

Tesis Doctoral

PEPT2, una diana accionable en la nefrotoxicidad por colistina

Raúl Fernández-Prado

Programa de Doctorado en Medicina y Cirugía

Dirección:

Dr. Alberto Ortiz Arduán

Dra. María Dolores Sánchez Niño

Madrid, 2025

Agradecimientos

En primera instancia quiero agradecer a mis dos directores de tesis, el **Dr. Alberto Ortiz** y la **Dra. María Dolores Sánchez Niño**. Gracias a la increíble sinergia que hay entre los dos, vuestra capacidad de realizar medicina traslacional y vuestra increíble ayuda y consejos, he podido realizar esta tesis. El empeño y las horas de dedicación que aplicáis a vuestras ideas es inspiradora. El Dr. Alberto Ortiz es todo un referente en la Nefrología y verle trabajar y poder apoyarse en sus hombros es todo un honor. Y la Dra. Sánchez Niño siempre ha estado pendiente de mí para poder resolverme cualquier duda, por muy básica que fuese. De verdad, gracias.

Por otro lado, tengo que agradecer haberme formado en el **Servicio de Nefrología del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz**. Gracias al equipo con el que me he formado como residente y, después, trabajado como adjunto ha hecho que pueda ser el profesional que soy hoy en día. La capacidad de todos de mantenerse actualizados en sus respectivos campos y compartir el state-of-the-art para que todos podamos tener conocimiento de la nefrología actual es algo que no se encuentra fácilmente. Dentro del servicio, quiero dedicar unas palabras a personas que han supuesto un apoyo extra:

- **Dr. Emilio González Parra:** el adjunto que más nos ayudaba de residentes, buscándonos siempre financiación para un curso, encargado de que hiciésemos sesiones para aprender, superarnos y poder marcar una diferencia. Has sido exigente con todos nosotros y eso ha hecho que nosotros lo seamos con los nuevos residentes.
- **Dra. Beatriz Fernández y Dra. Carolina Gracia:** dos pilares de apoyo durante la residencia y estupendas compañeras de trabajo. Poder comentar casos, discutir sobre pacientes o poder reírnos en cualquier comida es un lujo.
- **Dra. Vanessa Pérez Gómez:** la adjunta más senior. Durante los momentos más duros de mi residencia siempre me apoyaste. Confiaste en mi potencial y lo espoleaste. Me ayudaste a centrarme en mis momentos de caos y a maximizar la eficiencia. De ti he aprendido mucho sobre tu capacidad de organización. Además, eres una de mis mejores amigas y compartir un vino contigo siempre es un placer. Te estaré siempre agradecido por todo lo que has hecho por mí.
- **Dra. Lara Valiño:** con tu paciencia te has sentado a mi lado para explicarme todas mis lagunas de básica y gracias a ello, he podido comprender todo la magia que hacéis en el laboratorio.
- A mí equipo de “residentes pequeños”: **Alejandro Avello, Sol Carriazo, Elena Gomá y Marina González**. Que nos hayamos podido quedar todos juntos en el servicio ha hecho que traigamos sangre fresca y un ambiente espectacular para los próximos residentes.

- A mis residentes: **Michelle, Jorge, Deborah, Lucía, Pepe, Daria y Cristina**. Vaya hornada tenemos más entretenida. Poder formarlos y, además, tutorizarlos a algunos de vosotros es una experiencia de lo más interesante. Siempre ayudáis a vuestros adjuntos cuando lo necesitan y no todo el mundo tiene esa buena actitud.

A mi familia: a mis padres, que siempre me brindaron lo mejor para que yo pudiese salir adelante con los estudios. Manejaron todo mi estrés durante la carrera e intentaron que lo llevase lo mejor posible. Vuestro apoyo es incondicional y gracias a él he podido llegar hasta donde estoy ahora. A mi abuela María, a quien siempre intento llenar de alegrías, como con los dos nuevos bisnietos. Durante mi infancia pasábamos mucho tiempo juntos y no fue hasta que empecé la universidad que ya no podíamos comer juntos todos los días. A mi tía Chari, que siempre ha creído en mí. A mis abuelos Benjamín, Ramona y Antonio y a mis tíos Manolo y Auxi, que, aunque no puedan estar aquí ahora mismo para ser testigos de este logro, sé que el orgullo que sentirían es enorme. A mi mujer, **Malu**, nadie ha sabido llevarme tan bien como tú, manejando las crisis, apoyándome cuando más lo necesitaba y riéndote de todas mis tonterías. Desde el comienzo de nuestra relación todo fue un antes y un después. Y tras 4 años nacieron nuestros preciosos bebés, **Martín y Candela** que nos llenan de alegría cada día. El amor con el que me llenáis los tres no se puede describir.

Resumen

La Enfermedad Renal Crónica (ERC) es la causa de muerte no transmisible que más aumentó su incidencia entre 1990 y 2013, estimándose que en 2019 afectaba a 850 millones de personas, con previsión de convertirse en la primera causa de muerte en 2100. Su diagnóstico implica mayor riesgo de Fracaso Renal Agudo (FRA) y de muerte. Además, el desarrollo de FRA de cualquier causa aumenta el riesgo de desarrollar ERC. Aunque las causas más comunes de ERC son la diabetes e hipertensión, existen regiones donde la causa es desconocida, como en la Nefropatía Mesoamericana y de Sri-Lanka donde se hipotetiza sobre causas ambientales. Gracias a la Medicina de Sistemas, a través de estudios de asociación genética o GWAS, identificamos SLC15A2, y su producto PEPT2, como una diana accionable en enfermedad renal al ser un transportador apical en células del túbulo proximal. Este transportador presenta dos variantes genéticas con relevancia clínica, PEPT2*1 de alta afinidad por sustrato, que generaría mayor citotoxicidad en presencia de nefrotóxicos, y PEPT2*2, de baja afinidad. Identificamos dos problemas clínicos relacionados con dos sustratos nefrotóxicos de PEPT2: FRA por el antibiótico polipeptídico colistina y FRA por ácido delta-aminolevulínico (ALA), metabolito que se acumula en la porfiria aguda intermitente (PAI). Una tercera hipótesis era su asociación con la ERC de causa desconocida, dada la asociación familiar que presentan ambas enfermedades y la alta prevalencia de la variante PEPT2*1 en las regiones de Mesoamérica y Sri-Lanka. El acúmulo de ALA en la PAI genera daño renal mediado por especies reactivas de oxígeno y daño mitocondrial, contribuyendo al desarrollo de nefropatía crónica asociada a porfiria. El uso de colistina, un antibiótico de uso crítico frente a bacterias multirresistentes, está limitado por su nefrotoxicidad. Su mecanismo implica daño tubular proximal mediado por estrés mitocondrial y acumulación intracelular. A pesar de ser indispensable en infecciones graves, la falta de estrategias protectoras efectivas agrava su impacto renal. En este trabajo se abordaron ambos problemas mediante la realización de modelos murinos in vivo y modelos in vitro con células murinas y humanas para la nefrotoxicidad por colistina y un modelo in vitro con células murinas para la nefrotoxicidad por ALA, usando cefadroxilo como inhibidor competitivo del transporte de ambos sustratos. Con relación a los resultados, el cefadroxilo previno la citotoxicidad, la respuesta proinflamatoria y profibrótica inducida por colistina en los modelos in vitro e in vivo. Sin embargo, no se objetivó citotoxicidad in vitro en los modelos con ALA. Por tanto, el transportador PEPT2 surge como una potencial diana terapéutica para mitigar el daño renal inducido por toxinas y fármacos. Este estudio resalta la necesidad de un enfoque

interdisciplinario para comprender las interacciones entre factores genéticos, ambientales y terapéuticos en el daño renal. Los hallazgos subrayan la relevancia de avanzar en la medicina de precisión para prevenir y tratar patologías renales complejas.

Palabras clave: Enfermedad renal crónica, fracaso renal agudo, colistina, nefrotoxicidad, GWAS.

