



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Fisiopatología de la fibrosis túbulo-intersticial renal

Pathophysiology of renal tubulointerstitial fibrosis

Autora

María Pilar Guiral Foz

Director

Ignacio Giménez

Facultad de Medicina de Zaragoza

Curso 2018/2019

Índice

1. Resumen	4
2. Abstract	4
3. Metodología y palabras clave.	5
4. Introducción	6
5. Fibrosis túbulo-intersticial	7
6. Mediadores celulares.....	10
6.1. Macrófagos	10
6.2. Miofibroblastos	11
6.3. Fibrocitos	13
6.4. Células endoteliales	13
6.5. Células epiteliales tubulares	14
7. Papel de los componentes de la matriz extracelular	16
8. Hipoxia crónica y estrés oxidativo	17
9. Vías moleculares	17
10. Evaluación de la fibrosis	19
10.1. Biomarcadores en la ERC	20
TGFB	20
MCP-1 Y RBP	21
MMP-2	21
PAI-1.....	21
Péptidos derivados de precursores de colágenos	22
NAG Y B2-MG	22
HE4	23

BCL-3	23
KLOTHO.....	24
WISP-1	24
C1M Y C3M	25
MICRO-RNA	26
10.2. Técnicas de imagen	27
Resonancia magnética ponderada por difusión	27
Elastografía por ultrasonidos	27
10.3. Combinación de marcadores de imagen y laboratorio	28
11. Tratamiento	29
12. Conclusiones	30
13. Bibliografía	31

1. RESUMEN

Todas las enfermedades renales progresivas se caracterizan por presentar fibrosis intersticial y atrofia tubular (IFTA, del inglés *interstitial fibrosis and tubular atrophy*). La IFTA es el resultado de la acumulación continua y persistente de proteínas de la matriz extracelular que sustituye progresivamente y destruye el tejido renal normal. Como consecuencia, se producen cambios tanto en la estructura como en la función renal. La patogenia de la IFTA es un proceso complicado en el que participan varias vías celulares y moleculares complejas, independientes y superpuestas entre sí que aún no están completamente caracterizadas.

Hoy en día la única prueba disponible que nos garantiza un diagnóstico de certeza en pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) es la biopsia, pero no se puede aplicar de rutina a todos los pacientes por los riesgos que conlleva por ser una técnica invasiva. En la práctica clínica el diagnóstico se lleva a cabo con marcadores sanguíneos. El problema es que cuando se objetivan estos marcadores en sangre el daño renal lleva tiempo progresando y ofrecen un diagnóstico tardío.

En los últimos años se han realizado numerosos avances en el esclarecimiento de la fisiopatología de la IFTA con doble objetivo: 1) encontrar marcadores precoces no invasivos en sangre y en orina que sustituyan a la biopsia y proporcionen un diagnóstico precoz, y 2) encontrar nuevas dianas terapéuticas ya que en la actualidad no se dispone de ningún tratamiento dirigido específicamente a la IFTA. Sin embargo, los nuevos conocimientos en la patogenia aún no se han aplicado a la práctica clínica.

2. ABSTRACT

All progressive renal diseases are characterized by interstitial fibrosis and tubular atrophy (IFTA). IFTA is the result of continuous and persistent accumulation of extracellular matrix proteins that progressively replace and destroy normal renal tissue. As a consequence, changes occur both in the structure and in renal function. It is a complicated process involving several cellular and molecular pathways, complex, independent and overlapping each other that are not yet fully characterized.

Nowadays, the only available test that guarantees a definitive diagnosis is the biopsy, but it cannot be applied routinely to all patients with chronic kidney disease due to the risks involved. In clinical practice the diagnosis is carried out with blood markers. These markers offer a late diagnosis because when they rise in blood, damage in the kidney is already done.

In recent years there have been many advances in the clarification of the pathophysiology of tubulointerstitial fibrosis with two objectives: 1) to find non-invasive early markers in blood and urine to replace the biopsy and provide an early diagnosis, and 2) to find new therapeutic targets since there is currently no treatment specifically directed to IFTA. However, new knowledge in pathogenesis has not yet been applied to clinical practice.

3. METODOLOGÍA Y PALABRAS CLAVE.

Se realiza una búsqueda bibliográfica de las bases de datos biomédicas: Pubmed, Clinical Key. Se han incluido los artículos más relevantes publicados sobre este tema durante los últimos 5 años. Consultando las siguientes palabras clave: *renal fibrosis, pathophysiological mechanisms, tubulointerstitial damage, interstitial fibrosis, biomarkers, disease progression, kidney failure, chronic kidney failure, proteinuria, humans, renal tubular injury, prognosis.*

4. INTRODUCCIÓN

La ERC es hoy en día una de las patologías más prevalentes en la población mundial. En 2010 se estimó que un 10,4% de hombres y un 11,8 % de mujeres de la población mundial adulta sufren algún grado de ERC [1].

Todas las guías clínicas, incluyendo las guías KDIGO 2012 (del inglés *Kidney Disease Improving Global Outcomes*) y KDOQI (del inglés *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative*), definen la ERC como una tasa de filtración glomerular (TFG) inferior a 60 mL/min/1,73 m² o la presencia de daño renal durante al menos tres meses, refiriéndose a daño renal como la presencia de anormalidades estructurales o funcionales del riñón que puedan provocar potencialmente un descenso de la tasa de filtrado glomerular [2,3].

Tabla 1. Criterios para la definición de enfermedad renal crónica

Presencia de uno de los siguientes criterios durante al menos más de 3 meses	
Marcadores de daño renal (uno o más)	Albuminuria (TEA≥30 mg/24 horas; CAC ≥30mg/g [≥3 mg/mmol])
	Anormalidades en el sedimento urinario
	Anormalidades electrolíticas y otras debidas a trastornos tubulares
	Anormalidades estructurales detectadas por imágenes
	Historia de trasplante renal
Disminución de la TFG	TFG < 60 mL/min/1,73 m ² (Categorías de ERC G3a-G5)

Muchos de los pacientes con ERC avanzan hasta una etapa terminal en la que necesitan una terapia de reemplazo renal con diálisis y/o trasplante renal en algún momento de su vida. Tanto la diálisis como el trasplante renal son opciones terapéuticas que conllevan una elevada repercusión socioeconómica [4].

En los países en vías de desarrollo las causas principales de ERC son de tipo infeccioso, tóxico o desconocido [5,6]. Mientras que las causas fundamentales en los países desarrollados son la diabetes mellitus (DM) y la hipertensión (HTA), ambas enfermedades son cada vez más frecuentes en nuestro medio debido al estilo de vida de las personas. Como consecuencia del aumento de la prevalencia de la DM y la HTA, junto con el envejecimiento progresivo de la población en los países desarrollados, la prevalencia de ERC también está en un aumento continuo. Como resultado, la ERC se ha convertido en un importante problema de salud pública económico y social a escala mundial tanto por su elevada prevalencia como por los

elevados costes de su tratamiento [7]. Los pacientes con ERC se caracterizan por presentar IFTA. La importancia de la IFTA radica en que es un predictor pronóstico de la insuficiencia renal, de ahí la importancia de evaluarla correctamente. Su evaluación precisa técnicas sensibles y no invasivas que faciliten un diagnóstico precoz, la monitorización de la progresión y el tratamiento de pacientes con ERC [4].

En la mayoría de los casos de ERC, el diagnóstico y el seguimiento de estos pacientes se realiza actualmente con marcadores como: la estimación del filtrado glomerular, la creatinina en sangre y la albuminuria. El problema es que en el momento en el que estos marcadores son detectables, los riñones tienen alteraciones estructurales y funcionales avanzadas. Cuando el filtrado glomerular desciende por debajo de 60 mL/min/1.73m², se ha perdido un 50% de la función renal con sus cambios asociados en la estructura renal [8]. El objetivo de esta revisión es reunir evidencia científica sobre nuevos biomarcadores no invasivos que permitan un diagnóstico precoz, un análisis cuantitativo y así un mejor control de la ERC, disminuyendo la carga social y económica de esta enfermedad.

5. FIBROSIS TÚBULO-INTERSTICIAL

En los riñones se sintetizan y degradan continuamente proteínas que forman parte de la matriz extracelular (MEC), pero estas no se acumulan porque tanto la síntesis como la degradación están en equilibrio. Cuando el riñón sufre una lesión mantenida, se rompe este equilibrio a favor de la síntesis y aparece la IFTA [4]. La atrofia tubular (AT) se define como la pérdida de transporte especializado y de la capacidad metabólica manifestándose con pequeños túbulos delgados y dilatados. Aunque la AT suele asociarse con fibrosis intersticial son separables, como en el caso de la AT profunda en la estenosis de la arteria renal donde no hay fibrosis intersticial [9].

El principal desencadenante de la fibrosis es una lesión sostenida que provoca la puesta en marcha de una inflamación no resolutive. Sin embargo, la inflamación forma parte de los mecanismos de defensa del huésped. Aún no se conoce el factor que determina si la inflamación es una respuesta fisiológica o profibrótica [10,11].

Hay que destacar la gran variedad de moléculas y células que intervienen a través de diferentes vías en la patogenia de la IFTA. Las células que participan son (figura 1):

1. **Macrófagos/monocitos.** Son células inflamatorias multifuncionales. Llevan a cabo una respuesta inflamatoria intersticial que tiene múltiples consecuencias, algunas beneficiosas y otras perjudiciales (figura 1) [4].
2. **Miofibroblastos.** Son células intersticiales únicas, derivan principalmente de células estromales renales (fibroblastos y pericitos). Son la fuente principal de las diversas proteínas de la MEC que forman cicatrices intersticiales (figura 1) [4].
3. **Fibroцитos y fibroblastos.** Son dos estados diferentes del mismo tipo celular, los fibroцитos se encuentran circulando por la sangre y tienen menos actividad mientras que los fibroblastos son células residentes en el tejido conectivo con una gran actividad [4].
4. **Células epiteliales tubulares.** Sufren una transición epitelial-mesenquimatos, y pierden sus capacidades regenerativas (figura 1) [4].
5. **Células endoteliales microvasculares.** Sufren una transición endotelio-mesenquimatos. Se pierde la integridad capilar intersticial, lo que compromete el suministro de oxígeno y conduce a una cascada de hipoxia-estrés oxidativo (figura 1) [4].

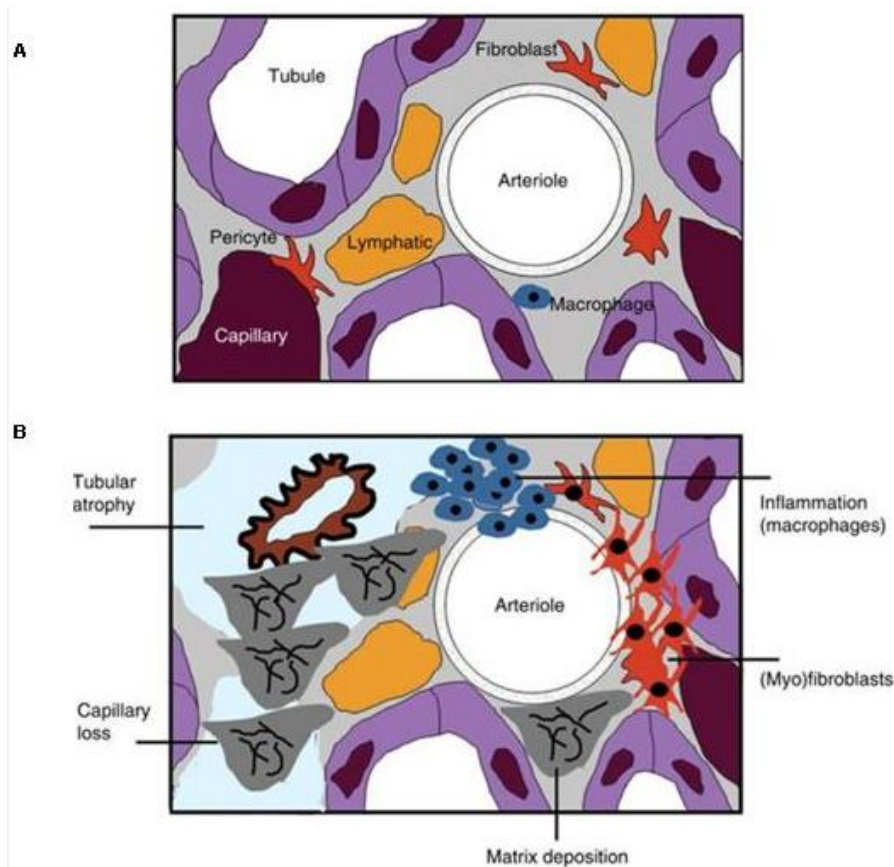


Figura 1. Distribución de las células tubulares e intersticiales en: A. Riñones sanos y B. Riñones fibróticos [4].

