía IgA, nefropatía membranosa, vasculitis ANCA y daño renal por isquemia aguda (isquemia-reperfusión). Esta categorización de las enfermedades, puede ayudarnos por ejemplo, para discernir en qué casos la terapia con inhibidores del complemento tendría indicación como primera línea o bien como tratamiento adyuvante. Desafortunadamente, estas diferencias no son absolutas. En la Enfermedad por Depósitos Densos, producida por disregulación directa del sistema del complemento, se ha descrito que el factor nefrítico C3 (C3nef), un inmunocomplejo, podría tener un relevante papel en su etiopatogenia⁵².

En la tabla 2 se muestra de manera resumida en que enfermedades renales se ha descrito alteración sérica, depósito tisular y/o alteración genética de alguno de los componentes del sistema del complemento (Tabla 2).

Enfermedad	Niveles plasmáticos	Biopsia Renal	Asociación Genética
Nefritis Lúpica	✓	✓	✓
GNMP I	✓	✓	✓
GNMP II	✓	✓	✓
Nefropatía IgA		✓	
Vasculitis ANCA			
Post-estreptocócica	✓	✓	
GN Membranosa		✓	
FSGS		✓	
N. Diabética		✓	
IRA isquémica		✓	
Enfermedad proteinúrica		✓	
Rechazo Humoral		✓	
Rechazo Celular			
SHUa	✓	✓	
TTP			✓
HELLP			✓

Tabla 2. Enfermedades renales en las que se ha descrito alteración sérica, depósito tisular y/o alteración genética de alguno de los componentes del sistema del complemento. **GNMP:** glomerulonefritis membranoproliferativa; **FSGF:** Glomeruloesclerosis Focal y Segmentaria; **TTP:** púrpura trombótica trombocitopénica; **HELLP:** síndrome de HELLP

Papel etiopatogénico del Complemento en enfermedad renal: evidencias.

Numerosos experimentos en modelos animales han demostrado el papel patogénico de esta activación en la glomerulonefritis membranoproliferativa tipo I y en la nefropatía membranosa^{53 54}. Recientemente, estudios en animales que presentan delección genética de algunas de las proteínas del sistema o de alguno de sus inhibidores, han demostrado la implicación en el daño renal en enfermedades no esperadas como la Isquemia-reperfusión⁵¹.

No obstante, es el éxito que ha tenido el tratamiento de algunas de estas enfermedades con inhibidores de proteínas reguladoras del sistema del

complemento⁵⁵, la mejor evidencia del papel etiopatogénico del sistema del complemento. Actualmente, se encuentran activos diferentes ensayos clínicos que incluyen tanto distintos tipos de glomerulonefritis como trasplante renal.

La activación del complemento genera distintos productos proinflamatorios, los cuales son capaces de generar daño en cada uno de los compartimentos renales dando lugar a distintas patologías. Existen estudios en animales que han demostrado diferencias en la enfermedad inducida, según la molécula implicada sea C3a^{56 57}, C5a⁵⁸ y C5b-C9⁵⁹.

Un importante problema no resuelto actualmente es cómo determinar la activación del complemento en un paciente. Esta activación puede ser inferida a través de hallazgos clínicos, incluyendo el depósito tisular de proteínas del complemento, alteraciones en los niveles circulantes de C3 y C4 durante los brotes de determinadas enfermedades⁶⁰, detección de fragmentos activados del complemento, (C3a, C3d, Bb, C5a, C5b-C9) en plasma u orina, y la asociación de mutaciones y polimorfismos de proteínas del complemento en el desarrollo de la enfermedad.

Aunque actualmente de manera rutinaria solo podemos realizar determinaciones plasmáticas de C3 y C4, la detección de fragmentos del complemento podría ser útil para confirmar activación intra-renal del complemento. Un ejemplo es en la nefropatía lúpica, en la que se ha descrito que la determinación de C3a tiene una mayor sensibilidad que C3 como marcador de actividad, siendo incluso capaz de predecir brotes de enfermedad renal^{61 62}. También se ha descrito el aumento en los niveles circulantes de C3a en pacientes con Nefropatía IgA, una enfermedad en la que clásicamente no se habían descrito variaciones en los niveles de C3^{63 64}.

Asimismo, se ha demostrado que se puede determinar la concentración urinaria de C5b-C9 en pacientes con nefropatía Membranosa, otra enfermedad en la que los niveles plasmáticos de C3 no están alterados⁶⁵. Las concentraciones plasmáticas de C5b-C9 están siendo utilizadas como marcador de actividad en SHUa y para monitorizar la respuesta a tratamiento con el inhibidor de C5 eculizumab⁶⁶.

INSUFICIENCIA RENAL AGUDA MEDIADA POR EL COMPLEMENTO. Evidencias actuales.

La activación intrarenal del sistema del complemento tras fenómenos de isquemia-reperfusión (I/R) se caracterizó originalmente por la detección mediante técnicas de inmunohistoquímica renal en modelos murinos de activación de C3, objetivándose depósito de C3 a lo largo de la membrana tubular tras I/R y ausencia de ese depósito en los capilares peritubulares y a nivel glomerular^{51 67 68 69}. (Figura 4)

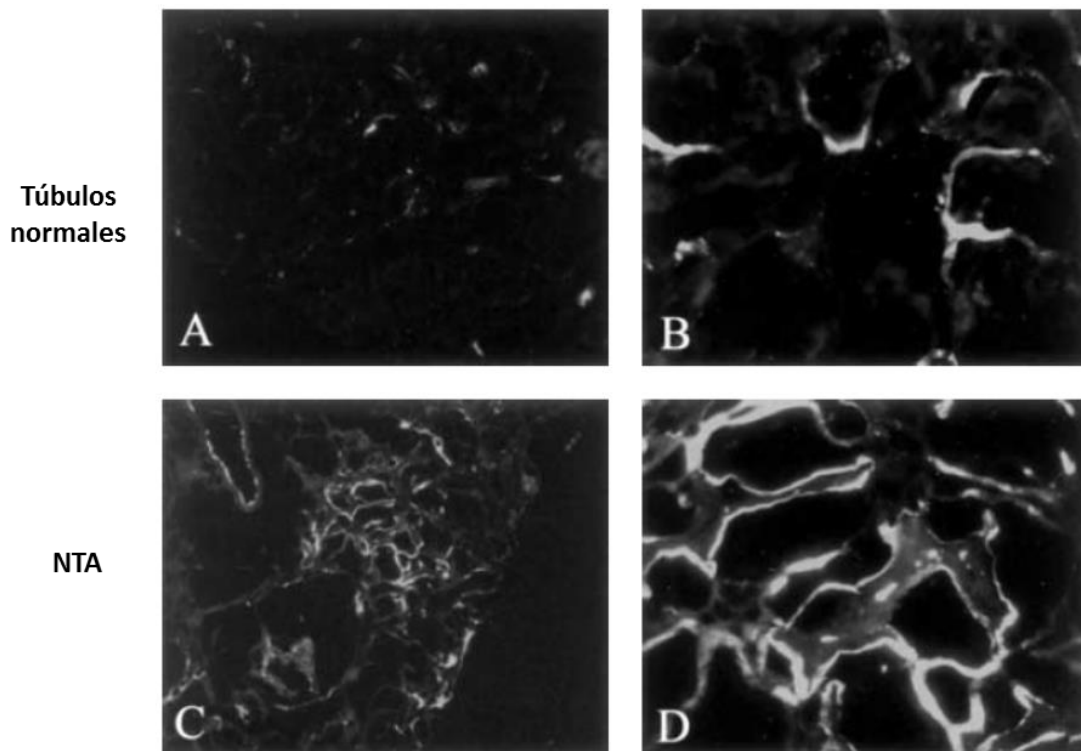


Figura 4. Depósito C3 en túbulos normales y NTA. Low power *100(A) y high power view *400 (B) de C3d en el intersticio tubular de riñones normales, mostrando discretos y dispersos depósitos C3d. Low (C) and high (D) de C3d en el intersticio tubular de riñones con NTA mostrando depósitos grandes con afectación total del diámetro tubular. Modificado de Thurman et al.⁴⁹

En biopsias renales humanas con evidencia histológica de necrosis tubular aguda, también se ha evidenciado este depósito de C3 en la membrana basal tubular⁶⁷. De manera similar, se habían descrito en modelos murinos depósitos parcheados túbulointersticiales de C3, aunque este depósito es más extenso en NTA. Existen una serie de condiciones que favorecen de forma basal la activación de la vía alternativa en el riñón. Por ejemplo, las proteínas del complemento en el plasma, se concentran a través de la filtración en el glomérulo; además, la activación de la vía alternativa está promovida en las células epiteliales a través de la síntesis de amonio, el cual puede formar de manera no enzimática un enlace tioester con C3⁷⁰. Esta modificación nucleofílica de C3 puede formar una molécula con propiedades C3b-like que es capaz de actuar como una convertasa⁷⁰. El ambiente ácido también promueve la activación de la vía alternativa en la superficie de las células tubulares⁷¹.

Existen múltiples mecanismos a través de los cuales el sistema del complemento puede dañar o activar a las células huésped. Las moléculas circulantes pueden unirse o bien reconocer “señales moleculares” generadas en los tejidos dañados. Por ejemplo, moléculas inmunes como la proteína C reactiva, lectinas y anticuerpos naturales pueden reconocer marcadores de daño y activar la vía del complemento. Todas las células del organismo expresan proteínas reguladoras del complemento, y la expresión de estas proteínas puede estar interrumpida por el daño tisular⁷².

Cada vez hay más evidencias de que la activación del complemento juega un papel importante en la patogénesis de la insuficiencia renal aguda (IRA), si bien estas evidencias derivan de estudios en modelos murinos y en cultivo celular ya que no existen prácticamente datos publicados en IRA humana.

De manera clásica, los experimentos de clampaje de arterias renales en animales para inducir daño por isquemia-reperfusión, se han utilizado como modelo para el estudio de la IRA por necrosis tubular aguda (NTA) humana, aunque el daño

histológico extenso y severo que aparece en este modelo, no es realmente superponible al daño histológico observado en la IRA/NTA humana⁷³.

El daño por I/R es un mecanismo frecuente de daño renal que se produce en variedad de situaciones y que se caracteriza por una disminución de la perfusión renal; durante el período isquémico, los tejidos son privados del oxígeno y los nutrientes necesarios para mantener el normal metabolismo y la homeostasis del medio⁷⁴. Como resultado, el tejido se necrosa y libera una variedad de sustancias endógenas, capaces de estimular la respuesta inmune innata. Tras la restauración de la perfusión tisular, los ligandos endógenos procedentes de las células necróticas y apoptóticas activan el sistema inmune exacerbando la respuesta inflamatoria en el tejido dañado⁷⁵.

El mecanismo de I/R es capaz de promover rápidamente el reclutamiento y la activación de neutrófilos y macrófagos en el tejido dañado. Los neutrófilos activados migran desde la circulación periférica al tejido isquémico donde se activan liberando citoquinas pro-inflamatorias, quemoquinas y especies activadas de oxígeno (ROS), tanto local como sistémicamente, las cuales han demostrado tener un importante papel en la apoptosis y necrosis celular^{76 77}.

El sistema del complemento se asocia estrechamente a la respuesta inflamatoria^{78 79 80}. Aunque clásicamente se creyó que estaba solo involucrado en la respuesta frente a autoanticuerpos, datos recientes han proporcionado una nueva perspectiva sobre el papel de esta intrincada red en la respuesta inmune estéril en el daño y en la reparación tisular. El complemento también juega un importante papel en la producción de citoquinas por parte de las células epiteliales tubulares tras el daño por isquemia-reperfusión⁸¹. Así, el complemento contribuye al daño por I/R en múltiples niveles, incluyendo quimiotaxis de neutrófilos, daño endotelial y daño tubular directo mediado por C5b-C9.

Existen evidencias de que el MAC produce directamente lesión en las células tubulares epiteliales. Modelos murinos deficientes en C3-, C5- y C6- están protegidos frente al daño renal por I/R, mientras que esto no ocurre en ratones deficientes en C4-. Esto sugiere que es la vía alternativa del complemento, la que contribuye a este daño tubular, mientras que la vía clásica no parece tener una gran importancia. Por ejemplo,

en ratones C4-deficientes, incapaces de generar IgM o IgG, se ha demostrado daño renal por el MAC^{82 83}. Por otro lado, los ratones Factor B-deficientes, que no pueden activar la vía alternativa del complemento, muestran una marcada reducción tanto funcional como morfológica del daño por I/R⁵¹.

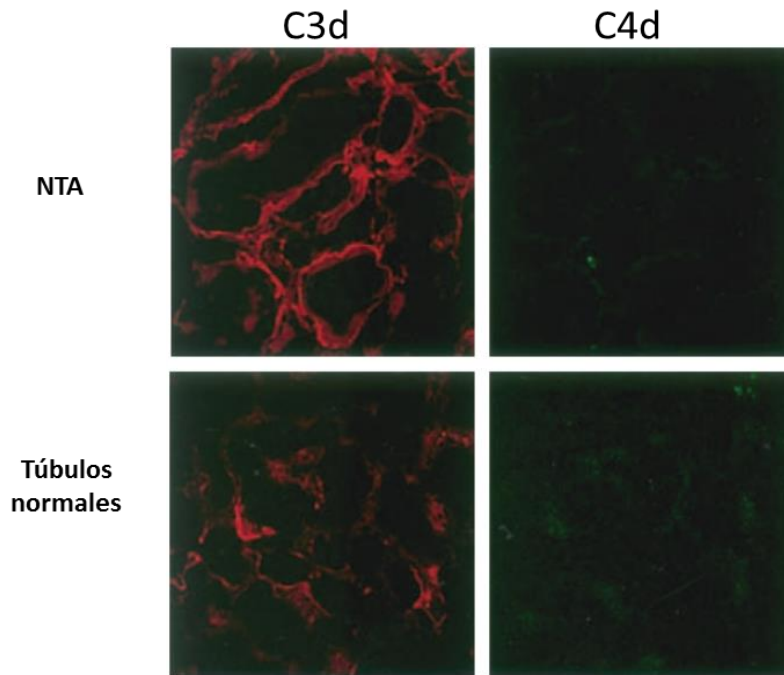


Figura 5. Inmunohistoquímica para C3d y C4d, adaptado de Thurman⁶⁷

Recientemente, el rol del complemento se ha estudiado en modelos murinos deficientes en C3a⁻ y C5aR⁻. Los ratones C5a⁻ y C3a⁺ C5aR⁻, están protegidos frente a la IRA y parece que los receptores expresados en las células tubulares y las células inflamatorias contribuyen al daño⁸⁴. El trabajo de Miwa et al⁸⁵ describe que la delección de genes de la vía alternativa (C3, FB, properdina, C3aR y C5aR), pero no C4 ni de la vía de la lectina, protegen frente al daño por I/R en ratones doble-knockout para DAF y CD59, sugiriendo que ambos, C5 y C5b-C9, son los responsables del daño tubular.

Otro ejemplo del papel del complemento en la IRA, lo podemos encontrar en el modelo de IRA nefrotóxica inducida por administración de cisplatino, en el que se ha

demostrado que los ratones deficientes en C5⁻ y C5aR⁻ están protegidos frente al daño renal agudo⁸⁶.

En la última década se han descubierto nuevas funciones del sistema del complemento, incluyendo la regulación de la respuesta inmune adaptativa, regeneración tisular y angiogénesis, movilización de células madres, desarrollo del sistema nervioso central y control del sistema de implantación embrionario⁸⁷.

RELACIÓN ENTRE EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO Y OTRAS VÍAS DE INFLAMACIÓN

Para añadir más complejidad a la acción del sistema del complemento, aquellos componentes del mismo con capacidad anafilotóxica y proinflamatoria (C3a y C5a) al igual que MAC a dosis sublétricas, son capaces de activar a través de la unión con receptores de superficie, otras vías inflamatorias promoviendo fenómenos como la activación leucocitaria, la quimiotaxis y el aumento de la permeabilidad vascular.

Evidencias recientes sugieren que el complemento podría jugar un importante papel en la presentación de antígenos a las células T naïve, además de en la activación y regulación de la respuesta aloinmune^{88 89 90}. En modelos animales sometidos a procesos de sepsis, se ha descrito una fuerte correlación entre los niveles plasmáticos de NGAL, IL-6, IL-10 y factor necrosis tumoral alfa (TNF α).⁹¹

En procesos isquémicos e inflamatorios, tanto los leucocitos como las células tubulares dañadas liberan múltiples citoquinas a la circulación desde el tejido renal y son importantes componentes tanto del proceso inicial como del mantenimiento de la inflamación en IRA; las principales citoquinas proinflamatorias son IL-6, IL-2, IL-10^{92 93 94}.

La IL-6 es un mediador mayor proinflamatorio bien caracterizado en la orquestación de la respuesta inflamatoria tras el daño renal agudo^{95 96} y en pacientes renales se ha mostrado como un marcador superior a otros candidatos proinflamatorios, como la proteína C reactiva^{97 98}. Estudios en modelos murinos sugieren que la IL-6 es capaz de exacerbar el daño renal^{93 99}. La IL-6 es una citoquina pleiotrópica cuyas propiedades pro y anti-inflamatorias han sido bien descritas¹⁰⁰. La

IL-6 se produce en cantidades elevadas por las células endoteliales en respuesta a señales proinflamatorias, incluyendo TNF α e hipoxia¹⁰¹. Se libera además en respuesta a daño tisular y fallo orgánico⁸⁰. La producción de IL-6 es un hallazgo común en fenómenos de isquemia de cualquier órgano, como cerebro¹⁰², intestino¹⁰³ y corazón¹⁰⁴, pero es a nivel renal donde disponemos de más datos: se ha descrito que en pacientes sometidos a trasplante renal, la IL-6 puede detectarse en orina y sus niveles se correlacionan con la severidad de la isquemia¹⁰⁵. Kielar et al ⁹³ demostraron que la IL-6 se produce en el riñón isquémico, muy probablemente sintetizada en los macrófagos adyacentes a las regiones isquémicas a nivel medular, y sugirieron que este fenómeno se debía a un trastorno maladaptativo de la propia citoquina. Desde el punto de vista clínico, la IL-6 es la responsable del Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS), fenómeno inflamatorio sistémico que se produce en pacientes gravemente enfermos, en los que se observa una importante liberación de mediadores inflamatorios como TNF- α , IL-18 o IL-1 β . Este proceso está seguido de manera temporal por un proceso compensatorio, cuyo responsable es la IL-10, denominado síndrome compensatorio de respuesta anti-inflamatoria (CARS) ¹⁰⁶.

En algunas situaciones clínicas como uremia o sepsis, se produce una disregulación de la respuesta inflamatoria, caracterizada por la activación simultánea de ambos procesos, el sistema anti (CARS) y pro-inflamatorio (SIRS)¹⁰⁷. Esta disregulación de la respuesta inflamatoria en pacientes críticos podría ser el mecanismo subyacente implicado en el desarrollo de fallo multiorgánico y muerte en estos pacientes¹⁰⁸.

Basándose en esta premisa, existen estudios clínicos en pacientes críticos con IRA grave que muestran una asociación entre los niveles plasmáticos de distintas citoquinas y diferente evolución en recuperación de la función renal, morbilidad y mortalidad^{109 110}.

La IL-10 es una potente citoquina anti-inflamatoria que inhibe la vía citotóxica implicada en IRA. Una de las probables funciones de la IL-10 es inhibir de manera parcial la activación maladaptativa de los genes que producen activación y adhesión leucocitaria¹¹¹. Aunque el papel de la IL-10 en el daño renal no ha sido bien

establecido, por una lado se trata del prototipo de citoquina anti-inflamatoria y su función sobre la modulación de la inflamación es crítica^{112 113}, mientras que en la literatura existen datos contradictorios sobre su acción sobre la función renal. Por un lado se ha descrito un efecto protector mediante el que atenúa la inflamación en modelos animales de isquemia¹¹¹, nefrotoxicidad inducida por cisplatino¹¹⁴ y en modelos animales de glomerulonefritis¹¹⁵. Por otro lado, los resultados de estudios clínicos son contradictorios. Simmons et al¹¹⁶, describen la correlación entre las concentraciones plasmáticas de IL-6 y IL-10 con la mortalidad intrahospitalaria de pacientes con IRA, aunque parece que esta asociación es más fuerte para la IL-10 mientras que datos procedentes de la cohorte TRIBE-AKI Consortium, demuestran que las concentraciones plasmáticas de IL-6 se asocian con mortalidad en pacientes sometidos a cateterismo cardíaco que desarrollan IRA y las concentraciones de IL-10 se asocian a una menor mortalidad, siendo el único estudio clínico que ha demostrado este efecto protector aunque se perdía con concentraciones por encima del segundo cuartil¹¹⁷, . Parece pues, que la IL-10 sería capaz de conferir ciertos efectos protectores^{118 111}; estudios preclínicos han demostrado que la IL-10 ejerce estos efectos protectores frente a fenómenos de isquemia renal a través de la inducción de la Lipocalina-2 o NGAL¹¹⁹.

NGAL o Lipocalina-2 es una proteína de 25 kDa de la familia de las Lipocalinas, identificada inicialmente en los neutrófilos. Posteriormente, se ha constatado que su expresión aumenta en otros tejidos en respuesta a diferentes estímulos como isquemia e infección^{120 121 122}. NGAL se almacena específicamente en los neutrófilos expresándose en diferentes órganos incluyendo los riñones¹²¹.

Datos clínicos indican una relación entre los niveles plasmáticos de NGAL y la respuesta inmune¹²³. Por otro lado, diversos estudios recientes confieren al NGAL una elevada capacidad como biomarcador de IRA^{124 125 122}. En los últimos años se ha descrito su relación en otro tipo de situaciones clínicas como procesos neoplásicos¹²⁶
127.

MOTIVOS PARA ESTUDIAR EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO EN LA IRA

La IRA es una patología grave con una elevada morbimortalidad y un elevado coste económico, especialmente en pacientes hospitalizados; que no ha disminuido en los últimos 20 años, a pesar de las mejoras técnicas continuas en el tratamiento renal sustitutivo.

En los últimos años diferentes sociedades nefrológicas internacionales han promovido el estudio de la IRA especialmente en el campo de los biomarcadores, buscando el sustituto de la creatinina plasmática que nos permita realizar precozmente el diagnóstico de IRA. Hasta el momento, a pesar de haber obtenido resultados prometedores en algunos de ellos, especialmente el NGAL, no se ha alcanzado este objetivo; pero estos trabajos han permitido entender la IRA como una patología inflamatoria sistémica, cuya etiopatogenia no está aclarada todavía.

El reciente descubrimiento de la participación del sistema del Complemento en la patología de distintas enfermedades renales, nos ha hecho preguntarnos si este, tiene algún papel en la etiopatogenia IRA humana, como así parecen indicar los resultados publicados tanto en cultivo celular como en modelos murinos.

El conocimiento sobre los mecanismos implicados en la IRA nos permitirá desarrollar nuevas estrategias para el diagnóstico precoz de la misma y disminuir con ello, todas las complicaciones que de ella derivan.

HIPÓTESIS

2. HIPÓTESIS.

Recientemente, se ha descrito de manera detallada la implicación de la vía del complemento en la fisiopatología de distintas enfermedades renales con una importante repercusión. De este modo, entidades glomerulares clásicas han sido reclasificadas y renombradas. Por otro lado, se están probando con éxito nuevas estrategias terapéuticas basadas en el bloqueo de este sistema en patologías renales que hasta este momento carecían de tratamiento etiológico efectivo.

La hipótesis de este trabajo de investigación es:

1. La activación o la disregulación de la vía del complemento a través de la vía alternativa, tiene un papel clave en la fisiopatología de la IRA.
2. La acción lítica directa de la fracción terminal o complejo ataque membrana (C5b-C9 ó MAC) sobre las membranas de las células tubulares es responsable de la lesión en la célula tubular.
3. La activación de la vía del complemento inicia una cascada inflamatoria con activación de diferentes citoquinas anti- y pro-inflamatorias y reclutamiento de neutrófilos que participarán en el desarrollo de la IRA.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS PRIMARIOS

El objetivo principal de este estudio es determinar si existe activación de la vía del complemento en la IRA humana, tanto a nivel plasmático como tisular, y su relación con la gravedad y la evolución de la función renal tanto a corto como medio plazo:

- 1.** Determinar si las concentraciones de MAC en muestras plasmáticas de IRA humana, son más elevadas que en pacientes con función renal normal.
- 2.** Examinar si las concentraciones plasmáticas de MAC se relacionan con la gravedad y el pronóstico de la IRA.
- 3.** Establecer la existencia y localización de MAC en muestras de tejido renal, y si su depósito se relaciona con la gravedad de la IRA.

3.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

Los objetivos secundarios de este estudio son por un lado, analizar si existe alteración de la vía alternativa del complemento, a través del Factor H y por otro, demostrar si en la IRA, existe activación de otras vías inflamatorias sistémicas.

- 1.** Determinar si existe depósito de Factor H, modulador plasmático de la vía alternativa y su localización en muestras de tejido renal y si se relaciona con la gravedad de la IRA.
- 2.** Demostrar que existe participación de otras vías inflamatorias en la IRA mediante las determinaciones plasmáticas de interleuquina-6 (IL-6) representante del SIRS, lipocalina-2 ó NGAL como marcador de reclutamiento de neutrófilos e interleuquina-10 (IL-10) como representante del CARS.

MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS.

4.1. POBLACION A ESTUDIO.

La población a estudio fueron los pacientes diagnosticados de IRA en nuestro centro, durante el período comprendido entre 2010-2012; se ha seguido la definición de IRA propuesta por el grupo ADQI utilizando el criterio de creatinina plasmática.

4.2. DISEÑO DEL ESTUDIO Y SELECCIÓN DE PACIENTES.

Este trabajo se ha diseñado como una cohorte prospectiva en la que se han incluido pacientes diagnosticados de IRA de distintas etiologías, según la definición del grupo ADQI, y pacientes con las mismas características clínicas, pero con función renal normal. Los pacientes han sido reclutados durante el período comprendido entre 2010-2012, con un seguimiento de 3 años.

Criterios de Inclusión:

- Pacientes mayores de 18 años que hubieran firmado el consentimiento informado.
- Pacientes que cumplen criterios diagnósticos de IRA según la definición ADQI, usando la determinación de creatinina sérica (mg/dl) como criterio diagnóstico.
- Pacientes en los que se excluyeron causas obstructivas de IRA mediante realización de prueba de imagen, aceptando indistintamente ecografía o TAC abdominal para excluir el diagnóstico.
- Pacientes en los que se descartaron causas “pre-renales” asegurando una correcta hemodinamia las 48 horas previas a su reclutamiento juntamente con la valoración del ionograma de orina, siguiendo las recomendaciones del grupo ADQI.
- Pacientes en los que ha sido posible demostrar que tenían función renal normal los tres meses previos al ingreso hospitalario, mediante la determinación de

creatinina sérica; bien mediante una analítica previa en nuestro centro, o bien revisando la base de datos de la Historia Clínica Compartida en Cataluña, para evitar la selección de pacientes con enfermedad renal crónica no conocida previamente.

Criterios de Exclusión:

- Imposibilidad para obtener el consentimiento informado.
- Incapacidad para valorar la función renal previa al ingreso.
- Pacientes que fallecen en las primeras 24 horas tras el reclutamiento.

Los pacientes incluidos en el estudio se clasificaron en distintos grupos según la etiología principal de la IRA, de manera que se definieron cuatro modelos diferentes de IRA:

1. **Modelo de IRA secundaria a sepsis:** se incluyeron pacientes diagnosticados de sepsis ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos de nuestro centro. Se descartaron los pacientes en situación de shock séptico para evitar sesgos de selección, puesto que la situación de inestabilidad hemodinámica inherente al proceso podría ser causante de IRA de origen pre-renal.
2. **Modelo de IRA secundaria a nefrotoxicidad:** se incluyeron pacientes en régimen de hospitalización domiciliaria en tratamiento con Colistina endovenosa, antibiótico con reconocida capacidad tóxica tubular directa^{128 129}. Escogimos pacientes en régimen domiciliario para evitar sesgos en la selección de pacientes sépticos.
3. **Modelo de IRA secundaria a isquemia-reperusión:** se han incluido pacientes sometidos a trasplante renal de donante cadáver en nuestro centro con igual pauta inmunosupresora.
4. **Modelo de IRA multifactorial:** se incluyeron pacientes en los que por anamnesis era difícil atribuir a una única causa la IRA, pacientes en los que de manera simultánea coexistían distintas causas como deshidratación,

nefrotoxicidad por ingesta de anti-inflamatorios no esteroideos, contraste yodado para exploraciones complementarias, etc.