Abstract

Chronic Kidney Disease (CKD) is a non-communicable disease that increases the risk of Acute Kidney Injury (AKI) and mortality. Its incidence most increased between 1990 and 2013. In 2019, 850 million people had CKD, expecting to become the leading cause of death by 2100. In addition, the development of AKI increases the risk of developing CKD. Although the most common causes of CKD are diabetes and hypertension, there are regions where the cause is unknown, such as in Mesoamerican and Sri-Lanka Nephropathies where environmental causes are hypothesized. Through Systems Medicine approaches and genome-wide association studies (GWAS), we identified *SLC15A2* and its product, PEPT2, as actionable targets in kidney disease. PEPT2 is a transporter in proximal tubular cells with two clinically relevant genetic variants: PEPT2*1, characterized by high substrate affinity that may exacerbate cytotoxicity in the presence of nephrotoxins, and PEPT2*2, associated with lower substrate affinity. Two clinical problems were found associated to PEPT2 substrates: AKI caused by the polypeptide antibiotic colistin and AKI due to delta-aminolaevulinic acid (ALA), a metabolite accumulated in acute intermittent porphyria (AIP). A third hypothesis was its association with CKD of unknown cause, given the familial association of both diseases and the high prevalence of the PEPT2*1 variant in the Mesoamerican and Sri-Lanka regions. The accumulation of ALA in IAP leads to renal damage contributing to the development of chronic porphyria-associated nephropathy. The use of colistin against multidrug-resistant bacteria is limited by its nephrotoxicity, involving proximal tubular injury due to intracellular accumulation. Despite being indispensable in severe infections, the lack of effective protective strategies exacerbates its renal impact. Both problems were addressed using in vivo murine models and in vitro murine and human cell models for colistin nephrotoxicity, and in vitro murine cell models for ALA-induced nephrotoxicity. Competitive inhibition of PEPT2 transport was evaluated using cefadroxil. Regarding the results, cefadroxil prevented cytotoxicity, proinflammatory and profibrotic response induced by colistin in the in vitro and in vivo models. However, no in vitro cytotoxicity was observed in the ALA models. Thus, PEPT2 emerges as a potential actionable target to decrease renal damage caused by toxins and drugs. This research highlights the interplay between genetic, environmental, and therapeutic factors in renal injury. The findings underscore the importance of advancing precision medicine to prevent and treat complex renal pathologies.

Keywords: Chronic kidney disease, acute kidney injury, colistin, nephrotoxicity, GWAS.

Abreviaturas

Abreviatura	Significado
7-AAD	7-amino-actinomicina
ABC	ATP-binding cassette
ALA	Ácido delta aminolevulínico
ALAS1	ALA sintetasa
Asn	Asparagina
CBA	Actividad de colistina base
CINAC	Chronic Interstitial Nephritis in Agricultural Communities o Nefritis intersticial crónica en comunidades agrícolas
CMS	Colistimetato de sodio
Col1a2	Colágeno 1a2
DT	Desviación típica
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ERC	Enfermedad renal crónica
ERCd	Enfermedad renal crónica de causa desconocida
ERCT	Enfermedad renal crónica terminal
FC	Fold-Change
FDR	False Discovery rate (valor ajustado de p)
FGe	Filtrado glomerular estimado
Fn1	Fibronectina 1
FRA	Fracaso renal agudo
GFP	Green fluorescent protein o proteína fluorescente verde
GWAS	Genome-wide association study o estudios de asociación por análisis genómico
HK2	Células de túbulo proximal humano
IL-6	Interleuquina 6
IL-8	Interleuquina 8
IP	Intraperitoneal
IQR	Rango intercuartílico
IRI	Isquemia-reperfusión renal
KDIGO	Kidney Disease – Improving Global Outcomes
KIM1	Kidney injury molecule 1
KO	Knock-Out
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LPS	Lipopolisacárido
MATE	Multidrug and toxin extrusion proteins
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1 o proteína quimiotáctica de monocitos 1
MCT	Murine cortical tubule cells o células de túbulo proximal renal murino
mRNA	RNA mensajero
NGAL	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin o lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos
NTA	Necrosis tubular aguda
OAT	Transportador de aniones orgánicos
OATP	Polipéptido transportador de aniones orgánicos

OCT	Transportador de cationes orgánicos
PAKD	Porphyria-associated kidney disease o ERC asociada a porfiria
PBG	Porfobilinógeno
PCR	Polymerase chain reaction o reacción en cadena de la polimerasa
PGP	Prolina-glicil-prolina
POT	Transportador de oligopéptidos acoplado a protones
qPCR	PCR a tiempo real
RANTES	Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted o quimiocina de regulación por activación expresada y secretada por los linfocitos T
RT	Transcripción reversa
scRNA-seq	Secuenciación de RNA usando la célula completa (single cell; sc)
siRNA	Small interfering RNA o pequeño RNA de interferencia
SLC	Solute Carrier o Portador de soluto
SNP	Single-nucleotide polymorphism o polimorfismo de un nucleótido simple
snRNA-seq	Secuenciación de RNA usando el núcleo aislado (single nuclei; sn)
TRS	Terapia renal sustitutiva
UOO	Obstrucción ureteral unilateral
WT	Wild-Type

Tabla de contenido

Introducción	13
1. Las funciones de los riñones y de las células tubulares	14
2. Enfermedad renal crónica y fracaso renal agudo	15
3. Predisposición genética a la ERC.....	17
4. Puntos calientes de ERC o ERC hotspots.....	18
5. Nefropatía Mesoamericana.....	19
6. Nefropatía agrícola de Sri-Lanka.....	21
7. Porfiria aguda intermitente	27
7.1. Patogénesis del daño renal mediado por ALA.....	29
8. Colistina.....	33
8.1. Mecanismos de la nefrotoxicidad por colistina	37
9. PEPT2 (SLC15A2)	41
9.1. ¿Qué es PEPT2?	41
9.2. Estructura y función de PEPT2	41
9.3. Sustratos	47
9.4. Distribución tisular.....	50
9.5. Variantes génicas de PEPT2	51
9.6. Regulación.....	53
10. La Medicina de Sistemas como método para generar hipótesis validables experimentalmente.....	55
Hipótesis.....	56
Objetivos	58
Materiales y métodos.....	60
1. Búsqueda bibliográfica.....	63
2. Minería de datos	63
2.1. Acceso y búsqueda de datos en Nephroseq.....	64

2.2.	Acceso y búsqueda de datos en Kidney Interactive Transcriptomics.....	65
2.3.	Acceso y búsqueda de datos en GnomAD	67
3.	Estudios experimentales.....	69
3.1.	Estudios in vivo. Modelos animales.....	69
3.1.1.	Modelo de daño renal inducido por colistina en ratones in vivo.....	69
3.1.1.1.	Eutanasia y extracción de muestras.	69
3.2.	Estudios in vitro	70
3.2.1.	Líneas celulares	70
3.2.1.1.	Genotipado de las células HK2	71
3.2.2.	Estímulos	72
3.2.3.	Extracción de RNA	73
3.2.4.	Transcripción reversa y PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)	73
3.2.5.	Inmunohistoquímica	74
3.2.6.	Estudios de muerte celular y apoptosis	75
3.3.	Análisis estadístico.....	76
	Resultados.....	77
1.	Primera parte: búsqueda bibliográfica	78
2.	Minería de datos identifica a <i>SLC15A2</i> como un gen expresado por células tubulares proximales y diferencialmente expresado en múltiples nefropatías humanas y experimentales.....	82
2.1.	Expresión génica de <i>SLC15A2</i> en transcriptómica de riñón total en Nephroseq	82
2.2.	Localización de la expresión de <i>SLC15A2</i> en transcriptómica de células individuales en KIT.....	84
2.2.1.	Transcriptómica en riñones humanos.....	85
2.2.1.1.	Expresión de <i>SLC15A2</i> en riñones humanos diabéticos.....	87
2.2.1.2.	Expresión de <i>SLC15A2</i> en enfermedad renal poliquística autosómica dominante humana	89