Estas células se activan por diferentes moléculas. El TGF β (factor de crecimiento transformador beta) parece ser el principal impulsor de la fibrosis renal. Se encuentra elevado en casi todos los casos de ERC [12]. Otras moléculas con papel modulador son: BMP (proteína morfogénica ósea), PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) y HGF (factor de crecimiento de hepatocitos) [10,11].

El TGF β es liberado tanto por el túbulo lesionado como por los macrófagos y el resto de células infiltradas en el intersticio, y además actúa sobre las mismas. Los miofibroblastos son especialmente sensibles al TGF β . Al tener tanta importancia en la patogenia de la IFTA se podría pensar en este factor como diana terapéutica, pero todos los ensayos clínicos llevados a cabo con este objetivo destacan por las incongruencias de sus resultados [13].

Independientemente de las causas iniciales, la fibrosis renal es un proceso dinámico y convergente que consta de fases superpuestas (figura 2):

- 1) **Etapla fibrogénica.** Ante una lesión se pone en marcha la inflamación. Esta inflamación promueve la infiltración peritubular de células inflamatorias (células T, macrófagos, células dendríticas) que liberan gran cantidad de citocinas (figura 2) [4,14].
- 2) **Activación y expansión de miofibroblastos de varias fuentes.** La lesión renal mantenida favorece la persistencia de altos niveles de citocinas profibróticas en el entorno con la activación de fibroblastos intersticiales en miofibroblastos. Los miofibroblastos ensamblan un complejo de proteínas multicomponente asociado a integrinas que facilitan la entrada de varias señales fibrogénicas y organizan la producción de gran cantidad de componentes de la matriz extracelular y su ensamblaje extracelular (figura 2) [4,14].
- 3) **Apoptosis de células epiteliales tubulares, transición epitelial-mesenquimal y atrofia tubular.** La proteinuria, TGF β , angiotensina II, hipoxia y niveles elevados de glucosa en sangre son algunos de los estímulos nocivos para las células epiteliales tubulares (figura 2) [4,14].
- 4) **Lesión microvascular e hipoxia tisular.** Promueven la formación de cicatrices y aseguran la progresión hacia la insuficiencia renal crónica [4,14].

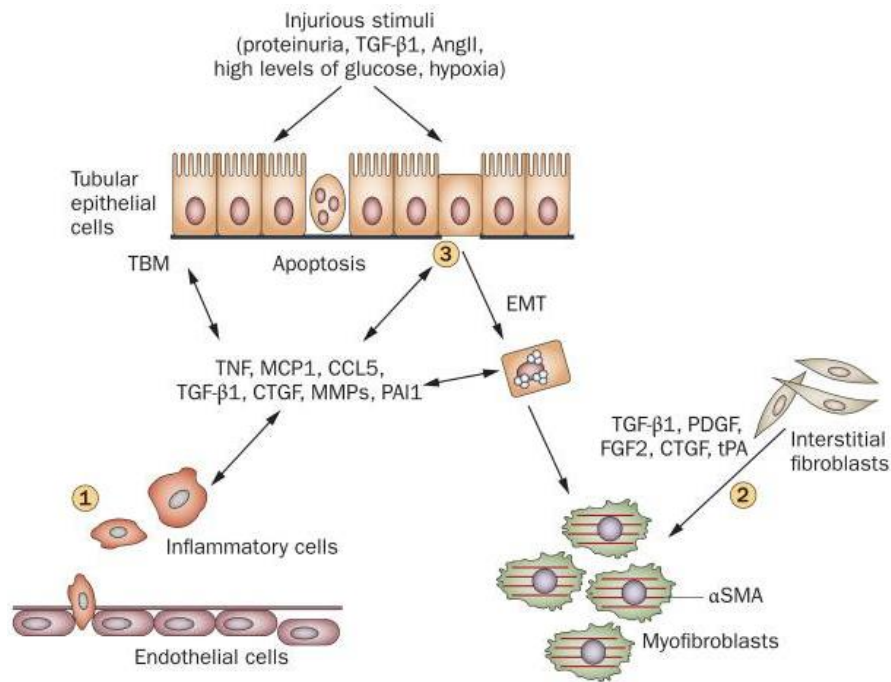


Figura 2. Fases de la patogenia de la IFTA [14].

6. MEDIADORES CELULARES

6.1. MACRÓFAGOS

La ERC se caracteriza por presentar un infiltrado intersticial de macrófagos. La cantidad de macrófagos en el intersticio es directamente proporcional a la gravedad de la enfermedad renal. También depende del estado de activación de los macrófagos [15]. Los macrófagos tienen un gran potencial multifuncional ya que pueden activarse clásicamente (M1) o alternativamente (M2) dependiendo de señales ambientales locales, distintas, no superpuestas, que están en continuo cambio.

Los macrófagos sintetizan y segregan una variedad de productos que influyen en la fibrosis. Estos incluyen factores de crecimiento y citocinas: TGF β , PDGF, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de necrosis tumoral alfa, interferón gamma, HGF, enzimas y sus inhibidores: enzima convertidora de angiotensina, activadores del plasminógeno, PAI-1 (inhibidor del activador del plasminógeno-1), colagenasas, inhibidor tisular de metaloproteinasas, proteínas de la matriz: colágeno, fibronectina, trombospondina y muchas otras: proteínas del complemento, factores de coagulación, lípidos bioactivos, ROS (del inglés *reactive oxygen species*), óxido nítrico, endotelina, etc. [16].

Los macrófagos M1 son activados por moléculas como el interferón gamma, lipopolisacáridos, el factor de necrosis tumoral o GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos). Esta especialización celular muestra un fenotipo proinflamatorio típico y produce quimiocinas que actúan directamente sobre los miofibroblastos como las ROS; por lo tanto, tienen funciones patógenas que conducen a una reparación tisular 'maladaptativa' con una pérdida irreversible de parénquima renal. Mientras que interleucina-4, interleucina-13, interleucina-10, corticosteroides, vitamina D, el factor estimulante de colonias macrófagos y el TGF β activan el subconjunto M2 promoviendo la reparación de tejidos 'adaptativa' con cicatrización mínima y restauración del parénquima normal [17].

6.2. MIOFIBROBLASTOS

Los miofibroblastos son una población única de células que aparecen *de novo* en el intersticio renal durante la fibrosis. Son responsables de sintetizar la mayor parte de las proteínas que forman la compleja MEC y tienen una gran capacidad proliferativa [18].

Los miofibroblastos se caracterizan por expresar α SMA (actina alfa del músculo liso), pero no todos ellos expresan α SMA de manera constante, lo que dificulta su identificación. Hoy en día no tenemos ningún marcador específico que nos ayude a identificar a los miofibroblastos, ya que todos los marcadores presentes en ellos son compartidos con otras estirpes celulares. Además, contienen fibras de estrés (microfilamentos con densidades focales), abundantes conexiones transmembrana entre la fibronectina extracelular y los microfilamentos de actina intracelular y uniones frecuentes a las membranas basales de las células tubulares. Presentan FSP1 (proteína 1 específica para fibroblastos, también conocida como S100A4). En un primer momento FSP1 se caracterizó como específica para fibroblastos y miofibroblastos, pero más tarde se demostró que también se encuentra en leucocitos. Los miofibroblastos presentan otros marcadores como PDGFR β (receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas β) en común con fibroblastos, células del músculo liso vascular y pericitos. La expresión de vimentina la comparten con los podocitos glomerulares. Con respecto a CD73 (también conocido como ecto-5'-nucleotidasa), se expresa, además de en los miofibroblastos, en fibroblastos intersticiales, en las células tubulares proximales, en las células mesangiales y en las células T [19,20].

Los miofibroblastos tienen una enorme heterogeneidad fenotípica, debido a sus múltiples orígenes (figura 3):

- **Activación fenotípica de fibroblastos intersticiales.** Es el origen más importante. Los fibroblastos al activarse proliferan y se transforman en miofibroblastos. Los fibroblastos mantienen la homeostasis de la matriz intersticial en condiciones fisiológicas al producir un nivel basal de componentes de la MEC. Morfológicamente, los fibroblastos de un riñón normal carecen de un marcador específico, lo que dificulta su estudio. Tienen forma estrellada y abundante retículo endoplásmico rugoso, gránulos secretorios de colágeno y citoesqueleto de actina F prominente. Poseen múltiples prolongaciones celulares, que los conectan a las membranas basales tubulares y capilares. En reposo, los fibroblastos intersticiales expresan CD73 en su membrana plasmática y producen eritropoyetina. También expresan PDGFR β , y FSP1 (figura 3) [21,22].
- **Diferenciación de los pericitos vasculares.** Los pericitos son un subconjunto de las células estromales que cubren parcialmente las paredes capilares, estabilizando así el endotelio. Los pericitos se separan del endotelio, migran, proliferan, y se diferencian en miofibroblastos. Como resultado se desestabiliza la microvasculatura. Los marcadores de los pericitos, como el PDGFR β , no son específicos y también están presentes en los fibroblastos. Además, al estar los fibroblastos conectados intrínsecamente a los capilares mediante procesos celulares en el intersticio renal, es difícil diferenciarlos (figura 3) [21,22].
- **Reclutamiento de fibrocitos circulantes.** Esto se discutirá en más detalle en el apartado 5.3. (figura 3)
- **Transición endotelial-mesenquimatosa.** Tiene lugar en etapas avanzadas de la enfermedad [21,22]. Esto se discutirá en más detalle en el apartado 5.4. (figura 3)
- **Transición epitelial-mesenquimal.** Tiene lugar en etapas avanzadas de la enfermedad [21,22]. Esto se discutirá en más detalle en el apartado 5.5. (figura 3)

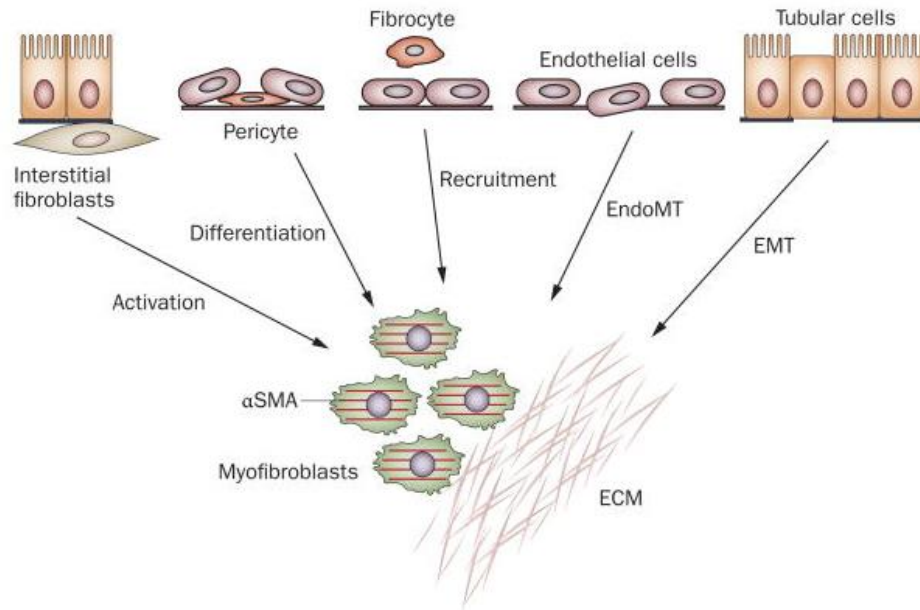


Figura 3. Origen de los miofibroblastos [14].

6.3. FIBROCITOS

Los fibrocitos son un subconjunto de los monocitos circulantes derivados de la médula ósea con características similares a los fibroblastos en la sangre periférica. Son células con forma de huso que expresan el marcador de células hematopoyéticas CD45 y son capaces de producir colágeno de tipo I. También expresan receptores de quimiocinas, como el CCR7 [23].

En respuesta a la lesión renal, los fibrocitos se movilizan, se infiltran en el parénquima renal y participan en la fibrosis, son células productoras de MEC. La diferenciación de los fibrocitos es modulada por otras células inflamatorias, como las células T CD4 +, a través de citocinas secretadas. Las citocinas profibróticas IL-4 e IL-13 promueven la diferenciación de los fibrocitos, mientras que las citocinas antifibróticas IFN- γ e IL-12 inhiben este proceso. Es complicado diferenciar a los fibrocitos del resto de estirpes celulares debido a la ausencia de marcadores específicos [23].