De manera paralela se diseñó un grupo control para cada grupo de IRA; sometidos a los mismos factores de riesgo, pero que mantuvieron una función renal normal durante su ingreso hospitalario:

1. Pacientes ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos con el diagnóstico de **sepsis**, pero función renal normal;
2. Pacientes sometidos a **trasplante** renal con función renal inmediata;
3. Pacientes en tratamiento domiciliario con **colistina** durante períodos similares al grupo de IRA, pero que mantuvieron función renal normal;
4. Como control del grupo de IRA multifactorial, se incluyó un grupo de pacientes que ingresaron de manera programada en el servicio de angiología para realización de **arteriografía** terapéutica, esto es, pacientes que recibieron contraste yodado y debido a sus patologías de base eran consumidores de otras fármacos nefrotóxicos como antiinflamatorios no esteroideos y/o inhibidores el enzima conversor de angiotensina.

Por último se incluyó un grupo de pacientes con **función renal normal y sin factores de riesgo** para desarrollarla como grupo control.

De todos los pacientes incluidos en el estudio se han recogido variables demográficas, antecedentes patológicos de la historia clínica y variables analíticas, tanto en el momento del diagnóstico de IRA como tres años después del episodio agudo.

Estos pacientes han sido seguidos durante los 3 años posteriores a la inclusión en el estudio, recogiéndose la aparición de nuevos episodios de IRA y su etiología y el desarrollo o no de enfermedad renal crónica.

De cada uno de estos pacientes se han recogido muestras plasmáticas en distintos momentos evolutivos para la realización de diferentes biomarcadores.

El estudio está adherido a la Declaración de los Principios de Helsinki y el comité de ética de nuestro centro (CEIC-IMAS) aprobó el protocolo.

4.3. DEFINICIONES UTILIZADAS:

- **Insuficiencia Renal Aguda:** disminución abrupta de la función renal en 48 horas, definida como una elevación absoluta de la creatinina plasmática > 0.3 mg/dl ó $> 50\%$ respecto a la basal, descartando tanto causas obstructivas como de prerenalidad.
- **Clasificación RIFLE-ADQI:** escala de gravedad de la IRA que usa el acrónimo RIFLE, tal como sigue brevemente:
 - “Risk” si creatinina sérica aumenta $\times 1.5$ veces o el filtrado glomerular disminuye (FG) $> 25\%$.
 - “Injury” si la creatinina sérica aumenta $\times 2$ veces o FG disminuye $> 50\%$.
 - “Failure” si la creatinina sérica aumenta $\times 3$ veces o FG disminuye $> 75\%$.
 - “Loss” si la pérdida de la función renal con necesidad de tratamiento renal sustitutivo es inferior a 4 semanas.
 - “End-Stage-Renal-Disease” si la pérdida de la función renal tiene una duración entre 4 semanas y 3 meses.
- **Enfermedad Renal Crónica:** disminución de la función renal con FG < 60 ml/min/1.73m² durante al menos 3 meses.
- **Recidiva IRA:** aparición de nuevo deterioro de función renal considerando aumento ≥ 0.3 mg/dl respecto a la basal, tras haber alcanzado la función renal basal previamente.
- **Función retardada del injerto:** necesidad de diálisis la primera semana post-trasplante y/o que la creatinina plasmática no mejore más de 30% respecto a basal en las primera semana post-trasplante.

4.4. MUESTRAS DE PLASMA

De cada uno de los pacientes incluidos en el estudio se han tomado muestras de plasma en el momento del diagnóstico de IRA, con la excepción del grupo de trasplante renal, en el que las muestras fueron tomadas al 7^a día post-trasplante.

Se han utilizado muestras de plasma con EDTA para evitar ulterior activación del sistema del complemento. Las muestras se procesaron mediante centrifugación (3000 G durante 10 minutos, a una temperatura de 4º) y fueron alicuotadas en viales eppendorf[®], y almacenadas en congelador a -80ºC hasta el momento de su utilización. Se evitaron ciclos repetidos de congelación/descongelación.

4.5. DETERMINACIONES Y TÉCNICAS UTILIZADAS EN LAS MUESTRAS PLASMATICAS.

En las muestras de plasma-EDTA se han realizado las determinaciones de las concentraciones plasmáticas de los distintos componentes del sistema del complemento (MAC, Factor H y CFHR1), de interleuquinas 6 y 10 mediante técnica de ELISA de alta sensibilidad y de NGAL o Lipocalina-2 mediante inmunoensayo por detección de inmunofluorescencia (fluoroimmunoensayo).

- **ELISA (Ensayo por inmunoadsorción ligado a Enzimas)**

La técnica de ELISA, en general y de manera breve, se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática.

Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizados sobre un soporte inmunoabsorbente, la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o colorímetro.

- ELISA **MAC** (Human Terminal Complement Complex, Hycult Biotech ©): se ha realizado mediante sándwich ELISA de alta sensibilidad, realizando las

determinaciones en duplicado con 100 µL de plasma siguiendo las instrucciones del protocolo del fabricante.

- ELISA **interleuquina-6** (R&D System©): hemos utilizado ELISA sándwich de alta sensibilidad con determinación de muestras en duplicado utilizando 50µL siguiendo las instrucciones del fabricante.
- ELISA **interleuquina-10** (Abcam©): se realizó mediante ELISA HS con 50 µL en duplicado y siguiendo las instrucciones del fabricante.
- HUMAN **factor H** (MyBiosource©): se realizó mediante ELISA HS con 50 µL en duplicado y siguiendo las instrucciones del fabricante.
- **CFHR1** (MyBiosource©): se realizó mediante ELISA HS con 50 µL en duplicado y siguiendo las instrucciones del fabricante

- **Inmunoensayo por detección de fluorescencia**

Hemos utilizado en nuestro estudio el sistema de fluoroinmunoanálisis Alere Triage©, utilizando 250µL de plasma para determinar las concentraciones plasmáticas de NGAL.

4.6. MUESTRAS DE TEJIDO RENAL

El diagnóstico de IRA es un diagnóstico de exclusión, en el que de manera rutinaria no se realiza biopsia renal si la evolución clínica es la esperada y se constata la reversibilidad en 10-15 días. LA biopsia renal suele indicarse si la duración del episodio se prolonga más de 3 semanas o aparecen otras alteraciones tanto clínicas como analíticas, que pongan en duda el diagnóstico. Por ello tenemos una escasa representación de tejido renal procedente de biopsia; con el fin de obtener muestras de tejido renal para su estudio, se decidió utilizar tejido renal procedente de muestras de autopsias clínicas.

Se revisaron las historias clínicas de aquellos pacientes en los que se realizó autopsia clínica entre Enero del 2011 y Diciembre del 2013, incluyéndose en el estudio, las muestras de tejido renal de aquellos pacientes con diagnóstico de IRA, independientemente de la etiología, realizado al menos 3 días antes del *exitus laetalis*,

para evitar sesgos de selección al incluir en el estudio muestras en las que primara el efecto de la hipoxia-isquemia peri-mortem más que el daño tubular *per se*.

Se incluyeron muestras de tejido renal sano y sin criterios analíticos de IRA para ser utilizadas como “control”.

En estas muestras de tejido renal se procedió a realizar tinciones mediante técnicas de inmunohistoquímica enzimática frente a MAC y a Factor H.

4.6.1. Inmunohistoquímica enzimática

Se realizaron secciones histológicas de parénquima renal en parafina, con cortes de 2-3 micras que posteriormente fueron deparafinados con Xilol y rehidratados usando gradientes decrecientes de alcohol etílico. La recuperación antigénica se realizó mediante técnicas enzimáticas utilizando Proteinasa K. La actividad endógena de la peroxidasa se bloqueó con peróxido de hidrógeno al 3% y se bloquearon las uniones inespecíficas utilizando BSA al 3% (Bovine Serum Albumin Fraction V).

Los anticuerpos primarios fueron utilizados a las diluciones descritas según el protocolo del fabricante. Los cortes fueron lavados posteriormente con PBS 1X (buffer fosfato salino). Posteriormente, fueron incubados con anticuerpo secundario marcado con peroxidasa y revelados usando como cromógeno diaminobenzina (DAB) mediante un kit comercial (Dual link rabbit/mouse kit Dako Real En Vision©).

Las preparaciones fueron contrastadas posteriormente con hematoxilina. Finalmente, se procedió a montar los cortes cubriéndolos con un cubreobjetos de cristal, quedando preparados para su estudio microscópico.

Anticuerpos Primarios:

- Anti-Human TCC (Terminal Complex Complement) (Hycult Biotech©) dilución 1:50
- Anti Factor H (rabbit polyclonal 34+35), (*generoso obsequio del Dr. Santiago Rodríguez de Córdoba, CSIC*), dilución 1:250.

Anticuerpos Secundarios:

- Dual link rabbit/mouse kit Dako Real En Vision™

4.6.2. Valoración de las muestras de tejido renal

Se han examinado 33 muestras de parénquima renal procedente de autopsias clínicas, de éstas, 21 (63.6%) con diagnóstico clínico de IRA frente a 12 muestras (36.4%) con función renal normal.

Las muestras han sido valoradas mediante 2 observadores de manera ciega. En cada muestra se determinaron las estructuras renales con inmunotinción (glomérulos, túbulos, intersticio y vasculatura) así como su localización. Asimismo, el tipo del tinción ha sido valorada de forma semicuantitativa siguiendo el siguiente protocolo: porcentaje de túbulos contorneados corticales y de túbulos medulares teñidos estimados en 5 campos de gran aumento (<25%, 25-50%, 50-75%, >75% y ausencia de tinción), el perímetro del túbulo teñido (<25%, 25-50%, 50-75%, >75% y ausencia de tinción) y la intensidad de esta tinción en función del aumento al que era visible la tinción (+1, +2, +3).

4.7. SUBESTUDIO EN TRASPLANTE RENAL

De manera paralela se diseñó un subestudio en pacientes sometidos a trasplante renal de donante cadáver (*Modelo Isquemia-reperusión*) con la misma pauta inmunosupresora de tratamiento, tanto de inducción como de mantenimiento.

Se incluyó una muestra de 10 pacientes diagnosticados de IRA por criterios clínicos e histológicos, 5 de los cuales recuperaron función renal durante el primer mes post-IRA mientras que los 5 restantes no recuperaron función renal.

De este grupo, se incluyó en el estudio muestras de plasma y tejido renal paraafinado procedente del excedente diagnóstico.

Las muestras de plasma se obtuvieron en el momento de la IRA y 30 días después, con el objetivo de realizar la determinación de concentraciones plasmáticas de MAC, IL-6, IL-10 y NGAL.

Las muestras de tejido proceden de la biopsia clínica que se utilizó para el diagnóstico de IRA; en ella se realizaron tinciones inmunohistoquímicas mediante técnica enzimática como está detallado en el punto **4.5**.

Este subgrupo permitió por un lado tener dos determinaciones plasmáticas en momentos evolutivos distintos de IRA y por otro lado disponer de tejido renal con necrosis tubular aguda (NTA) que permitió determinar si los resultados obtenidos en tejido renal procedente de autopsia, eran superponibles a los hallados en estas biopsias de NTA clínica.

4.8. ANALISIS ESTADISTICO

El análisis estadístico se ha realizado mediante *t de Student* o *U-Mann Whitney* en función de la normalidad o no de la distribución de las variables a analizar. Los estudios de asociación entre variables cuantitativas se realizaron mediante *correlación de Spearman*. Los datos se expresan como media \pm error estándar de la media. La significación estadística se definió como una $p < 0.05$. Para realizar el análisis estadístico se utilizó el software SPSS 21.0

RESULTADOS

5.1. CARACTERÍSTICAS BASALES DE LA MUESTRA

En el estudio se han incluido, datos demográficos, clínicos y analíticos de 156 pacientes de los cuales 102 son hombres (65.4%) y 54 mujeres (34.6%); con una edad media de 63 ± 15.4 años.

De los factores de riesgo cardiovascular, el más frecuente de ellos fue el de hipertensión arterial (HTA) que afectó a 99 pacientes (63.5%), seguido del diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 presente en el 22.5% (35 pacientes); el antecedente de cardiopatía isquémica 14% (22 pacientes) fue el menos frecuente en nuestra muestra.

De esta serie, 82 pacientes fueron diagnosticados de IRA (52.6%) según criterios ADQI utilizando la creatinina plasmática como criterio diagnóstico.

Previo al reclutamiento descartamos tanto causas pre-renales como obstructivas. Las causas pre-renales se descartaron siguiendo las recomendaciones del grupo ADQI, es decir, asegurando la correcta hemodinamia del paciente las 48 horas previas a su reclutamiento junto con la valoración del ionograma en orina. Las causas obstructivas se descartaron mediante la realización de pruebas de imagen (ecografía o tomografía axial computerizada).

El análisis univariado (Tabla 3) no mostró diferencias significativas entre las variables clínicas de los pacientes con IRA y los que mantuvieron función renal normal.

	IRA	No -IRA	p
Edad	64±14.3 años	61,5±16,5	0,16
Sexo	50 varones 31 mujeres	52 varones 23 mujeres	0,25
HTA	55 (68,8%)	44 (58,7%)	0,54
DM2	21 (26,3%)	14 (18,7%)	0,32
CPT Isquémica	6 (7,5%)	16 (21,3%)	0,24
Exitus	17 (21%)	11 (14,7%)	0,32

Tabla 3. Características de los pacientes con o sin IRA. **HTA:** hipertensión arterial; **DM2:** diabetes mellitus 2; **CPT Isquémica:** cardiopatía isquémica;

La Figura 6 detalla la distribución de los pacientes según los distintos modelos de IRA, detallándose el número de pacientes con IRA frente a los pacientes con función renal normal.

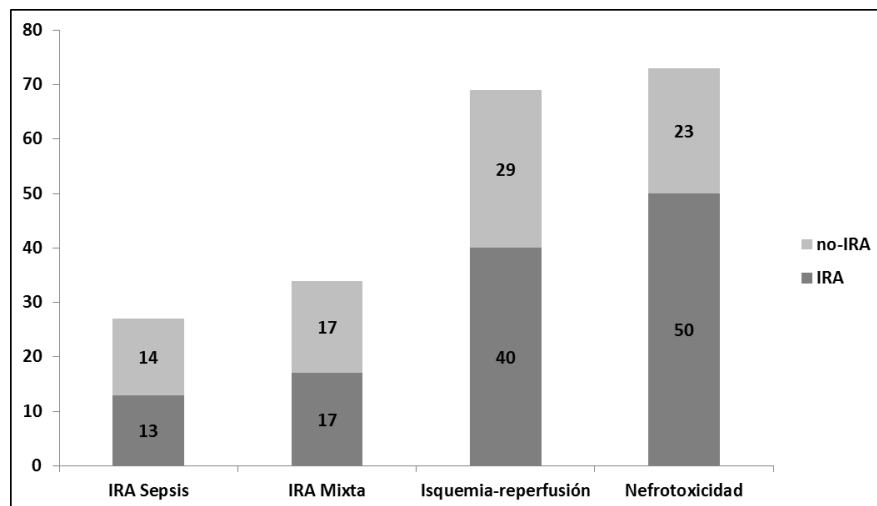


Figura 6. Distribución de los pacientes según los diferentes modelos de IRA.

La creatinina plasmática media en el grupo de IRA fue 4.1 ± 2.67 mg/dl y el filtrado glomerular 20.6 ± 14.5 ml/min/m².

Para reflejar la gravedad de la IRA, los pacientes fueron clasificados utilizando la clasificación RIFLE: 33 pacientes (40%) fueron clasificados en el grupo "Failure", el más frecuente, mientras que ninguno de ellos ha sido clasificado como "End-stage-renal-disease" (ESRD) (Figura 7).

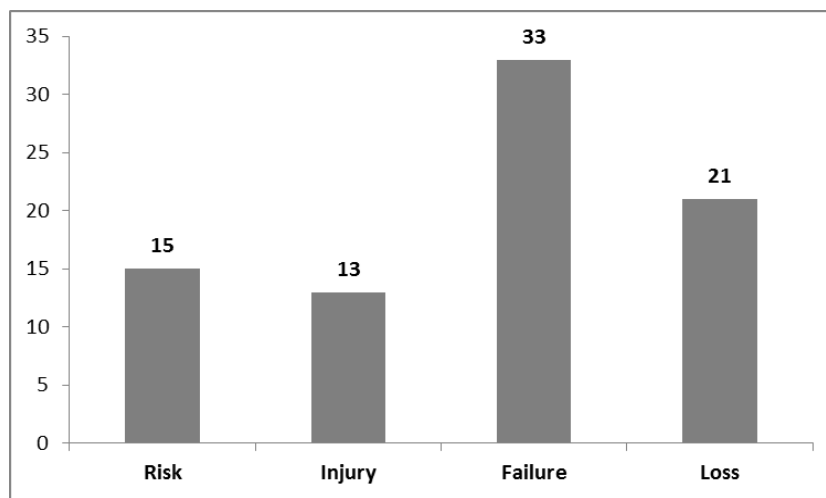


Figura 7. Distribución de los pacientes según clasificación RIFLE

La duración media del episodio de IRA fue de 18.2 días (p25: 4.5 – p75: 23.2 días). Un total de 27 pacientes (32.9%) necesitaron tratamiento renal sustitutivo durante el ingreso, en forma de hemodiálisis intermitente o mediante técnicas continuas de depuración extrarrenal.

Respecto a la recuperación de la función renal, en el momento del alta hospitalaria, 61 pacientes (32.9%) recuperaron la función renal, de manera completa o parcial, frente un 24.4% (20 pacientes) que no recuperaron función renal en el momento del alta. De estos 20 últimos, 6 pacientes (un 7.3% del total general) estaban en tratamiento renal sustitutivo en ese momento. Todos ellos recuperaron función renal de manera parcial, y eran independientes de diálisis en un período menor a 4 semanas.

La mortalidad global fue del 18% (28 pacientes) de los cuales 17 (21%) fallecieron en situación de IRA.

5.2. DETERMINACIONES PLASMATICAS DEL COMPLEJO ATAQUE DE MEMBRANA.

Se determinaron las concentraciones de MAC en muestras de plasma-EDTA, mediante técnica ELISA de alta sensibilidad, en 136 pacientes, de los que 71 presentaron IRA y 65 pacientes son homólogos en las características clínicas, pero con función renal normal.

Los valores considerados como normales para MAC en el ensayo utilizado en nuestro estudio, varían de 8.2 a 2000 mAU/ml, lo que concuerda con los resultados obtenidos en las muestras de los pacientes del grupo “control” (n=10) cuya mediana es 301.1 mAU/mL (p25: 226.7 – p75:374.8). Las concentraciones de MAC variaron según la función renal (Figura 8).

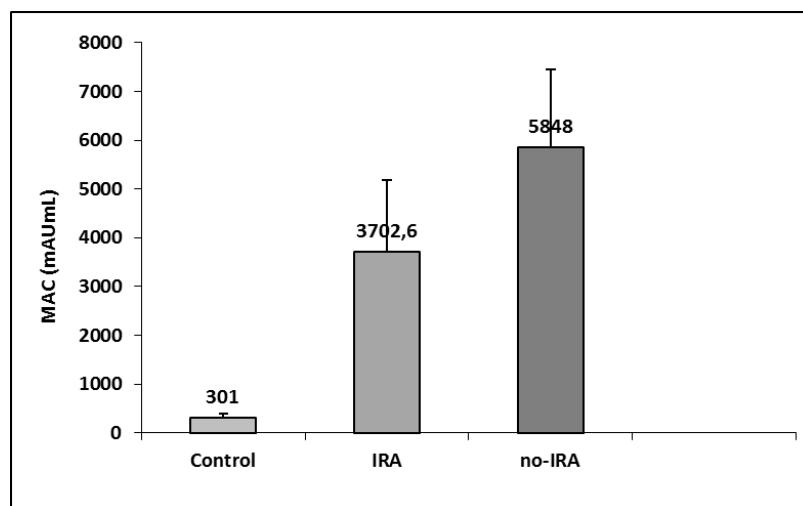


Figura 8. Concentración plasmática de MAC según función renal.

En un subgrupo de pacientes con IRA (n=22), se determinaron las concentraciones plasmáticas de C5b-C9 tras la resolución de la IRA, pero manteniendo activo el problema médico responsable de la misma. Los niveles de MAC fueron significativamente menores una vez resuelto el fracaso renal agudo, aunque no llegaron a normalizarse, ya que el proceso responsable de la IRA continuó activo (4555.3 ± 524.7 mAU/mL vs 3423 ± 325 mAU/mL, respectivamente, $p=0.04$) (Figura 9).

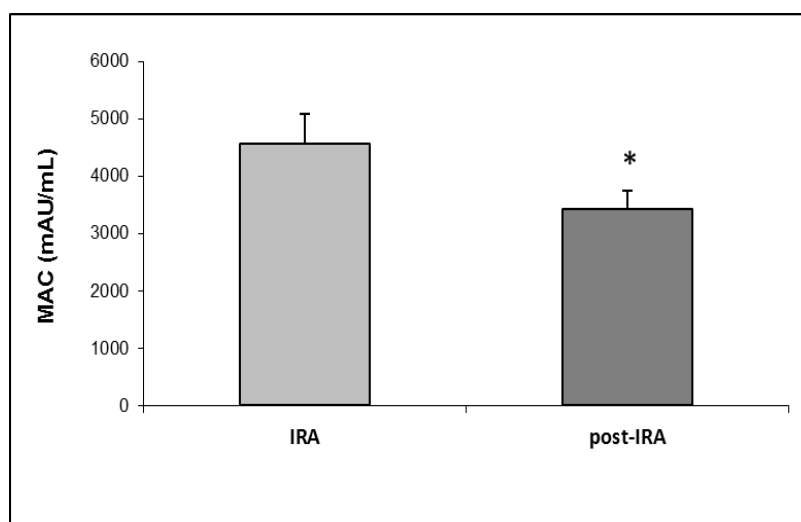


Figura 9. Concentración plasmática de MAC durante y después del episodio de IRA (* $p<0.05$).

Las concentraciones plasmáticas de MAC fueron significativamente más elevadas en pacientes con IRA (5848 ± 3604.2 mAU/mL) que en los pacientes con función renal normal (3702.6 ± 1483 mAU/mL) ($p<0,001$) (Figura 10).

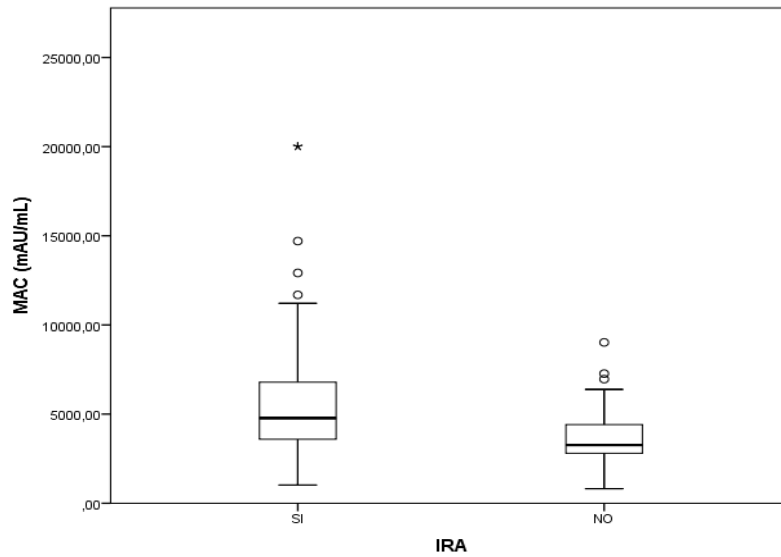
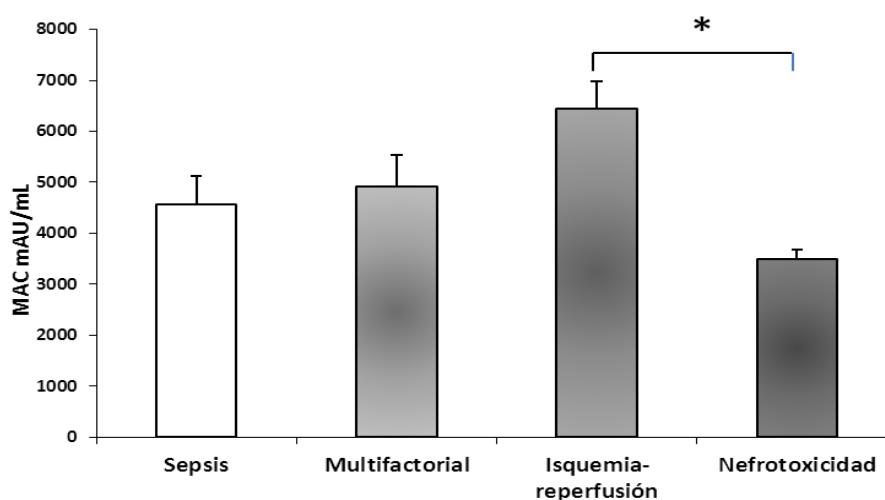


Figura 10. Concentración plasmática de MAC en pacientes con o sin IRA (* $p < 0.001$)

Al clasificar las concentraciones de MAC según etiología, independientemente de la función renal, se observó que los pacientes pertenecientes al grupo de *isquemia-reperfusión* (trasplante renal), presentaban concentraciones plasmáticas de MAC más elevadas que en el resto de pacientes, mientras que en el modelo de *nefrotoxicidad* por colistina, las concentraciones plasmáticas de la fracción lítica del complemento, fueron menores. La diferencia entre el grupo de I/R y el grupo de nefrotoxicidad alcanzó significación estadística (Figura 11).



ETIOLOGIA	n	MAC(mAU/mL) Media ± SD
Sepsis	26	4790,7±554,2
Isquemia-reperfusión	53	6532,9±489,3
Nefrotoxicidad	37	3500,3±175,2
Multifactorial	16	4906,6±636,5
Control	10	4981,6±294,8

Figura 11 Concentración plasmática de MAC en pacientes con IRA según la etiopatogenia del episodio (* $p < 0.05$). En la parte inferior, número de pacientes por grupo y valores de la concentración plasmática de MAC.

A la vista de estas diferencias, el análisis estadístico se ha realizado de diferentes modos: excluyendo el grupo de nefrotoxicidad, excluyendo el grupo de isquemia-reperfusión y excluyendo ambos modelos de IRA; sin observarse ninguna diferencia en los resultados obtenidos aplicando estas exclusiones. Por tanto, se describirán a continuación los resultados de la muestra global, y dado que el grupo de pacientes sometidos a trasplante renal tiene unas características clínicas especiales, este grupo se analizó de manera independiente.

5.2.1. Resultados plasmáticos de MAC en la muestra global.

- **Las concentraciones de MAC se relacionan con la gravedad de la IRA.**

Como hemos descrito previamente, las concentraciones plasmáticas de MAC fueron significativamente más elevadas en los pacientes con IRA. En ellos, las concentraciones plasmáticas de MAC se relacionaron con la gravedad del proceso utilizando la escala ADQI-RIFLE como medida de la misma: las concentraciones de MAC aumentaron de manera progresiva según los distintos estadios de la clasificación RIFLE, si bien estas diferencias no alcanzaron la significación estadística.

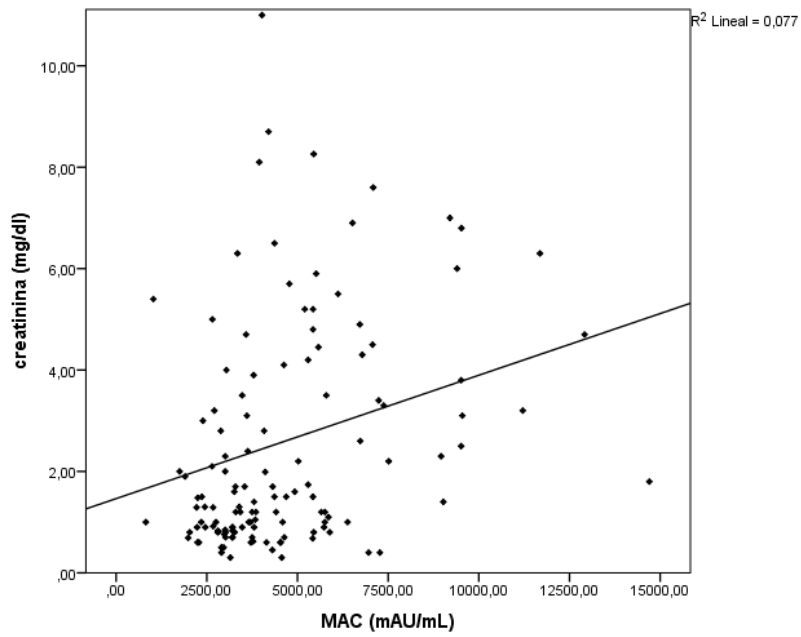
ADQI-RIFLE	n	MAC (mAU/mL)
Risk	13	4965,4±847,2
Injury	12	5246,3±952,3
Failure	27	5729±461
Loss	20	6970±888

Tabla 4. Concentración plasmática de MAC y severidad del episodio de IRA.