2.2.2. Expresión de <i>Slc15a2</i> en transcriptómica de nefropatías murinas experimentales.....	91
3. Data mining colocaliza variantes humanas de alto riesgo de ERC a <i>SLC15A2</i> como prevalentes en zonas de alto riesgo de ERCd	97
3.1. Variantes génicas humanas de <i>SLC15A2</i> en GnomAD	97
4. Prueba de concepto: PEPT2 como diana terapéutica en el FRA experimental.....	100
4.1. Daño renal inducido por colistina en ratones.....	101
4.2. Daño celular inducido por colistina en células MCT in vitro.....	107
4.3. Daño celular inducido por colistina en células HK2 in vitro	108
4.4. Secuenciación de las células HK2.....	111
5. Impacto traslacional: uso clínico de colistina.....	113
6. Modelo de daño celular inducido por ALA en células MCT in vitro	113
Discusión	115
1. El cefadroxilo previene la nefrotoxicidad por colistina.....	116
2. Porfiria aguda intermitente o ERCd	124
3. Limitaciones	125
4. Fortalezas	125
Conclusiones	126
Conclusions	128
Material suplementario	130
Bibliografía	132

Introducción

1. Las funciones de los riñones y de las células tubulares

El riñón tiene múltiples funciones entre las que destacan dos: la generación de orina y la función endocrinometabólica. La generación de orina ayuda a mantener el volumen y la composición del líquido extracelular, que dependen de dos elementos: la ingesta (sed y apetito) y el ajuste de la eliminación a través del riñón. El riñón conserva el agua y los electrolitos necesarios y elimina el exceso de agua y electrolitos de la ingesta, así como los productos de desecho, ya sean generados por el metabolismo o que hayan penetrado en el organismo. Dentro de las funciones endocrinometabólicas, el riñón secreta activamente varias hormonas y enzimas como renina, eritropoyetina, Klotho, renalasa y calcitriol (vitamina D activa), entre otras. Además, degrada hormonas peptídicas, como la insulina y citoquinas proinflamatorias (1).

La generación de orina depende de dos procesos: el filtrado glomerular y la modificación tubular del filtrado. El filtrado glomerular se produce en el glomérulo, a través de una barrera de filtración compuesta por el endotelio fenestrado, la membrana basal glomerular y los pedicelos de los podocitos. Cada día se filtra un gran volumen de plasma (150-180L/día) que los túbulos renales modifican para generar la orina final que será excretada con el volumen (1-2L) y las concentraciones necesarias de cada elemento. El túbulo renal se divide en varias partes: 1) túbulo proximal; 2) asa de Henle; 3) túbulo distal; 4) túbulo colector. En cada sección se realizan procesos específicos de reabsorción y secreción (1). En concreto vamos a centrarnos en el túbulo proximal.

El túbulo proximal es la primera sección del túbulo tras el glomérulo, siendo el segmento más largo de la nefrona y, en conjunto, ocupa la mayor parte de la corteza renal. El túbulo proximal reabsorbe el 60-70% del agua filtrada, cloruro sódico (NaCl), gran proporción del bicarbonato sódico (NaHCO_3) y prácticamente todos los nutrientes filtrados (2). Para ejercer esta función requiere de una gran superficie, que se consigue gracias al ribete en cepillo, que aumenta en más de 20 veces su superficie; y a una elevada actividad metabólica, consumiendo gran cantidad de oxígeno y ATP, ya que realiza una inmensa variedad de actividades de transporte dependientes de un gradiente de sodio (Na^+) que se consigue por la Na^+/K^+ ATPasa y requiere consumo de energía (2). Por lo tanto, las células del túbulo proximal requieren un elevado número de mitocondrias y de lisosomas, estos últimos para procesos de autofagia. En el túbulo proximal distinguimos 3 segmentos: 1) S1, con células altas, con grandes interdigitaciones y con más vacuolas y mitocondrias, ocupando gran parte de la pars convoluta; 2) S2, de transición

entre la pars convoluta y pars recta; 3) S3 con células cuboideas, con muy pocas interdigitaciones y mitocondrias, pero con las microvellosidades más largas de los 3 segmentos, ocupando la parte final de la pars recta (3).

El túbulo proximal produce hormonas, como calcitriol y Klotho y transporta fármacos (vg., colistina, β -lactámicos), toxinas urémicas (vg., indoxil sulfato) y ambientales (vg., mercurio, ácido aristolóquico), metabolitos (ácido úrico), componentes de la dieta y moléculas de señalización (4). Los principales transportadores son las superfamilia de los transportadores de solutos (solute carrier; SLC) y ATP-binding cassette (ABC), además de la megalina y la cubilina (4). La superfamilia SLC transporta moléculas a favor de un gradiente de concentración, pero también en contra, acoplándose en este caso a alguna otra molécula transportada a favor de gradiente. La familia SLC incluye los transportadores de aniones orgánicos (organic anion transporter; OAT) como el OAT1 (también llamado NKT, codificado por el gen *SLC22A6*) y el OAT3 (gen *SLC22A8*), ambos inhibidos por probenecid; los transportadores de cationes orgánicos (organic cation transporter; OCT) como el OCT2 (gen *SLC22A2*); los polipéptidos transportadores de aniónicos orgánicos (organic anion transporting polypeptide; OATP o familia *SLCO*); las proteínas de extrusión de múltiples fármacos y toxinas (multidrug and toxin extrusion proteins; MATEs o familia *SLC47*), los transportadores de carnitina/compuestos zwitteriónicos orgánicos (gen *SLC22A4* y *SLC22A5*), la familia de transportadores de péptidos (familia *SLC15*, que pertenece a la familia POT, proton-coupled oligopeptide transporter) y otras muchas (4,5).

Muchas toxinas son filtradas libremente por el glomérulo y posteriormente son reabsorbidas por estos transportadores, entrando en la célula, donde pueden ser tóxicas. Tal es el caso del ácido aristolóquico y la ocratoxina A, ambas involucradas en la nefropatía endémica de los Balcanes, transportadas al interior celular por los OATs (4).

2. Enfermedad renal crónica y fracaso renal agudo

La Enfermedad Renal Crónica (ERC) es una entidad definida por la disminución de la función renal, determinada por una tasa de filtrado glomerular estimado (FGe) menor a 60 ml/min/1.73 m², o por la existencia de daño renal determinado por una eliminación urinaria de albúmina superior a 30 mg/día o 30 mg/g de creatinina, alteraciones en el sedimento de orina, alteraciones electrolíticas debidas a tubulopatías, anormalidades histológicas detectadas en la biopsia renal, alteraciones estructurales en pruebas de imagen o historia de trasplante renal; de

al menos 3 meses de evolución, independientemente de la causa, y que tiene implicaciones para la salud del paciente (6). La ERC es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad por enfermedades no transmisibles. Su diagnóstico implica un mayor riesgo de progresión a fallo renal que requiera terapia renal sustitutiva (TRS), de fracaso renal agudo (FRA) y de muerte prematura cardiovascular o por cualquier causa (7).

A nivel mundial, en 2017, la prevalencia de ERC se estimó en 9,1% (aproximadamente 697,5 millones), siendo los estadios G1 y G2 el 5%, estadio G3 el 3,9%, estadio G4 el 0,16%, el estadio G5 un 0,07%, diálisis 0,041% y el trasplante renal 0,011% (8). Las causas más frecuentes de ERC son la diabetes y la hipertensión (aunque a nivel clínico, la ERC se atribuye a hipertensión cuando no hay otra causa evidente) (7,8). A nivel europeo, según el registro de la ERA-EDTA, la causa más común de ERC incidente en diálisis es desconocida (27%, 39% si añadimos hipertensión), seguida de diabetes (20%), glomerulonefritis (11%) y poliquistosis renal (5%) (7). En España, la principal causa de ERC es diabetes (25% de pacientes que llegan a TRS), seguida de desconocida (15%), “vascular”, glomerulonefritis (14%) y enfermedades hereditarias (aproximadamente 14%)(7). Sin embargo, en países en desarrollo también tiene un papel adicional el VIH, la exposición a metales pesados y toxinas y, en varias áreas mundiales, la causa sigue siendo desconocida (8).