6.4. CÉLULAS ENDOTELIALES

La isquemia y el estrés oxidativo dañan a las células endoteliales y favorecen que estas células sufran una transición endotelial-mesenquimal que genera miofibroblastos [24,25]. Como consecuencia de esta pérdida de células endoteliales aparece una

disfunción endotelial [26]. Además, se activan también miofibroblastos a partir de pericitos, lo que desestabiliza aún más la red vascular. Por todos estos motivos aumenta la permeabilidad de la microvasculatura intersticial en pacientes con ERC [27]. Al aumentar la permeabilidad vascular aparece el síndrome de fuga capilar renal, se filtran proteínas al intersticio que normalmente no se encuentran allí, como los conjugados de fibrinógeno y la albúmina, que actúan como estímulos profibroticos [28].

La mayoría de las enfermedades crónicas se caracterizan por una angiogénesis excesiva, sin embargo, en la ERC falla la angiogénesis y disminuyen progresivamente los capilares peritubulares intersticiales [29]. Los vasos linfáticos renales son los responsables de facilitar la migración de células inflamatorias. La IFTA se asocia con un aumento de la linfangiogénesis, impulsada principalmente por VEGF-C (factor de crecimiento endotelial vascular C), para intentar contrarrestar la gran producción y acumulación de proteínas en el intersticio renal, sin grandes resultados [30].

6.5. CÉLULAS EPITELIALES TUBULARES

Las primeras respuestas de los túbulos frente a una lesión son beneficiosas: proliferación celular y autofagia, aunque la autofagia excesiva conduce a una descomposición celular total. Si la lesión continúa y no se resuelve el problema es cuando aparecen las respuestas perjudiciales, las células del epitelio tubular sufren cambios fenotípicos (EMP, del inglés *epithelial mesenchymal phenotype*), una transición epitelial-mesenquimal (EMT, del inglés *epithelial-to-mesenchymal transition*), apoptosis, atrofia tubular, y pierden su capacidad regenerativa dejando atrás glomérulos atubulares no funcionales (figura 4). Además, las células adquieren una motilidad aumentada y atraviesan la membrana basal llegando al intersticio. Las células inflamatorias como los macrófagos y linfocitos favorecen estos procesos por la gran cantidad de citocinas que liberan [31, 32].

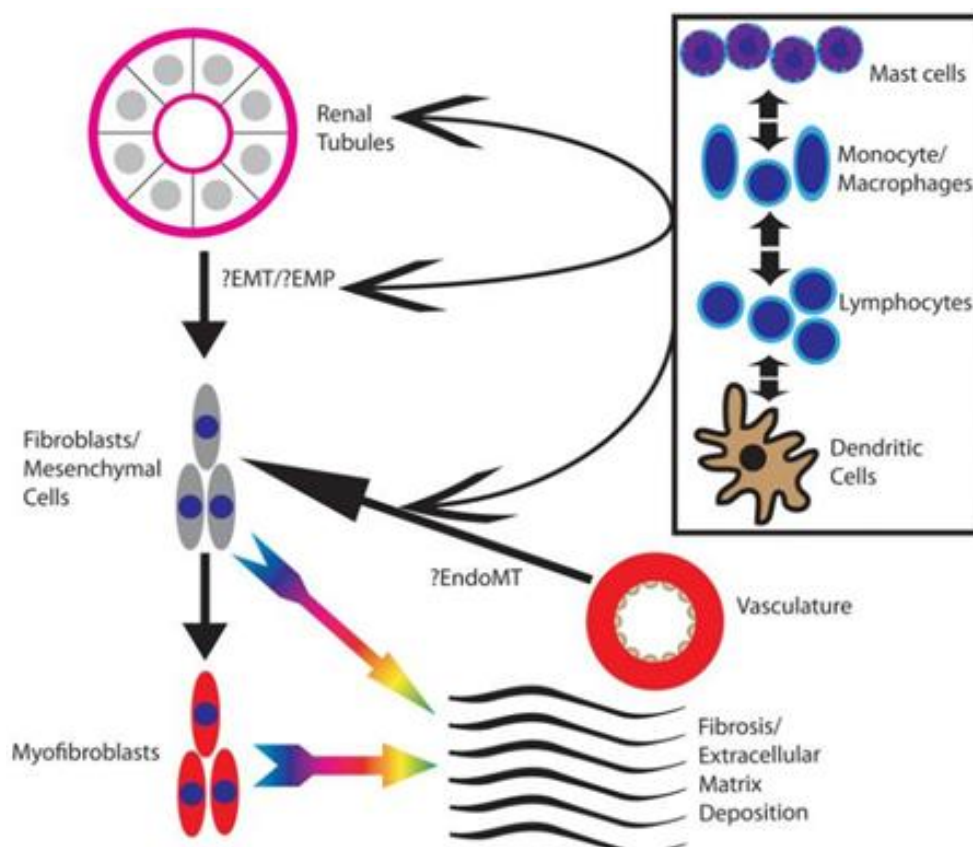


Figura 4. Mediadores celulares de la IFTA [33]

Durante EMT y EMP, las células pierden marcadores epiteliales (E-cadherina) y adquieren marcadores mesenquimales (vimentina, α SMA y FSP1). Esta conversión fenotípica no es patognomónica de la fibrosis, también tiene lugar durante el desarrollo embrionario y en la metástasis tumoral [34,35,36,37].

Las células epiteliales tubulares son susceptibles a la proteinuria (albuminuria), $TGF\beta 1$, los componentes de la cascada del complemento urinarios, las citocinas, niveles elevados de glucosa, la angiotensina II y ROS [38]. Estos estímulos continuos promueven la señalización de NF κ B (factor de transcripción nuclear kappa B) en el epitelio tubular renal, lo que desencadena la producción y liberación de agentes inflamatorios como ROS y citocinas ($TGF\beta$) e inicia la inflamación peritubular, por lo que las células epiteliales tubulares intervienen activamente en la patogenia de la IFTA [14]. La lesión sostenida también activa ILK [39], B-catenina [40], Notch 1 [41] y HIF1 (factor 1 inducible por hipoxia) [42]. Como consecuencia de la excesiva generación de ROS e inadecuadas defensas antioxidantes, las células tubulares sufren un estrés oxidante.

7. PAPEL DE LOS COMPONENTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

La ERC se caracteriza por una cicatriz fibrótica compuesta por macromoléculas que cambian de composición y de estructura conforme avanza el tiempo. La evaluación del área fibrótica es el mejor correlato histológico negativo de la función renal y el pronóstico renal a largo plazo [14].

Durante las primeras fases de la fibrosis, la matriz de colágeno es susceptible a la proteólisis y, por lo tanto, la fibrosis es reversible, igual que ocurre en la cicatrización de una herida. A medida que progresa la fibrosis, las proteínas de la matriz sufren cambios bioquímicos por la acción de enzimas como: transglutaminasa tisular y lisil oxidasa, que mediante reticulación hacen a las proteínas resistentes a la proteólisis. Por lo tanto cuanto más tiempo permanece la lesión que ha puesto en marcha la fibrosis menor es la probabilidad de que la fibrosis se resuelva. La expresión de la transglutaminasa tisular se encuentra elevada en las biopsias de pacientes con ERC, y se correlaciona estrechamente con la gravedad de la fibrosis renal [43].

Las MMP (metaloproteinasas de la matriz) son enzimas proteolíticas. Tienen la función de degradar las moléculas de colágeno de la MEC. Gracias a ellas, a pesar de las altas tasas de síntesis, el colágeno no se acumula en los riñones en condiciones normales. También previenen la cicatrización excesiva de las heridas. Por lo que en la fibrosis tienen una función protectora, al reducir la acumulación de matriz [44]. Las MMP son activadas por una proteasa sérica, la plasmina [45]. Sin embargo, no todas las funciones de las MMP son beneficiosas ya que durante todo el proceso activan factores de crecimiento latentes profibróticos [46].

En la etapa temprana de la fibrosis renal, el depósito de fibronectina precede a la producción de colágenos fibrilares. La fibronectina activa a las integrinas, se localiza conjuntamente con la secreción de procolágeno y forma andamios sueltos para los colágenos fibrilares [43]. Este proceso es seguido por la producción de nuevas proteínas de la matriz, como SPARC (proteína ácida secretada y rica en cisteína) y colágeno de tipo IV. Además de la fibronectina, SPARC también regula el ensamblaje del colágeno fibrilar. SPARC se une al colágeno, y su expresión en tejidos adultos se asocia frecuentemente con una deposición excesiva de colágeno. SPARC puede unirse a la integrina $\beta 1$ y activa la señalización de ILK, lo que sugiere una conexión potencial entre el complejo de integrina-ILK y el ensamblaje de la matriz [47].

8. HIPOXIA CRÓNICA Y ESTRÉS OXIDATIVO

En la ERC la presencia de afectación microvascular por la formación de miofibroblastos a partir de células endoteliales y de pericitos, junto con la disminución de la difusión de oxígeno por la fibrosis, el aumento de las demandas metabólicas por parte de las células tubulares y la ausencia de respuestas angiogénicas adecuadas provocan una disminución del aporte de oxígeno a los tejidos, es decir, aparece hipoxia crónica. La hipoxia favorece la apoptosis de las células tubulares, EMT tubular, activa a los fibroblastos residentes en miofibroblastos y altera los capilares peritubulares, creando así un ciclo de hipoxia crónica e insuficiencia renal progresiva [48, 49].

La hipoxia, el aumento de ROS y las inadecuadas respuestas antioxidantes facilitan la aparición de estrés oxidativo. Este estrés favorece que macromoléculas de gran importancia biológica como las proteínas, los lípidos y los hidratos de carbono sufran modificaciones estructurales originando productos finales de la glicación avanzada, productos avanzados de oxidación proteica y productos finales de la peroxidación lipídica [50,51]. Estas macromoléculas además de ser marcadores útiles para estimar el daño oxidativo también son mediadores celulares que favorecen la progresión de la IFTA [52,53].

9. VÍAS MOLECULARES

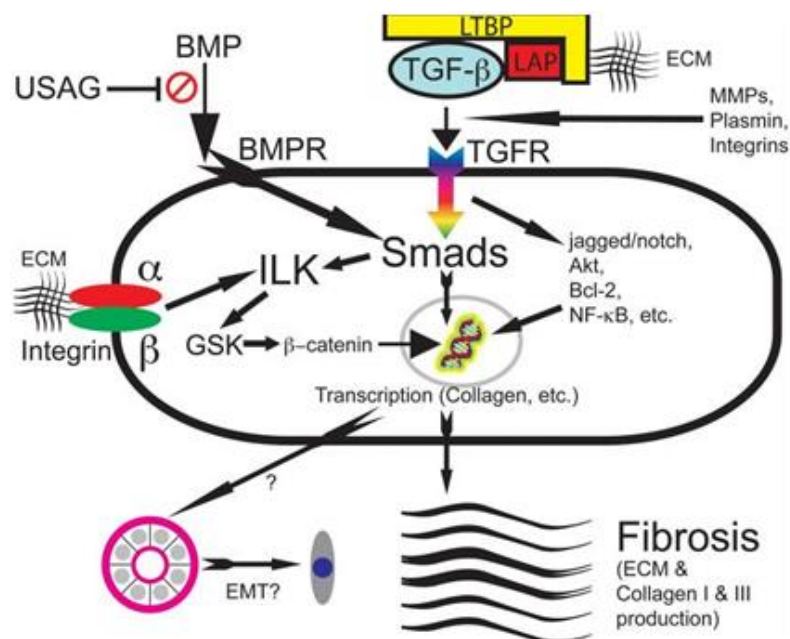


Figura 5. Vías celulares de la IFTA [33].

La síntesis de las proteínas de la MEC se controla principalmente a nivel de la transcripción génica en respuesta a varias señales fibrogénicas extracelulares (TGF β , niveles elevados de glucosa...), al microARN y estrés oxidativo [14].

Los factores fibrogénicos más importantes son TGF β , PDGF, factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGF2), factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), angiotensina II y el activador del plasminógeno (tPA), siendo el TGF β 1 el más determinante en la patogenia de la IFTA. El factor de crecimiento transformante se produce de forma inactiva (TGF β 1), unido a LAP, que impide la unión de TGF β 1 con su receptor (TGF β R). Además, LTBP se une a este complejo e inhibe su relación con la MEC. TGF β se libera de estas proteínas quedando así activada por la acción de las MMP, la plasmina y las integrinas [54] (figura 5). Al liberarse la forma activa se une a su receptor y pone en marcha diferentes vías entre las que destacan: Smads, Jagged/Notch, Akt, Bcl-2 y NF- κ B (figura 5).