Se valoraron una serie de parámetros clínicos utilizados en la práctica habitual, como fueron la determinación plasmática de creatinina, la estimación del filtrado glomerular, la necesidad de tratamiento renal sustitutivo (TRS), la duración del fracaso renal y la mortalidad en el ingreso hospitalario.

Los niveles plasmáticos de MAC se correlacionaron de manera directa y significativa con la creatinina plasmática ($r=0.37$; $p<0.01$) y de manera inversa con el filtrado glomerular ($r=0.7$, $p<0.01$) (Figura 12).

(A)



(B)

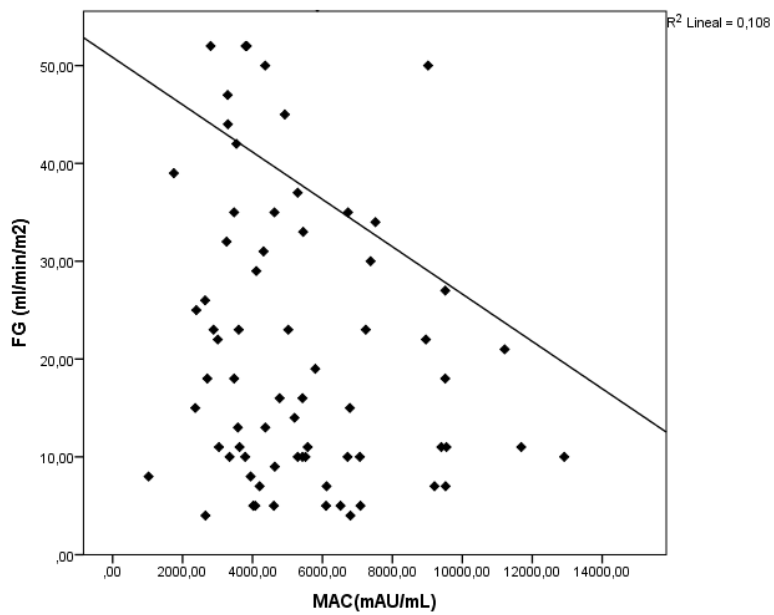


Figura 12. Correlación entre el nivel plasmático de MAC y creatinina plasmática (A) y entre el nivel plasmático de MAC y el filtrado glomerular estimado (B).

En el subgrupo de pacientes con IRA, la probabilidad de necesitar tratamiento renal sustitutivo durante el ingreso, en forma de hemodiálisis intermitente o de terapia renal continua, se relacionó con las concentraciones de MAC, observándose que los pacientes que requirieron diálisis durante el ingreso, fueron aquellos con mayores concentraciones de MAC ($n=24$; 6158.8 ± 527.7 mAU/mL) mientras que los pacientes que no necesitaron TRS fueron aquellos con menores niveles plasmáticos de MAC ($n=47$; $5818,3 \pm 590,4$ mAU/mL) ($p= 0,06$).

Al dicotomizar los niveles plasmáticos de MAC por su mediana (4923 mAU/mL), observamos que los pacientes que requirieron TRS durante el ingreso, fueron aquellos con concentraciones de MAC igual o superior a la mediana ($p=0.002$) (Figura 13).

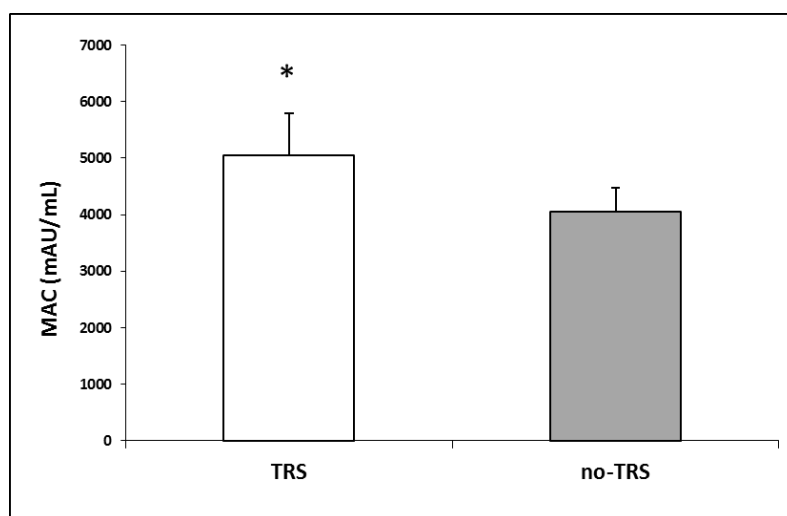


Figura 13. Concentraciones plasmáticas de MAC según necesidad de tratamiento sustitutivo renal (* $p=0.002$).

La media de duración del episodio de IRA fue de 18.2 días ($p25$: 4.5 – $p75$: 23.2 días) y se relacionó con las concentraciones de MAC. Los pacientes con recuperación de la función renal en el momento del alta hospitalaria, presentaban concentraciones plasmáticas menores de MAC ($n= 51$; $4197,4 \pm 762$ mAU/mL) que los pacientes que en

el momento del alta hospitalaria no habían recuperado la función renal (n= 19; 6123,2 ± 516.5 mAU/mL, p=0.03) (Figura 14).

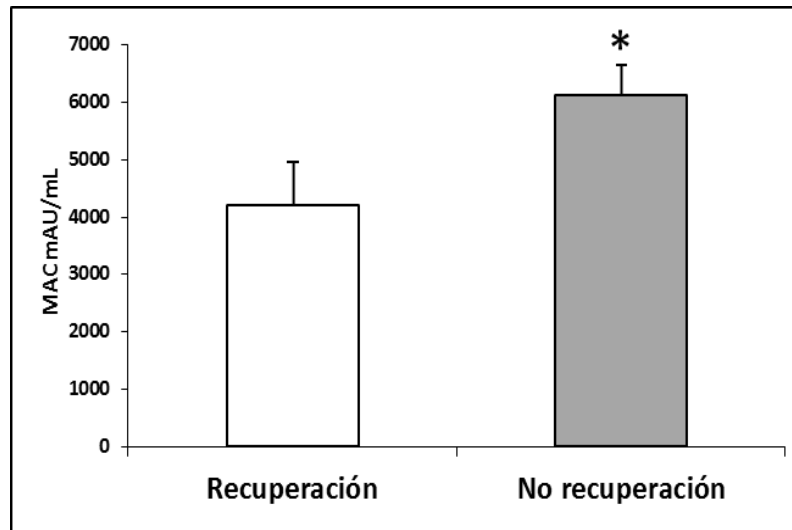


Figura 14. Concentraciones plasmáticas de MAC según recuperación o no de la función renal al alta hospitalaria (*p<0.05).

Respecto a la probabilidad de ser fallecer durante el ingreso, no hemos objetivado diferencias en los niveles de MAC, ya sea en la muestra global o solo en el subgrupo de IRA.

- ***Las concentraciones plasmáticas de MAC se relacionan con parámetros inflamatorios.***

Hemos estudiado si existe relación entre las concentraciones plasmáticas de MAC y diferentes vías inflamatorias como son la interleukina-6, principal mediadora proinflamatoria responsable del SIRS, la interleukina-10 como prototipo de citoquina antiinflamatoria responsable del CARS y la Lipocalina-2 o NGAL como parámetro de activación de neutrófilos.

Interleukina-6

Hemos realizado la determinación de valores plasmáticos de interleukina-6 (IL-6) en 118 pacientes, de los cuales 65 presentaban IRA frente a 52 pacientes homólogos a nivel clínico con función renal normal.

Las concentraciones plasmáticas de IL-6 consideradas como normales para el ensayo ELISA utilizado en nuestro estudio, varían entre 1-10 pg/mL, lo que concuerda con los resultados del grupo control (n=10) cuyas concentraciones son $6,7 \pm 4,8$ pg/mL.

Observamos que hay diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones plasmáticas de IL-6 de los pacientes controles (6.7 ± 4.8 pg/mL), los pacientes diagnosticados de IRA (16.4 ± 9.1 pg/mL), y sus homólogos en situación clínica con función renal normal (9.6 ± 8.7 pg/mL) (Figura 15).

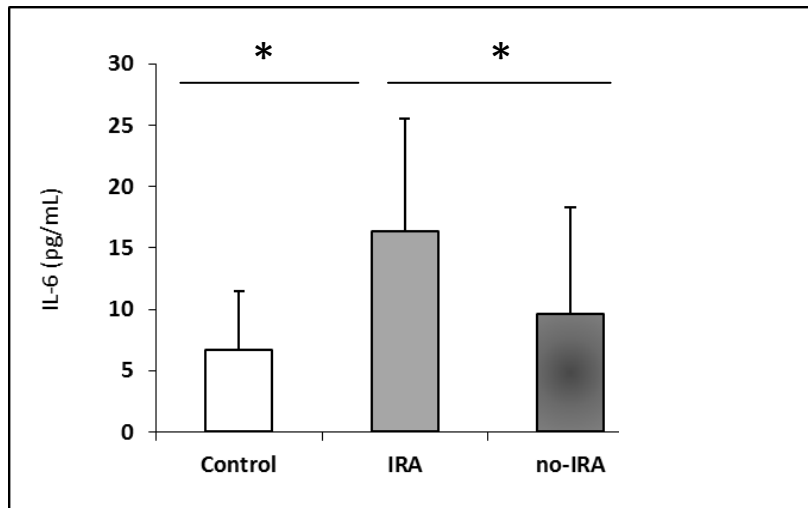


Figura 15. Concentraciones plasmáticas de IL-6 según el desarrollo o no de IRA (* $p < 0.001$).

En un subgrupo de pacientes con IRA, pertenecientes al grupo de **Sepsis**, se midieron además, las concentraciones de IL-6 tras la resolución de la IRA, objetivando una disminución significativa de los niveles de IL-6 post fracaso renal agudo (21.0 ± 3.0 pg/mL vs 12.5 ± 2.7 pg/mL, $p = 0.04$) aunque sin volver a las concentraciones consideradas normales (Figura 16).

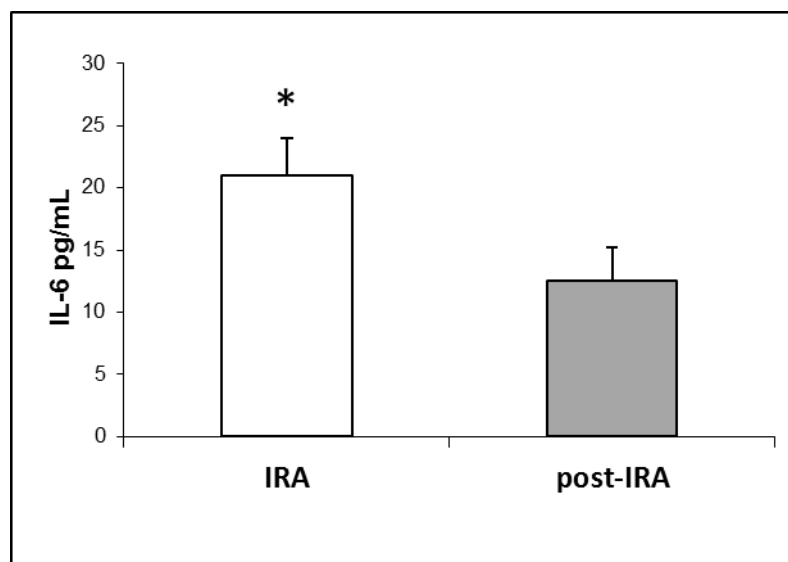


Figura 16. Concentraciones plasmáticas de IL-6 durante y después del episodio de IRA secundaria a sepsis (* $p < 0.05$).

En los pacientes en los que se resuelve el proceso séptico, pero mantienen deterioro de función renal, observamos una tendencia no significativa a la disminución de los niveles plasmáticos de IL-6, ($14,5 \pm 4$ pg/mL vs $9,0 \pm 5$ pg/mL, $p=0.05$).

De manera global, en nuestra serie, las concentraciones plasmáticas de IL-6 son significativamente más elevadas en el grupo de pacientes con IRA ($n= 71$; 16.4 ± 9.1 pg/mL) comparado con las concentraciones plasmáticas de sus homólogos con función renal normal ($n=65$; 9.6 ± 8.7 pg/mL, $p<0.001$) (Figura 17).

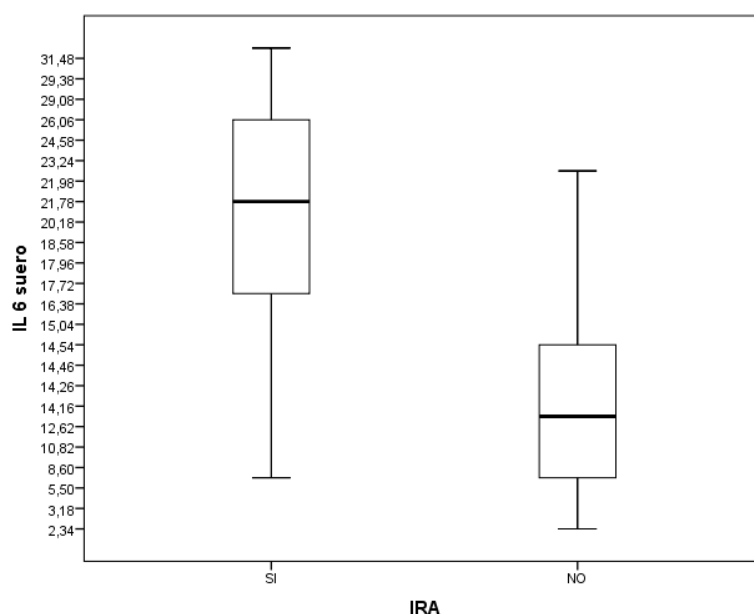


Figura 17. Concentraciones plasmáticas de IL-6 según el desarrollo o no de un episodio de IRA (* $p<0.001$).

Si clasificamos los pacientes según los diferentes modelos de IRA, no hemos encontrado diferencias en los niveles de IL-6 entre el modelo de sepsis y los modelos de nefrotoxicidad y el multifactorial, mientras que las concentraciones de IL-6 son significativamente menores en los pacientes del grupo etiológico de Isquemia-reperusión, como detallaremos más adelante.

A pesar de que existen diferencias entre IRA y función renal normal, no hemos demostrado que en el grupo de IRA, las concentraciones plasmáticas se relacionen con

la gravedad de la misma, es decir, no hay diferencias entre los pacientes que necesitan TRS durante el ingreso y los que no (16.4 ± 9.3 pg/mL vs 16.4 ± 9.0 pg/mL; $p=0.8$) y tampoco hemos observado diferencias respecto a la recuperación del funcionalismo renal al alta hospitalaria (15.6 ± 9.3 pg/mL vs 18.5 ± 8.8 pg/mL, $p=0.2$).

Existe una correlación negativa, aunque no estadísticamente significativa entre las concentraciones de MAC y las de IL-6, de tal manera que aquellos pacientes con IRA y concentraciones más elevadas de MAC tienen niveles más bajos de IL-6 y viceversa (Figura 18).

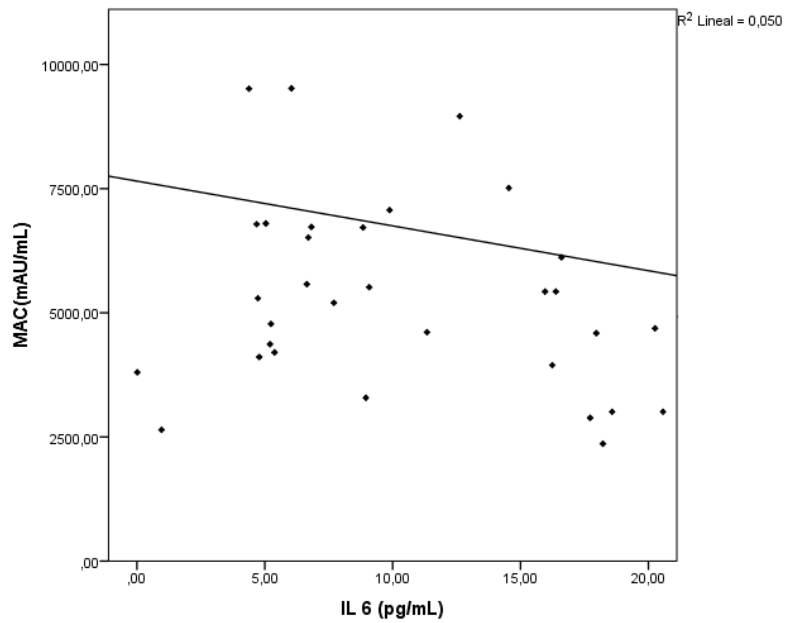


Figura 18. Correlación entre niveles plasmáticos de MAC y de IL-6.

Interleuquina-10

El rango de las concentraciones plasmáticas consideradas normales en el ensayo ELISA utilizado, varían entre 1.5-50 pg/mL, lo que concuerda con los niveles calculados en el grupo control ($n=10$) 14.8 ± 9.6 pg/mL.

Se realizó la determinación de concentraciones plasmáticas de IL-10 en 101 pacientes, de los cuales 59 (58%) presentaban IRA frente a 42 pacientes (42%) con función renal normal. Existieron diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas de IL-10 entre el grupo control y los pacientes de nuestra muestra, independientemente de la función renal. En los pacientes con IRA de cualquier etiología, observamos concentraciones plasmáticas de IL-10 más elevadas que en los pacientes con función renal normal, aunque estas diferencias no alcanzaron significación estadística (71 ± 41 pg/mL vs 78 ± 64 pg/mL, respectivamente, $p=0,12$) (Figura 19).

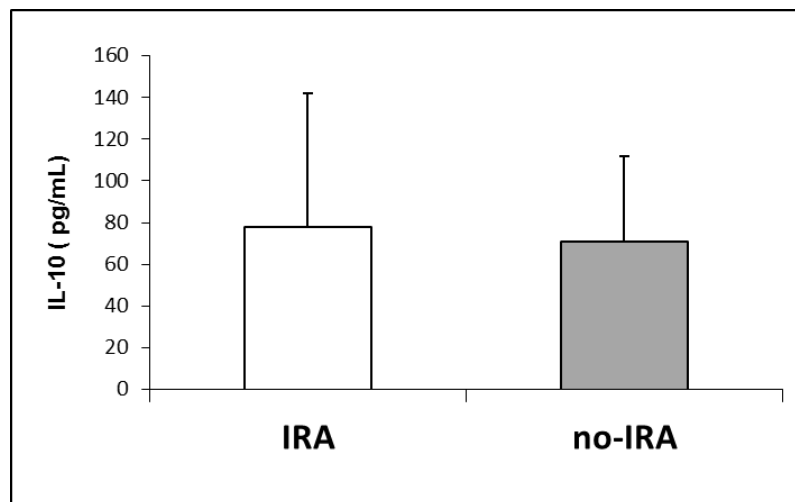


Figura 19. Concentraciones plasmáticas de IL-10 según la presencia o no de un episodio de IRA ($p=0.12$).

Las concentraciones plasmáticas de IL-10 fueron significativamente más elevadas en aquellos pacientes que fallecieron durante el ingreso hospitalario, independientemente de la función renal ($n=15$, $58,8 \pm 36$ pg/mL vs $n=90$, $12,6 \pm 3,5$ pg/mL, respectivamente, $p < 0.005$) (Figura 20).

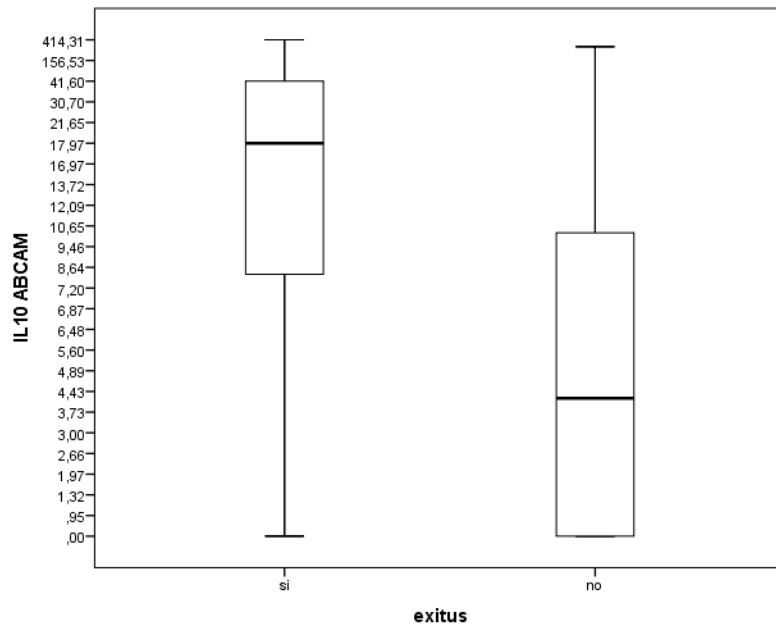


Figura 20. Concentraciones plasmáticas de IL-10 en los pacientes que fallecieron o sobrevivieron ($p < 0.005$).

Destaca que las concentraciones de IL-10 fueron más elevadas en los pacientes pertenecientes al grupo de "Sepsis" aunque estas diferencias respecto al resto de grupos no alcanzaron la significación estadística. Del global de la serie fallecieron un total de 28 pacientes, de los cuales 17 con IRA. No se produjo ningún fallecimiento en el grupo de isquemia-reperfusión.

Las concentraciones de IL-10 se correlacionaron de manera directa y significativa con las concentraciones de MAC ($r=0.47$, $p=0.01$) (Figura 21).

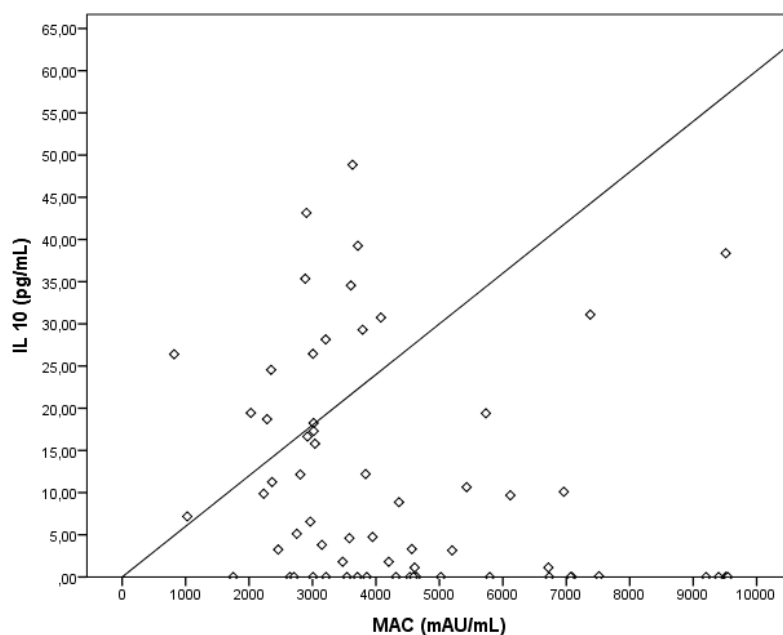


Figura 21. Correlación entre niveles plasmáticos de MAC e IL-10.

Lipocalina-2 ó NGAL

Se realizaron determinaciones de niveles plasmáticos de NGAL en 77 pacientes, de los que 49 tenían diagnóstico de IRA y en 28 con función renal normal. Los valores considerados como normales en el ensayo utilizado en nuestro estudio, varían entre 15-130 ng/mL, lo que concuerda con los resultados obtenidos en el grupo control (n=10; 104 ± 49 ng/mL).

Los niveles plasmáticos de NGAL en pacientes con IRA (n=49; $565,0 \pm 310$ ng/mL) fueron significativamente más elevados que las concentraciones plasmáticas de sus homólogos con función renal normal (n=28; $313,2 \pm 228$ ng/mL) ($p < 0,001$) (Figura 22).

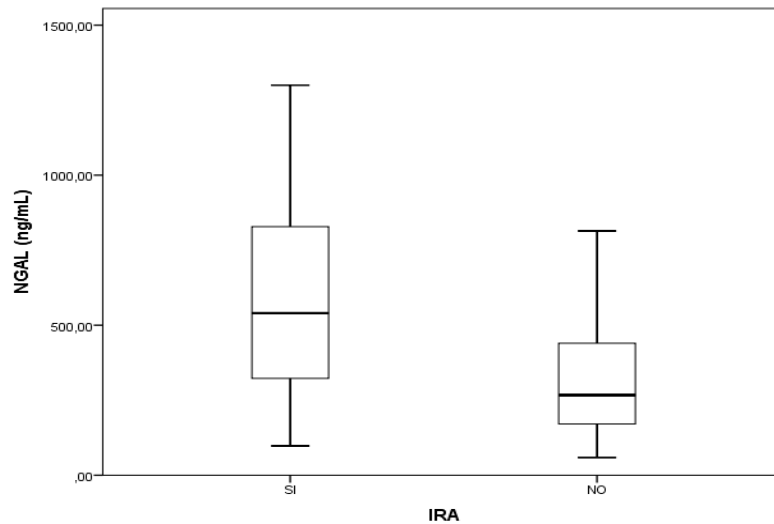


Figura 22. Concentraciones plasmáticas de NGAL según la presencia o no de IRA.

Estas diferencias se mantuvieron entre grupos si comparamos etiologías y aumentan progresivamente según los diferentes estadios de la clasificación RIFLE, aunque en este caso las diferencias inter-grupos no fueron significativas (Tabla 5).

	n (49)	Media ± error típico media
Risk	8	396±95 ng/mL
Injury	9	460,5±46,7ng/mL
Failure	14	562,3±11ng/mL
Loss	18	722,7±78,4 ng/mL

Tabla 5. Concentración plasmática de NGAL y severidad del episodio de IRA.

En el grupo de pacientes con IRA, las determinaciones de NGAL se relacionaron con la gravedad de la IRA, de tal manera que fueron significativamente más elevadas en aquellos pacientes que necesitaron TRS durante el episodio agudo ($n=21$; 715.0 ± 73.4 ng/mL) comparándolas con aquellos pacientes que no necesitaron terapias de depuración extrarrenal ($n= 56$; 382.9 ± 32.3 ng/mL) ($p<0.001$) (Figura 23).

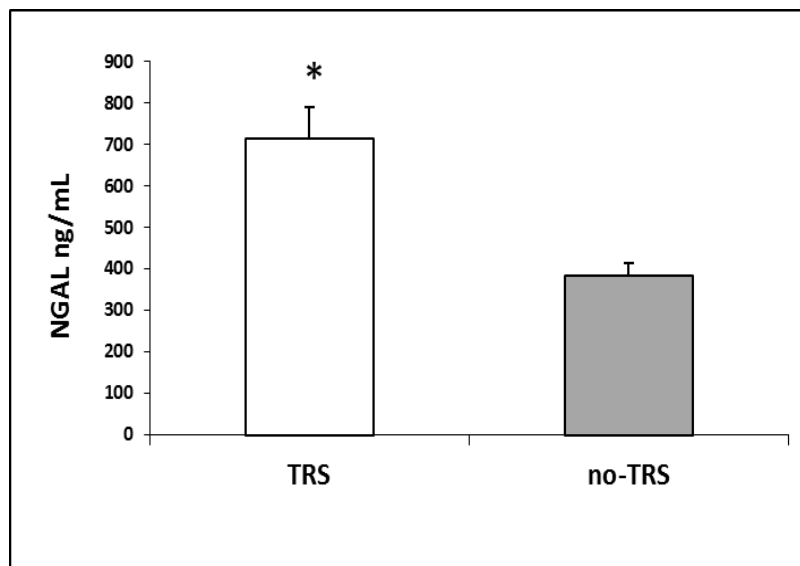


Figura 23. Concentraciones plasmáticas de NGAL según necesidad de diálisis durante el episodio de IRA ($*p<0.001$). Media \pm error típico

Se han observado diferencias significativas en los niveles plasmáticos de NGAL entre aquellos pacientes que recuperaron la función renal en el momento del alta hospitalaria; de tal manera que las concentraciones más bajas de NGAL correspondieron a aquellos pacientes que recuperaron la función renal al alta, de manera total o parcial ($n=35$; $516,7\pm 247$ ng/mL) mientras que en los pacientes que no recuperaron la función renal presentaron concentraciones más elevadas de NGAL. ($n=13$; $744,8\pm 408$ ng/mL) ($p=0,02$) (Figura 24).