En 2017, 1,2 millones de personas fallecieron por causas atribuibles a ERC y el número de personas que reciben TRS excedió los 2,5 millones, previéndose que para 2030 se doble hasta 5,4 millones (8). Sin embargo, en algunos países el acceso a TRS es limitado, por lo que se estima que 2,3 - 7,1 millones de personas murieron prematuramente por la falta de acceso a TRS (8). En 2016, la ERC fue la decimosexta causa de muerte a nivel mundial, estimándose que ascenderá a la quinta causa de muerte en 2040 y a la primera causa de muerte en 2100 (7–9). En España, siguiendo esta progresión, la ERC será la segunda causa de muerte, tras el Alzheimer, a finales del siglo XXI (7).

Entre 1990 y 2017, la prevalencia de ERC y su mortalidad ha variado según las diferentes regiones. Dentro de Centroamérica y la región Andina, la ERC es la segunda y quinta causa de muerte respectivamente (8), siendo más llamativo en El Salvador, México y Ecuador (aumento de mortalidad del 199%, 102,3% y 95,5%, respectivamente (8). En el sudeste asiático, Sri Lanka es el país con mayor incremento de la prevalencia de ERC durante este período, un 15,9%, pero con un descenso de la mortalidad de un 17% (8). En Europa occidental, donde los porcentajes de variación en la tasa de prevalencia y mortalidad de ERC ajustada por edad entre 1990 y 2017

era de -5% y de -0,7%, Dinamarca presentó un incremento de un 4,9% en prevalencia y de un 117% en mortalidad (8).

Las consecuencias de la ERC para la salud incluyen también las propias manifestaciones de la ERC (anemia, enfermedad ósea, acidosis metabólica, hiperpotasemia y, eventualmente, muerte por uremia) así como un mayor riesgo de FRA, definido por las guías KDIGO como aumento de la creatinina sérica $\geq 0,3$ mg/dl en 48 horas o aumento de la creatinina sérica $\geq 1,5$ veces la creatinina basal, que ha ocurrido en los 7 días previos; o una diuresis $< 0,5$ ml/kg/h durante 6 horas. Una vez determinado que existe un FRA, hay que estratificar su gravedad y determinar su causa (10). Según la gravedad, se distinguen 3 estadios: KDIGO 1 si la creatinina aumenta $\geq 0,3$ mg/dl; KDIGO 2 si la creatinina está entre 2 y 2,9 veces su valor basal y KDIGO 3 si la creatinina plasmática es ≥ 3 veces el valor basal, si aumenta por encima de 4 mg/dl o si el paciente requiere TRS (10).

La ERC y el FRA tienen una relación bidireccional: la ERC aumenta el riesgo de FRA y el FRA puede causar o acelerar la ERC. Las principales causas de FRA son prerrenal, renal o parenquimatoso, y postrenal u obstructivo. El FRA prerrenal se debe a una disminución de la perfusión renal, ya sea por hipovolemia, disminución del gasto cardíaco, vasodilatación sistémica o modulación de la vasculatura renal (vg., por IECA, ARA2, AINEs) (10,11). El FRA postrenal u obstructivo se debe a obstrucción de la vía urinaria (10,11). El FRA renal o parenquimatoso tiene múltiples causas, desde la perpetuación en el tiempo de un FRA prerrenal u obstructivo no corregidos hasta diversas enfermedades o tóxicos que afectan de forma directa al riñón. Podemos clasificarlas según donde se produzca el daño en vascular o microvascular, glomerular o tubulointersticiales, que incluiría la necrosis/daño tubular aguda (NTA) por isquemia, procesos inflamatorios, metabolitos y fármacos (10,11). Varios antibióticos causan NTA, como los aminoglicósidos, anfotericina B y colistina, lo que requiere ajuste de dosis o limitar su uso sistémico/intravenoso, como ocurre con la colistina (12,13). Entre los metabolitos, el ácido delta aminolevulínico (ALA) se acumula en los pacientes con porfiria aguda intermitente y se ha descrito un efecto nefrotóxico (14,15).

3. Predisposición genética a la ERC

Las enfermedades genéticas causan el 17% de ERC en niños (tercera causa más común). La poliquistosis renal autosómica dominante es la nefropatía genética más frecuente en adultos y

lleva a necesitar diálisis a los 55-60 años (16). El diagnóstico puede realizarse mediante ecografía. En este caso, el fenotipo clínico es claro y ayuda al diagnóstico, pero en las enfermedades genéticas cuyo fenotipo clínico puede pasar desapercibido, la prevalencia y el diagnóstico quedan infraestimados, llevando al paciente a ERC y diálisis sin una causa establecida. Generalmente en estos casos, dado que la hipertensión es una enfermedad prevalente en la población general y aún más en pacientes con ERC, la etiología asignada es “daño microvascular por HTA o nefropatía hipertensiva” (16). La práctica clínica está cambiando, pero todavía es necesario aumentar el número de estudios genéticos para esclarecer la causa de nefropatías, especialmente entre los más jóvenes. El estudio GENSEN encontró que prácticamente uno de cada 4 pacientes menores de 45 años en TRS tenía una nefropatía genética (17).

En otro ejemplo, la secuenciación del exoma (whole-exome sequencing) cambió el diagnóstico en 22 (24%) de 92 pacientes desde ERC de causa desconocida (ERCd), nefropatía familiar o hipertensión a 13 enfermedades genéticas diferentes (18). La nefronoptosis es la causa genética más prevalente de ERC terminal (ERCT) en niños. Sin embargo, en 5606 pacientes con ERCT de inicio en adultos, 0,5% tenían delecciones homocigotas en el gen NPHP1, una causa de nefronoptosis. La mediana de edad de inicio de TRS fue 30 años, pero el rango de edad llegó hasta los 61 años (16). El 88% de estos pacientes estaban diagnosticados de ERCd (16).

4. Puntos calientes de ERC o ERC hotspots

Existen regiones donde la prevalencia de ERC ha aumentado sin un aumento en la prevalencia de las causas principales de ERC (diabetes e hipertensión) denominadas puntos calientes de ERC o ERC hotspots (Figura 1) (19). Las principales causas de ERC en los hotspots, además de la diabetes y la hipertensión, son las infecciones y la ERCd (19). La ERCd ha recibido diferentes nombres según el área geográfica: Nefropatía Mesoamericana, Nefropatía de América Central, enfermedad renal crónica túbulointersticial de América Central, la Nefropatía agrícola de El Salvador, la Nefropatía agrícola de Sri-Lanka y la Nefropatía endémica de Uddanam. Estos términos se aplican a individuos con ERC, normalmente no biopsiada, en los que no hay una clara causa identificable (19). Actualmente, sigue sin aclararse la causa de la Nefropatía Mesoamericana, aunque en la Nefropatía endémica de los Balcanes, se ha identificado el ácido aristolóquico como agente causal (19). Existe una compleja interacción entre posibles factores genéticos, bajo peso al nacer, exposiciones prenatales o en la infancia, exposiciones ambientales

dañinas a edades tempranas, y determinantes sociales como pobreza, malnutrición, educación insuficiente, escaso acceso a sistemas sanitarios y una exposición desproporcionada a ciertos factores ambientales u ocupacionales(19).