Smads actúa directamente sobre la transcripción génica aumentando la expresión de integrinas, ILK (quinasa unida a integrina), PINCH y CTGF [55,56]. La vía Smad también se pone en marcha en respuesta a altos niveles de angiotensina II mediante mecanismos tanto dependientes de TGF β , al inducir su expresión, como independientes de este [57]. Las integrinas son una familia de receptores transmembrana heterodiméricos que constan de dos subunidades (α y β) y están conectadas con la MEC y con las vías de señalización intracelular involucradas en la IFTA, integrando así las señales entre las células y la matriz extracelular (figura 5). Las integrinas transmiten sus señales activando la ILK. ILK ensambla un complejo de proteínas junto con PINCH1 y parvin [58]. A través de PINCH1 se conecta con las señales fibróticas generadas por PDGF y FGF2 a través de su receptor tirosin quinasa (TRK) y la proteína citoplasmática NICK2 [14]. Y mediante parvin se conecta con la actina F del citoesqueleto, esto permite a ILK conectar las integrinas, el citoesqueleto de actina y otras cascadas de señales profibroticas [59]. Casi todas las señales profibróticas que promueven la producción y el ensamblaje de componentes de la MEC lo hacen mediante este complejo. La inhibición de la actividad de ILK atenúa la expresión, el depósito y el ensamblaje extracelular de la fibronectina, lo que sugiere que la integridad y la actividad de este complejo es imprescindible para la producción de matriz. ILK además de activarse por el TGF β y la angiotensina II a través de la señalización Smad, también está regulada por otros factores fibrogénicos, incluyendo CTGF, niveles altos de glucosa y tPA. En los miofibroblastos, el tPA y CTGF promueven la expresión de colágeno tipo I al desencadenar el reclutamiento de la

integrina $\beta 1$ y la activación de ILK, mediado por la proteína 1 relacionada con el receptor de LDL (LRP1) [14,60].

En condiciones normales GSK inhibe tanto a Snail1 como a β -catenina. ILK facilita la fosforilación e inactivación de GSK3 β , como consecuencia aumentan los niveles de Snail1 y β -catenina intracelulares. B-catenina entra en el núcleo y controla directamente la transcripción de la fibronectina, PAI-1, Snail1 y MMP 7 mientras que Snail1 regula la motilidad de los fibroblastos, la EMT tubular y la fibrosis renal [61]. Jagged/Notch, Akt, Bcl-2 y NF- κ B son factores de transcripción que se ponen en marcha tras su activación por TGF β . Cabe destacar que la activación de NF κ B depende del factor de necrosis tumoral y estabiliza Snail1 al bloquear su degradación [62].

No todos los factores que regulan la patogenia de la IFTA son profibróticos. El HGF y la BMP-7 inhiben la producción de componentes de la matriz, al ser antagonistas del TGF $\beta 1$ [63]. HGF bloquea la translocación nuclear de Smad2/3, inhibiendo la EMP tubular [64]. BMP-7 es un factor antifibrótico producido por las células epiteliales en los riñones normales en respuesta a la lesión tubular. En pacientes con ERC se reducen progresivamente sus niveles. Además, está regulada por USAG-1 (gen 1 asociado a la sensibilización uterina, también conocido como proteína 1 que contiene el dominio de la esclerostina), que es un inhibidor endógeno de BMP-7 [65] (figura 5).

10. EVALUACIÓN DE LA FIBROSIS

Hoy en día la única prueba que nos da el diagnóstico definitivo de fibrosis es la biopsia, pero no se realiza de rutina a todos los pacientes con ERC por su elevado coste y porque al ser una prueba invasiva tiene muchas complicaciones que en muchos casos superan a los posibles beneficios de esta, entre las que destacan: hemorragia, dolor, fístulas arterio-venosas, infección [66], hipertensión crónica (la isquemia inducida por presión de un hematoma subcapsular grande puede conducir a la activación persistente del sistema renina-angiotensina) [67], punción del hígado, páncreas o bazo y urinoma [68]. Además, hay que tener en cuenta el error de muestreo que se produce al biopsiar una parte del riñón y no el riñón entero, y la variabilidad inter e intra-observador [33].

Por todo esto, en la práctica clínica se diagnostica y se valora la progresión de la ERC con marcadores como: TFG, proteinuria, la albuminuria, creatinina, BUN (del

inglés *blood urea nitrogen*)...El problema de estos marcadores es que cuando se alteran ya se han producido cambios estructurales patológicos avanzados en los riñones. La investigación hoy en día está centrada en encontrar alternativas no invasivas más sensibles y específicas para diagnosticar la fibrosis como los biomarcadores en sangre y orina o las pruebas de imagen.

Durante la fibrosis, se liberan pequeños fragmentos de proteínas al medio extracelular. Estos marcadores difieren al hablar de enfermedad aguda o crónica. En el fracaso renal agudo son: la lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL), la cistatina C urinaria, NAG (N-acetil- β -D-glucosaminidasa), IL-18, L-FABP y la molécula de lesión renal-1 (KIM-1) [69]. Ahora nos vamos a centrar en los marcadores más investigados en la ERC.

10.1. BIOMARCADORES EN LA ERC

En una revisión sistemática se valoró la confiabilidad de varios biomarcadores en sangre y en orina para identificar la fibrosis en la biopsia. En la etapa I se identificaron 17 estudios y 14 biomarcadores. Cinco biomarcadores cumplieron con los criterios para avanzar a la etapa II, pero solo tres se asociaron de forma independiente con los resultados renales: TGF β en orina, MCP-1 (proteína-1 quimioatrayente de monocitos) en orina y MMP-2 en sangre y orina [70]. Estos tres últimos además de asociarse de forma independiente con la fibrosis renal, son predictores de mal pronóstico en la ERC y pueden identificar a pacientes con riesgo de fibrosis renal por lo que tienen gran potencial diagnóstico y pronóstico en pacientes con enfermedad renal [70].

TGF β

En un estudio se objetivó la cantidad de TGF β 1 en orina en pacientes con glomerulonefritis membranosa idiopática humana (MGN), enfermedad de alta variabilidad clínica y factores pronósticos poco conocidos, en comparación con sujetos sanos. La mediana de la excreción urinaria de TGF β 1 fue significativamente mayor en pacientes con MGN que en los controles sanos. En MGN, el TGF β 1 urinario se correlacionó con la excreción urinaria de albúmina pero no se encontró correlación con la función renal o la duración de la enfermedad. El TGF β 1 urinario en la biopsia renal se correlacionó con la inflamación celular intersticial y su excreción un año antes de la biopsia se correlacionó con los índices de fibrosis [71].

Otro estudio comparó las cifras de TGF β 1 y α SMA en orina en pacientes con nefropatía lúpica tanto con IFTA como sin IFTA teniendo en cuenta los años de progresión de la enfermedad. El análisis de IFTA se llevo a cabo con biopsia renal. Se

encontró una correlación positiva significativa entre la cantidad de TGF β con la cronicidad de las enfermedades y con el grado de fibrosis. Sin embargo, no ocurrió lo mismo con la α SMA, donde no hubo resultados significativos. Por lo que la concentración de TGF β 1 en orina se presenta como un posible futuro biomarcador más sensible, específico y con mayor valor predictivo negativo que α SMA [172].

MCP-1 y RBP

La MCP-1 es una citocina liberada por los macrófagos responsable del reclutamiento y la migración de células inflamatorias al foco de inflamación. El bloqueo del receptor MCP-1 (CCR2) reduce la fibrosis intersticial [70].

En un estudio se demostró que RBP (del inglés, *retinol-binding protein*) urinaria y MCP-1 sérica y urinaria están relacionadas de forma independiente con el riesgo de progresión de la ERC, en 56 pacientes con DM tipo II con nefropatía diabética y macroalbuminuria. Debe investigarse más a fondo si estos biomarcadores también se pueden utilizar en pacientes con nefropatía diabética con normoalbuminuria y microalbuminuria [73].

MMP-2

Las MMP-2, -3 y -9 son importantes predictores pronósticos de la enfermedad cardiovascular en pacientes con arteriopatía coronaria, pero su papel como factor pronóstico en la ERC no se conocía hasta que un estudio prospectivo demostró que los niveles de MMP circulantes se asocian de forma independiente con la progresión de la enfermedad renal en pacientes no diabéticos con arteriopatía coronaria y añaden un poder predictivo más, junto con todos los factores de riesgo convencionales conocidos. En el estudio se incluyeron a 251 sujetos no diabéticos remitidos para angiografía coronaria: 30 sin alteraciones, 95 con estenosis insignificante y 126 con estenosis significativa [74].

PAI-1

PAI-1 es un importante modulador profibrótico, inducido tanto por la angiotensina como por el TGF β . Los niveles de PAI-1 en sangre tienen correlaciones positivas moderadas con la fibrosis detectada en las biopsias [70].

Es el principal inhibidor fisiológico del activador del plasminógeno de tipo tisular (t-PA) y del activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (u-PA), moléculas que escinden el plasminógeno en plasmina. El PAI-1 también desempeña funciones independientes de esta vía inhibitoria. La plasmina activa varias MMP latentes (MMP-1

y MMP-3) provocando la degradación de la MEC, lo que sugiere una respuesta favorecedora para la IFTA. Sin embargo, estudios in vitro demuestran que la plasmina activa el TGF β , este efecto no parece tener relevancia en estudios en vivo [75, 76, 77, 78].

PÉPTIDOS DERIVADOS DE PRECURSORES DE COLÁGENOS

PIIINP (péptido amino-terminal de procolágeno tipo III) es un producto de degradación del colágeno, que se libera durante la síntesis de colágeno tipo III, en sangre y orina. Un estudio demostró su relación con la síntesis y la degradación de la MEC [70]. Un estudio demostró que los niveles urinarios de PIIINP se correlacionaban con la gravedad de la enfermedad en la nefropatía por IgA en 92 pacientes en comparación con 53 controles sanos [79]. En otro estudio de 118 pacientes sometidos a una biopsia renal se encontró que el PIIINP urinario se correlacionaba positivamente con el grado de fibrosis renal en la biopsia renal [80]. En un análisis multivariante PIIINP urinario se correlaciono negativamente con la TFG. Aunque PIIINP se filtra en el riñón, esto puede deberse o bien a un aumento de su síntesis renal o a un aumento de la secreción renal durante la ERC [70]. Son necesarios más estudios para que PIIINP pueda sustituir a la biopsia renal en el manejo de pacientes con ERC.

NAG y β 2-MG (β 2-microglobulina)

Un estudio valoró la posible función de NAG (*N*-acetil- β - D –glucosaminidasa) y β 2-MG como biomarcadores urinarios predictores del pronóstico renal en la ERC. NAG es una enzima que reside en las microvellosidades de las células epiteliales tubulares renales. El daño a estas células da como resultado el desprendimiento de esta enzima en la orina, ya que debido a su alto peso molecular (130 kD), la NAG plasmática no es filtrada a través de los glomérulos [81]. La excreción urinaria de NAG también está asociada a la inflamación. β 2-MG es una proteína de bajo peso molecular (11.8 kD) producida por todas las células que expresan el antígeno de clase 1 del MHC (del inglés *major histocompatibility complex*). Se filtra por los glomérulos, pero luego se reabsorbe casi por completo por las células de los túbulos proximales por lo que en condiciones normales no aparece en la orina. Por lo tanto, ambos se han considerado biomarcadores clásicos de lesión tubulointersticial renal. Se incluyeron en el estudio 210 pacientes con DM tipo II y nefropatía diabética comprobado por biopsia desde 1985 hasta 2011, de los cuales 149 tenían datos de NAG en orina y β 2-MG en orina en el momento de la biopsia. Concluyeron que la adición de NAG y β 2-MG a los factores pronósticos conocidos para la ERC no ayudo a predecir el pronóstico, sin

embargo, el grado de IFTA sí que ayudo por lo que hay que seguir investigando sobre si NAG y β 2-MG son buenos biomarcadores para la IFTA [82].

HE4

Inicialmente se identificó la relación de HE4 (proteína epididimal humana 4, también conocida como WFDC2), con la maduración de los espermatozoides, la inmunidad innata en vías respiratorias, la cavidad oral, el adenocarcinoma de pulmón y el cáncer de ovario [83, 84, 85]. Recientes estudios han demostrado su papel como mediador de la fibrosis renal [85]. Inhibe diferentes proteasas, como las MMP y las serin proteasas Prss35 y Prss23, actuando mayormente a nivel de colágeno tipo I [85]. Los pacientes con ERC tienen niveles de HE4 en suero más altos que personas sanas, es decir, se encuentra regulado postivamente en los riñones fibróticos [86]. Además, los pacientes con mayor grado de ERC tienen concentraciones más altas de HE4 en plasma, lo que lo convierte en un potencial biomarcador de la fibrosis renal [87]. Sin embargo, HE4 aumenta en los sueros de pacientes con múltiples cánceres, como en los cánceres de ovario. Por lo tanto, se necesitan biomarcadores complementarios para la detección y el seguimiento de la progresión de la fibrosis renal en la ERC [88].