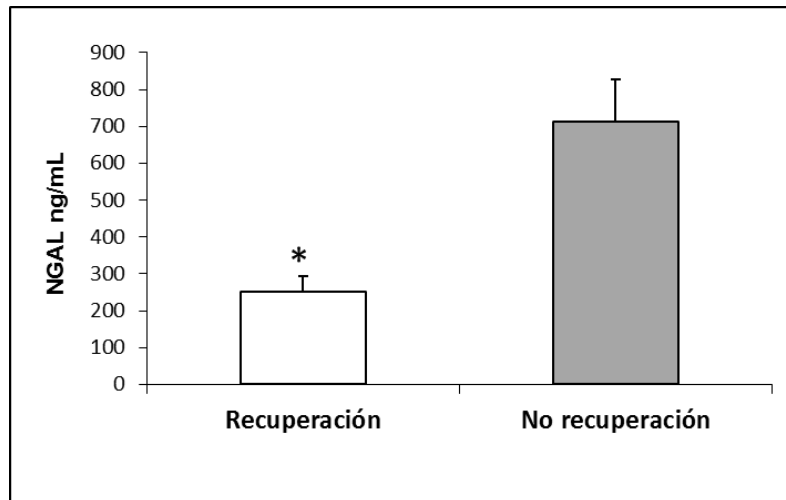


Figura 24. Concentraciones plasmáticas de NGAL según si el paciente recuperó la función renal al alta hospitalaria o no (* $p < 0.05$).

En el grupo de pacientes con IRA, las concentraciones de NGAL fueron significativamente más elevadas en aquellos pacientes que fallecieron durante el ingreso (796.3 ± 351.3 ng/mL vs 513 ± 268.4 ng/mL) ($p = 0.01$).

Esta relación con la mortalidad se mantuvo en la muestra global, mostrando los niveles plasmáticos de NGAL más altos, aquellos pacientes que fallecieron ($n = 10$) frente a los que sobrevivieron ($n = 67$) independientemente de su función renal (768 ± 379 vs 429.5 ± 271 ng/mL respectivamente, $p < 0,001$). (Figura 25).

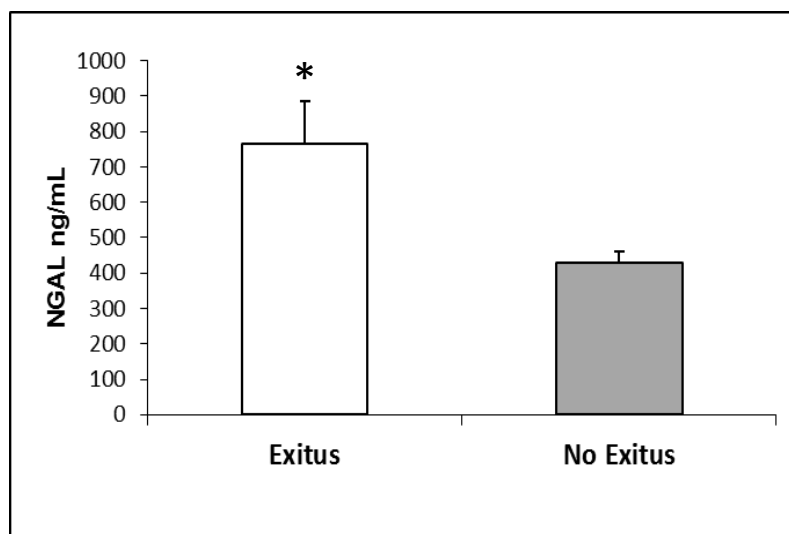
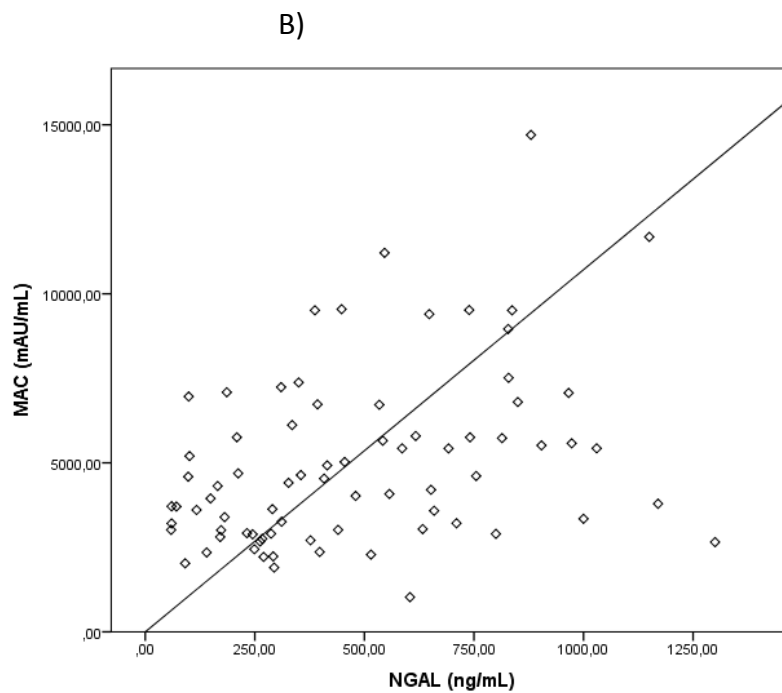


Figura 25. Concentraciones plasmáticas de NGAL según si el paciente fallece o no (* $p < 0.01$).

Las concentraciones plasmáticas de Lipocalina-2 se correlacionaron de manera directa con las concentraciones plasmáticas tanto de MAC ($r=0.47$, $p=0.01$) como de IL-10 ($r=0.46$, $P=0.05$), de tal manera que según aumentan los niveles de NGAL en el plasma de los pacientes con IRA, aumentan de manera proporcional las concentraciones de IL-10 y MAC (Figura 26).

A)



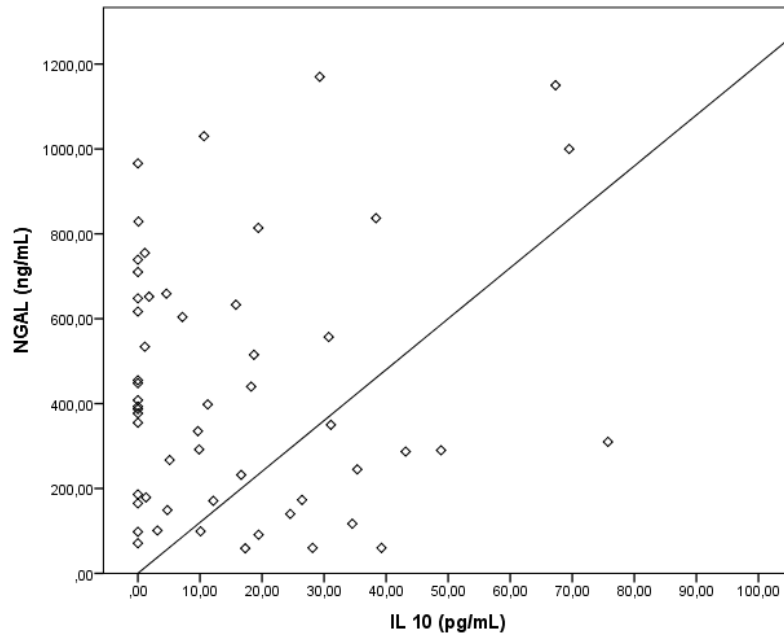


Figura 26. Correlación entre niveles plasmáticos de NGAL y MAC (A) y entre NGAL e IL-10 (B).

- **Determinaciones plasmáticas de Factor H.**

Las concentraciones plasmáticas de Factor H en pacientes con IRA fueron significativamente más elevados que los niveles de los pacientes con función renal normal ($0,86 \pm 0,05$ mg/mL vs $0,6 \pm 0,04$ mg/mL; $p=0,007$) (Figura 27). Dentro del grupo de pacientes con IRA, aquellos que necesitaron TRS presentaron concentraciones más elevadas de Factor H, que aunque no alcanzaron significación estadística, si mostraron una tendencia ($0,88 \pm 0,12$ mg/mL vs $0,68 \pm 0,04$ mg/mL; $p=0,061$).

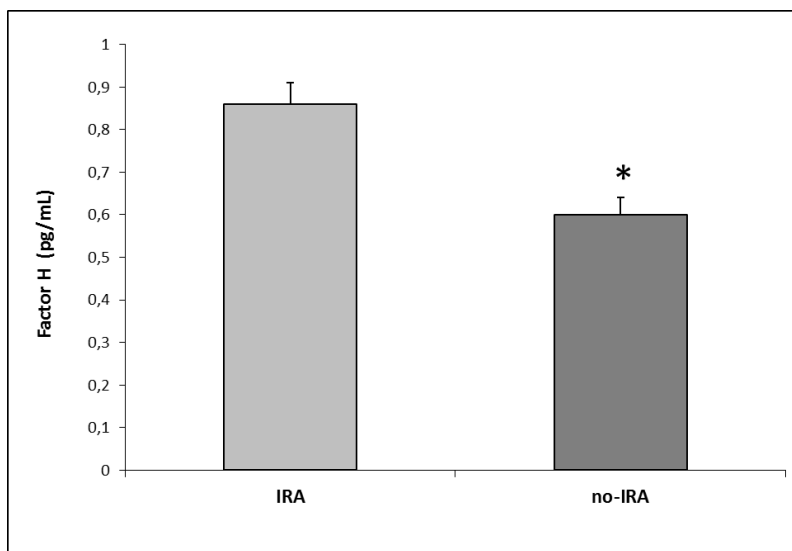


Figura 27. Concentraciones plasmáticas de Factor H e IRA

Se demostró una correlación fuertemente positiva entre las concentraciones plasmáticas de MAC y de Factor H ($r=0,709$; $p<0,01$) (Figura 28)

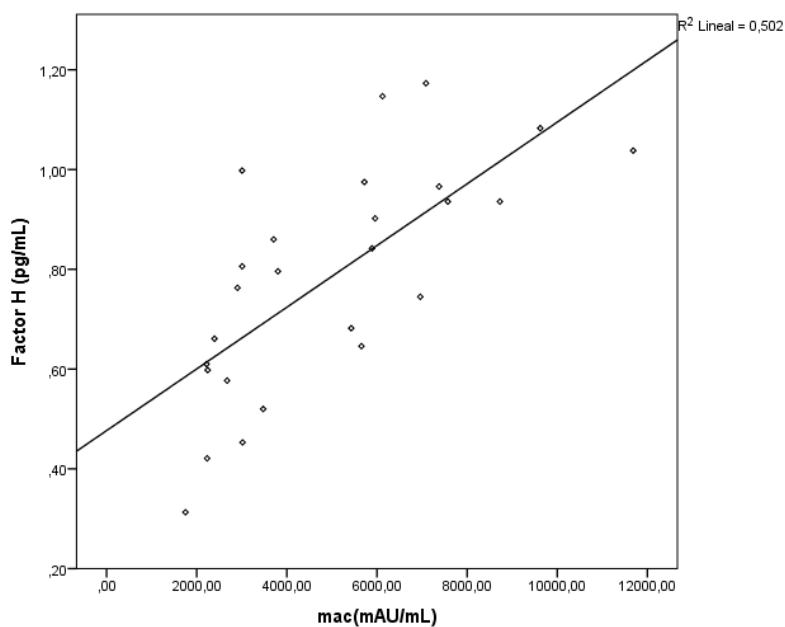


Figura 28. Correlación entre niveles plasmáticos Factor H y MAC.

- **Las concentraciones plasmáticas de MAC se relacionan con la evolución de la función renal y de la supervivencia a medio-largo plazo.**

De los 81 pacientes con IRA incluidos en nuestro estudio, 60 pacientes tienen un seguimiento de 36 meses. Durante este tiempo se han detectado 29 **nuevos episodios de IRA**. Según la etiología del primer episodio, la distribución es la siguiente (Figura 29).

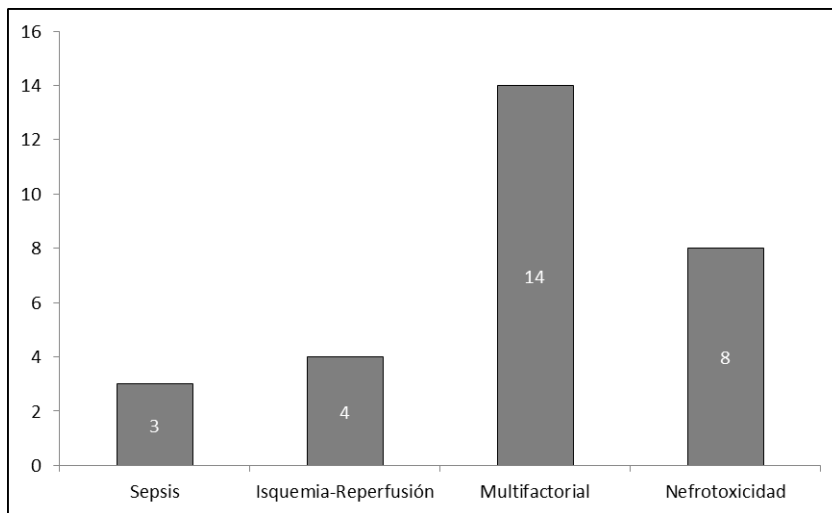


Figura 29. Distribución de las etiologías del primer episodio de IRA en los 29 pacientes con nuevos episodios de IRA en el seguimiento.

Las concentraciones de MAC muestran una tendencia no significativa a ser más elevadas en aquellos pacientes que desarrollan posteriormente nuevos episodios de IRA que en los que no (6613.9 ± 939.7 mAU/mL vs 5791.4 ± 527.3 mAU/mL, $p=0.074$) (Figura 30).

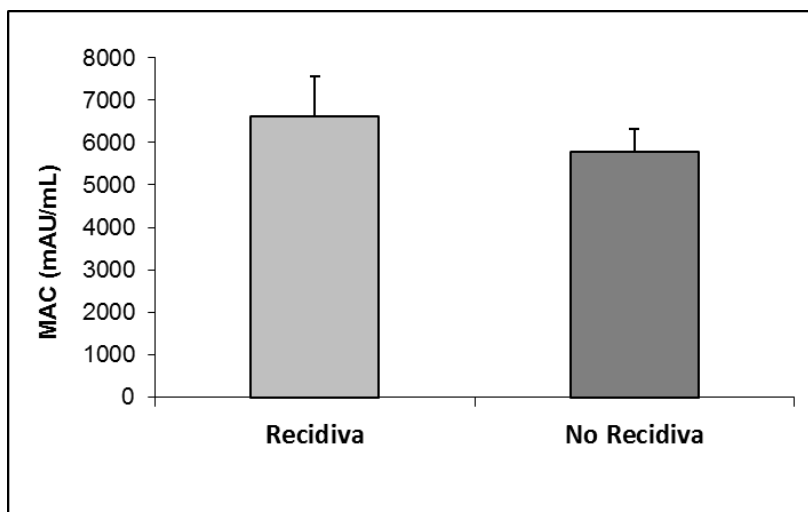


Figura 30. Concentraciones plasmáticas de MAC según si el paciente desarrolla nuevos episodios de IRA o no ($p=0.07$)

Si observamos diferencias estadísticamente significativas en los niveles plasmáticos de IL-6, de tal manera que aquellos pacientes que presentarán nuevos episodios de IRA, tienen unas concentraciones menores de IL-6 comparando con las concentraciones de los pacientes que si sufrirán nuevos episodios (12.0 ± 1.6 pg/mL vs 19 ± 1.7 pg/mL, $p=0.008$) (Figura 31). Esta misma tendencia la observamos en las concentraciones de IL-10, de tal manera que aquellos pacientes que sufrirán nuevos episodios de IRA, son los que en el primer episodio de IRA presentan menores niveles de IL-10, aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas (4.5 ± 1.2 pg/mL vs 27.3 ± 11.7 pg/mL: $p=0.08$).

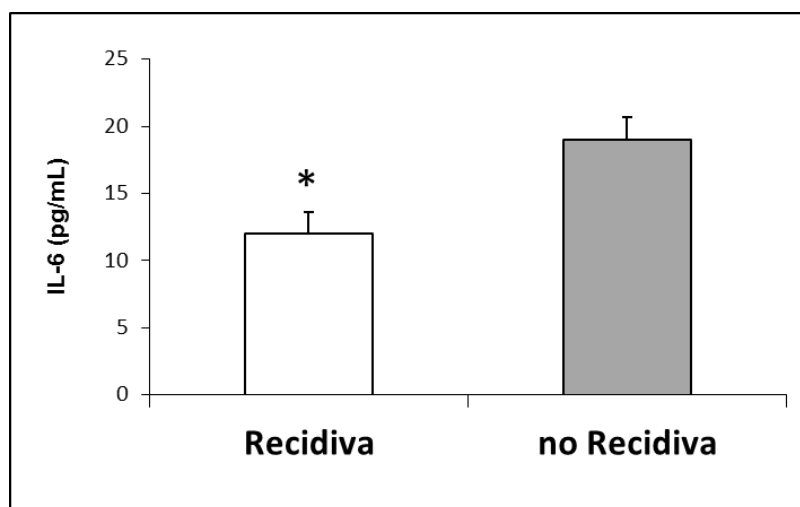


Figura 31. Concentraciones plasmáticas de IL-6 según si el paciente desarrolla nuevos episodios de IRA o no (*p=0.008). Media ± error típico.

Durante el seguimiento, 23 de estos pacientes desarrollan **Insuficiencia Renal Crónica (IRC)**. La distribución de la etiología de los episodios de IRA se detalla en la figura 32.

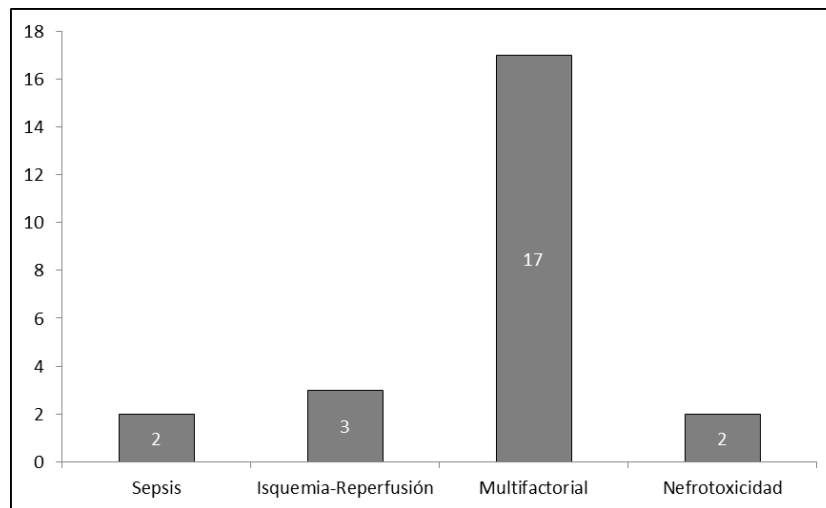


Figura 32. Distribución de las etiologías del primer episodio de IRA en los 23 pacientes que desarrollan enfermedad renal crónica en el seguimiento.

En los pacientes que desarrollarán IRC, los niveles de MAC en el episodio de IRA son significativamente más elevados (7786.2 ± 959 vs 4838.8 ± 434 mAUmL, $p=0.02$) (Figura 33).

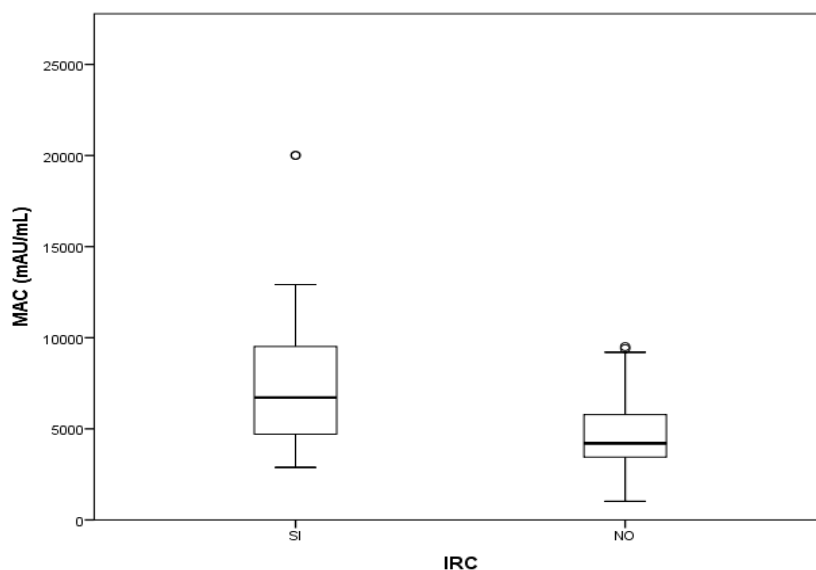


Figura 33. Concentraciones plasmáticas de MAC según si el paciente desarrolla IRC ($p=0.02$)

Hemos observado además, que también existen diferencias en las concentraciones plasmáticas de otros parámetros inflamatorios, de tal manera que los pacientes que desarrollarán IRC, durante el episodio de IRA tienen unas concentraciones significativas más elevadas de Lipocalina-2 (688.5 ± 70.6 ng/mL vs 411.2 ± 20.2 ng/mL, $p=0.003$) (Figura 34); además este grupo de pacientes muestra unas concentraciones plasmáticas de IL-6 en el episodio de IRA son significativamente menores que en grupo de pacientes que mantienen una función renal normal (13.1 ± 1.7 pg/mL vs 18.8 ± 2 , $p=0.03$) (Figura 35).

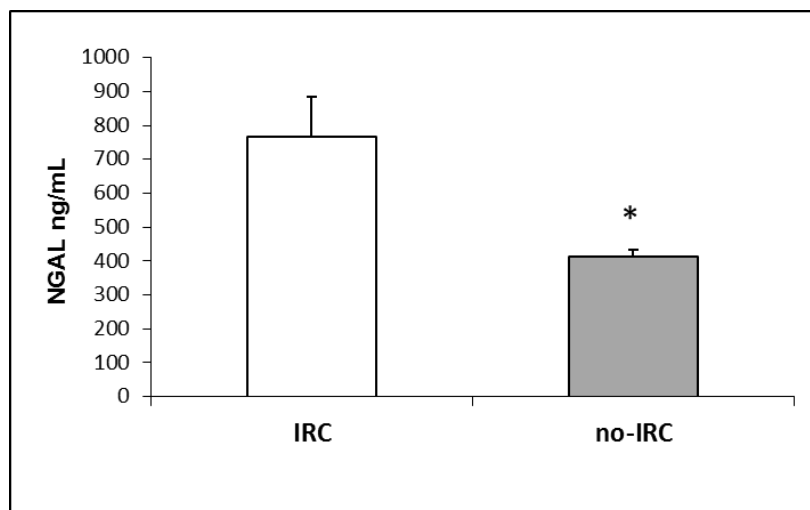


Figura 34. Concentraciones plasmáticas de NGAL según si el paciente desarrolla IRC o no ($p=0.003$). Media \pm error típico

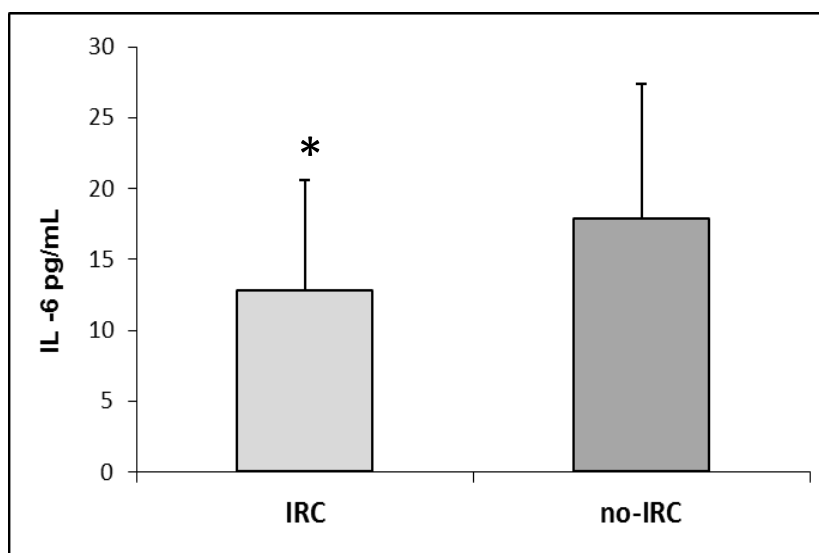


Figura 35. Concentraciones plasmáticas de IL-6 según si el paciente desarrolla IRC o no ($p=0.03$). Media \pm error típico

En este grupo de pacientes, a los 3 años se producen 13 éxitos (7.9%) siendo más frecuente en aquellos pacientes que durante el episodio de IRA presentan, de manera significativa concentraciones más altas de IL-10 (47.8 ± 10.2 pg/mL vs 10.3 ± 4.7 pg/mL $p<0.05$) (Figura 36) y de NGAL o lipocalina-2 (558.6 ± 52.6 vs 343.7 ± 54 mAU/mL, $p<0.05$) (Figura 37).

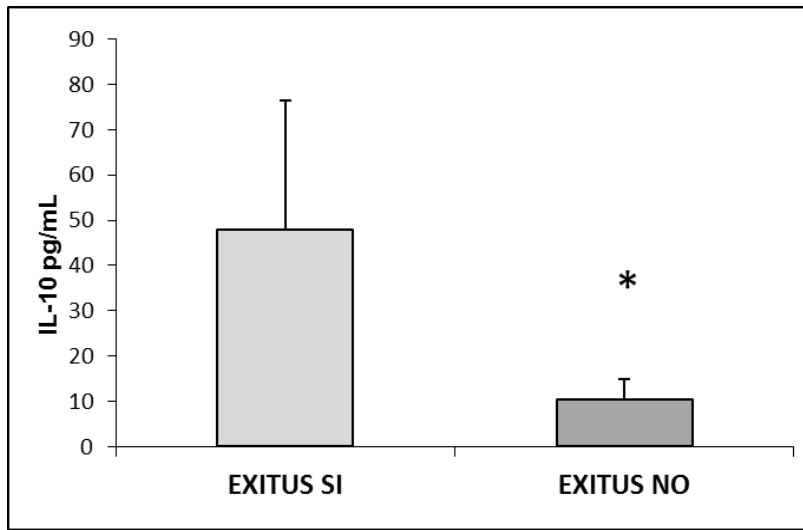


Figura 36. Concentraciones plasmáticas de IL-10 según si el paciente fallece o no. Media \pm error típico

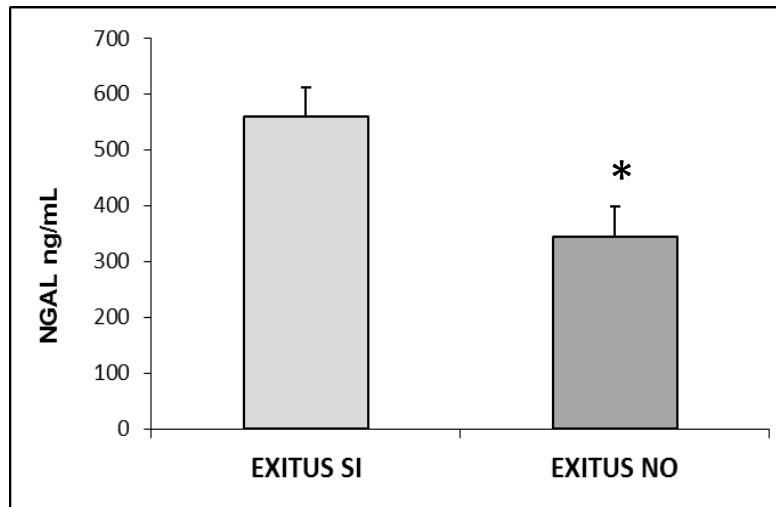


Figura 37. Concentraciones plasmáticas de NGAL según si el paciente fallece o no. Media \pm error típico

5.2.2. Resultados plasmáticos MAC en el grupo de IRA 2^o isquemia-reperfusión

El grupo de isquemia-reperfusión presenta unas características clínicas que justifican un análisis específico. Las muestras de sangre de este grupo fueron tomadas el séptimo día post-trasplante, mientras estos pacientes ya recibían tratamiento farmacológico inmunosupresor con tacrolimus, micofenolato y esteroides. Por otro lado, las definiciones clásicas de recuperación de función renal y las indicaciones de diálisis no se ajustan a las de la IRA de otra etiología.