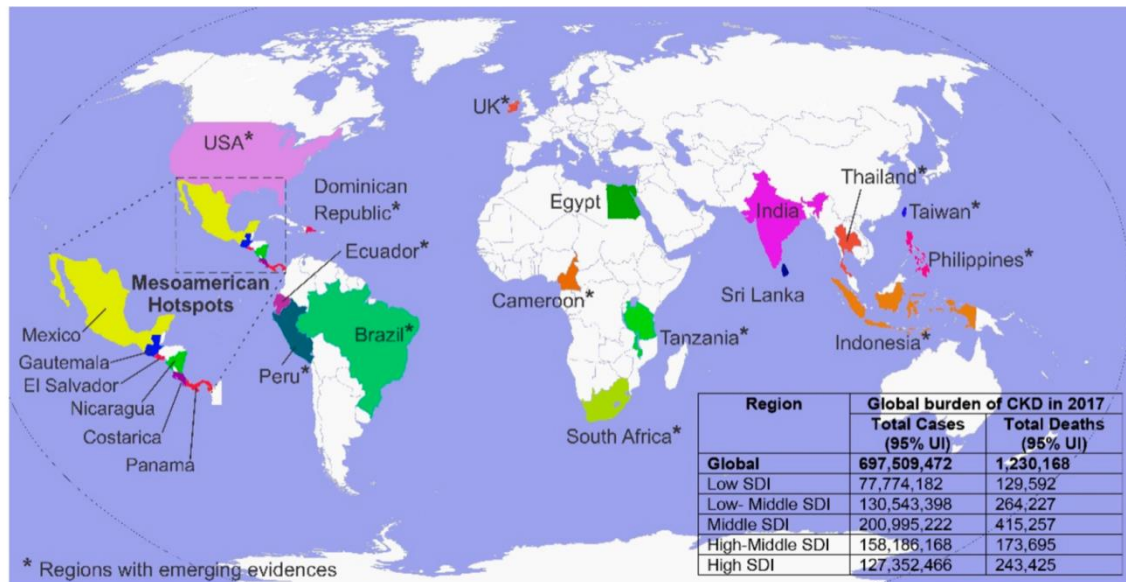


Figura 1. Mapa mundial donde destacan las regiones con mayor prevalencia de ERCd. De (20).

En el siglo XXI, la ERCd y las nefropatías genéticas suponen problemas de salud no resueltos, posiblemente relacionados.

5. Nefropatía Mesoamericana

La Nefropatía Mesoamericana es una ERCd que aparece en jóvenes de regiones agrícolas de El Salvador, Nicaragua, Guatemala y Costa Rica (21). Tiene características distintivas (21,22):

- Aunque afecta a toda la región de América central, se concentra en las tierras bajas de la costa pacífica.
- Afectación predominantemente en varones con aumento de creatinina en torno a la tercera o cuarta década de la vida.
- Perfil de afectación no glomerular con poca frecuencia de aparición de proteinuria significativa (<1g/día).
- Curso indolente y lentamente progresivo.
- Riñones ecogénicos y pequeños en ecografía.

- f) Asocia síntomas del tracto urinario inferior (denominado chistata por los locales para definir esos síntomas), normalmente acompañado de piuria estéril y de positividad para la esterasa leucocitaria.

En algunos casos se ha evidenciado enfermedad vascular en las piernas y hallazgos neurológicos como sordera neurosensorial y mioclonías (21). Además, la prevalencia de FGe $<60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ en residentes nicaragüenses que viven por debajo de los 500 m de altitud sobre el nivel del mar es casi el doble que en los que viven a mayores altitudes. Se ha asociado con factores ocupacionales, como un trabajo previo en campos de algodón, de azúcar o la exposición a pesticidas (22).

En El Salvador, Peraza et al, estudió a 664 residentes entre los 20 y 60 años que vivían en 5 comunidades y que trabajaban en diferentes industrias: dos comunidades en campos de azúcar (0-50 m sobre el nivel del mar), una en un campo de azúcar a mayor altitud ($>500 \text{ m}$), en un área de producción de café (1650 m) y una en un área de servicio (650 m). En los dos campos de azúcar a nivel del mar, 19% de los varones tenían FGe $<60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ frente al 2% en el campo de azúcar de alta altitud (23). Además, la duración del trabajo ajustada por edad en los campos de azúcar de baja altitud se asoció de forma independiente a mayor probabilidad de reducción de la función renal (22). Sin embargo, el uso de agroquímicos y el tipo de trabajo en los campos de azúcar eran similares entre las comunidades que trabajaban a diferentes altitudes, aunque la temperatura media era 4°C más baja en la comunidad de elevada altitud.

Existen múltiples teorías sobre las causas de la Nefropatía Mesoamericana: estrés por calor, medicaciones y toxinas (agroquímicos, metales pesados, ácido aristolóquico, contaminantes en alcoholes destilados localmente), infecciones (leptospirosis) y factores genéticos. Sanoff et al. encontró una asociación entre FGe $<60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ y la ingesta de más de 5 litros de agua al día (24), y sugirió que una toxina presente en el agua a baja concentración, sumado a la gran ingesta de agua en las zonas más calurosas y húmedas (baja altitud) y a la susceptibilidad individual o factores genéticos que aumenten la reabsorción tubular de dicha toxina, facilitaría el daño renal en función de la cantidad total filtrada (22).

Por otro lado, la asociación con la gran ingesta hídrica es difícil de interpretar, ya que iría en contra de la hipótesis de la deshidratación a no ser que, aun así, la ingesta de agua siga siendo insuficiente para reponer las pérdidas. Además, la poliuria resultante de la resistencia parcial a la hormona antidiurética (isostenuria) es una manifestación de muchas formas de ERC,

reflejando la pérdida de la capacidad de concentrar la orina. Por ello, la asociación con grandes ingestas de agua puede ser solo el reflejo de la existencia de ERC (16). En este sentido, la histología renal corresponde a una nefritis túbulointersticial con datos de cronicidad y algunos cambios isquémicos (25).

El riesgo de desarrollar Nefropatía Mesoamericana es mayor en pacientes con historia familiar de ERC lo que podría sugerir una predisposición genética. Sin embargo, actualmente no hay estudios de asociación genética que lo demuestre (26). Muchos autores rechazan la hipótesis de un posible componente genético centrándose en los factores ambientales. El hecho de tener una mayor prevalencia en varones podría estar relacionado con variantes o enfermedades asociadas al cromosoma X (como el síndrome de Alport o Enfermedad de Fabry), o por enfermedades autosómicas que progresan más rápidamente en varones que en mujeres (como la poliquistosis hepatorenal autosómica dominante, en la que los quistes renales y la ERC progresan más rápidamente en hombres y los quistes hepáticos en mujeres) (16). Existen determinantes genéticos que son específicos de determinadas etnias, como las variantes en *APOL1* e individuos de ascendencia africana, que predisponen a ERC. El marcador urinario NGAL (lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos o neutrophil gelatinase-associated lipocalin) es un marcador de daño tubular agudo y ERC. Entre los trabajadores de los campos de azúcar con Nefropatía Mesoamericana, aquellos con mayores aumentos del ratio urinario NGAL/creatinina durante los 6 meses de la época de cosecha tenían filtrados glomerulares disminuidos. Aunque inicialmente se había descrito como una enfermedad ocupacional, los niños que residen en regiones de Nicaragua con alta incidencia de Nefropatía Mesoamericana pueden presentar daño renal subclínico (determinado por el aumento de NGAL urinario, pero no de proteinuria) antes de aparecer las exposiciones ocupacionales (16,27). Por lo que, si la ausencia de historia laboral es correcta, esto podría implicar una predisposición genética y/o factores ambientales más allá de las duras condiciones laborales (16).

6. Nefropatía agrícola de Sri-Lanka

La prevalencia de la Nefropatía agrícola de Sri Lanka, como en la Nefropatía Mesoamericana, es mayor en hombres, llegándose incluso a evidenciar en niños, presentando un cociente urinario albúmina/creatinina entre 30 y 300 mg/g (28). El resto de las características son similares a la Nefropatía Mesoamericana: aumento lento y progresivo de las cifras de creatinina, riñones pequeños e hiperecogénicos, ausencia de sedimento activo o con algún cilindro hialino o

granular, proteinuria tubular (aumento de $\alpha 1$ y $\beta 2$ microglobulina) y aumento de NGAL urinario, e incluso síntomas neurológicos como mioclonías y signo de Babinski, hiperpigmentación palmoplantar y anormalidades en la ecografía doppler de la arteria tibial (29). Wijkstrom et al encontró también una eliminación urinaria de magnesio aumentada (30).