BCL-3

Bcl-3 es una proteína que se encuentra en el citoplasma de las células con un papel importante en la patogenia de la fibrosis renal [89,90]. Regula la transcripción génica al interactuar como un cofactor con NF κ B [91]. También actúa a nivel de la vía de señalización TGF β / Smad, al unirse a Smad3 e impedir su degradación [92]. En un experimento provocaron la fibrosis renal en ratones y vieron que en las etapas tempranas de la fibrosis se eleva el ARNm y el Bcl-3 en las células de manera similar a otros biomarcadores de fibrosis, incluidos Wfdc2, Snail1, Acta2, Col1 α 1, TGF β 1, P21y Twist1. Este aumento tiene lugar tan solo tres días después de inducir la fibrosis, Bcl-3 se libera a la sangre tras la apoptosis de las células epiteliales, o bien a través de exosomas. Los niveles de ARN m de Bcl-3 aumentaron antes que los de HE-4, lo que sugiere que Bcl-3 es más sensible que el HE4 como biomarcador de la fibrosis renal. Los niveles séricos de proteína Bcl-3 aumentaron gradualmente con la progresión de la fibrosis renal. Los niveles de ARNm y Bcl-3 aumentan en los tejidos tumorales en comparación con los tejidos normales en diversos tipos de cáncer como el colorrectal y el de mama, pero todavía no se ha estudiado si su concentración en plasma aumenta [92]. Los niveles elevados de Bcl-3 en suero se asocian con una disminución de la función renal. Bcl-3 podría servir como un nuevo biomarcador,

sobretudo en combinación con otros marcadores como HE4 en pacientes no cancerosos [92].

KLOTHO

Klotho es una proteína transmembrana antienviejecimiento [93]. Se encuentra en diferentes órganos entre los que se encuentra el riñón [94]. Lo podemos encontrar tanto en la membrana plasmática como disuelto en sangre. El Klotho membranoso tiene un papel importante en el metabolismo de los fosfatos al actuar como un coreceptor de los receptores de FGF para el ligando FGF23 [95]. El Klotho soluble inhibe múltiples factores de crecimiento, incluidos TGF β 1, Wnt / β -catenina y el factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1), favorece la inhibición de la apoptosis celular, la oxidación, la fibrosis y la modula el transporte de iones [96]. El Klotho soluble está presente en la sangre, la orina y el líquido cefalorraquídeo, y se cuantifica mediante ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas [97]. Varios modelos animales informaron de que la deficiencia de Klotho desencadena la fibrosis renal mediante la falta de inhibición de los factores de crecimiento, el aumento del estrés en el retículo endoplasmático, la regulación positiva de los canales de receptores transitorios y la regulación del sistema renina-angiotensina (SRAA) [98]. Sin embargo, ningún estudio en humanos ha examinado el mecanismo de asociación entre el Klotho soluble y la fibrosis renal, y se desconoce el papel exacto del Klotho soluble en la fibrosis renal en humanos [99].

En animales, se observan niveles reducidos de Klotho en suero, en orina y en los tejidos en las etapas iniciales de la fibrosis tubulo-intersticial, con una disminución progresiva en las etapas más avanzadas [100]. El Klotho en plasma también se correlacionó negativamente con el grado de esclerosis segmentaria. Debido a la alta sensibilidad del Klotho para predecir la fibrosis renal, podemos descartar la presencia de fibrosis renal ante niveles elevados de Klotho en plasma [99]. La reducción de la concentración de Klotho en sangre también se asocia con un aumento de la albuminuria, especialmente en pacientes con DM [101]. Hay estudios que sugieren que la angiotensina inhibe al Klotho y viceversa. Sin embargo, en otros estudios no se ha demostrado esta relación. Lo mismo ocurre con la relación entre el angiotensinógeno urinario y la fibrosis [102,103]. Los niveles de Klotho en suero y en orina representan un biomarcador potencial para predecir la fibrosis renal y la lesión de podocitos en humanos [99].

WISP-1 (proteína 1 de la vía de señalización inducible por Wnt1, también conocida como ccn4 / elm-1)

Es un mediador profibrótico que favorece la proliferación de los fibroblastos y la producción de proteínas de la MEC en varias enfermedades como la fibrosis pulmonar, cardíaca y hepática a través de la vía de señalización Wnt1, además en estas enfermedades sus niveles en sangre se encuentran elevados [104, 105, 106]. Es inducida por la proteína Wnt-1. Activa la vía de Wnt-1 y β -catenina. Se cree que la expresión de WISP1 en las células tubulares puede depender de TGF β 1 a través de la EMT [107]. Hay estudios que demuestran que al bloquear esta molécula en fibrosis pulmonar y hepática en modelos de ratones se atenúa la enfermedad, hay que seguir investigando para poder aplicar esta terapia a los humanos con ERC [108]. Los niveles de WISP-1 en sangre se relacionan con la fibrosis renal, y además nos permite diferenciar la gravedad de esta [109], mientras que los niveles de WISP-1 en orina son indetectables tanto en sujetos sanos como en pacientes con ERC [109].

C1M Y C3M

La presencia de un continuo remodelado de la MEC durante la fibrosis hace posible que los componentes que se degradan por la acción de las MMP pasen a la orina y a la sangre y puedan ser cuantificados [110]. En la etapa temprana de la fibrosis hay una gran actividad de producción y de degradación de los componentes de la MEC, conforme progresa la fibrosis la producción adquiere más importancia mientras que la degradación se debilita. Gracias a esto se acumulan gran cantidad de componentes de la MEC entre los que destacan el colágeno tipo I y III [111].

Un estudio experimental examinó el valor diagnóstico de los productos de degradación del colágeno tipo I en orina (uC1M) y del colágeno tipo III en orina (uC3M) y plasma (pC3M) de la fibrosis renal en ratas inducida por proteinuria mediante la técnica ELISA. Se estudió la presencia de fibrosis con biopsia y los niveles de uC1M, uC3M y pC3M a las 6 y a las 12 semanas después de inducir la fibrosis. Los niveles de pC3M aumentaron a las 6 semanas para regresar a sus niveles basales a las 12 semanas. Mientras que los niveles de uC1M y uC3M aumentaron progresivamente conforme progresa la fibrosis [110]. UC1M y uC3M predicen la fibrosis y pueden usarse como biomarcadores tempranos (semana 6) y sensibles ya que en particular uC3M se puede medir antes de ser histológicamente detectable, antes incluso de que se pierda el equilibrio entre la producción y degradación de MEC, en una etapa prefibrótica, al menos en este modelo experimental, uC3M predice con más fuerza la fibrosis. Además, uC1M y uC3M son marcadores tardíos (semana 12) que reflejan la extensión de la fibrosis renal establecida [110]. Sin embargo, estudios en humanos afirman que conforme progresa la fibrosis disminuyen los niveles de uC3M [112]. Esto puede

explicarse con el hecho de que conforme progresa la enfermedad el colágeno sufre modificaciones como la reticulación, lo que hace que las MMP no los puedan reconocer ni degradar [113]. Lisil oxidasa es la enzima responsable de estos cambios sobre el colágeno, y durante la fibrosis aumenta su concentración, esto se ha demostrado en humanos [114]. Este estudio tiene limitaciones, por ejemplo, los productos de degradación del colágeno podrían aumentar por un aumento del filtrado glomerular en vez de por un aumento en el recambio de colágeno de tipo I y III, por eso es necesario seguir investigando [110].

MICRO-RNA

Otro posible futuro biomarcador son los microARN, pequeños ARN no codificantes, que actúan como moduladores intracelulares de la expresión genética [115]. Su concentración en sangre y orina es estable y además están protegidos contra la degradación en sangre, lo que favorece su uso como biomarcadores no invasivos de la fibrosis renal [116]. Un solo miRNA modula la expresión de varios genes, pudiendo regular así muchas de las vías de la fibrosis renal [117].

Trabajos recientes sobre cardiología y oncología han demostrado que además de liberarse cuando las células se mueren y ser biomarcadores de enfermedad, también se secretan activamente y transportan información genética de una célula a otra, modificando la transcripción génica de las células receptoras [118,119]. Esta función todavía no se ha demostrado en el riñón. Simplemente sabemos que los niveles circulantes de miRNA se relacionan con daño renal. La cuestión es si los miRNAs circulantes son simplemente biomarcadores, o pueden considerarse como factores de progresión de la enfermedad en los riñones [120]. Aunque no se conoce la función exacta de los microRNA en la patogenia de la IFTA, sabemos que los microRNA desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis renal ya que un estudio sobre ratones demostró que los ratones con déficit de enzimas imprescindibles para el anabolismo de microRNA maduros, sufrían alteraciones glomerulares y tubulares, con proteinuria y fallecían por insuficiencia renal [121]. Además, varios estudios demuestran la correlación entre los microRNA circulantes y marcadores clínico-patológicos de daño renal [121, 122, 123]. Varios estudios tanto en animales como en humanos han investigado la relación entre los microRNA y la fibrosis renal con escasos resultados [124,125, 126].

Debido a la falta de estudios que demostrarán qué microRNAs pueden ser futuros biomarcadores de ERC, un grupo de investigación llevó a cabo un meta-análisis donde se incluyeron 20 estudios. Concluyeron que algunos microRNA están regulados al alza

y otros a la baja en la fibrosis renal. Al alza: miR-142-3p, miR-223-3p, miR-21-5p, miR-142-5p y miR-214-3p y a la baja: miR-29c-3p y miR-200a-3p [127].

10.2. TÉCNICAS DE IMAGEN

RESONANCIA MAGNÉTICA PONDERADA POR DIFUSIÓN (DWI, del inglés Diffusion-weighted Magnetic Resonance Imaging)

DWI es un método no invasivo sensible al movimiento de agua local en el tejido [128]. En los riñones fibróticos tanto la deposición y acumulación de la MEC como la atrofia tubular, dificultan la difusión de las moléculas de agua. La DWI al ser capaz de cuantificar este movimiento de las moléculas de agua es útil para detectar alteraciones en el intersticio renal, como la fibrosis intersticial cortical tan característica de la ERC y así diferenciar entre un riñón enfermo con ERC y otro sano en humanos [129]. Además, se correlaciona con la función renal [130,131]. Las limitaciones para su uso en la práctica clínica radican en la resolución de la imagen, la variabilidad de protocolo y la variabilidad interindividual. La mejora en la resolución de la imagen permitiría separar de una manera más exacta la corteza de la médula renal, disminuyendo la variabilidad interindividual [132,133]. En consecuencia, hoy en día no hay un corte claro que separe al riñón enfermo del sano.

ELASTOGRAFÍA POR ULTRASONIDOS (UE, del inglés, Ultrasound Elastography)

Al igual que la resonancia, la UE se utiliza para detectar la fibrosis renal mediante la evaluación de la rigidez del tejido. En la IFTA se han utilizado dos variantes de esta técnica: la elastografía de tensión (SE, del inglés *strain elastography*) y la elastografía de ondas de corte (SWE, del inglés, *shear wave elastography*) [134].

SE cuantifica el desplazamiento del tejido causado por una compresión externa, al ser imprescindible realizar una compresión externa se reserva solo para los casos de aloinjertos renales, ya que estos se encuentran más cerca de la superficie corporal [134]. Un estudio demostró la existencia de una correlación inversa entre la elasticidad derivada de SE y el grado de fibrosis en pacientes con aloinjertos renales [135].

SWE evalúa la elasticidad del tejido midiendo la velocidad de las ondas de corte (SWV, del inglés *shear wave velocity*) generadas por ultrasonido para calcular la rigidez del tejido. A diferencia de la SE, SWE no requiere compresión externa y, por lo tanto, puede usarse tanto en aloinjertos como en riñones nativos [134]. Varios estudios verifican una disminución del SWV asociada a la insuficiencia renal en pacientes con ERC [136, 137, 138]. Un estudio también demostró una buena correlación entre el

SWV medido por SWE y la fibrosis renal [137]. Sin embargo, otro estudio demostró que la rigidez estimada por SWE no predijo el estadio de la ERC ni se correlacionó con la fibrosis renal [139]. Posiblemente, estas discrepancias son la consecuencia de diferentes grados de fibrosis renal o de la hemodinámica renal.

La rigidez renal no sólo se altera por la existencia de IFTA, si no que otros factores como la perfusión renal también intervienen en las variaciones de la rigidez renal [140]. La evidencia acumulada muestra que la rigidez renal medida por SWE se reduce significativamente por una reducción en la perfusión renal, que puede enmascarar la presencia de fibrosis renal [141, 142]. El efecto de la perfusión renal es más pronunciado en la corteza renal que en la médula, ya que el 90% del flujo sanguíneo renal va a la corteza [143]. Esto puede explicar la observación de otro estudio que defiende que esa rigidez renal no reflejaba la fibrosis cortical, sino que estaba moderadamente asociada con la fibrosis medular [144]. Posiblemente, la rigidez renal medida por la SWE puede ser más útil en una etapa tardía, cuando hay fibrosis severa [145].