Como hemos explicado anteriormente, los resultados muestran que las concentraciones plasmáticas de MAC en este grupo de pacientes son significativamente más altas que en el resto de los pacientes estudiados, independientemente de su función renal.

- **Las concentraciones de MAC se relacionan con la gravedad de la IRA.**

En el grupo de pacientes sometidos a trasplante renal, los niveles plasmáticos de MAC en el séptimo día post-trasplante, son significativamente más elevados en aquellos pacientes con función renal retardada del injerto (n=26) comparando con los pacientes con función renal inmediata (n=21) (8040.5 ± 816.2 vs 4450.9 ± 382 mAU/mL, $p=0.001$) (Figura 38).

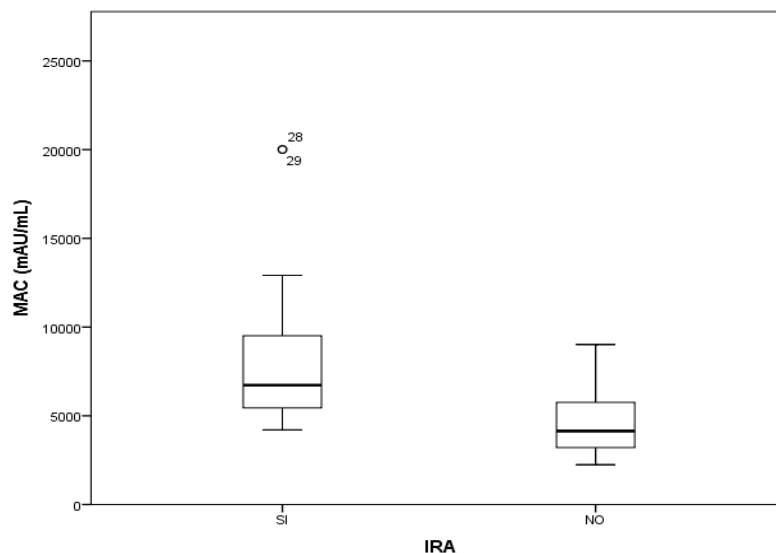


Figura 38. Concentraciones plasmáticas de MAC según si el paciente transplantado desarrolla IRA por necrosis tubular aguda o no.

En un pequeño subgrupo de pacientes (n=17) todos ellos con recuperación de la función renal en el momento del alta hospitalaria, realizamos niveles plasmáticos de MAC 30 días post trasplante renal, observando una disminución en las concentraciones plasmáticas de MAC de ambos grupos, tanto en el de función retardada del injerto [FRI] como en el de función inmediata del injerto [FII]. A pesar de

esa disminución, la concentración mantienen una tendencia a ser más elevada en aquellos pacientes que habían presentado IRA (4818.7 ± 477 vs 3739.5 ± 352 mAU/mL; $p=0.09$) (Figura 39).

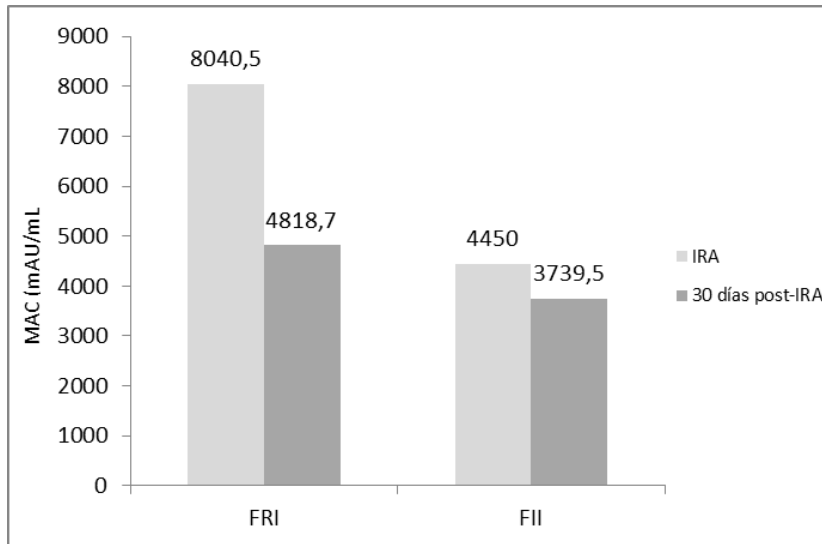


Figura 39. Concentraciones plasmáticas de MAC según si el paciente trasplantado desarrolla IRA o no.

No hemos observado que las concentraciones de MAC en el episodio agudo estén relacionadas con la duración del mismo. Respecto a la recuperación de la función renal, es necesario especificar que en este grupo todos los pacientes recuperan función renal al menos parcialmente. Definimos recuperación parcial como disminución $>50\%$ de la creatinina basal sin necesidad de tratamiento renal sustitutivo en el momento del alta.

Las concentraciones más elevadas de MAC corresponden a aquellos pacientes que en el momento del alta no han recuperado función renal de manera completa, de tal manera que aquellos pacientes que recuperan ($n=11$) tienen menores concentraciones de MAC (5450 ± 584 mAU/mL) que aquellos que no ($n=18$; 8240 ± 480 mAU/mL; $p<0.001$) (Figura 40).

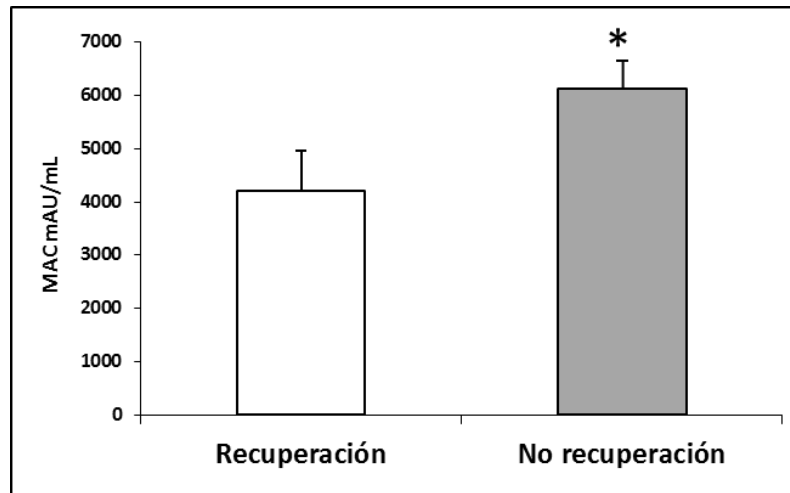


Figura 40. Concentraciones plasmáticas de MAC según si el paciente trasplantado recupera total o parcialmente la función del injerto renal (* $p < 0.001$). Media \pm error típico

Dado que la indicación de TRS en este grupo de pacientes se basa más en datos clínicos que analíticos, no hemos utilizado este parámetro para valorar la gravedad del fracaso renal.

- **Las concentraciones plasmáticas de MAC se relacionan con parámetros inflamatorios.**

En este grupo de pacientes hemos objetivado unas concentraciones plasmáticas más elevadas de IL-6, IL-10 y NGAL, en aquellos con FRI, aunque estas diferencias solo alcanzan significación estadística en el caso de NGAL (666.5 ± 50.2 vs 260.8 ± 45.7 ng/mL, $p < 0.001$) (Figura 41).

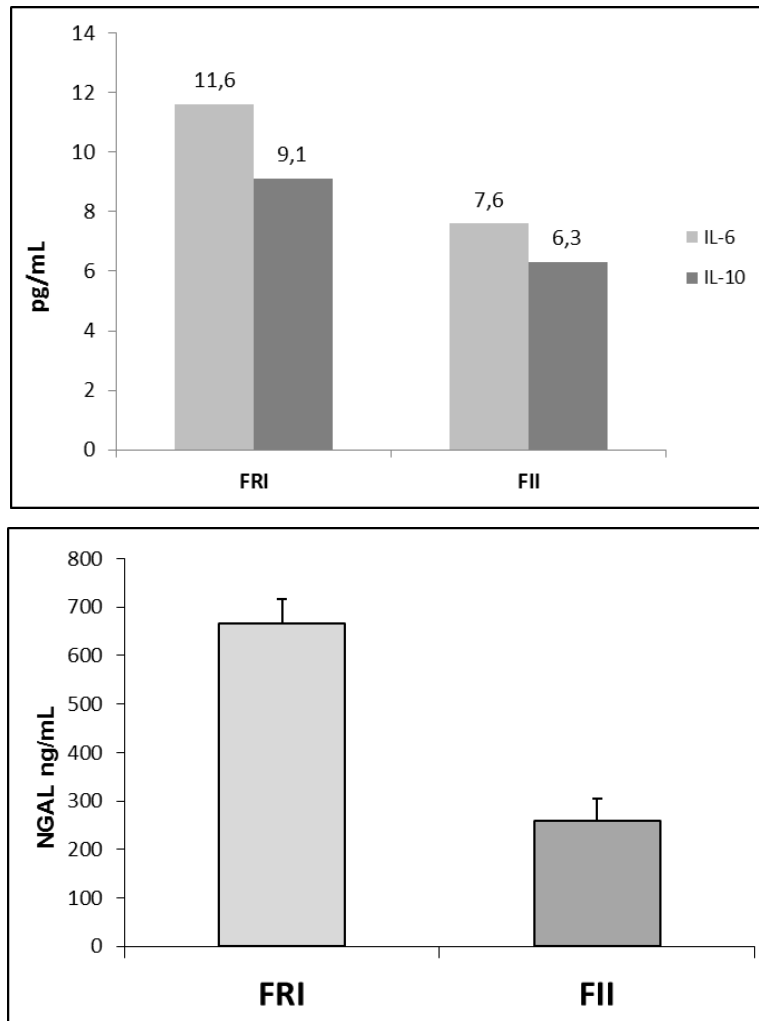


Figura 41. Concentraciones de IL-6 e IL-10 (panel superior) y NGAL (panel inferior) en pacientes con función retardada (FRI) o inmediata del injerto (FII).

En este subgrupo de pacientes hemos detectado una correlación indirecta significativa entre los niveles de MAC y las concentraciones de IL-10 (coeficiente de Pearson 0.6, $p=0,03$). Por otro lado, se han hallado correlaciones directas significativas entre la concentración de IL-6 (coeficiente Pearson 0.66, $p=0.05$) e IL-10 (coeficiente Pearson 0.99, $p=0.01$) y la duración de la IRA (Figura 42 A y B).

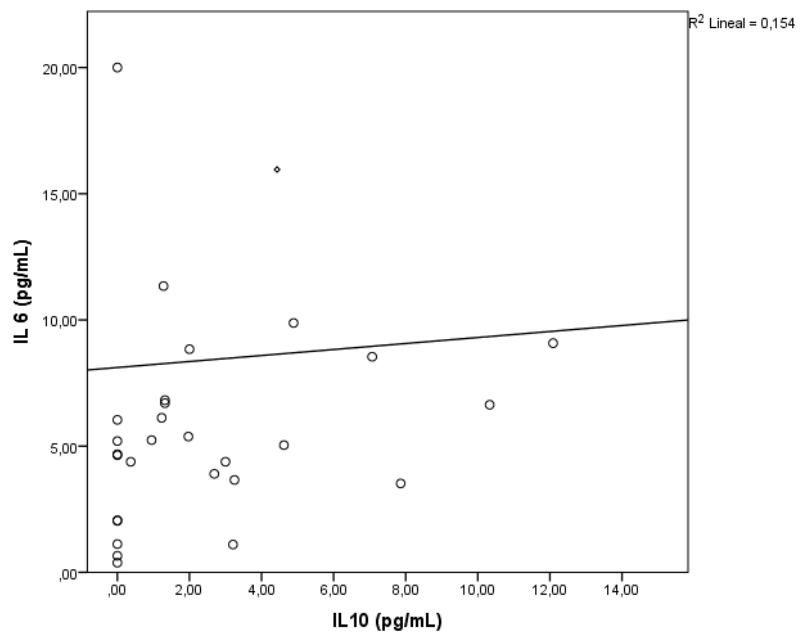
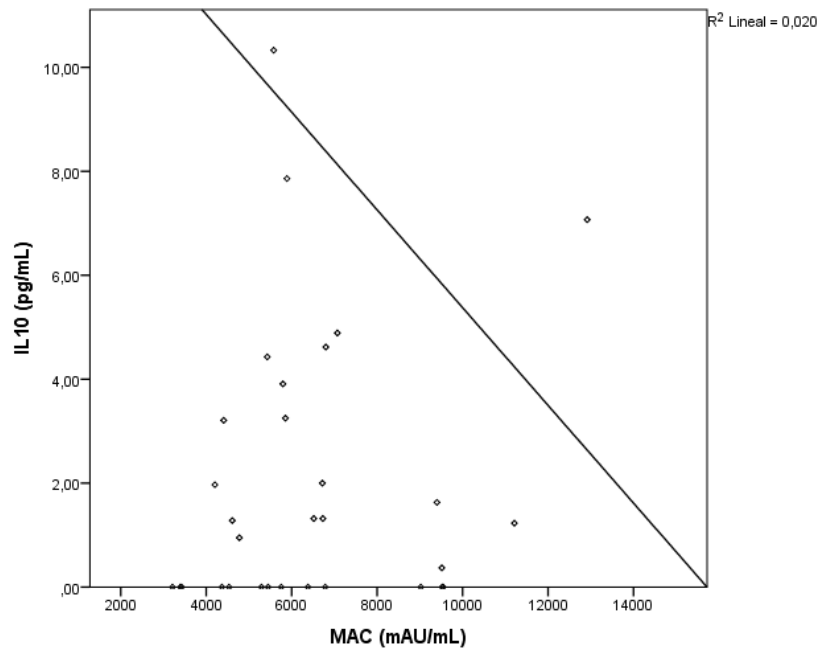


Figura 42. Correlación entre los niveles de MAC y las concentraciones de IL-10 (A), entre las concentraciones de IL-6 e IL-10 (B)

- **Las concentraciones plasmáticas de MAC se relacionan con la evolución de la función renal a medio plazo.**

En este grupo de pacientes sometidos a trasplante renal, evolucionan hacia IRC, definida como pérdida del injerto o bien empeoramiento progresivo de función renal en tres años, 18 pacientes. Estos pacientes muestran una tendencia no significativa a presentar en el post trasplante inmediato niveles de MAC más elevados que aquellos pacientes que presentarán una buena evolución del injerto, (8678 ± 524 vs 6606.2 ± 826.3 mAU/mL; $p=0.24$) (Figura 43).

Esa misma tendencia se mantiene a los 30 días del trasplante, con mayor concentración de MAC en aquellos pacientes que evolucionan hacia la pérdida renal. Se trata de un grupo muy pequeño ($n=5$) y las diferencias no son estadísticamente relevantes (4721 ± 491 vs 2677 ± 681.3 mAU/mL, $p=0.07$) (Figura 43).

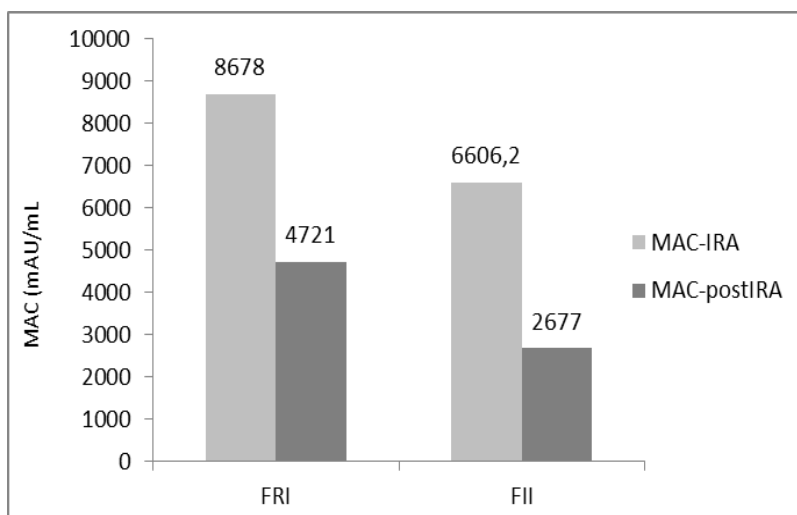


Figura 43. Concentraciones de MAC a los 7 y 30 días del trasplante renal, FRI=5 pacientes vs FII= 5 pacientes.

5.3. RESULTADOS INMUNOHISTOQUIMICA ENZIMATICA EN TEJIDO RENAL PROCEDENTE DE AUTOPSIA.

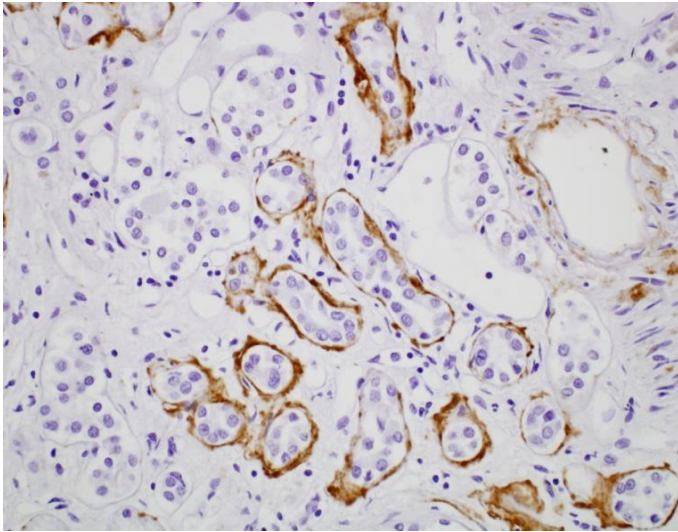
5.3.1. Tinción inmunohistoquímica complejo ataque membrana del complemento (C5b-C9)

Hemos procedido a la tinción de 33 muestras de parénquima renal cortical fijado en formol e incluido en parafina procedentes de autopsias clínicas, utilizando como anticuerpo primario anti-MAC humano. Veintiuna (63.6%) muestras proceden de cadáveres de pacientes con diagnóstico analítico de IRA frente a 12 (36.4%) muestras de tejido renal procedente de pacientes con función renal normal.

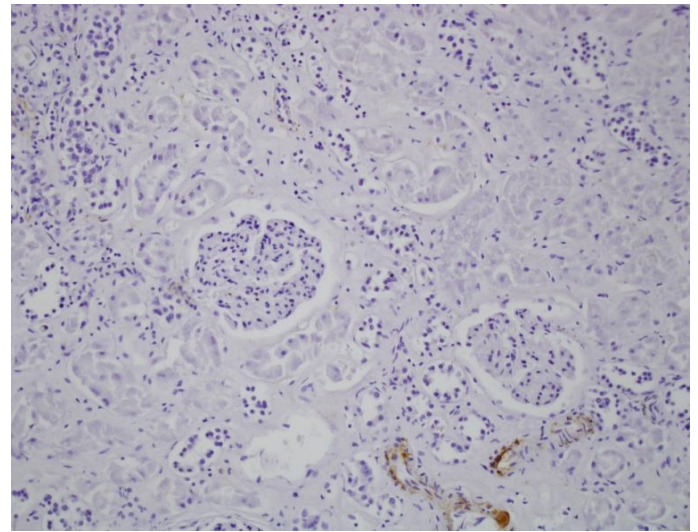
- **Tinción de Inmunohistoquímica en túbulos corticales proximales**

En la muestra de pacientes con IRA, se observó una tinción inmunohistoquímica de MAC lineal de tipo peritubular localizada en la membrana basal tubular sin observarse tinción citoplasmática ni de la membrana lateral o apical de la célula tubular (Figura 38). Observamos, que en los pacientes con IRA la tinción afectaba a un mayor número de túbulos, de tal manera que 57% (n=12) de los pacientes con IRA presentaban una tinción marcada (>50% de los túbulos corticales), mientras que no se objetivó tinción marcada en ninguna de las muestras de tejido renal con función renal normal (p<0.001). Un 36.4% de los pacientes con función renal normal tenían una tinción débil para MAC (<25% de los túbulos).

En los pacientes con IRA, además de observarse un mayor porcentaje de túbulos que mostraban tinción para MAC, observamos que esta tinción afectaba a un mayor porcentaje del perímetro tubular, de manera que 11 pacientes con IRA (52.4%) presentan un tinción para MAC que afectaba >50% del perímetro tubular, a diferencia de las muestras de pacientes con función renal normal (n=12), en las cuales la afectación del perímetro tubular es <25% (p=0.02).



Tinción MAC (marrón) en IRA. Aumento original *20

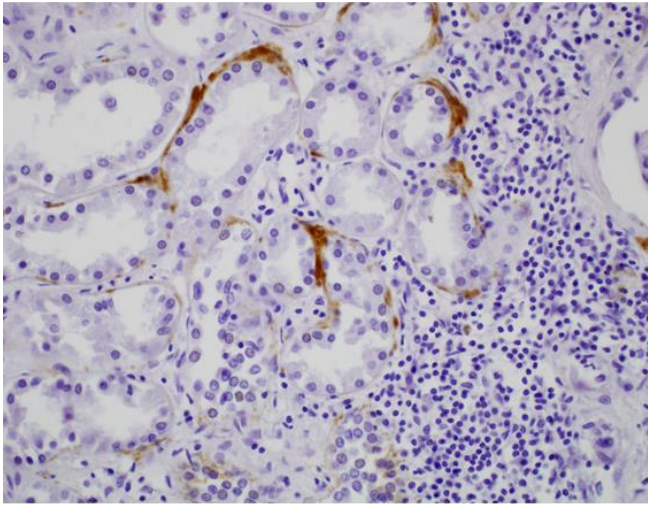


Tinción MAC en función renal normal. Aumento original *20

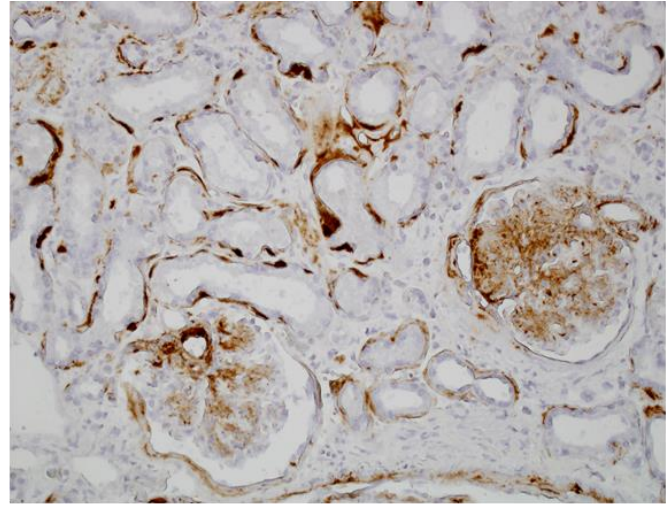
Figura 44. Tinción de MAC en tejido renal de autopsia procedente de pacientes fallecidos con IRA o función renal normal.

Por último, valoramos la intensidad de la tinción, hallándose que los pacientes con IRA (n=14; 66.7%) presentan una tinción marcada, mientras que 63.2% de los pacientes con función renal normal (n=12) presentan una tinción para MAC de intensidad leve (≤ 2).

Por otro lado, apreciamos tinción de MAC de aspecto inespecífico en las paredes y en el endotelio de arteriolas intrarrenales y en glomérulos (Figura 39), sin objetivarse diferencias significativas entre las muestras con IRA y aquellas pertenecientes a pacientes con función renal normal.



Tinción MAC (en marrón) en membranas basales tubulares. Aumento original *40.



Tinción MAC (en marrón) en glomérulos. Aumento original *20

Figura 45. Tinción de MAC membranas basales tubulares (IRA) y en glomérulo, inespecífico de tejido renal autopsia.

- **Tinción de Inmunohistoquímica en túbulo colectores medulares**

Los resultados observados en la tinción con C5b-C9 o MAC en túbulo medulares, son similares a los descritos previamente en los túbulo corticales proximales; de tal manera que hemos encontrado un mayor número de túbulo con tinción de C5b-C9 en pacientes con IRA comparando con las muestras de pacientes con función renal normal ($p=0.004$), además, los pacientes con IRA presentan un mayor porcentaje del perímetro tubular teñido ($p=0.025$) y una mayor intensidad de la tinción ($p=0.025$).

5.3.2. Tinción inmunohistoquímica factor H humano.

Hemos procedido a la tinción de 28 muestras de parénquima renal cortical fijado en formol e incluido en parafina procedentes de autopsias clínicas, utilizando como anticuerpo primario anti-Factor H humano; 18 de estas 28 muestras (64.3%) pertenecientes a pacientes diagnosticados de IRA mediante determinación de creatinina sérica y 10 de estas muestras (35.7%) correspondientes a pacientes con función renal normal.

En la mayor parte de las muestras remitidas se ha observado tinción citoplasmática difusa del epitelio tubular cortical (TC), apreciándose diferencias en la intensidad de la misma respecto a la función renal y respecto a alteraciones morfológicas en los TC. La intensidad de la tinción se ha valorado como negativa (ausencia de tinción), tinción débil (+1, +2) o tinción marcada (+3,+4).

No se ha observado tinción de patrón membranoso en los túbulos o en la membrana basal de estos.

En cuanto a la intensidad de tinción, el 70% de las muestras de tejido renal procedente de pacientes con función renal normal, presentan una tinción inmunohistoquímica para Factor H débil o negativa; mientras que el 77,8% de las muestras de pacientes con IRA, presentan una tinción marcada de Factor H, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p=0.02$).

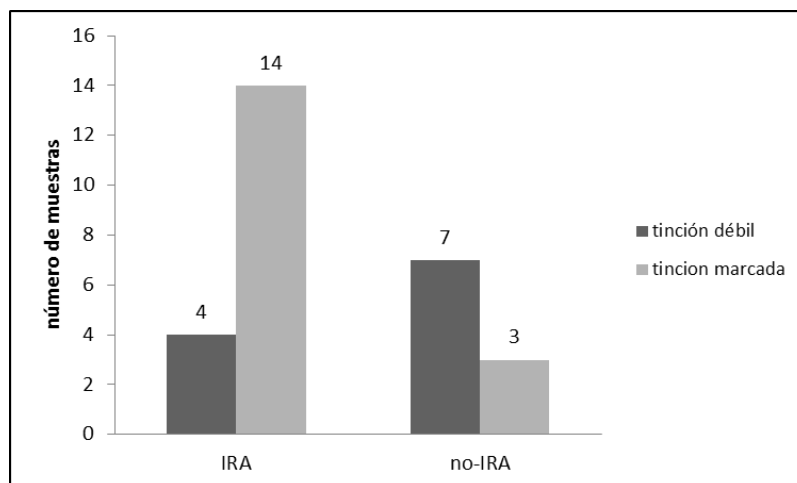


Figura 46. Diferencias cualitativas de tinción inmunohistoquímica para factor H en muestras autópsicas de pacientes fallecidos con IRA o función renal normal.

En el grupo de pacientes con diagnóstico IRA, hemos observado que la intensidad de la tinción varía según el patrón morfológico de daño agudo tubular renal (DATR) histológico observado en cada muestra. De este modo, hemos clasificado las muestras en dos patrones histológicos:

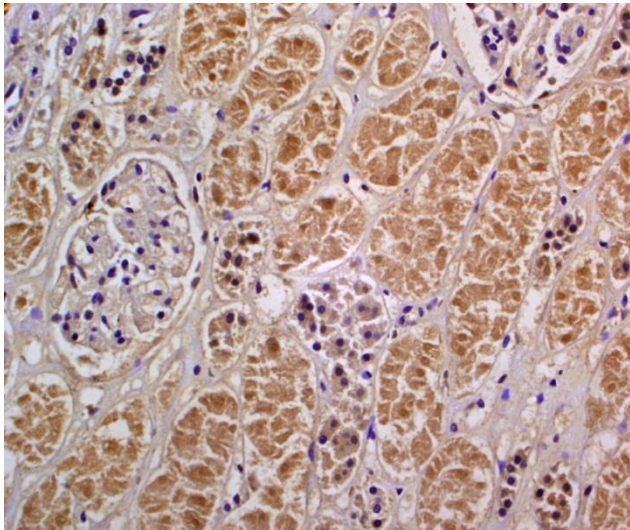
1. Patrón histológico **leve**: incluye por un lado los casos con dilatación del túbulo y aplanamiento del epitelio tubular y, por otro lado, los casos con vacuolización del epitelio tubular (clásicamente conocida por degeneración hidrópica).
2. Patrón histológico **grave**: incluye los casos con necrosis de tipo coagulativo significativa del epitelio tubular o aquellos con desprendimiento del epitelio a la luz tubular en forma de detritus celular.