En Sri-Lanka se reconocen dos áreas climáticas: la región húmeda, (sur, oeste y central) y la zona seca (norte, central del norte y oriental) (28). La Nefropatía agrícola de Sri-Lanka afecta principalmente a la región central del norte con una incidencia del 10-27% (31), pero con escasa incidencia en la región norte, donde el clima, la agricultura, los patrones ocupacionales y el campo es similar a las regiones endémicas (Figura 2).

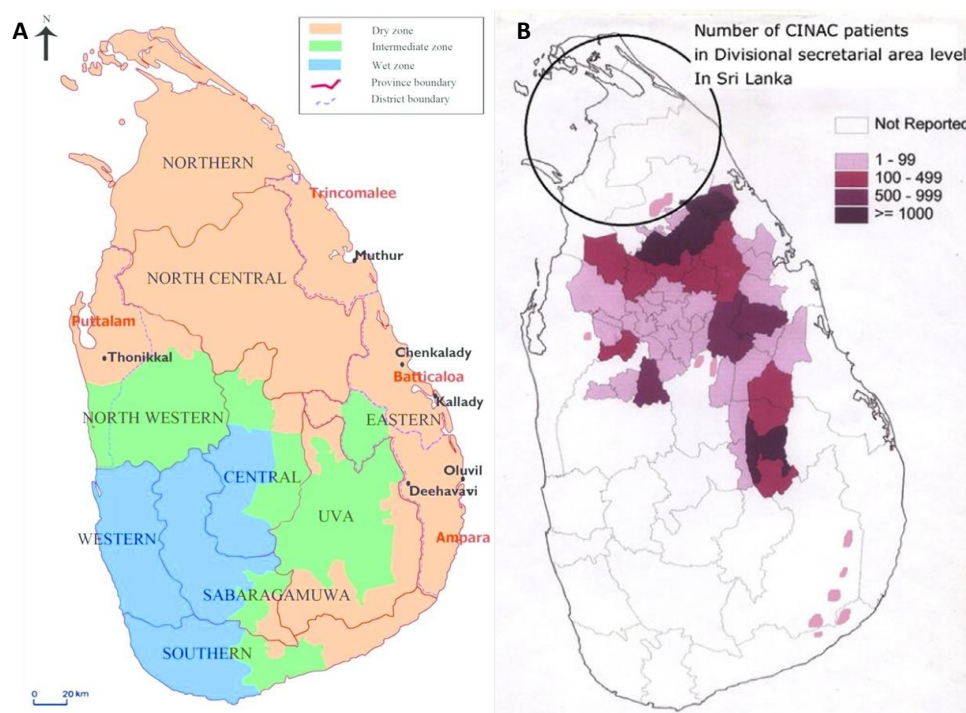


Figura 2. Mapa de Sri-Lanka. A: diferentes regiones en las que se divide Sri-Lanka. B: distribución de la prevalencia de la Nefropatía de Sri-Lanka. El círculo indica el área norte. Como se puede evidenciar, la Nefropatía de Sri-Lanka afecta principalmente a la región central del norte. De (28,32).

La histopatología muestra una nefritis tubulointersticial con infiltrado mononuclear, esclerosis glomerular y atrofia tubular (28). Se han descrito asociaciones con ser granjero, el uso de pesticidas, beber agua de pozos, historia familiar de ERC, historia previa de mordeduras de serpientes, haber recibido medicina ayurvédica y la edad >60 años (28). También se ha atribuido al flúor y al cadmio ingerido a través del pescado y del arroz, ya que los pacientes presentaban mayores concentraciones de cadmio urinario, encontrándose una asociación entre los niveles

de cadmio urinario y los estadios de ERC (28). Sin embargo, los niveles de selenio urinario eran bastante bajos (33). Por otro lado, otros autores no encontraron asociaciones significativas con ninguno de los metales expuestos (cromo, arsénico, plomo y cadmio) (34). Otra posible etiopatogenia son los contaminantes naturales como la ocratoxina A (toxina fúngica) o toxinas de cianobacterias, sin embargo, ambas se encontraron en dosis infratóxicas o indetectables (28).

Dentro de la susceptibilidad genética, mediante estudios de asociación por análisis genómico o genome-wide association study (GWAS), se observó una asociación con un polimorfismo de un nucleótido simple o single-nucleotide polymorphism (SNP) en el gen *SLC13A3* (sodium-dependent dicarboxylate transporter member 3; rs6066043; $P = 5,23 \times 10^{-9}$ en análisis de locus del rasgo cuantitativo o quantitative trait locus analysis; $P = 3,73 \times 10^{-9}$ en análisis dicotómico) con una fracción atribuible a la población del 50% y un OR de 2,13 (35). En otros estudios, se encontró una asociación familiar en 10 de 106 pacientes con ERCd en la región de Medawachchiya y Girandurukotte con un patrón de herencia que no correspondía a enfermedades monogénicas o autosómicas recesivas, sugiriendo la posibilidad de un polimorfismo con alta frecuencia de expresión en la población (36,37). También se describió una posible asociación con 4 variantes raras en el gen de la laminina beta-2 (*LAMB2*) y con una variante el gen *KCNA10* (rs34970857) que codifica un canal de potasio dependiente de voltaje (c.658G>A/V220 M) (34,37). La asociación familiar, compatible con susceptibilidad genética, es un rasgo común tanto en la Nefropatía Mesoamericana como la Nefropatía de Sri-Lanka, que dadas sus similitudes se agruparon en un término común: nefritis intersticial crónica en comunidades agrícolas o CINAC de sus siglas en inglés. A partir de ahora, me referiré de forma genérica a ambas como CINAC, y en caso de querer hacer alguna distinción concreta usaré el término de Nefropatía Mesoamericana o de Sri-Lanka. La Tabla 1 muestra una comparativa de ambas enfermedades.

Tabla 1. Comparativa de la Nefropatía Mesoamericana y de Sri-Lanka. KIM1: kidney injury molecule 1; NGAL: neutrophil gelatinase-associated lipocalin o lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos. Adaptado de (21,25,28).

Variable	Nefropatía Mesoamericana	Nefropatía de Sri-Lanka
Región	Tierras bajas de la costa pacífica, áreas rurales desde México a Panamá	Provincia Central del Norte
Edad	20-50 años	40-50 años
Clima	Húmedo, temperatura media 26°C	Seco, temperatura media en la costa 28°C
Sexo	Varones 3:1	Varones 1,3:1
Ocupación	Trabajadores de caña de azúcar, algodón, agricultor de maíz, construcción, trabajadores portuarios, mineros, industria pesquera, fábricas de camarones y de ladrillo	Agricultores de arroz
Afectación en infancia	Sí	Sí
Asociación familiar	Sí	Sí
Sedimento	Piuria estéril	Sin cilindros
Proteinuria	Negativa o mínima	Mínima
Hipertensión	Raro	Desconocido
Marcadores urinarios	NGAL y KIM-1	NGAL y KIM-1
Histología	Glomeruloesclerosis extensa, datos de isquemia glomerular crónica Nefropatía crónica túbulointersticial Lesiones vasculares leves	Glomeruloesclerosis Nefropatía crónica túbulointersticial Lesiones vasculares

A pesar de que la biopsia renal en la CINAC es poco específica, Vervaet et al. describió una constelación de lesiones de la célula proximal que incluían unos grandes gránulos dismórficos que contienen “agregados” dispersos, electrón-densos, no unidos a membranas que se

identificaron como lisosomas con microscopía óptica y electrónica (Figura 3 y Figura 4) (29). Estos depósitos no coinciden con los de lipofuscina, son diferentes de los cuerpos mieloides lisosomales y tampoco son compatibles con otras enfermedades de depósito lisosomal como la Enfermedad de Fabry (29). Estas lesiones eran similares a las observadas en otras nefropatías inducidas por toxinas, como en los pacientes tratados con inhibidores de calcineurina, litio, otras nefritis intersticiales por fármacos y casos de nefrotoxicidad por lomustina (quimioterápico) y clomifeno (usado para inducir la ovulación) (29). Hay que destacar que no todas las nefropatías inducidas por toxinas (cisplatino o tenofovir) presentan este fenotipo lisosomal aberrante, indicando que solo ocurre en determinadas patologías que afectan a la misma vía o vías, entre las que podría estar incluida la vía de la calcineurina (siendo la toxina otro inhibidor o modulador) (29). A este respecto, los pesticidas piretroides inhiben directamente la calcineurina y hay descritos casos de toxicidad renal aguda por pesticidas piretroides en forma de NTA no oligúrica con hipopotasemia, característica también presente en los casos de CINAC (38). En este caso, la biopsia renal mostró datos de NTA con cambios degenerativos extensos y vacuolización citoplasmática (38).