10.3. COMBINACIÓN DE MARCADORES DE IMAGEN Y LABORATORIO

La fibrosis renal es un proceso complejo y dinámico que involucra a una gran variedad de células y moléculas interaccionadas entre sí por lo que una combinación de diferentes enfoques puede ser mejor que una prueba aislada individual. Un estudio investigó la combinación de dos pruebas no invasivas: ecografía con contraste (CEUS) y biomarcadores de laboratorio con respecto a la biopsia, para la evaluación del grado de lesión de la fibrosis renal. Demostraron la mayor sensibilidad y especificidad de esta combinación con respecto a pruebas individuales no invasivas hasta el momento conocidas [146].

Durante la fibrosis renal se reduce la cantidad de capilares peritubulares [147], la ecografía con contraste es una prueba de imagen no invasiva capaz de evaluar cuantitativamente la perfusión microvascular de órganos parenquimatosos como el riñón [148, 149], valorando así la gravedad de la lesión tubulointersticial [146]. En el estudio utilizaron como contraste “SonoVue”, un contraste no nefrotóxico que permite su uso en pacientes con ERC. Se usaron marcadores como: RBP, β 2-MG y NAG [150]. RBP, al igual β 2-MG, también es una proteína de bajo peso molecular (25,000 Daltons), en comparación con los 69,000 Daltons de la albúmina. En condiciones normales, estas proteínas se filtran y se reabsorben casi por completo en el túbulo

proximal. En la IFTA se altera su reabsorción, apareciendo niveles elevados en orina [151]. Tanto $\beta 2$ -microglobulina urinaria como RBP fueron más altos en los pacientes con mayor grado de fibrosis, pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para NAG [146].

La combinación de CEUS con biomarcadores de laboratorio puede usarse potencialmente como indicador para evaluar la gravedad de la lesión tubulointersticial y como marcadores en el seguimiento de la progresión de la lesión tubulointersticial en la ERC. Esta asociación de técnicas de imagen juntos con parámetros del laboratorio, se presenta como un potencial sustituto de las biopsias renales [146].

11. TRATAMIENTO

Hoy en día no hay ningún tratamiento específico dirigido a la fibrosis. Comprender las vías que conducen a IFTA es esencial para poder desarrollar nuevas opciones terapéuticas para la ERC, teniendo en cuenta la gran variedad de moléculas y células involucradas y el papel de éstas tanto en la respuesta reparadora como en la respuesta fibrótica, no solo a nivel renal, sino en todo el organismo. La primera estrategia terapéutica eficaz para la fibrosis renal fue el bloqueo del SRAA con IECAS (inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina) y ARAlI (antagonistas de los receptores de angiotensina II), independientemente de su acción sistémica sobre la presión arterial. Esta estrategia se descubrió hace años, y hasta la fecha no hay nuevas dianas terapéuticas que sean seguras y eficientes [152].

El TGF β es el mediador más importante en la patogenia de la fibrosis, por lo que su bloqueo ha sido estudiado como posible opción terapéutica en múltiples estudios experimentales de fibrosis renal en animales [153]. Un ensayo clínico en fase I y II estudió el valor de fresolimumab, un anticuerpo monoclonal que bloquea el TGF β como tratamiento de la IFTA en pacientes con glomeruloesclerosis focal y segmentaria resistente a esteroides. Se seleccionó esta enfermedad por la escasez de tratamiento que tiene y su mal pronóstico. La TFG se estabilizó y no empeoró con respecto al grupo placebo, pero la proteinuria no se vió beneficiada. No se pudo confirmar el papel de este tratamiento en la IFTA [13,154]. La pirfenidona también es un antagonista del TGF β [155,156] con buena eficiencia en modelos animales [153]. Un ensayo clínico en fase II en pacientes con nefropatía diabética obtuvo conclusiones contradictorias: con dosis bajas de pirfenidona, mejoró la TFG, mientras que, con dosis más elevadas, la TFG fue similar al grupo placebo [156]. A pesar de los grandes esfuerzos invertidos en el esclarecimiento del papel del TGF β durante años, los resultados de los ensayos

clínicos son desalentadores. Esto puede ser debido o bien a un ineficiente bloqueo local, a un incremento de la inflamación renal o a un descenso en la protección tubular a través de la vía Wnt/B-catenina. Estas incoherencias han sido demostradas en modelos animales [157,158].

12. CONCLUSIONES

- La IFTA es un proceso complejo y dinámico en el que intervienen múltiples células, su comprensión ha evolucionado mucho en la última década, pero hoy en día todavía no está completamente caracterizada.
- Comprender las vías celulares y moleculares que conducen a IFTA es un reto para muchos grupos de investigación desde hace tiempo, para descubrir nuevos biomarcadores no invasivos que nos proporcionen un diagnóstico precoz, así como nuevas dianas terapéuticas.
- En la ERC los biomarcadores con más potencial son: TGFB, MCP-1, RBP, MMP-2, PAI-1, PIIINP, NAG, B2-MG, HE4, BCL-3, KLOTHO, WISP-1 C1M Y C3M Y MICRO-RNA.
- La combinación de pruebas de imagen como DWI, UE o CEUS junto con marcadores de laboratorio, puede sustituir a la biopsia como prueba diagnóstica en un futuro próximo.
- Varios estudios experimentales han intentado demostrar la eficacia de bloquear el TGFβ en la fibrosis renal tanto en animales como en humanos, sin resultados satisfactorios.

13. BIBLIOGRAFÍA

[1]. Mills KT, Xu Y, Zhang W, et al. A systematic analysis of worldwide population-based data on the global burden of chronic kidney disease in 2010. *KidneyInt*2015; 88:950.

[2]. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J KidneyDis*. 2002;39 (2 Suppl 1):S1-266.

[3]. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney inter., Suppl*. 2013;3:1–150.

[4]. Eddy AA. Overview of the cellular and molecular basis of kidney fibrosis. *Kidney Int Suppl*. 2014/10/31. 2014 Nov;4(1):2–8.

[5]. Engelgau MM, El-Saharty S, Kudesia P, et al. Regional aging and disease burden. In: Capitalizing on the demographic transition: tackling noncommunicable diseases in South Asia. Washington, DC: World Bank. 2011:15–40.

[6]. Ayodele OE, Alebiosu CO. Burden of chronic kidney disease: an international perspective. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2010;17:215–24.

[7]. Levey AS, Atkins R, Coresh J, et al. Chronic kidney disease as a global public health problem: approaches and initiatives - a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes. *Kidney Int* 2007; 72:247.

[8]. Bjornstad P, Cherney D, Maahs DM. Early Diabetic Nephropathy in Type 1 Diabetes - New Insights. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2014;21(4):279–86.

[9]. Colvin RB, Chang A, Farris AB, et al. Diagnostic Pathology: Kidney Diseases. Salt Lake City, UT: Amirsys; 2011.

[10]. Liu Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *KidneyInt*. 2006;69:213–217.

[11]. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*. 2008;214:199–210.

[12]. Bottinger EP. TGF-beta in renal injury and disease. *Semin Nephrol*. 2007;27:309–320.

- [13]. B.M. Klinkhammer, R. Goldschmeding, J. Floege, P. Boor, Treatment of Renal Fibrosis-Turning Challenges into Opportunities, *Adv. ChronicKidneyDis.* 24 (2017) 117–129.
- [14]. Liu Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *NatRevNephrol.* 2011 Oct;7(12):684–96.
- [15]. Yu F, Wu LH, Tan Y, et al. Tubulointerstitial lesions of patients with lupus nephritis classified by the 2003 International Society of Nephrology and Renal Pathology Society system. *Kidney Int.* 2010;77:820–829.
- [16]. Eddy AA, Neilson EG. Chronic kidney disease progression. *J Am SocNephrol.* 2006;17:2964–2966.
- [17]. Ricardo SD, van Goor H, Eddy AA. Macrophage diversity in renal injury and repair. *J Clin Invest.* 2008;118:3522–3530.
- [18]. Grande MT, Lopez-Novoa JM. Fibroblast activation and myofibroblast generation in obstructive nephropathy. *NatRevNephrol.* 2009;5:319–328.
- [19]. Kaissling B, Le Hir M. The renal cortical interstitium: morphological and functional aspects. *Histochemistry and cellbiology.* 2008;130:247–262.
- [20]. Hinz B. The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell. *J Biomech.* 2010;43:146–155.
- [21]. Lebleu VS, Taduri G, O'Connell J, et al. Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nat Med.* 2013;19:1047–1053.
- [22]. Eddy AA. The origin of scar-forming kidney myofibroblasts. *Nat Med.* 2013;19:964–966.
- [23]. Pilling D, Fan T, Huang D, Kaul B, Gomer RH. Identification of markers that distinguish monocyte-derived fibrocytes from monocytes, macrophages, and fibroblasts. *PLoS ONE.* 2009;4:e7475.
- [24]. Venkatachalam MA, et al. Acute kidney injury: a springboard for progression in chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010;298:F1078–F1094.
- [25]. Kelly KJ, Burford JL, Dominguez JH. Postischemic inflammatory syndrome: a critical mechanism of progression in diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009;297:F923–F931.

- [26]. Zeisberg EM, Potenta SE, Sugimoto H, Zeisberg M, Kalluri R. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19:2282–2287.
- [27]. Yamaguchi I, Tchao BN, Burger ML, et al. Vascular endothelial cadherin modulates renal interstitial fibrosis. *Nephron Exp Nephrol*. 2012;120:e20–e31.
- [28]. Sorensen I, Susnik N, Inhester T, et al. El fibrinógeno, que actúa como mitógeno para los fibroblastos tubulointersticiales, promueve la fibrosis renal. *Riñon Int*. 2011; 80 : 1035-1044.
- [29]. Long DA, Norman JT, Fine LG. Restoring the renal microvasculature to treat chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2012;8:244–250.
- [30]. Sakamoto I, Ito Y, Mizuno M, et al. Lymphatic vessels develop during tubulointerstitial fibrosis. *Kidney international*. 2009;75:828–838.
- [31]. Li L, Zepeda-Orozco D, Black R, et al. Autophagy is a component of epithelial cell fate in obstructive uropathy. *Am J Pathol*. 2010;176:1767–1778.
- [32]. Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15:1–12. 118.
- [33]. Farris AB, Colvin RB. Renal interstitial fibrosis: mechanisms and evaluation. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2012 May;21(3):289–300.
- [34]. López-Novoa JM, Nieto MA. Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression. *EMBO Mol Med*. 2009;1:303–314.
- [35]. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009;139:871–890.
- [36]. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009;119:1420–1428.
- [37]. Sleeman JP, Thiery JP. SnapShot: the epithelial-mesenchymal transition. *Cell*. 2011;145:162.e1.
- [38]. Christensen EI, Birn H, Storm T, et al. Endocytic receptors in the renal proximal tubule. *Physiology (Bethesda)* 2012;27:223–236.

- [39]. Li Y, Yang J, Dai C, Wu C, Liu Y. Role for integrin-linked kinase in mediating tubular epithelial to mesenchymal transition and renal interstitial fibrogenesis. *J Clin Invest*. 2003;112:503–516.
- [40]. He W, et al. Wnt/ β -catenin signaling promotes renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20:765–776.
- [41]. Sharma S, Sirin Y, Susztak K. The story of Notch and chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2011;20:56–61.
- [42]. Higgins DF, et al. Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2007;117:3810–3820.
- [43]. Eddy AA. Progression in chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2005;12:353–365.
- [44]. Yang J, et al. Disruption of tissue-type plasminogen activator gene in mice reduces renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *J Clin Invest*. 2002;110:1525–1538.
- [45]. Edgton KL, Gow RM, Kelly DJ, et al. Plasmin is not protective in experimental renal interstitial fibrosis. *Kidney international*. 2004;66:68–76.
- [46]. Zeisberg M, et al. Stage-specific action of matrix metalloproteinases influences progressive hereditary kidney disease. *PLoS Med*. 2006;3:e100.
- [47]. Bradshaw AD. The role of SPARC in extracellular matrix assembly. *J Cell Commun Signal*. 2009;3:239–246.
- [48]. Mimura I, Nangaku M. The suffocating kidney: tubulointerstitial hypoxia in end-stage renal disease. *Nat Rev Nephrol*. 2010;6:667–678.
- [49]. Fine LG, Norman JT. Chronic hypoxia as a mechanism of progression of chronic kidney diseases: from hypothesis to novel therapeutics. *Kidney Int*. 2008;74:867–872.
- [50]. D'Agati V, Schmidt AM. RAGE and the pathogenesis of chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2010;6:352–360.
- [51]. Negre-Salvayre A, Coatrieux C, Ingueneau C, Salvayre R. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *Br J Pharmacol*. 2008;153:6–20.