Si comparamos estos dos patrones histológicos con la intensidad de la tinción para factor H encontramos diferencias significativas, de manera que el 100% de las muestras pertenecientes a las formas histológicas con menor severidad de DATR presentan tinción débil frente al factor H. Por otro lado, en las muestras con formas

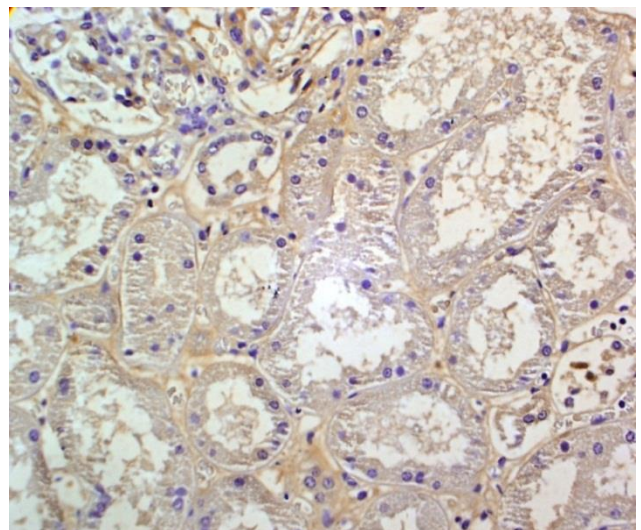
histológicas más severas de DATR un 62.5% presentan tinción marcada frente al Factor H y sólo un 37.5% de éstas, presentan una tinción débil ($p < 0.05$) (Figura 48).

Además observamos en todas las muestras examinadas tinción de factor H en el citoplasma de las células epiteliales de la cápsula de Bowman, con independencia de la función renal.

No se ha observado tinción de factor H en las células del epitelio visceral glomerular (o podocitos) ni en células endoteliales (tanto glomerulares como vasculares).



*Inmunohistoquímica Factor H en IRA (marrón). Aumento original *40*



*Inmunohistoquímica Factor H, función renal normal (marrón). Aumento original *40*

Figura 47. Tinción inmunohistoquímica de factor H en tejido renal

5.4. SUBESTUDIO EN SUBGRUPO DE PACIENTES CON TRASPLANTE RENAL

Con el objetivo de confirmar los resultados descritos previamente, tanto en las muestras de suero como de histología renal, seleccionamos un pequeño grupo de pacientes (n=10) con diagnóstico analítico e histológico de necrosis tubular aguda (NTA) en el inmediato postrasplante. Cinco pacientes presentaron una recuperación completa de la función renal durante los primeros 30 días tras el diagnóstico mientras que 5 pacientes mantenían deterioro de función renal.

De cada uno de estos pacientes hemos obtenido muestras de plasma en el momento del diagnóstico de IRA y a los 30 días, y además, muestras de tejido renal procedente del excedente diagnóstico de la biopsia renal; se han realizado:

- Determinaciones plasmáticas MAC, Factor H y CFHR1 en el momento del diagnóstico y al mes.
- Estudio inmunohistoquímico enzimático en tejido renal parafinado usando anticuerpos anti-MAC, anti-Factor H.

- **Determinaciones plasmáticas de MAC.**

La concentración de MAC muestra una tendencia a ser más elevada en aquellos pacientes con IRA que no recuperan función renal a los 30 días, aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas (7884.7 ± 824 vs 6728.2 ± 984 mAU/mL, $p=0.4$)

Se observan diferencias significativas en las concentraciones de MAC post-IRA, de tal manera que los pacientes trasplantados renales con función retardada del injerto (n=5) presentan unos niveles más altos de MAC que aquellos pacientes que recuperaran función renal durante el primer mes post trasplante renal (n=5) (6361.2 ± 221 vs 4728.6 ± 221 mAU/mL, $p=0.012$).

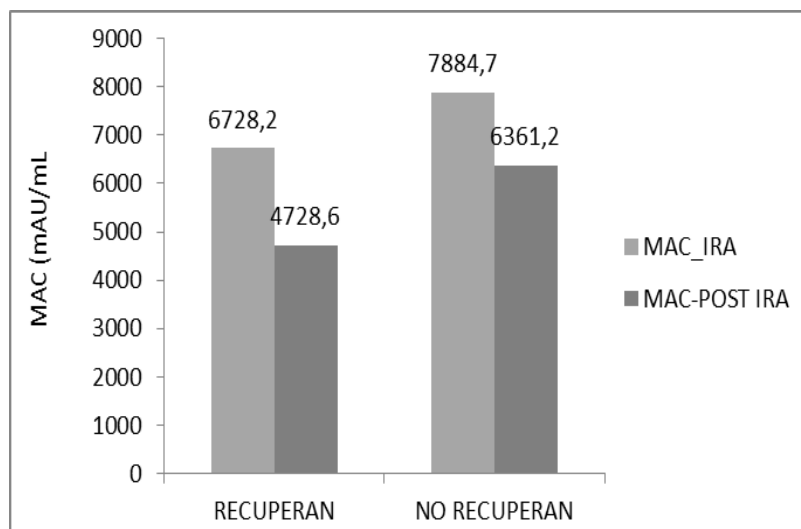


Figura 48. Concentraciones de MAC a los 7 y 30 días de trasplante en dos pequeños grupos de pacientes trasplantados, 5 pacientes que recuperan totalmente la función del injerto y otros 5 que no recuperan.

Existe, además, una correlación directa entre la creatinina plasmática en el momento de la NTA y la concentración plasmática de MAC a los 30 días del proceso ($r=-0.47$; $p=0.05$).

- **Determinaciones plasmáticas Factor H.**

Hemos realizado la determinación de las concentraciones plasmáticas de Factor H en el mismo grupo de pacientes. En el momento del diagnóstico de IRA, no hemos hallado ninguna diferencia en las concentraciones de factor H entre aquellos pacientes que recuperan la función renal ($n=5$; 0.95 ± 0.09 ; $p=0.65$) y aquellos que 30 días después continuarán con IRA ($n=5$; 0.90 ± 0.75 vs 0.90 ± 0.77 ; $p=0.74$).

Tampoco hemos hallado ninguna diferencia en las concentraciones de factor H 30 días después del episodio agudo (0.92 ± 0.07 vs 0.93 ± 0.07 ng/mL; $p=0.8$); siendo además las concentraciones plasmáticas similares en todas las situaciones.

- **Determinaciones plasmáticas de CFHR1**

Realizamos determinaciones plasmáticas de CFHR1 en un pequeño grupo de estos pacientes sometidos a trasplante renal, sin encontrar ninguna diferencia entre las concentraciones tanto en el momento de la IRA como a los 30 días post-IRA.

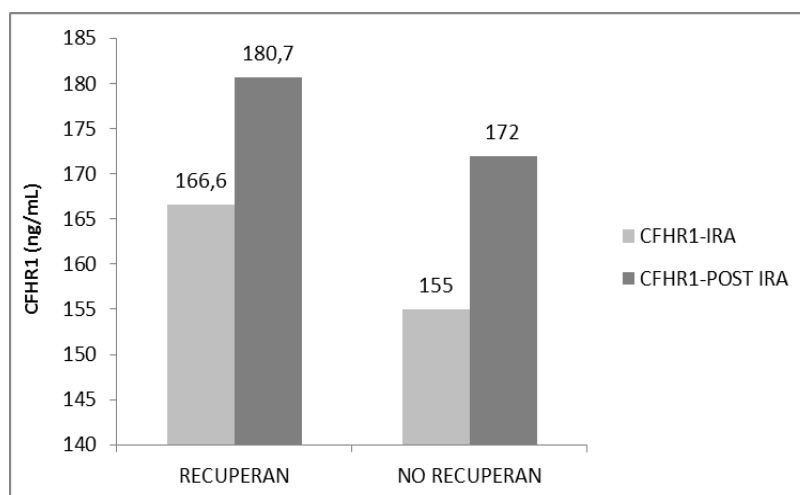


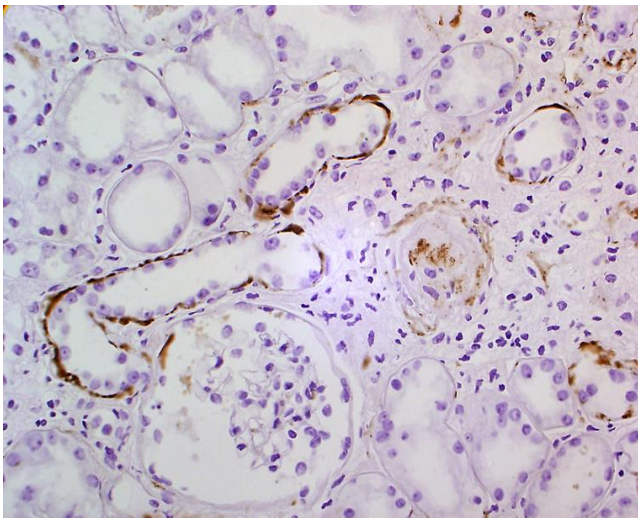
Figura 49. Concentraciones de CFHR1 a los 7 y 30 días de trasplante en dos pequeños grupos de pacientes trasplantados, 5 pacientes que recuperan totalmente la función del injerto y otros 5 que no recuperan.

- **Tinción inmunohistoquímica MAC en tejido procedente de biopsia.**

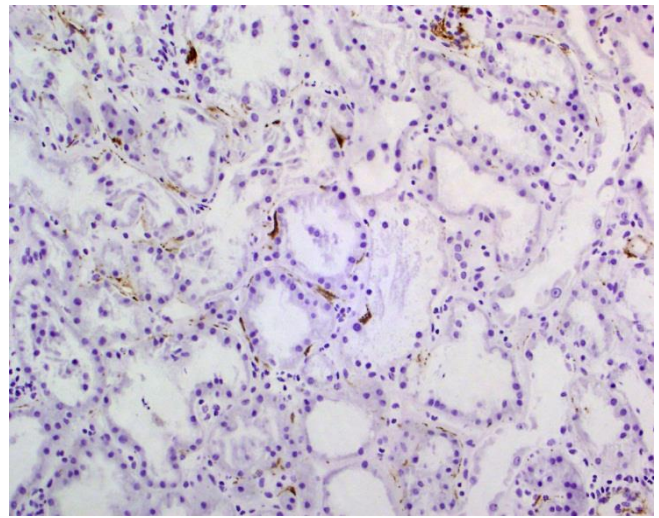
Hemos realizado tinción inmunohistoquímica para MAC en tejido renal procedente del excedente diagnóstico de 10 muestras de biopsia renal, de pacientes diagnosticados de NTA tanto por parámetros analíticos como histológicos. De estos, 5 pacientes alcanzaron función renal normal antes de 30 días y los 5 restantes mantuvieron deterioro de función renal.

También se realizó tinción para MAC en dos muestras de pacientes con función renal normal, obtenidas de nefrectomías indicadas por causas oncológicas.

El patrón hallado es similar al descrito en las tinciones de tejido renal procedente de autopsia, mostrando un patrón de tinción lineal peritubular que afecta > 50% de los túbulos con una tinción que afecta a > 50% del diámetro tubular (Figura 43). Aunque estadísticamente no es significativo, la tinción en las muestras de pacientes que recuperaran función renal, afecta a un menor porcentaje del diámetro tubular (25-50% vs 50-75%) mostrando también una menor intensidad (+2 vs +3,+4).

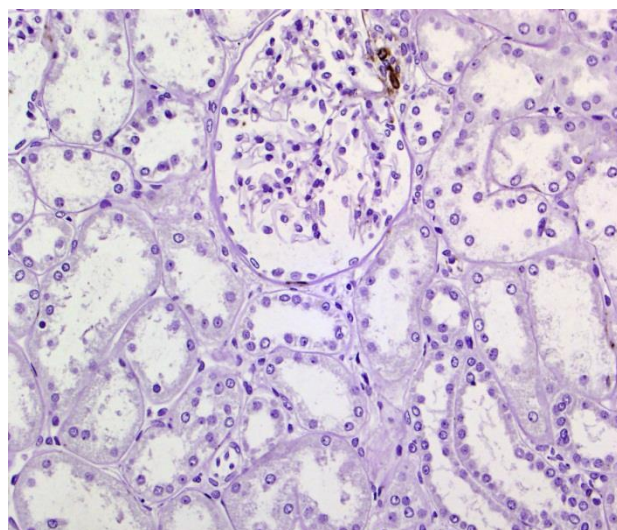


*Imunohistoquímica MAC en IRA (marrón). Aumento original *40 . Paciente NO recupera función renal.*



*Imunohistoquímica MAC en IRA (marrón). Aumento original *40 . Paciente recupera función renal.*

A diferencia de las muestras procedente de autopsia, donde aquellas correspondientes a pacientes con función renal normal mostraban tinción para Factor H intracitoplasmática, pero de intensidad leve (Figura 44), en las muestras utilizadas como “controles” no observamos tinción inmunohistoquímica.

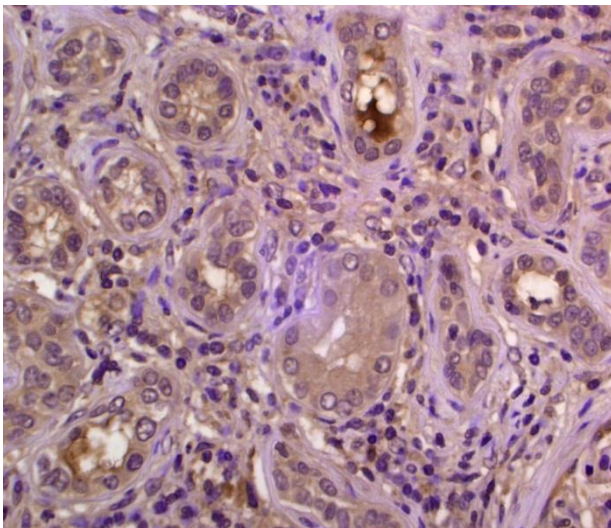


*Imunohistoquímica MAC en función renal normal (marrón). Aumento original *40*

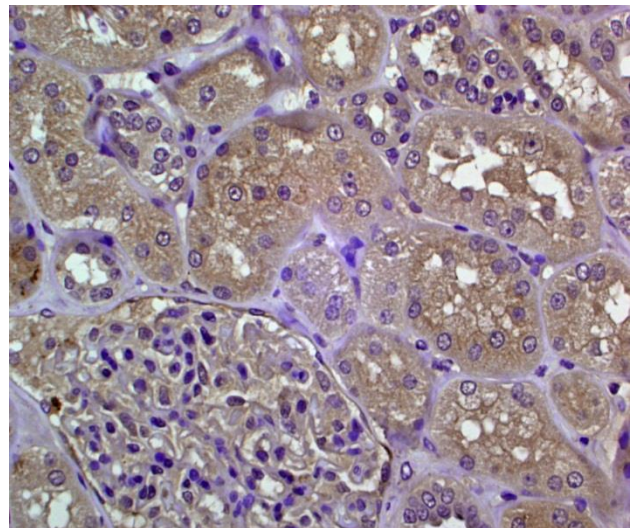
- ***Tinción inmunohistoquímica Factor H en tejido procedente de biopsia***

Los resultados muestran un patrón de tinción citoplasmático superponible a los hallazgos de la tinción inmunohistoquímica de las muestras procedentes de autopsias. Hemos observado que en los pacientes que no recuperaran la función renal se observa una tinción de intensidad marcada (+3, +4) (80%) mientras que esta tinción marcada no se observa en ninguno de los pacientes que recuperaran función renal, estas diferencias no alcanzan la significación estadística ($p=0.075$).

En las muestras “controles” no se observa tinción inmunohistoquímica para Factor H.



*Inmunohistoquímica Factor H en función renal normal (marrón). Aumento original *40*



*Inmunohistoquímica Factor H IRA (marrón). Aumento original *40*

DISCUSIÓN

6. DISCUSION

6.1. RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS EN MUESTRAS PLASMATICAS.

Los resultados de este trabajo de investigación muestran que en la patogenia de la IRA humana existe una participación del sistema del complemento, medido a través de las concentraciones plasmáticas de la fracción lítica del mismo (C5b-C9), el llamado Complejo Ataque de Membrana (MAC). Esta participación se produce independientemente de la etiología del fracaso renal agudo, y no solo en procesos sépticos en los que clásicamente se conoce que el sistema del complemento está activado, al constituir uno de los elementos más importantes del sistema inmune innato.

Nuestros datos muestran que las concentraciones plasmáticas de MAC son significativamente más elevadas en pacientes con IRA comparado con los niveles plasmáticos de MAC de pacientes con función renal normal pero con las mismas características clínicas. Las concentraciones plasmáticas de MAC se relacionan con diferentes parámetros clínicos de gravedad, y se elevan proporcionalmente en los estadios RIFLE de la clasificación ADQI. Son más elevados también en aquellos pacientes que requerirán tratamiento renal sustitutivo durante el episodio de IRA y que no recuperarán función renal de manera completa en el momento del alta hospitalaria.

Nuestra población de estudio está compuesta por pacientes con procesos agudos predisponentes a IRA (sepsis, nefrotóxicos, procesos de isquemia-reperusión) y en todos ellos se detecta activación del sistema del complemento. Incluso aquellos pacientes que mantienen función renal normal presentan concentraciones plasmáticas de MAC más elevadas que las del grupo "control" (3702.6 vs 301 mUAU/mL), traduciendo la activación del sistema del complemento frente a una agresión. Hemos confirmado que en el momento en que existe deterioro de función renal, las concentraciones de MAC prácticamente son el doble de las concentraciones de los pacientes que a pesar de sufrir el mismo proceso agudo mantienen la función renal

normal (5848 vs 3702,6 mUAU/mL). Por otro lado, tras resolver el cuadro de IRA pero manteniendo el factor predisponente (infección, fármaco nefrotóxico, etc.) las concentraciones plasmáticas disminuyen hasta los valores que mostraban los pacientes con función renal normal (3702.6 vs 3423 mUAU/mL).

En nuestro conocimiento, este es el único trabajo que sugiere que el sistema del complemento está implicado en la etiopatogenia de la IRA humana, completando los resultados de estudios preliminares realizados por nuestro grupo¹³⁰.

Existen estudios en cultivos celulares y en modelos murinos, que han analizado la relación existente entre el sistema del complemento y la IRA, utilizando para ello diferentes modelos de fracaso renal agudo, como son los modelos de IRA secundaria a sepsis por administración de liposacárido del E. Coli (LPS), secundaria a nefrotoxicidad por administración de adriamicina u otros tóxicos, o secundario a isquemia-reperfusión. Este último modelo ha sido el más utilizado, seguramente por tratarse del más parecido a la IRA/NTA humana. El fenómeno de isquemia-reperfusión produce daño renal a través de dos mecanismos principales: la activación de la cascada del complemento, que dará lugar a apoptosis de células tubulares, y la inflamación túbulo-intersticial mediante reclutamiento y activación de células inflamatorias. Este reclutamiento celular se ha constatado ya en estudios clásicos en modelos animales a los que se somete a clampaje de arteria renal (modelo de Isquemia), publicados a finales de los 90^{131 132}.

La acción lítica o efectora del MAC como responsable del daño tubular a nivel de las células epiteliales sin afectación de otras estructuras renales, se describe por Zhou et al, en un modelo murino con déficit de C3- y C6-, en el que se demuestra además, que la infiltración por neutrófilos en estos ratones es menor que en sus homólogos *wild type*¹³³.

Posteriormente se ha descrito, también en modelos preclínicos, que el daño tubular dependerá del número de multímeros de MAC depositados en la membrana de las células tubulares, de tal manera que a concentraciones sublíticas inducirán apoptosis y activación de la célula con estimulación de distintas vías inflamatorias,

mientras que a dosis más elevadas, estos complejos de MAC “perforarán” las membranas celulares produciendo lisis celular directa o necrosis^{134 135}.

Nuestros datos clínicos parecen confirmar estos trabajos, ya que los pacientes con concentraciones plasmáticas más elevadas de MAC presentan más daño tubular en forma de insuficiencia renal más severa, más necesidad de tratamiento renal sustitutivo y necesidad de un mayor período de tiempo para la recuperación de la función renal, observándose además, una correlación directa entre las concentraciones de MAC y la creatinina plasmática y una correlación inversa con el filtrado glomerular.

Los resultados obtenidos de estudios preclínicos realizados en estos modelos de IRA han conducido a la elaboración de una hipótesis sobre el papel del sistema del complemento en los procesos de IRA (Figura 46). Según esta hipótesis, tras la injuria o agresión renal (isquemia) se produce una activación del sistema del complemento que dará lugar al depósito de MAC en la membrana de las células tubulares; este depósito inicial a concentraciones bajas de MAC (sublíticas) en las células tubulares va a producir apoptosis, y juntamente con la acción anafiláctica de los fragmentos C3a y C5a dará lugar a la activación de diferentes vías de inflamación, reclutamiento de neutrófilos y liberación de interleuquinas/citoquinas, entre ellas IL-6 e IL-10. Estas interleuquinas/citoquinas, conjuntamente con las concentraciones progresivamente más elevadas de MAC, darán lugar a necrosis celular y activarán distintas vías de fibrosis, mediante mecanismos aún pendientes de elucidar^{136 137 138 139}.

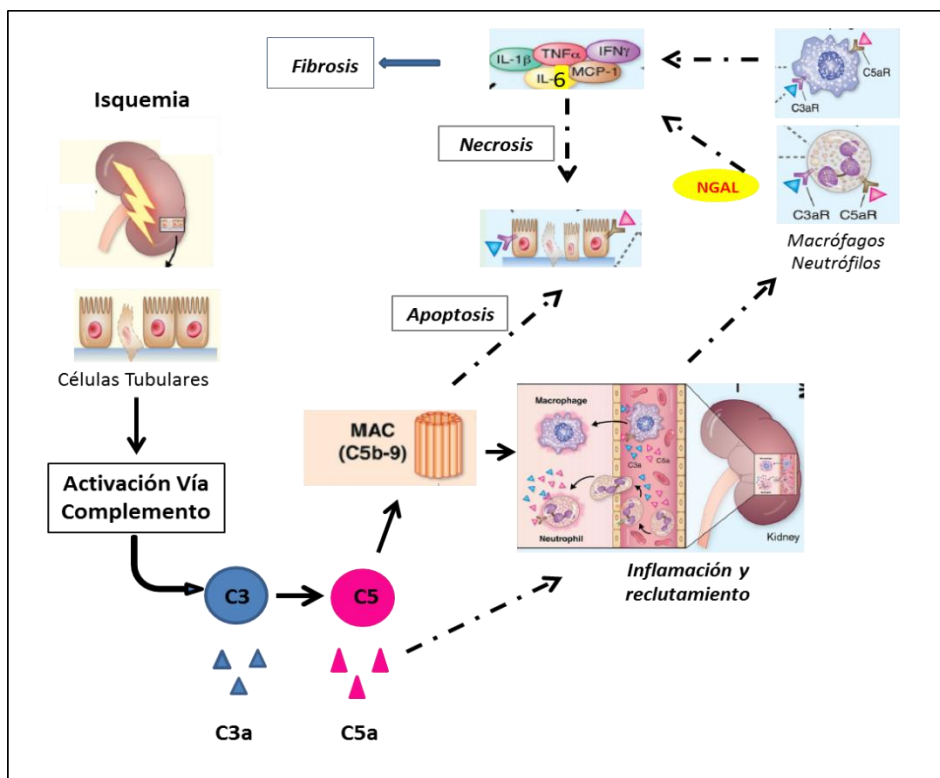


Figura 53. Hipótesis sobre el papel del Sistema del Complemento en IRA, inflamación y fibrosis. Modificado de Danobeitia et al.¹⁴⁰

Nuestros resultados parecen apoyar esta hipótesis como detallaremos a continuación. Uno de los objetivos de este trabajo es establecer si existe relación entre el sistema del complemento y otras vías de inflamación, para lo que hemos estudiado la IL-6 como responsable del SIRS, la IL-10 como máximo representante del CARS y la Lipocalina-2 o NGAL como “marcador” de activación y reclutamiento de neutrófilos.

Nuestros datos muestran que las concentraciones plasmáticas de **IL-6** son significativamente más elevadas en los pacientes con IRA que en los pacientes con función renal normal ($16,4 \pm 9,1$ vs $9,6 \pm 8,7$ pg/nL) y más elevadas en la muestra global, que las concentraciones de los pacientes pertenecientes al grupo control ($6,7 \pm 4,8$ pg/mL). Estos resultados muestran, además, que las concentraciones de IL-6 disminuyen de manera significativa tras resolverse el cuadro de IRA y disminuyen, pero sin llegar a la normalidad, en el subgrupo de pacientes en los que se resuelve el proceso agudo predisponente a IRA pero mantienen deterioro de función renal;

asimismo hemos observado que los niveles plasmáticos de IL-6 no muestran capacidad de discriminar aquellos pacientes con IRA más graves.

Hemos objetivado que existe una correlación negativa entre las concentraciones de IL-6 y las concentraciones de MAC; es importante resaltar que las todas determinaciones de biomarcadores utilizadas en este trabajo, están realizadas una vez diagnosticada IRA mediante creatinina plasmática, lo que significa que ya en ese momento existe un daño renal que afecta > 50% de las nefronas; es decir, que al inicio de la IRA, cuando al creatinina todavía no está elevada en plasma, sería el momento evolutivo de la IRA que correspondería a dosis sublétricas de MAC y activación del SIRS (IL-6); mientras que según evoluciona el proceso, las concentraciones de MAC serán más elevadas (dosis líticas), los niveles de IL-6 empezarán a descender, mientras que se elevan parámetros que traducen reclutamiento y activación de neutrófilos (Lipocalina-2) y vías contrareguladoras (IL-10) y de fibrosis.

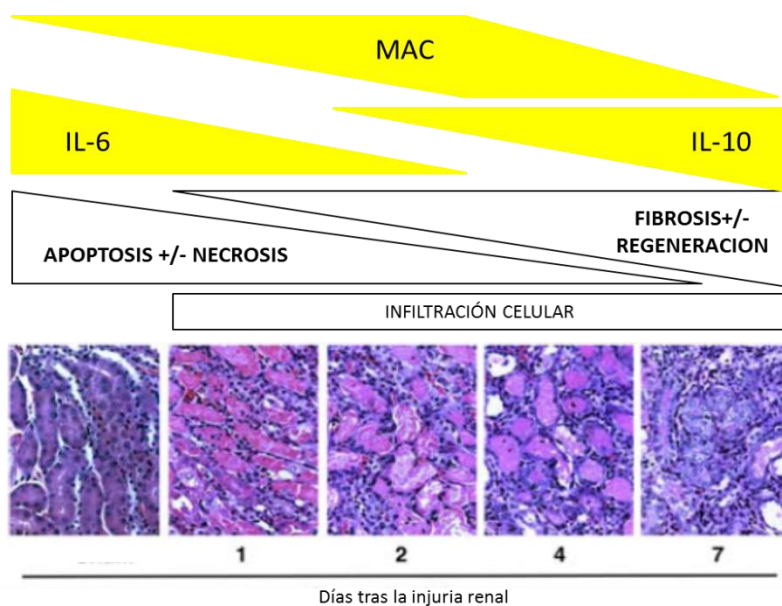


Figura 47. Esquema de la actuación de las vías inflamatorias en IRA. Modificado de¹⁴¹

Los resultados que ofrecen los pacientes pertenecientes al grupo de Isquemia-reperfusión (trasplante renal) pueden apoyar esta hipótesis; en ellos, las determinaciones plasmáticas se han realizado al séptimo día del diagnóstico de IRA, observándose que las concentraciones de MAC son más elevadas en estos pacientes comparándolas con los distintos grupos según etiología de la función renal ($6532,9 \pm 489,2$ vs $4790,7 \pm 489,3$ mAU/mL, *sepsis*). Sabemos que la terapia inmunosupresora utilizada en nuestro centro no actúa sobre ninguna vía que pueda modificar las concentraciones de MAC, así pues una explicación plausible a esta elevación en las concentraciones de MAC es que las muestras de plasma se han tomado en diferentes momentos evolutivos de la IRA, cuando está completamente instaurada (7º día post-trasplante renal) y por tanto las concentraciones de MAC son más elevadas en este grupo de pacientes. Destaca además que las concentraciones de IL-6 de estos pacientes son menores a las objetivadas en el resto de la muestra, lo que también apoyaría esta hipótesis.