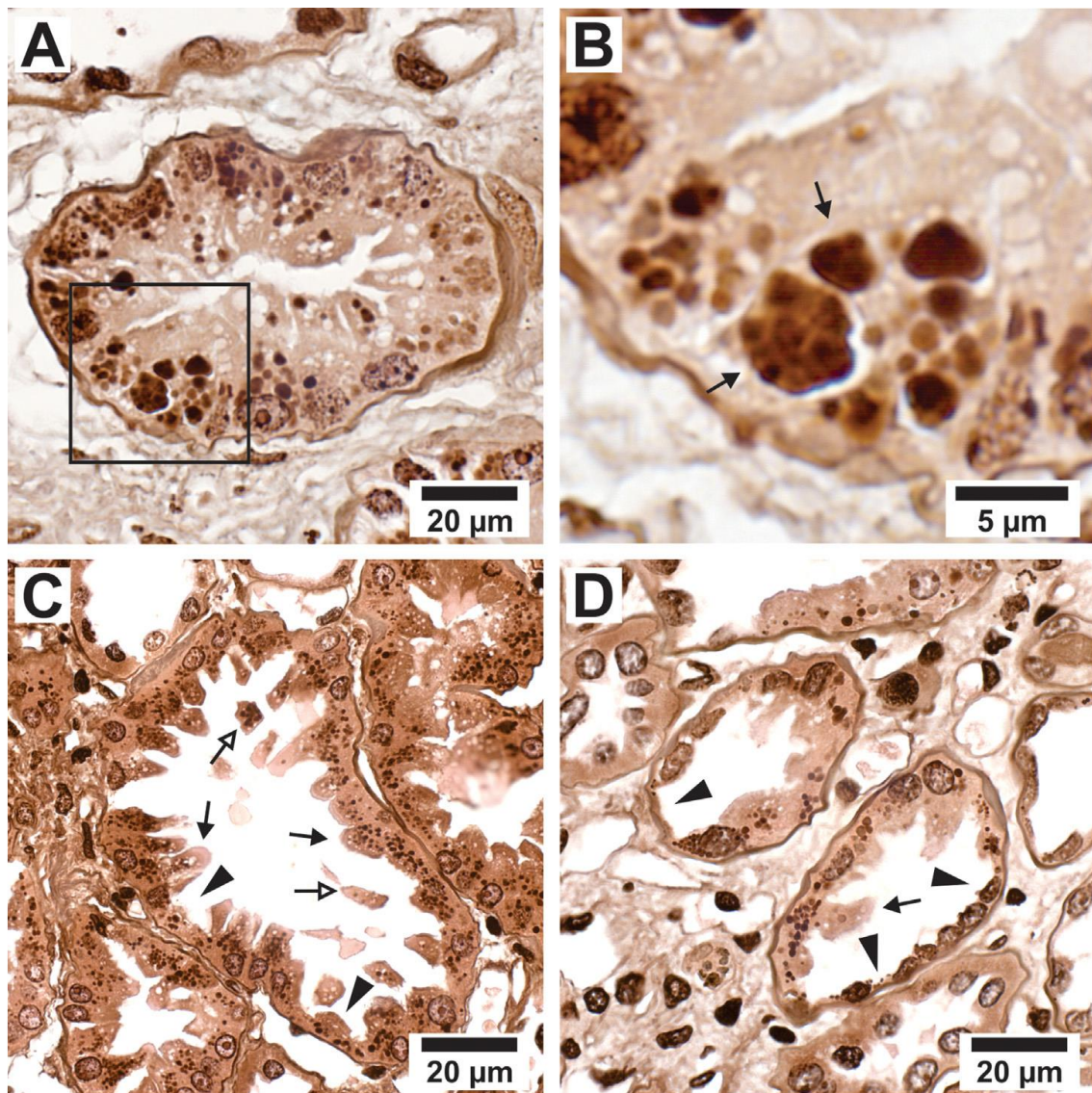


Figura 3. La presencia de gránulos argirofílicos de células tubulares proximales agrandadas (identificados como lisosomas) en asociación con diversos grados de simplificación epitelial, atrofia tubular, desprendimiento de fragmentos de células luminales con o sin expansión tubulointersticial son sospechosos de nefritis intersticial crónica de comunidades agrícolas, sin embargo, requiere de microscopía electrónica para confirmar (ver Figura 4). (A y B) Gránulos agrandados prominentes, identificados como lisosomas, algunos con formas irregulares/dismórficas y que contienen material agrupado más oscuro (flecha). (C) Células tubulares aplanadas (puntas de flecha) con pérdida del reborde en cepillo. Ampolla apical (flechas sólidas) y fragmentos de células intraluminales (flechas abiertas). (D) Lesión prominente del revestimiento epitelial (puntas de flecha), junto a varias células con vesículas apicales (flecha). Biopsias de nefritis intersticial crónica de comunidades agrícolas de Sri Lanka. Tinción de plata de Jones con contratinción limitada. De (29).