- [52]. Zhou LL, et al. Accumulation of advanced oxidation protein products induces podocyte apoptosis and deletion through NADPH-dependent mechanisms. *Kidney Int.* 2009;76:1148–1160.
- [53]. Shanmugam N, et al. Proinflammatory effects of advanced lipoxidation end products in monocytes. *Diabetes.* 2008;57:879–888.
- [54]. Huang XR, Chung AC, Wang XJ, et al. Mice overexpressing latent TGF- β 1 are protected against renal fibrosis in obstructive kidney disease. *American journal of physiology Renal physiology.* 2008;295:F118–127.
- [55]. Margadant C, Sonnenberg A. Integrin-TGF- β crosstalk in fibrosis, cancer and wound healing. *EMBO Rep.* 2010;11:97–105.
- [56]. Han SY, et al. High glucose and angiotensin II increase β 1 integrin and integrin-linked kinase synthesis in cultured mouse podocytes. *Cell Tissue Res.* 2006;323:321–332.
- [57]. Yang F, et al. Essential role for Smad3 in angiotensin II-induced tubular epithelial-mesenchymal transition. *J Pathol.* 2010;221:390–401.
- [58]. Wu C. PINCH, N(i)ck and the ILK: network wiring at cell-matrix adhesions. *Trends Cell Biol.* 2005;15:460–466.
- [59]. Li Y, Dai C, Wu C, Liu Y. PINCH-1 promotes tubular epithelial-to-mesenchymal transition by interacting with integrin-linked kinase. *J Am SocNephrol.* 2007;18:2534–2543.
- [60]. He J., Xu Y., Koya D., and Kanasaki K.: Role of the endothelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis of chronic kidney disease. *Clin ExpNephrol* 2013; 17: pp. 488-497
- [61]. Boutet A, et al. Snail activation disrupts tissue homeostasis and induces fibrosis in the adult kidney. *EMBO J.* 2006;25:5603–5613.
- [62]. Wu Y, et al. Stabilization of snail by NF- κ B is required for inflammation-induced cell migration and invasion. *Cancer Cell.* 2009;15:416–428.
- [63]. Boor P, Floege J. Chronic kidney disease growth factors in renal fibrosis. *Clin ExpPharmacolPhysiol.* 2011;38:391–400.

[64]. Lekushi K, Taniyama Y, Azuma J, et al. Hepatocyte growth factor attenuates renal fibrosis through TGF-beta1 suppression by apoptosis of myofibroblasts. *J Hypertens*. 2010;28:2454–2461.

[65]. Zeisberg M. Bone morphogenic protein-7 and the kidney: current concepts and open questions. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2006;21:568–573.

[66]. Madaio MP. Renal biopsy. *Kidney Int* 1990; 38:529.

[67]. McCune TR, Stone WJ, Breyer JA. Page kidney: case report and review of the literature. *Am J KidneyDis* 1991; 18:593.

[68]. Limwattana S, Rianthavorn P. Urinoma following Kidney Biopsy: A Case Report. *UrolInt* 2015; 95:246.

[69]. Parikh CR, Koyner JL. Biomarcadores en la enfermedad renal aguda y crónica. Brenner y Rector. *El riñón*. España: Elsevier; 2018. p. 926-955.

[70]. Mansour SG, Puthumana J, Coca SG, Gentry M, Parikh CR. Biomarkers for the detection of renal fibrosis and prediction of renal outcomes: a systematic review. *BMC Nephrol*

[71]. Honkanen E, Teppo AM, Tornroth T, Groop PH, Gronhagen-Riska C. Factor de crecimiento transformante urinario β 1 en la glomerulonefritis membranosa. *Nephrol Dial Transplant*. 1997; 12 : 2562–2568. doi: 10.1093 / ndt / 12.12.2562.

[72]. Susianti H, Handono K, Gunawan A, Mintaroem K, Purnomo BB, Kalim H. El factor de crecimiento transformante β 1 es mejor que la actina del músculo liso α para la predicción de la fibrosis renal en pacientes con lupus nefrítico. *Biomarcadoresgenómicos med*. 2015; 7 : 25–30. doi: 10.1016 / j.bgm.2014.08.010.

[73]. Titan SM, Vieira JM, Jr., Dominguez WV, Moreira SRS, Pereira AB, Barros RT, et al. MCP-1 y RBP urinarios: predictores independientes del resultado renal en la nefropatía diabética macroalbuminúrica. *Complicaciones de la diabetes*. 2012; 26 : 546–553.

[74]. Hsu TW, Kuo KL, Hung SC, Huang PH, Chen JW, Tarng DC. Progresión de la enfermedad renal en pacientes no diabéticos con enfermedad arterial coronaria: papel predictivo de la metaloproteinasa métrica circulante 2, 3 y 9. *Más uno*. 2013; 8 : e70132.

[75]. Chang HR, Yang SF, Lian JD, Lin CC, Wen MC, Chen YT, et al. Predicción del índice de daño crónico del aloinjerto de los aloinjertos renales usando el nivel sérico de inhibidor del activador del plasminógeno-1. Clin Transplant. 2009; 23 : 206–212.

[76]. Eddy AA. Plasminogen activator inhibitor-1 and the kidney. Am J Physiol Renal Physiol 2002; 283: F209.

[77]. Fogo AB. Renal fibrosis: not just PAI-1 in the sky. J Clin Invest 2003; 112: 326.

[78]. Lyons RM, Gentry LE, Purchio AF, and Moses HL. Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor beta 1 by plasmin. J Cell Biol 110: 1361–1367, 1990.

[79]. F. Genovese, P. Boor, M. Papasotiriou, D.J. Leeming, M.A. Karsdal, J. Floege, Turnover of type III collagen reflects disease severity and is associated with progression and microinflammation in patients with IgA nephropathy, Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc.- Eur. Ren. Assoc. 31 (2016) 472–479.

[80]. B.E. Ghouli, T. Squalli, A. Servais, C. Elie, V. Meas-Yedid, C. Trivint, J. Vanmassenhove, J.-P. Grünfeld, J.-C. Olivo-Marin, E. Thervet, L.-H. Noël, D. Prié, F. Fakhouri, Urinary procollagen III aminoterminalpropeptide (PIIINP): a fibrotest for the nephrologist, Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN. 5 (2010) 205–210.

[81]. Liangos O., et al: Urinary N-acetyl-beta-(D)-glucosaminidase activity and kidney injury molecule-1 level are associated with adverse outcomes in acute renal failure. J Am Soc Nephrol 2007; 18: pp. 904-912

[82]. Mise K, Hoshino J, Ueno T, Hazue R, Hasegawa J, Sekine A, et al. Prognostic Value of Tubulointerstitial Lesions, Urinary N-Acetyl-β-d-Glucosaminidase, and Urinary β2-Microglobulin in Patients with Type 2 Diabetes and Biopsy-Proven Diabetic Nephropathy. Clin J Am Soc Nephrol. 2016/01/22. 2016 Apr 7;11(4):593–601.

[83]. Kirchhoff C, Habben I, Ivell R, Krull N. A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular proteinase inhibitors. Biology of reproduction.

[84]. Hellstrom I, Raycraft J, Hayden-Ledbetter M, Ledbetter JA, Schummer M, McIntosh M, Drescher C, Urban N, Hellstrom KE. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. Cancer research. 2003;63:3695–3700.

- [85]. LeBleu VS, Teng Y, O'Connell JT, Charytan D, Muller GA, Muller CA, Sugimoto H, Kalluri R. Identification of human epididymis protein-4 as a fibroblast-derived mediator of fibrosis. *Nature medicine*. 2013;19:227–231.
- [86]. Nagy B, Jr, Krasznai ZT, Balla H, Csoban M, Antal-Szalmas P, Hernadi Z, Kappelmayer J. Elevated human epididymis protein 4 concentrations in chronic kidney disease. *Annals of clinical biochemistry*. 2012;49:377–380.
- [87]. Allison SJ. Fibrosis: HE4—a biomarker and target in renal fibrosis. *Nature reviews Nephrology*. 2013;9:124.
- [88]. Wan J, Wang Y, Cai G, Liang J, Yue C, Wang F, et al. Elevated serum concentrations of HE4 as a novel biomarker of disease severity and renal fibrosis in kidney disease. *Oncotarget* [Internet]. 2016 Aug 29;7(42):67748–59.
- [89]. Urban BC, Collard TJ, Eagle CJ, Southern SL, Greenhough A, Hamdollah-Zadeh M, Ghosh A, Poulsom R, Paraskeva C, Silver A, Williams AC. BCL-3 expression promotes colorectal tumorigenesis through activation of AKT signalling. *Gut*. 2016;65:1151–1164.
- [90]. Liu Z, Jiang Y, Hou Y, Hu Y, Cao X, Tao Y, Xu C, Liu S, Wang S, Wang L, Shi Y, Siebenlist U, Zhang X. The I κ B family member Bcl-3 stabilizes c-Myc in colorectal cancer. *Journal of molecular cell biology*. 2013;5:280–282.
- [91]. Ohno H, Takimoto G, McKeithan TW. The candidate proto-oncogene bcl-3 is related to genes implicated in cell lineage determination and cell cycle control. *Cell*. 1990;60:991–997.
- [92]. Chen R, Wang L, Liu S, Chen X, Hu Y, Liu H, et al. Bcl-3 is a novel biomarker of renal fibrosis in chronic kidney disease. *Oncotarget*. 2017 Oct 9;8(57):97206–16.
- [93]. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*. 1997;390(6655):45–51.
- [94]. Ohyama Y, Kurabayashi M, Masuda H, Nakamura T, Aihara Y, Kaname T, et al. Molecular cloning of rat klotho cDNA: markedly decreased expression of klotho by acute inflammatory stress. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;251(3):920–5.
- [95]. Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, et al. Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho. *J Biol Chem*. 2006;281(10):6120–3.

- [96]. Sugiura H, Yoshida T, Shiohira S, Kohei J, Mitobe M, Kurosu H, et al. Reduced Klotho expression level in kidney aggravates renal interstitial fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012;302(10):F1252–64.
- [97]. Hu MC, Shi M, Zhang J, Quinones H, Griffith C, Kuro-o M, et al. Klotho deficiency causes vascular calcification in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(1):124–36.
- [98]. Doi S, Zou Y, Togao O, Pastor JV, John GB, Wang L, et al. Klotho inhibits transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) signaling and suppresses renal fibrosis and cancer metastasis in mice. *J Biol Chem*. 2011;286(10):8655–65.
- [99]. Cho N-J, Han D-J, Lee J-H, Jang S-H, Kang JS, Gil H-W, et al. Soluble klotho as a marker of renal fibrosis and podocyte injuries in human kidneys. *PLoSOne*. 2018 Mar 28;13(3):e0194617–e0194617.
- [100]. Akimoto T, Yoshizawa H, Watanabe Y, Numata A, Yamazaki T, Takeshima E, et al. Characteristics of urinary and serum soluble Klotho protein in patients with different degrees of chronic kidney disease. *BMC Nephrol*. 2012;13:155
- [101]. Lee EY, Kim SS, Lee JS, Kim IJ, Song SH, Cha SK, et al. Soluble α -klotho as a novel biomarker in the early stage of nephropathy in patients with type 2 diabetes. *PLoS One*. 2014;9(8):e102984
- [102]. Zhou L, Mo H, Miao J, Zhou D, Tan RJ, Hou FF, et al. Klotho Ameliorates Kidney Injury and Fibrosis and Normalizes Blood Pressure by Targeting the Renin-Angiotensin System. *Am J Pathol*. 2015;185(12):3211–23.
- [103]. Yamamoto T, Nakagawa T, Suzuki H, Ohashi N, Fukasawa H, Fujigaki Y, et al. Urinary angiotensinogen as a marker of intrarenal angiotensin II activity associated with deterioration of renal function in patients with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(5):1558–65.
- [104]. Jian YC, Wang JJ, Dong S, Hu JW, Hu LJ, Yang GM, Zheng YX, Xiong WJ. Wnt-Induced Secreted Protein 1/CCN4 in Liver Fibrosis Both in vitro and in vivo. *Clin Lab*. 2014;60:29–35.
- [105]. Konigshoff M, Kramer M, Balsara N, Wilhelm J, Amarie OV, Jahn A, Rose F, Fink L, Seeger W, Schaefer L, Gunther A, Eickelberg O. WNT1-inducible signaling protein-1 mediates pulmonary fibrosis in mice and is upregulated in humans with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*. 2009;119:772–787.

[106]. Zhao XJ, Hua Y, Chen HM, Yang HY, Zhang T, Huang GQ, Fan HJ, Tan ZB, Huang XF, Liu B, Zhou YC. Aldehyde dehydrogenase-2 protects against myocardial infarction-related cardiac fibrosis through modulation of the Wnt/betacatenin signaling pathway. *Ther Clin RiskManag*. 2015;11:1371–1381.