Los resultados existentes en la literatura actualmente no permiten aclarar completamente el papel de la IL-6 en la IRA. Por un lado, estudios preclínicos en cultivo celular describen cierto papel protector sobre las células tubulares: la IL-6 capaz de disminuir el daño renal en modelos de IRA secundaria a endotoxemia y/o administración de HgCl₂ y conferir cierta protección al daño tubular^{99 142 93 143}, mientras que los resultados de diferentes trabajos en modelos murinos ofrecen resultados contradictorios, ya que se ha descrito que el tratamiento con IL-6 no previene el daño renal utilizando distintos modelos murinos de IRA^{144 145}. Por otro lado, los resultados de los estudios clínicos en distintas cohortes muestran que la IL-6 es un buen biomarcador de IRA, superior a otros a la hora de “predecir” IRA tras una agresión o injuria^{146 97}. Estudios realizados en la cohorte *TRIBE-AKI Consortium* constituida por pacientes sometidos a cirugía cardíaca, muestran que las concentraciones de IL-6 peroperatorias son capaces de predecir la aparición de IRA y que estas concentraciones alcanzan el pico a las 6h de la cirugía (injuria) disminuyendo

posteriormente¹¹⁷. Estudios en trasplante renal apoyan estos hallazgos, ya que los niveles de IL-6 en estos pacientes se encuentran elevados inmediatamente después de la reperfusión del órgano, con normalización posterior¹⁴⁷.

Se ha demostrado además, que en pacientes críticos se produce una estimulación tanto de SIRS (IL-6) como de CARS (IL-10) y estudios en pacientes sépticos muestran niveles de IL6 e IL-10 similares a nuestros resultados y en la misma dirección^{148 149 116}.

Por lo que respecta a la **IL-10**, los resultados de este trabajo muestran que todos los pacientes, independientemente de la función renal, tienen unas concentraciones plasmáticas elevadas de IL-10 si las comparamos con las de los pacientes del grupo "Control" y que los niveles más altos corresponden a los pacientes del grupo "Sepsis" con una diferencia significativa entre este grupo y el resto. Nuestros datos demuestran, además, una fuerte correlación entre las concentraciones plasmáticas de IL-10 y NGAL; esta correlación ha sido previamente descrita, tanto a nivel de modelos animales¹¹⁹ como en situaciones clínicas que predisponen a IRA¹¹⁷. Se ha sugerido que el papel de la IL-10 es el de moduladora en situaciones inflamatorias y que a través de este efecto, esta interleuquina sería capaz de conferir cierto efecto protector a nivel renal^{150 151}. Estudios preclínicos recientes han demostrado que este efecto protector de la IL-10 se produce a través de la inducción de NGAL¹¹⁹, confirmándose esta observación en estudios en pacientes sometidos a cirugía cardíaca como factor predisponente a IRA, en los que se observa elevación plasmática de esta citoquina tras la cirugía, aunque posteriormente estos pacientes no lleguen a desarrollar IRA. En este estudio¹¹⁶ se detalla cómo los pacientes con los niveles más elevados de IL-10 son los que presentan además concentraciones más elevadas de NGAL ó lipocalina-2 y la relación con la mortalidad de la muestra. Otros trabajos en pacientes críticos con IRA han demostrado que las concentraciones de IL-10 se relacionan de manera directa con la mortalidad durante el episodio agudo. En nuestro trabajo las concentraciones de IL-10 son significativamente más elevadas en aquellos pacientes que fallecerán durante el ingreso, independientemente de la función renal, y son además los pacientes con mayores niveles de NGAL. Es importante resaltar que en nuestra población, los pacientes que fallecen son exclusivamente

pacientes pertenecientes al grupo de “Sepsis” que además, son los pacientes que mostraban mayores concentraciones plasmáticas de IL-10, es muy probable que estos resultados traduzcan una situación inflamatoria grave en la que fracasan los sistemas compensatorios.

Por último, en nuestro estudio se muestra por primera vez una fuerte correlación entre las concentraciones plasmáticas de IL-10 y las concentraciones plasmáticas de MAC.

Respecto a los resultados de **NGAL o Lipocalina 2** hemos observado que los pacientes con IRA presentan unas concentraciones superiores en plasma a los pacientes con función renal normal, independientemente de la etiología del fracaso renal agudo y que estos niveles se correlacionan con parámetros clínicos de severidad, como la necesidad de tratamiento renal sustitutivo, la no recuperación de la función renal en el momento del alta hospitalaria del paciente y la posibilidad de ser éxitus durante el proceso agudo. Desataca que las concentraciones de NGAL son significativamente más elevadas en aquellos pacientes que fallecen, independientemente de su función renal, lo que podría traducir, al igual que los resultados de IL-10, una situación inflamatoria grave en la que fracasan los sistemas compensatorios.

Hemos confirmado también que existe una fuerte correlación positiva entre los niveles plasmáticos de NGAL, MAC e IL-10.

Si bien es cierto que en los últimos años se había identificado al NGAL como uno de los más prometedores candidatos para el diagnóstico y monitorización de la IRA^{152 153}, actualmente sabemos que se encuentra elevado en distintas situaciones como isquemia tisular e infección^{120 122}. Existen múltiples evidencias en la literatura que describen la relación entre NGAL y respuesta inmune sin que exista afectación renal^{154 155 156}, lo que hace que su función como biomarcador de IRA deba interpretarse con suma cautela. También se ha descrito en modelos murinos de sepsis sin afectación renal, la misma relación que hemos observado en nuestro estudio entre las concentraciones de NGAL e IL-10^{157 158}. La Lipocalina-2 ó NGAL tiene una acción antiinflamatoria al ser capaz de unirse a moléculas de hierro como un fagocito, lo que

impide que sea metabolizado por las bacterias inhibiendo el crecimiento de las mismas¹⁵⁹. Este es el mecanismo a través del cual se relaciona con la IL-10, ya que sabemos que la IL-10 es capaz de aumentar la expresión de la ferritina y los almacenes intracelulares de hierro¹⁶⁰.

Por último determinamos las concentraciones de **Factor H** en un pequeño subgrupo de la muestra. Dado que sabemos que la IRA no es un mecanismo mediado por reconocimiento antígeno-anticuerpo, es correcto suponer que si en la IRA existe alteración o disregulación del sistema del complemento, esta debe producirse por alteración a través del vía alternativa del complemento, como se ha demostrado en otras enfermedades renales en los últimos años^{161 40 42}. Por este motivo decidimos estudiar el Factor H, proteína reguladora de la vía alternativa del complemento. Nuestros resultados muestran que las concentraciones plasmáticas de Factor H son significativamente más elevadas en aquellos pacientes con IRA, aunque no sirven para discriminar formas clínicas graves posiblemente por el pequeño tamaño muestral. Hemos objetivado también que existe una correlación positiva con las concentraciones de MAC. El factor H se sintetiza de manera preferente en el hígado^{162 22}, aunque está descrita la síntesis extrahepática en una gran variedad de células, como células epiteliales de la retina, linfocitos, mioblastos, células glomerulares mesangiales y células epiteliales^{24 163 164}. Esta síntesis extrahepática se ha interpretado como un mecanismo para aumentar la concentración local de Factor H para proteger a las células huésped de la acción del MAC⁴⁰. Nuestros datos podrían estar mostrando este efecto: un aumento de la producción local de Factor H de manera paralela al aumento en las concentraciones de MAC en las células epiteliales tubulares con el objetivo de protegerse frente a la acción lítica del MAC, pero que por mecanismos aún no conocidos fracasa y dando lugar a la IRA.

Nuestros resultados muestran que el sistema del complemento no solo juega un papel importante en el momento agudo de la IRA, sino que parece que pueda tener un papel en la evolución a medio-largo plazo de la función renal de estos pacientes. De este modo, hemos observado que de la población inicial de 81 pacientes con IRA incluidos en nuestro estudio, 60 pacientes tienen un seguimiento de 36 meses y durante este tiempo se han detectado 29 nuevos episodios de IRA.

Los pacientes que han presentado **nuevos episodios de IRA**, son aquellos que durante el primer episodio mostraron las concentraciones más elevadas de MAC (6613.9 ± 939.7 vs 5791.4 ± 527.3 mAU/mL, $p=0.07$), con una diferencia que si bien no alcanza la significación estadística, probablemente debido al pequeño tamaño muestral, si marcan una clara tendencia.

No solo la activación del sistema del complemento en el episodio de fracaso inicial tiene relevancia en la evolución de la función renal; parece existir una relación con otros parámetros inflamatorios. Los pacientes que presentarán nuevos episodios de IRA son aquellos que durante el primer episodio mostraron menores concentraciones de IL-6 en suero (12.0 ± 1.6 vs 19 ± 1.7 pg/mL, $p=0.008$), pudiendo traducir una “disregulación” entre el sistema SIRS/CARS que hace que la recuperación de este tejido renal no sea la adecuada y confiera cierta “labilidad” a estos órganos, pudiendo sufrir episodios de IRA frente a distintas agresiones. No hemos encontrado en la literatura ningún estudio previo que analice estos parámetros en pacientes con repetidos episodios de IRA.

Durante el período de seguimiento de 3 años, 23 pacientes desarrollaron **Enfermedad Renal Crónica**. Estos pacientes son los que en el episodio de IRA presentaban las concentraciones más elevadas de MAC (7786.2 ± 959 vs 4838.8 ± 434 mAU/mL, $p=0.02$). Hemos objetivado los mismos resultados en las concentraciones de MAC del subgrupo de pacientes del grupo de “Isquemia-reperfusión”, es decir, que las concentraciones de MAC son más elevadas en aquellos pacientes que desarrollarán ERC en 3 años.

En una pequeña muestra de pacientes sometidos a trasplante renal, realizamos determinaciones séricas de MAC 30 días después de la recuperación completa de la función renal, y estas concentraciones, que podríamos considerar como las basales, son más elevadas en los pacientes que desarrollaran ERC ($n=5$) (4721 ± 491 vs 2677 ± 681.3 mAU/mL), si bien el pequeño tamaño muestral dificulta extraer conclusiones.

También hemos encontrado diferencias entre otras citoquinas inflamatorias, de tal manera que aquellos pacientes que desarrollaran ERC durante los 3 años posteriores al episodio de IRA, presentan concentraciones más elevadas, durante el episodio de IRA,

de NGAL (688.5 ± 70.6 vs 411.2 ± 20.2 ng/mL, $p=0.003$), mientras que los niveles plasmáticos de IL-6 son menores en estos pacientes que presentarán ERC. A pesar de que no hemos encontrado datos en la literatura sobre la relación entre la ERC y las concentraciones de MAC, es conocido por estudios tanto en humanos como en modelos animales que la IL-6 está elevada en situaciones de IRC¹⁶⁵ y está considerada actualmente como marcador de enfermedad cardiovascular¹⁶⁶. Se especula que su acción sobre la función renal se produce a través de la estimulación de factores profibróticos que producirán ERC¹⁶⁷. Aunque no existen datos en la literatura que expliquen la evolución de los niveles de IL-6 antes de llegar a la situación de ERC establecida, está descrito que en pacientes críticos, tras la resolución del cuadro agudo se produce una disminución plasmática de las concentraciones de IL-6¹¹⁶, así que podríamos especular que en situaciones de IRA en la que no se produzca una reparación completa del daño renal, posiblemente por alteración entre los sistemas inflamatorios SIRS/CARS, es decir entre IL-6/IL-10, manteniéndose una alteración “subclínica” por activación del sistema del complemento, podría producirse como respuesta compensadora una elevación progresiva de IL-6 con estimulación de agentes profibróticos hasta instaurar ERC.

El hallazgo de los niveles elevados de NGAL en aquellos pacientes que evolucionarán hacia ERC (688.5 ± 70.6 vs 411.2 ± 20.2 ng/mL, $p=0.003$) parece apoyar esta disregulación de distintas vías inflamatorias, que será la responsable de la estimulación de vías de fibrosis produciendo ERC.

En este grupo de pacientes, a los 3 años se producen 13 éxitus (7.9%). La mortalidad es más frecuente en aquellos pacientes que durante el episodio de IRA presentan, de manera significativa concentraciones más altas de IL-10 (47.8 ± 10.2 pg/mL, $p<0.05$) y de NGAL o lipocalina-2 (558.6 ± 52.6 vs 343.7 ± 54 mAU/mL, $p<0.05$).

Debido a que las concentraciones de MAC del grupo de pacientes pertenecientes al grupo de “Isquemia-reperfusión” son significativamente más elevadas que en el resto de pacientes, decidimos analizar a estos pacientes de manera separada para evitar sesgos de selección.

Los resultados son muy similares a los obtenidos tras analizar la muestra de manera global; es decir, las concentraciones de MAC en pacientes con función retardada del injerto son significativamente más elevadas que en aquellos pacientes con función inmediata (8040.5 ± 816.2 vs 4450.9 ± 382 mAU/mL, $p=0.001$), en un pequeño subgrupo de estos pacientes ($n=17$) observamos que las concentraciones de MAC 30 días después de la resolución de la IRA han disminuido aunque siguen siendo más elevadas en aquellos con función retardada.

No hemos observado que las concentraciones del MAC sean capaces de discriminar la gravedad de la IRA, pero creemos que es debido a las especiales características clínicas de este grupo. La necesidad de tratamiento renal sustitutivo se basa en características individuales de cada paciente y a diferencia del resto de etiologías de IRA, consideramos recuperación de función renal la mejoría $>50\%$ de la creatinina plasmática en la primera semana tras el trasplante.

6.2. RESULTADOS DE TINCION INMUNOHISTOQUIMICA EN TEJIDO RENAL

Los resultados obtenidos tras valorar las muestras de tejido renal en las que hemos realizado tinción **inmunohistoquímica para MAC**, muestran que la activación del complemento se produce no solo en suero sino que existe un depósito de MAC en el tejido renal, localizado a nivel de la membrana basal tubular de las células epiteliales y que existen diferencias entre las muestras pertenecientes a tejido renal sano y las muestras pertenecientes a pacientes que fallecen con IRA. Es decir, que en situación de IRA existe una mayor cantidad de depósito de MAC en los túbulos tanto corticales como medulares, con una tinción que afecta a un mayor perímetro de túbulo y muestra una mayor intensidad que en las muestras de los pacientes que mostraban una función renal normal, siendo las diferencias estadísticamente significativas.

Existen trabajos en la literatura que al estudiar tejido renal de ratones sometidos a isquemia-reperfusión, observan depósito de C3 en la membrana basal tubular en aquellos con IRA¹⁶⁸, con un patrón similar al descrito en nuestros resultados. Estudios con inmunofluorescencia en cultivo celular de células tubulares

epiteliales de ratón, muestran una localización de C3 tanto en las superficie apical como basal de las células ⁶⁹. En nuestro conocimiento, este trabajo es el primero que demuestra depósito de la fracción lítica del complemento en muestras humanas de IRA/NTA.

Los resultados de **inmunohistoquímica para Factor H** en las muestras de tejido renal procedente de autopsia, muestran que existe tinción citoplasmática en las células epiteliales tubulares independientemente de la función renal, pero que se aprecia una mayor intensidad de la misma en las muestras con IRA. Dentro del grupo de pacientes con IRA, observamos que en las formas histológicas más graves de NTA (necrosis tipo coagulativo) muestran una tinción intensa, mientras que en las formas histológicas de menor severidad (degeneración hidrópica tubular) se observa una tinción débil frente al Factor H.

No existen estudios que hayan documentado el comportamiento histológico del Factor H en situaciones de IRA, pero sabemos por cultivos celulares, que las células epiteliales proximales humanas son capaces de producir Factor H^{169 170}, representando probablemente, el único mecanismo de defensa frente a la activación del complemento¹⁷¹. Buelli et al desarrollan en cultivo de células epiteliales tubulares un modelo de enfermedad proteinúrica, en el que demuestran disminución de depósito de MAC en la membrana tubular tras añadir Factor H al cultivo¹⁷¹.

Una de las limitaciones de este estudio es la utilización de tejido renal procedente de autopsia. La IRA que evoluciona según lo esperado de modo habitual no es indicación habitual de biopsia renal, por lo que está ampliamente aceptado la obtención de tejido renal de autopsia para estudios de NTA¹⁷². A pesar de todo, esto podría implicar que este tejido no sea representativo de la NTA de la práctica clínica habitual. Para confirmar los hallazgos obtenidos, decidimos diseñar un pequeño grupo de NTA de pacientes de los que además contáramos con suero para estudiar Factor H y MAC.

6.3. RESULTADOS DEL SUBESTUDIO EN TRASPLANTE RENAL

Los resultados en este subestudio son superponibles a los descritos previamente, tanto los experimentos en suero como los resultados de la tinción inmunohistoquímica.

Las concentraciones plasmáticas de MAC realizadas al 7º y 30º día post-trasplante renal en 10 pacientes con IRA, muestran que los niveles de MAC en el momento inicial son más elevados en aquellos pacientes que no recuperan función renal a los 30 días, aunque sin alcanzar significación, mientras que las concentraciones de MAC si son significativamente más elevados a los 30 días post-TR en aquellos pacientes que no recuperan función renal.

Respecto a las **concentraciones plasmáticas de Factor H** realizadas en estos pacientes no hemos hallado ninguna diferencia entre los pacientes que recuperaran función renal y los que no; si bien es cierto que no existen estudios que hayan descrito el comportamiento el Factor H en IRA.

Los resultados de las tinciones **inmunohistoquímicas para Factor H y MAC** en tejido renal procedente de biopsia por indicación clínica, muestran el mismo patrón de tinción que hemos obtenido en las muestras procedentes de autopsias, con la única excepción de las muestras de pacientes “controles”, en las que no se observa tinción con ninguno de los dos anticuerpos, mientras que en la muestras de autopsia se objetivaba tinción con ambos anticuerpos pero de menor intensidad a la que muestran los pacientes con IRA. Es probable que esto traduzca el efecto de hipoxia *perimorten* que sufrieron estos pacientes.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. En la IRA humana existe una activación del sistema del complemento tanto a nivel sistémico (suero) como local (tejido renal), independientemente de la etiología del daño renal.

2. Las concentraciones plasmáticas de MAC sirven para identificar aquellos pacientes que presentarán formas más severas de IRA.

3. La activación del sistema del complemento parece tener influencia en la función renal a medio plazo.

4. Existe un aumento de Factor H tanto a nivel sistémico (suero) como local (tejido renal) en pacientes con IRA.

5. En la IRA se produce activación de distintas vías inflamatorias parece que iniciadas por el sistema del complemento.

6. Las determinaciones plasmáticas de IL-6 y de NGAL sirven para identificar aquellos pacientes que presentarán en su evolución formas más severas de IRA.

LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

8. LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabajo de investigación tiene una serie de limitaciones. El pequeño tamaño muestral y la falta de determinaciones seriadas de los componentes del sistema el complemento (MAC y Factor H) y de los distintos marcadores inflamatorios (IL-6, IL-10 y NGAL) en la evolución de la IRA, son probablemente las más importantes.

Por otro lado los resultados de este trabajo son mayoritariamente descriptivos y es necesario el diseño de trabajos de investigación, ya sea a través de muestras bien diseñadas o experimentos en modelos de IRA (animales o cultivo celular) que nos permitan profundizar en la relación entre el sistema del complemento y otras vías inflamatorias y en la relación con el Factor H y sus proteínas homólogas.

BIBLIOGRAFIA

9. BIBLIOGRAFIA

1. Feucht HE, Zwirner J, Bevec D, et al. Biosynthesis of complement C4 messenger RNA in normal human kidney. *Nephron*. 1989;53(4):338-342. doi:10.1159/000185778.
2. Passwell J, Schreiner GF, Nonaka M, Beuscher HU, Colten HR. Local extrahepatic expression of complement genes C3, factor B, C2, and C4 is increased in murine lupus nephritis. *J Clin Invest*. 1988;82(5):1676-1684. doi:10.1172/JCI113780.
3. Verroust PJ, Wilson CB, Cooper NR, Edgington TS, Dixon FJ. Glomerular complement components in human glomerulonephritis. *J Clin Invest*. 1974;53(1):77-84. doi:10.1172/JCI107562.
4. Zhou W, Marsh JE, Sacks SH. Intrarenal synthesis of complement. *Kidney Int*. 2001;59:1227-1235. doi:10.1046/j.1523-1755.2001.0590041227.x.
5. Strey CW, Markiewski M, Mastellos D, et al. The proinflammatory mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration. *J Exp Med*. 2003;198(6):913-23. doi:10.1084/jem.20030374.
6. Walport MJ. Complement-first of two parts. *N Engl J Med*. 2001;344:1058–1066. Available at: <http://nejm.highwire.org/cgi/content/extract/344/14/1058>.
7. Oppermann M, Würzner R. Modern determination of complement activation. *Semin Thromb Hemost*. 2010;36(6):611-619. doi:10.1055/s-0030-1262882.
8. Heurich M, Martínez-Barricarte R, Francis NJ, et al. Common polymorphisms in C3, factor B, and factor H collaborate to determine systemic complement activity and disease risk. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(21):8761-8766. doi:10.1073/pnas.1019338108.
9. Ricklin D, Lambris JD. Complement in immune and inflammatory disorders: pathophysiological mechanisms. *J Immunol*. 2013;190(8):3831-8. doi:10.4049/jimmunol.1203487.
10. Nielsen CH, Fischer EM, Leslie RG. The role of complement in the acquired immune response. *Immunology*. 2000;100(1):4-12. doi:imm009 [pii].
11. Carroll MC. The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat Immunol*. 2004;5(10):981-986. doi:10.1038/ni1113.

12. Cole DS, Morgan BP. Beyond lysis: how complement influences cell fate. *Clin Sci (Lond)*. 2003;104(5):455-466. doi:10.1042/CS20020362.
13. Takano T, Elimam H, Cybulsky A V. Complement-Mediated Cellular Injury. *Semin Nephrol*. 2013;33(6):586-601. doi:10.1016/j.semnephrol.2013.08.009.
14. Tegla CA, Cudrici C, Patel S, et al. Membrane attack by complement: The assembly and biology of terminal complement complexes. *Immunol Res*. 2011;51(1):45-60. doi:10.1007/s12026-011-8239-5.
15. Triantafilou K, Hughes TR, Triantafilou M, Morgan BP. The complement membrane attack complex triggers intracellular Ca²⁺ fluxes leading to NLRP3 inflammasome activation. *J Cell Sci*. 2013;126(Pt 13):2903-13. doi:10.1242/jcs.124388.
16. Nauta AJ, Daha MR, Tijssma O, Van De Water B, Tedesco F, Roos A. The membrane attack complex of complement induces caspase activation and apoptosis. *Eur J Immunol*. 2002;32(3):783-792. doi:10.1002/1521-4141(200203)32:3<783::AID-IMMU783>3.0.CO;2-Q.
17. Zipfel PF, Skerka C. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(10):729-740. doi:10.1038/nri2620.
18. Blom AM, Villoutreix BO, Dahlbäck B. Complement inhibitor C4b-binding protein - Friend or foe in the innate immune system? *Mol Immunol*. 2004;40(18):1333-1346. doi:10.1016/j.molimm.2003.12.002.
19. Józsi M, Zipfel PF. Factor H family proteins and human diseases. *Trends Immunol*. 2008;29(8):380-387. doi:10.1016/j.it.2008.04.008.
20. Davis AE. Biological effects of C1 inhibitor. *Drug News Perspect*. 2004;17(7):439-446.
21. Adinolfi M, Dobson NC, Bradwell AR. Synthesis of two components of human complement, beta 1H and C3bINA, during fetal life. *Acta Paediatr Scand*. 1981;70(5):705-710.
22. Schwaeble W, Zwirner J, Schulz TF, Linke RP, Dierich MP, Weiss EH. Human complement factor H: expression of an additional truncated gene product of 43 kDa in human liver. *Eur J Immunol*. 1987;17(10):1485-1489. doi:10.1002/eji.1830171015.
23. Brooimans RA, van der Ark AA, Buurman WA, van Es LA, Daha MR. Differential regulation of complement factor H and C3 production in human umbilical vein endothelial cells by IFN-gamma and IL-1. *J Immunol*. 1990;144(10):3835-3840.

24. Chen M, Forrester J V., Xu H. Synthesis of complement factor H by retinal pigment epithelial cells is down-regulated by oxidized photoreceptor outer segments. *Exp Eye Res.* 2007;84(4):635-645. doi:10.1016/j.exer.2006.11.015.
25. Licht C, Pluthero FG, Li L, et al. Platelet-associated complement factor H in healthy persons and patients with atypical HUS. *Blood.* 2009;114(20):4538-4545. doi:10.1182/blood-2009-03-205096.
26. Sakaue T, Takeuchi K, Maeda T, Yamamoto Y, Nishi K, Ohkubo I. Factor H in porcine seminal plasma protects sperm against complement attack in genital tracts. *J Biol Chem.* 2010;285(3):2184-2192. doi:10.1074/jbc.M109.063495.
27. Tu Z, Li Q, Bu H, Lin F. Mesenchymal stem cells inhibit complement activation by secreting factor H. *Stem Cells Dev.* 2010;19(11):1803-1809. doi:10.1089/scd.2009.0418.
28. Esparza-Gordillo J, Soria JM, Buil A, et al. Genetic and environmental factors influencing the human factor H plasma levels. *Immunogenetics.* 2004;56(2):77-82. doi:10.1007/s00251-004-0660-7.
29. De C?rdoba SR, De Jorge EG. Translational Mini-Review Series on Complement Factor H: Genetics and disease associations of human complement factor H. *Clin Exp Immunol.* 2008;151:1-13. doi:10.1111/j.1365-2249.2007.03552.x.
30. Harrison RA, Lachmann PJ. The physiological breakdown of the third component of human complement. *Mol Immunol.* 1980;17(1):9-20. doi:10.1016/0161-5890(80)90119-4.
31. Schreiber RD, Pangburn MK, Lesavre PH, Müller-Eberhard HJ. Initiation of the alternative pathway of complement: recognition of activators by bound C3b and assembly of the entire pathway from six isolated proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978;75(8):3948-3952. doi:10.1073/pnas.75.8.3948.
32. Ferreira VP, Pangburn MK, Cortés C. Complement control protein factor H: The good, the bad, and the inadequate. *Mol Immunol.* 2010;47:2187-2197. doi:10.1016/j.molimm.2010.05.007.
33. Pangburn MK, Ferreira VP, Cortes C. Discrimination between host and pathogens by the complement system. *Vaccine.* 2008;26(SUPPL. 8). doi:10.1016/j.vaccine.2008.11.023.
34. Fearon DT. Regulation by membrane sialic acid of beta1H-dependent decay-dissociation of amplification C3 convertase of the alternative complement pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978;75(4):1971-1975.
35. Carreno MP, Labarre D, Maillet F, Jozefowicz M, Kazatchkine MD. Regulation of the human alternative complement pathway: Formation of a ternary complex

- between factor H, surface-bound C3b and chemical groups on nonactivating surfaces. *Eur J Immunol*. 1989;19(11):2145-2150. doi:10.1002/eji.1830191126.
36. Leffler J, Herbert AP, Norström E, et al. Annexin-II, DNA, and histones serve as factor H ligands on the surface of apoptotic cells. *J Biol Chem*. 2010;285(6):3766-3776. doi:10.1074/jbc.M109.045427.
 37. Trouw LA, Blom AM, Gasque P. Role of complement and complement regulators in the removal of apoptotic cells. *Mol Immunol*. 2008;45(5):1199-1207. doi:10.1016/j.molimm.2007.09.008.
 38. Mnjoyan Z, Li J, Afshar-Kharghan V. Factor H binds to platelet integrin α IIb β 3. *Platelets*. 2008;19(7):512-519. doi:10.1080/09537100802238494.
 39. Holers VM. The spectrum of complement alternative pathway-mediated diseases. *Immunol Rev*. 2008;223(1):300-316. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00641.x.
 40. Pickering MC, Cook HT. Translational Mini-Review Series on Complement Factor H: Renal diseases associated with complement factor H: Novel insights from humans and animals. *Clin Exp Immunol*. 2008;151(2):210-230. doi:10.1111/j.1365-2249.2007.03574.x.
 41. Noris M, Mescia F, Remuzzi G. STEC-HUS, atypical HUS and TTP are all diseases of complement activation. *Nat Rev Nephrol*. 2012;8(11):622-633. doi:10.1038/nrneph.2012.195.
 42. Noris M, Remuzzi G. Atypical hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med*. 2009;361(17):1676-1687. doi:10.1056/NEJMra0902814.
 43. Bresin E, Rurali E, Caprioli J, et al. Combined complement gene mutations in atypical hemolytic uremic syndrome influence clinical phenotype. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24(3):475-86. doi:10.1681/ASN.2012090884.
 44. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et al. Banff '05 meeting report: Differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). In: *American Journal of Transplantation*. Vol 7.; 2007:518-526. doi:10.1111/j.1600-6143.2006.01688.x.
 45. Roos A, Rastaldi MP, Calvaresi N, et al. Glomerular activation of the lectin pathway of complement in IgA nephropathy is associated with more severe renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(6):1724-1734. doi:10.1681/ASN.2005090923.
 46. Roos A, Bouwman LH, van Gijlswijk-Janssen DJ, Faber-Krol MC, Stahl GL, Daha MR. Human IgA activates the complement system via the mannan-binding lectin pathway. *J Immunol*. 2001;167(5):2861-2868. doi:10.4049/jimmunol.167.5.2861.