[107]. Schlegelmilch K, Keller A, Zehe V, Hondke S, Schilling T, Jakob F, Klein-Hitpass L, Schutze N. WISP 1 is an important survival factor in human mesenchymal stromal cells.

[108]. Konigshoff M, Kramer M, Balsara N, Wilhelm J, Amarie OV, Jahn A, Rose F, Fink L, Seeger W, Schaefer L, Gunther A, Eickelberg O. WNT1-inducible signaling protein-1 mediates pulmonary fibrosis in mice and is upregulated in humans with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*. 2009;119:772–787.

[109]. Zhong X, Tu YJ, Li Y, Zhang P, Wang W, Chen SS, et al. Serum levels of WNT1-inducible signaling pathway protein-1 (WISP-1): a noninvasive biomarker of renal fibrosis in subjects with chronic kidney disease. *Am J Transl Res* [Internet]. 2017 Jun 15;9(6):2920–32.

[110]. Hijmans RS, Rasmussen DGK, Yazdani S, Navis G, van Goor H, Karsdal MA, et al. Urinary collagen degradation products as early markers of progressive renal fibrosis. *J Transl Med* [Internet]. 2017 Mar 20;15(1):63.

[111]. Costigan M, Chambers DA, Boot-Handford RP. Collagen turnover in renal disease. *ExpNephrol*. 1995;3:114–121.

[112]. Genovese F, Boor P, Papasotiriou M, Leeming DJ, Karsdal MA, Floege J. Turnover of type III collagen reflects disease severity and is associated with progression and microinflammation in patients with IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2016;31:472–479.

[113]. Van der Slot-Verhoeven AJ, van Dura EA, Attema J, Blauw B, DeGroot J, Huizinga TWJ, et al. The type of collagen cross-link determines the reversibility of experimental skin fibrosis. *BiochimBiophys Acta Mol Basis Dis*. 2005;1740:60–67.

[114]. Di Donato A, Ghiggeri GM, Di Duca M, Jivotenko E, Acinni R, Campolo J, et al. Lysyl oxidase expression and collagen cross-linking during chronic Adriamycin nephropathy. *Nephron*. 1997;76:192–200.

[115]. Hergenreider E, Heydt S, Tréguer K, Boettger T, Horrevoets AJ, Zeiher AM, Scheffer MP, Frangakis AS, Yin X, Mayr M, Braun T, Urbich C, Boon RA, Dimmeler S:

Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nat Cell Biol* 14: 249–256, 2012pmid:22327366

[116]. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M: Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *ProcNatlAcad Sci USA* 105: 10513–10518, 2008pmid:18663219

[117]. Liu Y, Taylor NE, Lu L, Usa K, Cowley AW Jr., Ferreri NR, Yeo NC, Liang M: Renal medullary microRNAs in Dahl salt-sensitive rats: miR-29b regulates several collagens and related genes. *Hypertension* 55: 974–982, 2010pmid:20194304

[118]. Zerneck A, Bidzhekov K, Noels H, Shagdarsuren E, Gan L, Denecke B, Hristov M, Köppel T, Jahantigh MN, Lutgens E, Wang S, Olson EN, Schober A, Weber C: Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *SciSignal* 2: ra81, 2009pmid:19996457

[119]. Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Grange C, Fonsato V, Tetta C: Exosome/microvesicle-mediated epigenetic reprogramming of cells. *Am J Cancer Res* 1: 98–110, 2011pmid:21969178

[120]. Lorenzen JM, Thum T. Circulating and Urinary microRNAs in Kidney Disease. *Clin J Am SocNephrol*. 2012 Sep 1;7(9):1528 LP-1533.

[121]. Ho, J., Ng, K.H., Rosen, S., Dostal, A., Gregory, R.I. &Kreidberg, J.A., 2008. Podocyte-specific loss of functional microRNAs leads to rapid glomerular and tubular injury. *Journal of the American Society of Nephrology*, 19, 2069-2075.

[122]. Cortez, M.A., Bueso-Ramos, C., Ferdin, J., Lopez-Berestein, G., Sood, A.K. Calin, G.A., 2011. MicroRNAs in body fluids—the mix of hormones and biomarkers. *Nature reviews Clinical oncology*, 8, 467- 477.

[123]. Cortez, M.A. & Calin, G.A., 2009. MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases. *Expert opinion on biological therapy*, 9, 703-711.

[124]. Zarjou, A., Yang, S., Abraham, E., Agarwal, A. & Liu, G., 2011. Identification of a microRNA signature in renal fibrosis: role of miR-21. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 301, F793-F801.

[125]. Rudnicki, M., Perco, P., Leierer, J., Heinzl, A., Mühlberger, I., Schweibert, N., Sunzenauer, J., Regele, H., Kronbichler, A. & Mestdag, P., 2016. Renal microRNA-and RNA-profiles in progressive chronic kidney disease. *European journal of clinical investigation*, 46, 213-226.

[126]. Muralidharan, J., Ramezani, A., Hubal, M., Knoblich, S., Shrivastav, S., Karandish, S., Scott, R., Maxwell, N., Ozturk, S. & Beddhu, S., 2017. Extracellular microRNA signature in chronic kidney disease. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 312, F982-F991.

[127]. Gholaminejad A, Abdul Tehrani H, GholamiFesharaki M. Identification of candidate microRNA biomarkers in renal fibrosis: a meta-analysis of profiling studies. *Biomarkers BiochemIndic Expo response, susceptibilitytoChem*. 2018 Dec;23(8):713–24.

[128]. Caroli A, Schneider M, Friedli I, Ljimini A, De Seigneux S, Boor P, et al. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging to assess diffuse renal pathology: a systematic review and statement paper. *Nephrol Dial Transplant*. 2018 Sep;33(suppl_2):ii29-ii40.

[129]. Liu Z, Xu Y, Zhang J. et al. Chronic kidney disease: pathological and functional assessment with diffusion tensor imaging at 3T MR. *EurRadiol* 2015; 25: 652–660

[130]. Ding J, Chen J, Jiang Z. et al. Assessment of renal dysfunction with diffusion-weighted imaging: comparing intra-voxel incoherent motion (IVIM) with a mono-exponential model. *Acta Radiol* 2016; 57: 507–512

[131]. Emre T, Kilickesmez O, Buker A. et al. Renal function and diffusion-weighted imaging: a new method to diagnose kidney failure before losing half function. *Radiol Med* 2016; 121: 163–172

[132]. Friedli I, Crowe LA, de Perrot T. et al. Comparison of readout-segmented and conventional single-shot for echo-planar diffusion-weighted imaging in the assessment of kidney interstitial fibrosis. *J MagnReson Imaging* 2017; 46: 1631–1640

[133]. Friedli I, Crowe LA, Viallon M. et al. Improvement of renal diffusion-weighted magnetic resonance imaging with readout-segmented echo-planar imaging at 3T. *MagnResonImaging* 2015; 33: 701–708

[134]. Jiang K, Ferguson CM, Lerman LO. *US CR. Transl Res* .2019.

- [135]. Gao J., Rubin J.M., Weitzel W., et al: Comparison of ultrasound corticomedullary strain with Doppler parameters in assessment of renal allograft interstitial fibrosis/tubular atrophy. *UltrasoundMedBiol* 2015; 41: pp. 2631-2639
- [136]. Guo L.H., Xu H.X., Fu H.J., Peng A., Zhang Y.F., and Liu L.N.: Acoustic radiation force impulse imaging for noninvasive evaluation of renal parenchyma elasticity: preliminary findings. *PLoSOne* 2013; 8: pp. e68925
- [137]. Hu Q., Wang XY, He HG, Wei HM, Kang LK y Qin GC: imágenes de impulso de fuerza de radiación acústica para la evaluación no invasiva de la histopatología renal en la enfermedad renal crónica. *PLoSOne* 2014; 9
- [138]. Bob F., Grosu I., Sporea I., et al: Elastografía de onda de corte basada en ultrasonido en la evaluación de pacientes con enfermedad renal diabética. *Ultrasonido MedBiol* 2017; 43: pp. 2159-2166
- [139]. Wang L., Xia P., Lv K., et al.: Evaluación de la elasticidad del tejido renal mediante la cuantificación del impulso de la fuerza de radiación acústica con correlación histopatológica: experiencia preliminar en la enfermedad renal crónica. *Eur Radiol* 2014; 24: pp. 1694-1699
- [140]. . Gennisson J.L., Grenier N., Combe C., and Tanter M.: Supersonic shear wave elastography of in vivo pig kidney: influence of blood pressure, urinary pressure and tissue anisotropy. *UltrasoundMedBiol* 2012; 38: pp. 1559-1567
- [141]. Asano K., Ogata A., Tanaka K., et al: Acoustic radiation force impulse elastography of the kidneys: is shear wave velocity affected by tissue fibrosis or renal blood flow? *J UltrasoundMed*. 2014; 33: pp. 793-801
- [142]. Wang H.K., Lai Y.C., Lin Y.H., Chiou H.J., and Chou Y.H.: Acoustic radiation force impulse imaging of the transplant kidney: correlation between cortical stiffness and arterial resistance in early post-transplant period. *TransplantProc* 2017; 49: pp. 1001-1004
- [143]. Wong P.C., Li Z., Guo J., and Zhang A.: Pathophysiology of contrast-induced nephropathy. *Int J Cardiol* 2012; 158: pp. 186-192
- [144]. Early H.M., Cheang E.C., Aguilera J.M., et al: Utility of shear wave elastography for assessing allograft fibrosis in renal transplant recipients: a pilot study. *J UltrasoundMed* 2018; 37: pp. 1455-1465

- [145]. Sommerer C., Scharf M., Seitz C., et al: Assessment of renal allograft fibrosis by transient elastography. *Transplant* 2013; 26: pp. 545-551
- [146]. Yang W-Q, Mou S, Xu L, Li F-H, Li H-L. Prediction of Tubulointerstitial Injury in Chronic Kidney Disease Using a Non-Invasive Model: Combination of Renal Sonography and Laboratory Biomarkers. *Ultrasound Med Biol*. 2018 May;44(5):941–8.
- [147]. Bohle A, Mackensen-Haen S, Wehrmann M. Significance of postglomerular capillaries in the pathogenesis of chronic renal failure. *KidneyBloodPress Res* 1996;19:191–195.
- [148]. Schneider AG, Hofmann L, Wuerzner G, Glatz N, Maillard M, Meuwly JY, Eggimann P, Burnier M, Vogt B. Renal perfusion evaluation with contrast-enhanced ultrasonography. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27:674–681.
- [149]. Dong Y, Wang WP, Cao J, Fan P, Lin X. Early assessment of chronic kidney dysfunction using contrast-enhanced ultrasound: A pilot study. *Br J Radiol* 2014;87:20140350.
- [150]. D'Amico G, Bazzi C. Urinary protein and enzyme excretion as markers of tubular damage. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003;12:639– 643.
- [151]. Carter JL, Tomson CR, Stevens PE, Lamb EJ. ¿La infección del tracto urinario causa proteinuria o microalbuminuria? Una revisión sistemática. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 3031.
- [152]. François H, Chatziantoniou C. *NU SC. Matrix Biol*. 2017
- [153]. G. Vega, S. Alarcón, R. San Martín, The cellular and signalling alterations conducted by TGF- β contributing to renal fibrosis, *Cytokine*. 88 (2016) 115–125.
- [154]. Tumlin JA et al., A Phase 2, double-blind, Randomized study of fresolimumab or placebo in patients with steroid-resistant primary focal segmental glomerulosclerosis. *ASN Kidney Week*; 2015; San Diego, CA. *J Am Soc Nephrol*. 2015, (n.d.).
- [155]. M.E. Cho, D.C. Smith, M.H. Branton, S.R. Penzak, J.B. Kopp, Pirfenidone slows renal function decline in patients with focal segmental glomerulosclerosis, *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN*. 2 (2007) 906–913.
- [156]. M.E. Cho, J.B. Kopp, Pirfenidone: an anti-fibrotic therapy for progressive kidney disease, *Expert Opin. Investig. Drugs*. 19 (2010) 275–283.

[157]. S. Nlandu-Khodo, S. Neelisetty, M. Phillips, M. Manolopoulou, G. Bhave, L. May, P.E. Clark, H. Yang, A.B. Fogo, R.C. Harris, M.M. Taketo, E. Lee, L.S. Gewin, Blocking TGF- β and β -Catenin Epithelial Crosstalk Exacerbates CKD, J. Am. Soc. Nephrol. JASN. (2017).

[158]. R. Rodriguez-Díez, S. Rayego-Mateos, M. Orejudo, L.S. Aroeira, R. Selgas, A. Ortiz, J. Egido, M. Ruiz-Ortega, TGF-Beta Blockade Increases Renal Inflammation Caused by the C-Terminal Module of the CCN2, Mediators Inflamm. 2015 (2015) 506041.