47. Collard CD, Montalto MC, Reenstra WR, Buras JA, Stahl GL. Endothelial oxidative stress activates the lectin complement pathway: role of cytokeratin 1. *Am J Pathol.* 2001;159(3):1045-1054. doi:10.1016/S0002-9440(10)61779-8.
48. Xiao H, Schreiber A, Heeringa P, Falk RJ, Jennette JC. Alternative complement pathway in the pathogenesis of disease mediated by anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies. *Am J Pathol.* 2007;170(1):52-64. doi:10.2353/ajpath.2007.060573.
49. Lenderink AM, Liegel K, Ljubanović D, et al. The alternative pathway of complement is activated in the glomeruli and tubulointerstitium of mice with adriamycin nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;293(2):F555-F564. doi:10.1152/ajprenal.00403.2006.
50. Nangaku M, Pippin J, Couser WG. Complement membrane attack complex (C5b-9) mediates interstitial disease in experimental nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10(11):2323-2331.
51. Thurman JM, Ljubanovic D, Edelstein CL, Gilkeson GS, Holers VM. Lack of a functional alternative complement pathway ameliorates ischemic acute renal failure in mice. *J Immunol.* 2003;170(3):1517-1523. doi:10.4049/jimmunol.170.3.1517.
52. Sethi S, Nester CM, Smith RJH. Membranoproliferative glomerulonephritis and C3 glomerulopathy: resolving the confusion. *Kidney Int.* 2012;81(5):434-441. doi:10.1038/ki.2011.399.
53. Brandt J, Pippin J, Schulze M, et al. Role of the complement membrane attack complex (C5b-9) in mediating experimental mesangioproliferative glomerulonephritis. *Kidney Int.* 1996;49(2):335-343. doi:10.1038/ki.1996.50.
54. Salant DJ, Belok S, Madaio MP, Couser WG. A new role for complement in experimental membranous nephropathy in rats. *J Clin Invest.* 1980;66(6):1339-1350. doi:10.1172/JCI109987.
55. Legendre CM, Licht C, Muus P, et al. Terminal complement inhibitor eculizumab in atypical hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med.* 2013;368(23):2169-81. doi:10.1056/NEJMoa1208981.
56. Tang Z, Lu B, Hatch E, Sacks SH, Sheerin NS. C3a mediates epithelial-to-mesenchymal transition in proteinuric nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(3):593-603. doi:10.1681/ASN.2008040434.
57. Bao L, Osawe I, Haas M, Quigg RJ. Signaling through up-regulated C3a receptor is key to the development of experimental lupus nephritis. *J Immunol.* 2005;175(3):1947-1955. doi:175/3/1947 [pii].

58. Li Q, Peng Q, Xing G, et al. Deficiency of C5aR prolongs renal allograft survival. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(8):1344-1353. doi:10.1681/ASN.2009090977.
59. Rangan GK, Pippin JW, Couser WG. C5b-9 regulates peritubular myofibroblast accumulation in experimental focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int*. 2004;66(5):1838-1848. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00957.x.
60. Hebert LA, Cosio FG, Neff JC. Diagnostic significance of hypocomplementemia. *Kidney Int*. 1991;39(5):811-821. doi:10.1038/ki.1991.102.
61. Porcel JM, Ordi J, Castro-Salomo A, et al. The value of complement activation products in the assessment of systemic lupus erythematosus flares. *Clin Immunol Immunopathol*. 1995;74(3):283-288. doi:10.1006/clin.1995.1040.
62. Isenberg DA, Allen E, Farewell V, et al. An assessment of disease flare in patients with systemic lupus erythematosus: a comparison of BILAG 2004 and the flare version of SELENA. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(1):54-59. doi:10.1136/ard.2010.132068.
63. Abou-Ragheb HH, Williams AJ, Brown CB, Milford-Ward A. Plasma levels and mode of excretion of the anaphylatoxins C3a and C4a in renal disease. *J Clin Lab Immunol*. 1991;35(3):113-119.
64. Wyatt RJ, Julian BA. Activation of complement in IgA nephropathy. *Am J Kidney Dis*. 1988;12(5):437-442.
65. Brenchley PE, Coupes B, Short CD, O'Donoghue DJ, Ballardie FW, Mallick NP. Urinary C3dg and C5b-9 indicate active immune disease in human membranous nephropathy. *Kidney Int*. 1992;41(4):933-937. doi:10.1038/ki.1992.143.
66. Mache CJ, Acham-Roschitz B, Frémeaux-Bacchi V, et al. Complement inhibitor eculizumab in atypical hemolytic uremic syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4(8):1312-1316. doi:10.2215/CJN.01090209.
67. Thurman JM, Lucia MS, Ljubanovic D, Holers VM. Acute tubular necrosis is characterized by activation of the alternative pathway of complement. *Kidney Int*. 2005;67(2):524-530. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.67109.x.
68. Stein JH, Osgood RW, Barnes JL, Reineck HJ, Pinckard RN, McManus LM. The role of complement in the pathogenesis of postischemic acute renal failure. *Miner Electrolyte Metab*. 1985;11(4):256-261.
69. Renner B, Coleman K, Goldberg R, et al. The complement inhibitors Crry and factor H are critical for preventing autologous complement activation on renal tubular epithelial cells. *J Immunol*. 2010;185:3086-3094. doi:10.4049/jimmunol.1000111.

70. Nath KA, Hostetter MK, Hostetter TH. Pathophysiology of chronic tubulo-interstitial disease in rats. Interactions of dietary acid load, ammonia, and complement component C3. *J Clin Invest*. 1985;76(2):667-675. doi:10.1172/JCI112020.
71. Isenman DE, Kells DI, Cooper NR, Müller-Eberhard HJ, Pangburn MK. Nucleophilic modification of human complement protein C3: correlation of conformational changes with acquisition of C3b-like functional properties. *Biochemistry*. 1981;20(15):4458-4467.
72. McCullough JW, Renner B, Thurman JM. The role of the complement system in acute kidney injury. *Semin Nephrol*. 2013;33(6):543-556. doi:10.1016/j.semnephrol.2013.08.005.
73. BRUN C, RAASCHOU F. The results of five hundred percutaneous renal biopsies. *AMA Arch Intern Med*. 1958;102(5):716-21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13582258>. Accessed June 19, 2015.
74. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nat Med*. 2011;17(11):1391-1401. doi:10.1038/nm.2507.
75. Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(4):279-289. doi:10.1038/nri2215.
76. Friedewald JJ, Rabb H. Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. In: *Kidney International*. Vol 66.; 2004:486-491. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.761_3.x.
77. Bonventre J V., Zuk A. Ischemic acute renal failure: An inflammatory disease? In: *Kidney International*. Vol 66.; 2004:480-485. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.761_2.x.
78. Diepenhorst GMP, van Gulik TM, Hack CE. Complement-mediated ischemia-reperfusion injury: lessons learned from animal and clinical studies. *Ann Surg*. 2009;249(6):889-899. doi:10.1097/SLA.0b013e3181a38f45.
79. Guo R-F, Ward PA. Role of C5a in inflammatory responses. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:821-852. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115835.
80. McCaughan JA, O'Rourke DM, Courtney AE. The complement cascade in kidney disease: From sideline to center stage. *Am J Kidney Dis*. 2013;62(3):604-614. doi:10.1053/j.ajkd.2012.12.033.
81. Amura CR, Renner B, Lyubchenko T, Faubel S, Simonian PL, Thurman JM. Complement activation and toll-like receptor-2 signaling contribute to cytokine production after renal ischemia/reperfusion. *Mol Immunol*. 2012;52(3-4):249-257. doi:10.1016/j.molimm.2012.05.020.

82. Park P, Haas M, Cunningham PN, Bao L, Alexander JJ, Quigg RJ. Injury in renal ischemia-reperfusion is independent from immunoglobulins and T lymphocytes. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002;282(2):F352-F357. doi:10.1152/ajprenal.00160.2001.
83. Lin T, Zhou W, Farrar CA, Hargreaves REG, Sheerin NS, Sacks SH. Deficiency of C4 from donor or recipient mouse fails to prevent renal allograft rejection. *Am J Pathol*. 2006;168(4):1241-1248. doi:10.2353/ajpath.2006.050360.
84. Peng Q, Li K, Smyth LA, et al. C3a and C5a Promote Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(9):1474-1485. doi:10.1681/ASN.2011111072.
85. Miwa T, Sato S, Gullipalli D, Nangaku M, Song W-C. Blocking properdin, the alternative pathway, and anaphylatoxin receptors ameliorates renal ischemia-reperfusion injury in decay-accelerating factor and CD59 double-knockout mice. *J Immunol*. 2013;190(7):3552-9. doi:10.4049/jimmunol.1202275.
86. Pan H, Shen Z, Mukhopadhyay P, et al. Anaphylatoxin C5a contributes to the pathogenesis of cisplatin-induced nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009;296(3):F496-F504. doi:10.1152/ajprenal.90443.2008.
87. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol*. 2010;11(9):785-797. doi:10.1038/ni.1923.
88. Zhou W. The new face of anaphylatoxins in immune regulation. *Immunobiology*. 2012;217(2):225-234. doi:10.1016/j.imbio.2011.07.016.
89. Van der Touw W, Cravedi P, Kwan W, Paz-Artal E, Merad M, Heeger PS. Cutting edge: Receptors for C3a and C5a modulate stability of alloantigen-reactive induced regulatory T cells. *J Immunol*. 2013;190(12):5921-5. doi:10.4049/jimmunol.1300847.
90. Cravedi P, Leventhal J, Lakhani P, Ward SC, Donovan MJ, Heeger PS. Immune cell-derived C3a and C5a costimulate human T cell alloimmunity. *Am J Transplant*. 2013;13(10):2530-2539. doi:10.1111/ajt.12405.
91. Liu Q, Nilsen-Hamilton M. Identification of a new acute phase protein. *J Biol Chem*. 1995;270(38):22565-22570. doi:10.1074/jbc.270.38.22565.
92. Goes N, Urmson J, Ramassar V, Halloran PF. Ischemic acute tubular necrosis induces an extensive local cytokine response. Evidence for induction of interferon-gamma, transforming growth factor-beta 1, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-2, and interleukin-10. *Transplantation*. 1995;59(4):565-572.

93. Kielar ML, John R, Bennett M, et al. Maladaptive role of IL-6 in ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(11):3315-3325. doi:10.1681/ASN.2003090757.
94. Rice JC, Spence JS, Yetman DL, Safirstein RL. Monocyte chemoattractant protein-1 expression correlates with monocyte infiltration in the post-ischemic kidney. *Ren Fail*. 2002;24(6):703-723. doi:10.1081/JDI-120015673.
95. Nechemia-Arbely Y, Barkan D, Pizov G, et al. IL-6/IL-6R axis plays a critical role in acute kidney injury. *JAmSocNephrol*. 2008;19(1533-3450 (Electronic) LA - eng PT - Journal Article PT - Research Support, Non-U.S. Gov't SB - IM):1106-1115.
96. Jones S a, Fraser DJ, Fielding C a, Jones GW. Interleukin-6 in renal disease and therapy. *Nephrol Dial Transplant*. 2014:1-10. doi:10.1093/ndt/gfu233.
97. Pecoits-Filho R, Bárány P, Lindholm B, Heimbürger O, Stenvinkel P. Interleukin-6 is an independent predictor of mortality in patients starting dialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17(9):1684-1688.
98. Stenvinkel P, Lindholm B. C-Reactive protein in end-stage renal disease: Are there reasons to measure it? *Blood Purif*. 2005;23(1):72-78. doi:10.1159/000082014.
99. Patel NSA, Chatterjee PK, Di Paola R, et al. Endogenous interleukin-6 enhances the renal injury, dysfunction, and inflammation caused by ischemia/reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;312(3):1170-1178. doi:10.1124/jpet.104.078659.
100. Jones SA, Horiuchi S, Topley N, Yamamoto N, Fuller GM. The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. *FASEB J*. 2001;15(1):43-58. doi:10.1096/fj.99-1003rev.
101. Yan SF, Tritto I, Pinsky D, et al. Induction of interleukin 6 (IL-6) by hypoxia in vascular cells: Central role of the binding site for nuclear factor-IL-6. *J Biol Chem*. 1995;270(19):11463-11471. doi:10.1074/jbc.270.19.11463.
102. Clark WM, Rinker LG, Lessov NS, et al. Lack of interleukin-6 expression is not protective against focal central nervous system ischemia. *Stroke*. 2000;31(7):1715-1720. doi:10.1161/01.STR.31.7.1715.
103. Yang R, Han X, Uchiyama T, et al. IL-6 is essential for development of gut barrier dysfunction after hemorrhagic shock and resuscitation in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003;285(3):G621-G629. doi:10.1152/ajpgi.00177.2003.
104. Kukielka GL, Youker KA, Michael LH, et al. Role of early reperfusion in the induction of adhesion molecules and cytokines in previously ischemic myocardium. *Mol Cell Biochem*. 1995;147(1-2):5-12. doi:10.1007/BF00944777.

105. Kwon O, Molitoris BA, Pescovitz M, Kelly KJ. Urinary actin, interleukin-6, and interleukin-8 may predict sustained ARF after ischemic injury in renal allografts. *Am J Kidney Dis*. 2003;41(5):1074-1087. doi:10.1016/S0272-6386(03)00206-3.
106. Bone RC. Immunologic Dissonance: A Continuing Evolution in Our Understanding of the Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) and the Multiple Organ Dysfunction Syndrome (MODS). *Ann Intern Med*. 1996;125(8):680-687.
107. Girndt M, Sester U, Kaul H, Köhler H. *Production of proinflammatory and regulatory monokines in hemodialysis patients shown at a single-cell level.*; 1998.
108. Casey LC, Balk RA, Bone RC. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med*. 1993;119(8):771-778.
109. Pinsky MR, Vincent JL, Deviere J, Alegre M, Kahn RJ, Dupont E. Serum cytokine levels in human septic shock; Relation to multiple-system organ failure and mortality. *Chest*. 1993;103(2):565-575. doi:10.1378/chest.103.2.565.
110. Gogos CA, Drosou E, Bassaris HP, Skoutelis A. Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis*. 2000;181(1):176-180. doi:10.1086/315214.
111. Deng J, Kohda Y, Chiao H, et al. Interleukin-10 inhibits ischemic and cisplatin-induced acute renal injury. *Kidney Int*. 2001;60(6):2118-2128. doi:10.1046/j.1523-1755.2001.00043.x.
112. Sinuani I, Beberashvili I, Averbukh Z, Sandbank J. Role of IL-10 in the progression of kidney disease. *World J Transplant*. 2013;3(4):91-98. doi:10.5500/wjt.v3.i4.91.
113. Sabat R, Grütz G, Warszawska K, et al. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010;21(5):331-344. doi:10.1016/j.cytogfr.2010.09.002.
114. Kinsey GR, Li L, Okusa MD. Inflammation in acute kidney injury. *Nephron - Exp Nephrol*. 2008;109(4). doi:10.1159/000142934.
115. Kitching AR, Katerelos M, Mudge SJ, Tipping PG, Power DA, Holdsworth SR. Interleukin-10 inhibits experimental mesangial proliferative glomerulonephritis. *Clin Exp Immunol*. 2002;128(1):36-43. doi:10.1046/j.1365-2249.2002.01793.x.
116. Simmons EM, Himmelfarb J, Tugrul Sezer M, et al. Plasma cytokine levels predict mortality in patients with acute renal failure. *Kidney Int*. 2004;65(4):1357-1365. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00512.x.

117. Zhang WR, Garg AX, Coca SG, et al. Plasma IL-6 and IL-10 Concentrations Predict AKI and Long-Term Mortality in Adults after Cardiac Surgery. *J Am Soc Nephrol*. 2015. doi:10.1681/ASN.2014080764.
118. Kitching AR, Tipping PG, Timoshanko JR, Holdsworth SR. Endogenous interleukin-10 regulates Th1 responses that induce crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int*. 2000;57(2):518-525. doi:10.1046/j.1523-1755.2000.00872.x.
119. Jung M, Sola A, Hughes J, et al. Infusion of IL-10-expressing cells protects against renal ischemia through induction of lipocalin-2. *Kidney Int*. 2012;81(10):969-982. doi:10.1038/ki.2011.446.
120. Kjeldsen L, Cowland JB, Borregaard N. Human neutrophil gelatinase-associated lipocalin and homologous proteins in rat and mouse. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1482(1-2):272-283. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00152-7.
121. Cowland JB, Borregaard N. Molecular Characterization and Pattern of Tissue Expression of the Gene for Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin from Humans. *Genomics*. 1997;45(1):17-23. doi:DOI: 10.1006/geno.1997.4896.
122. Mishra J, Ma Q, Prada A, et al. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14:2534-2543. doi:10.1097/01.ASN.0000088027.54400.C6.
123. Meheus LA, Fransen LM, Raymackers JG, et al. Identification by microsequencing of lipopolysaccharide-induced proteins secreted by mouse macrophages. *J Immunol*. 1993;151(3):1535-1547.
124. Siew ED, Ware LB, Gebretsadik T, et al. Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin moderately predicts acute kidney injury in critically ill adults. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(8):1823-1832. doi:10.1681/ASN.2008070673.
125. Bolignano D, Donato V, Coppolino G, et al. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) as a Marker of Kidney Damage. *Am J Kidney Dis*. 2008;52(3):595-605. doi:10.1053/j.ajkd.2008.01.020.
126. Candido S, Maestro R, Polesel J, et al. Roles of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in human cancer. *Oncotarget*. 2014;5(6):1576-94. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4039233&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
127. Bauer M, Eickhoff JC, Gould MN, Mundhenke C, Maass N, Friedl a. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) Is a Predictor of Poor Prognosis in Human Primary Breast Cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;108(3):389-397. doi:10.1007/s10549-007-9619-3.

128. Rocco M, Montini L, De Pascale G, Antonelli M. Dose of colistin: a work in progress? *Crit Care*. 2015;19:65. doi:10.1186/s13054-015-0743-x.
129. Pike M, Saltiel E. Colistin- and polymyxin-induced nephrotoxicity: focus on literature utilizing the RIFLE classification scheme of acute kidney injury. *J Pharm Pract*. 2014;27(6):554-61. doi:10.1177/0897190014546116.
130. Rodríguez E, Riera M, Barrios C, Pascual J. Value of plasmatic membrane attack complex as a marker of severity in acute kidney injury. *Biomed Res Int*. 2014;2014. doi:10.1155/2014/361065.
131. Pagtalunan ME, Olson JL, Tilney NL, Meyer TW. Late consequences of acute ischemic injury to a solitary kidney. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10(2):366-373.
132. Korthuis RJ, Smith JK, Carden DL. Hypoxic reperfusion attenuates postischemic microvascular injury. *Am J Physiol*. 1989;256(1 Pt 2):H315-H319.
133. Zhou W, Farrar CA, Abe K, et al. Predominant role for C5b-9 in renal ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest*. 2000;105:1363-1371. doi:10.1172/JCI8621.
134. Nicholson-Weller A, Halperin JA. Membrane signaling by complement C5b-9, the membrane attack complex. *Immunol Res*. 1993;12(3):244-257. doi:10.1007/BF02918256.
135. Bohana-Kashtan O, Ziporen L, Donin N, Kraus S, Fishelson Z. Cell signals transduced by complement. *Mol Immunol*. 2004;41(6-7):583-597. doi:10.1016/j.molimm.2004.04.007.
136. Ricardo SD, Van Goor H, Eddy AA. Macrophage diversity in renal injury and repair. *J Clin Invest*. 2008;118(11):3522-3530. doi:10.1172/JCI36150.
137. Mannon RB. Macrophages: contributors to allograft dysfunction, repair, or innocent bystanders? *Curr Opin Organ Transplant*. 2012;17(1):20-5. doi:10.1097/MOT.0b013e32834ee5b6.
138. Phieler J, Chung K-J, Chatzigeorgiou A, et al. The complement anaphylatoxin C5a receptor contributes to obese adipose tissue inflammation and insulin resistance. *J Immunol*. 2013;191(8):4367-74. doi:10.4049/jimmunol.1300038.
139. Bedard K, Krause K-H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2007;87(1):245-313. doi:10.1152/physrev.00044.2005.
140. Danobeitia JS, Djamali A, Fernandez LA. The role of complement in the pathogenesis of renal ischemia-reperfusion injury and fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2014;7:16. doi:10.1186/1755-1536-7-16.

141. Furuichi K, Kaneko S, Wada T. Chemokine/chemokine receptor-mediated inflammation regulates pathologic changes from acute kidney injury to chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol*. 2009;13(1):9-14. doi:10.1007/s10157-008-0119-5.
142. Singbartl K, Bockhorn SG, Zarbock A, Schmolke M, Van Aken H. T cells modulate neutrophil-dependent acute renal failure during endotoxemia: critical role for CD28. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(3):720-728. doi:10.1681/ASN.2004050381.
143. Melnikov VY, Faubel S, Siegmund B, Scott Lucia M, Ljubanovic D, Edelstein CL. Neutrophil-independent mechanisms of caspase-1- and IL-18-mediated ischemic acute tubular necrosis in mice. *J Clin Invest*. 2002;110(8):1083-1091. doi:10.1172/JCI200215623.
144. Homsí E, Ribeiro-Alves MA, Lopes De Faria JB, Dias EPO. Interleukin-6 stimulates tubular regeneration in rats with glycerol-induced acute renal failure. *Nephron*. 2002;92(1):192-199. doi:10.1159/000064478.
145. Dawn B, Xuan YT, Guo Y, et al. IL-6 plays an obligatory role in late preconditioning via JAK-STAT signaling and upregulation of iNOS and COX-2. *Cardiovasc Res*. 2004;64(1):61-71. doi:10.1016/j.cardiores.2004.05.011.
146. Ortiz A, Massy ZA, Fliser D, et al. Clinical usefulness of novel prognostic biomarkers in patients on hemodialysis. *Nat Rev Nephrol*. 2011;8(3):141-150. doi:10.1038/nrneph.2011.170.
147. De Vries DK, Lindeman JHN, Tsikas D, et al. Early renal ischemia-reperfusion injury in humans is dominated by IL-6 release from the allograft. *Am J Transplant*. 2009;9(7):1574-1584. doi:10.1111/j.1600-6143.2009.02675.x.
148. Friedman G, Jankowski S, Marchant A, Goldman M, Kahn RJ, Vincent JL. Blood interleukin 10 levels parallel the severity of septic shock. *J Crit Care*. 1997;12(4):183-187. doi:10.1016/S0883-9441(97)90030-7.
149. Marchant A, Alegre ML, Hakim A, et al. Clinical and biological significance of interleukin-10 plasma levels in patients with septic shock. *J Clin Immunol*. 1995;15(5):266-273.
150. Jin Y, Liu R, Xie J, Xiong H, He JC, Chen N. Interleukin-10 deficiency aggravates kidney inflammation and fibrosis in the unilateral ureteral obstruction mouse model. *Lab Invest*. 2013;93(7):801-11. doi:10.1038/labinvest.2013.64.
151. Huang XR, Kitching AR, Tipping PG, Holdsworth SR. Interleukin-10 inhibits macrophage-induced glomerular injury. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11(2):262-269.
152. Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a promising biomarker for human acute kidney injury. *Biomark Med*. 2010;4(2):265-280. doi:10.2217/bmm.10.12.

153. Haase M, Bellomo R, Devarajan P, Schlattmann P, Haase-Fielitz a. 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*. 2009;54(6):1012-1024. doi:10.1053/j.ajkd.2009.07.020.
154. Oikonomou KA, Kapsoritakis AN, Theodoridou C, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in inflammatory bowel disease: Association with pathophysiology of inflammation, established markers, and disease activity. *J Gastroenterol*. 2012;47(5):519-530. doi:10.1007/s00535-011-0516-5.
155. Flo TH, Smith KD, Sato S, et al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature*. 2004;432(7019):917-921. doi:10.1038/nature03104.
156. Landrø L, Damås JK, Flo TH, et al. Decreased serum lipocalin-2 levels in human immunodeficiency virus-infected patients: Increase during highly active anti-retroviral therapy. *Clin Exp Immunol*. 2008;152(1):57-63. doi:10.1111/j.1365-2249.2008.03592.x.
157. McIlroy DR, Wagener G, Lee HT. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin and acute kidney injury after cardiac surgery: the effect of baseline renal function on diagnostic performance. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5(2):211-219. doi:10.2215/CJN.04240609.
158. Otto GP, Hurtado-Oliveros J, Chung H-Y, et al. Plasma Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Is Primarily Related to Inflammation during Sepsis: A Translational Approach. *PLoS One*. 2015;10(4):e0124429. doi:10.1371/journal.pone.0124429.
159. Li J-Y, Ram G, Gast K, et al. Detection of intracellular iron by its regulatory effect. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;287(6):C1547-C1559. doi:10.1152/ajpcell.00260.2004.
160. Tilg H, Ulmer H, Kaser A, Weiss G. *Role of IL-10 for induction of anemia during inflammation.*; 2002.
161. Pickering MC, Cook HT. Translational mini-review series on complement factor H: renal diseases associated with complement factor H: novel insights from humans and animals. *Clin Exp Immunol*. 2008;151(2):210-30. doi:10.1111/j.1365-2249.2007.03574.x.
162. Morris KM, Aden DP, Knowles BB, Colten HR. Complement biosynthesis by the human hepatoma-derived cell line HepG2. *J Clin Invest*. 1982;70(4):906-13. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=370299&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>. Accessed May 31, 2015.

163. Friese MA, Hellwage J, Jokiranta TS, et al. Different regulation of factor H and FHL-1/reconectin by inflammatory mediators and expression of the two proteins in rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol*. 2000;121(2):406-15. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1905714&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed June 19, 2015.
164. Hageman GS, Anderson DH, Johnson L V, et al. A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(20):7227-32. doi:10.1073/pnas.0501536102.
165. Honda H, Qureshi AR, Heimbürger O, et al. Serum albumin, C-reactive protein, interleukin 6, and fetuin a as predictors of malnutrition, cardiovascular disease, and mortality in patients with ESRD. *Am J Kidney Dis*. 2006;47(1):139-148. doi:10.1053/j.ajkd.2005.09.014.
166. Stenvinkel P, Barany P, Heimbürger O, Pecoits-Filho R, Lindholm B. Mortality, malnutrition, and atherosclerosis in ESRD: what is the role of interleukin-6? *Kidney Int Suppl*. 2002;(80):103-108. doi:10.1046/j.1523-1755.61.s80.19.x.
167. Zhang W, Wang W, Yu H, et al. Interleukin 6 underlies angiotensin II-induced hypertension and chronic renal damage. *Hypertension*. 2012;59(1):136-144. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.173328.
168. Thurman JM, Ljubanović D, Royer PA, et al. Altered renal tubular expression of the complement inhibitor Crry permits complement activation after ischemia/reperfusion. *J Clin Invest*. 2006;116:357-368. doi:10.1172/JCI24521.
169. Gerritsma JS, Gerritsen AF, De Ley M, van Es LA, Daha MR. Interferon-gamma induces biosynthesis of complement components C2, C4 and factor H by human proximal tubular epithelial cells. *Cytokine*. 1997;9(4):276-83. doi:10.1006/cyto.1996.0164.
170. Józsi M, Manuelian T, Heinen S, Oppermann M, Zipfel PF. Attachment of the soluble complement regulator factor H to cell and tissue surfaces: relevance for pathology. *Histol Histopathol*. 2004;19(1):251-8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14702193>. Accessed June 19, 2015.
171. Buelli S, Abbate M, Morigi M, et al. Protein load impairs factor H binding promoting complement-dependent dysfunction of proximal tubular cells. *Kidney Int*. 2009;75(10):1050-9. doi:10.1038/ki.2009.8.
172. Lager D. Heptinstall's Pathology of the Kidney. *Am J Surg Pathol*. 2008;32(2):344. doi:10.1097/PAS.0b013e3181468b05.