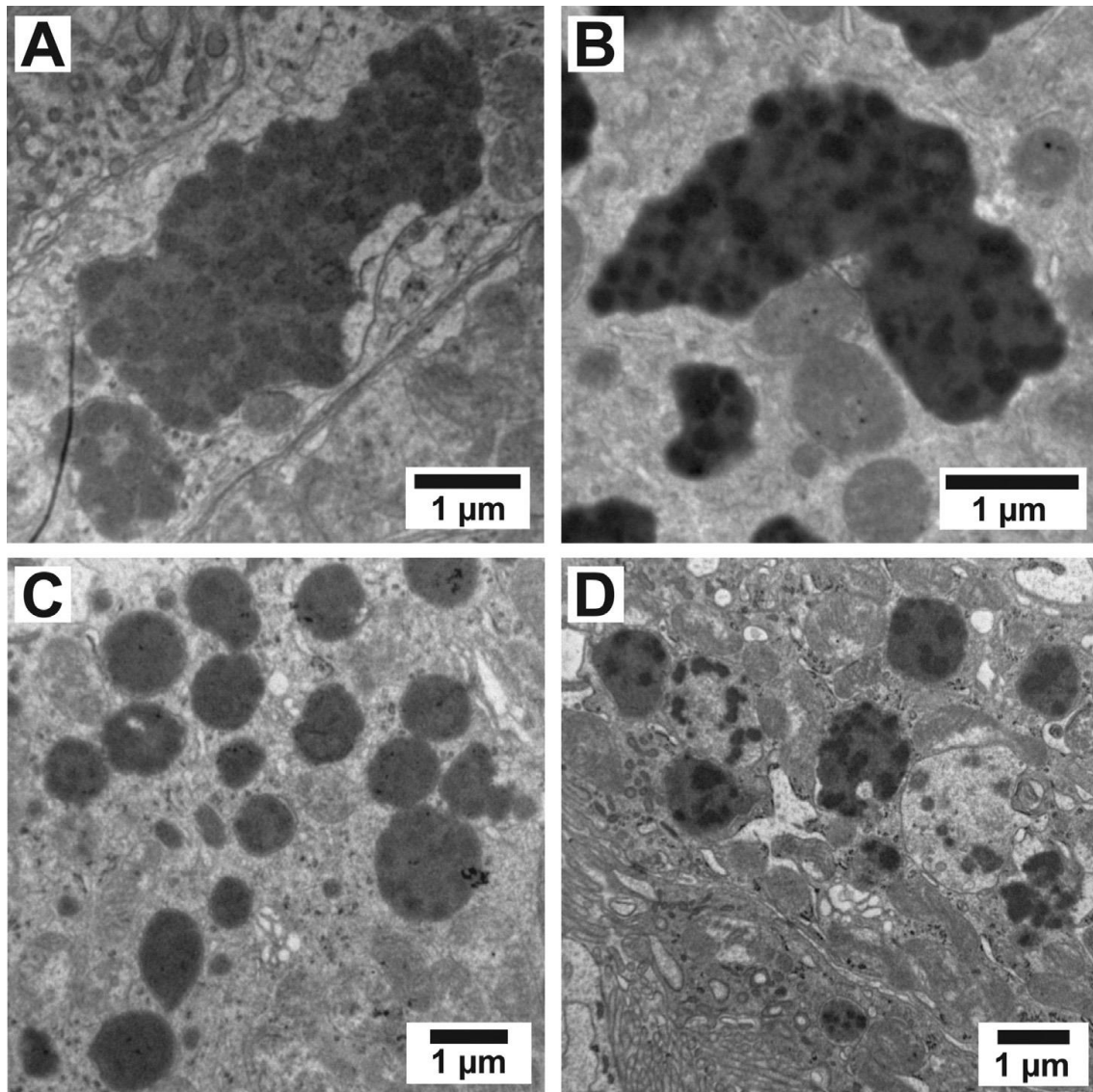


Figura 4. Variabilidad fenotípica en microscopía electrónica de la lesión lisosomal. (A y B) Dos lisosomas dismórficos muy grandes. Todos contienen agregados electrón-densos dispersos. La presencia de lisosomas con diámetros superiores a 1,2 μm tiene valor diagnóstico confirmatorio para la identificación de nefritis intersticial crónica de comunidades agrícolas en pacientes que cumplen los criterios clínicos de la enfermedad. (C y D) Ejemplos de grupos de lisosomas dismórficos más pequeños que contienen agregados. Los casos clínicos de nefritis intersticial crónica de comunidades agrícolas que presentan dos o más grupos de al menos tres lisosomas que cumplen los criterios de agregados intralisomales y dismorfia de leve a moderada, pero con un diámetro máximo menor de 1,2 μm , se designan como "sospechosos". Las imágenes son de pacientes de Sri Lanka con nefritis intersticial crónica de comunidades agrícolas. De (29).

7. Porfiria aguda intermitente

Las porfirias son enfermedades que afectan a alguno de los 8 pasos enzimáticos de la síntesis del grupo hemo (Figura 5). Cada tipo de porfiria se debe a un defecto enzimático, que puede ser adquirido o hereditario (39). Un defecto significativo causa el acúmulo de los precursores proximales al defecto, que entran en la circulación y se excretan en la orina o bilis. Se agrupan

en las porfirias agudas hepáticas y las fotocutáneas. Las porfirias agudas se deben a la sobreproducción hepática de los precursores porfirínicos, ácido delta aminolevulínico (ALA) y porfobilinógeno (PBG), cuyos síntomas están causados por daño al sistema nervioso. Las porfirias cutáneas se deben a la sobreproducción de porfirinas fotosensibilizantes, ya sea por el hígado o la médula ósea (39). La única porfiria cuya causa es una ganancia de función es la protoporfiria eritropoyética asociada al cromosoma X, con una mutación en la ALA sintetasa 2 de los eritrocitos en médula ósea, aumentando los niveles de ALA (40).

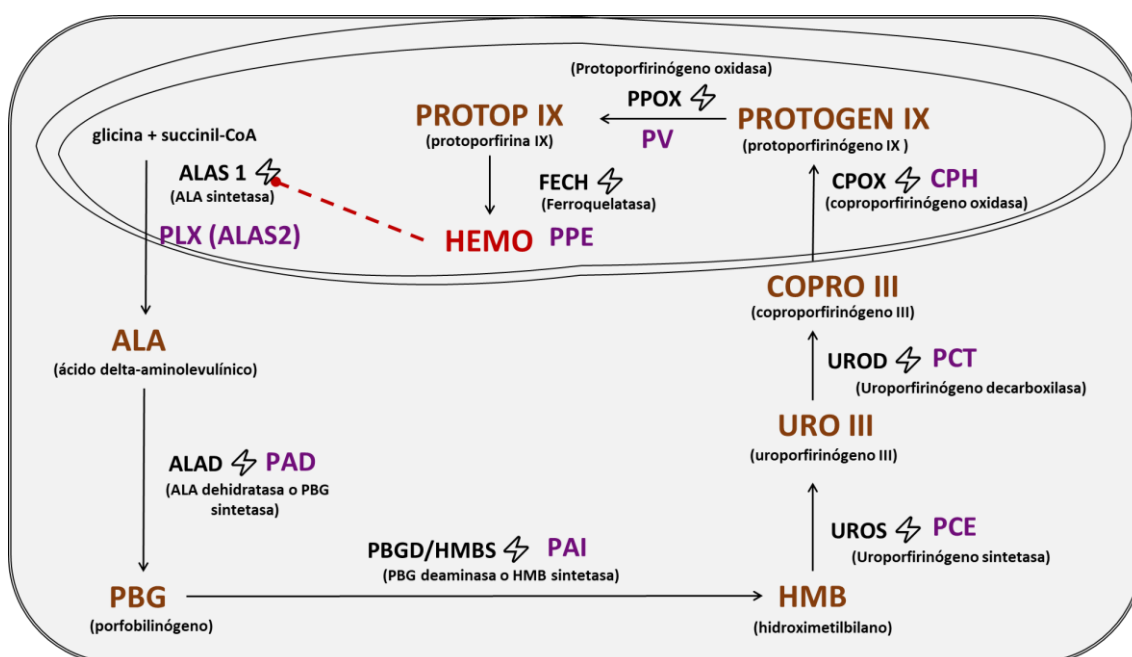


Figura 5. Vía metabólica de síntesis del grupo HEMO. En color marrón, los sustratos; en negro las enzimas encargadas de cada paso metabólico; en morado la porfiria asociada a esa alteración enzimática. PLX: protoporfiria eritropoyética ligada al X; PAD: porfiria asociada a ALAD; PAI: porfiria aguda intermitente; PCE: porfiria congénita eritropoyética; PCT: porfiria cutánea tarda; CPH: coproporfiria hereditaria; PV: porfiria variegata; PPE: protoporfiria eritropoyética. Adaptado de (39).

La porfiria aguda intermitente es la más frecuente en la práctica clínica y se debe a la deficiencia parcial de la tercera enzima en la síntesis del grupo hemo, porfobilinógeno deaminasa o hidroximetilbilano sintetasa, acumulándose PBG y ALA. Es una enfermedad autosómica dominante con una prevalencia de mutaciones en la población occidental de 1 por cada 2000 personas y una penetrancia clínica del 0,5-1% (39,40). Sin embargo, los ataques agudos ocurren en menos del 10% de la población en riesgo (39).

Las manifestaciones típicas comienzan con unos días de astenia muy marcada, incapacidad para concentrarse, seguidos de dolor abdominal que empeora progresivamente, náuseas, vómitos y sutiles signos neurológicos (debilidad, disestesia y afecto alterado), asociando taquicardia e

hipertensión (39). Una complicación frecuente es la hiponatremia secundaria a una secreción inadecuada de hormona antidiurética, debido al paso de ALA al hipotálamo (15). En este caso, el color de la orina es normal, pero si se mantiene a la luz a temperatura ambiente, se torna oscura lentamente por la formación de pigmentos similares a las uroporfirinas (39). Los ataques ocurren generalmente en mujeres en edad reproductiva desencadenados por factores hormonales (ciclo menstrual), fármacos, disminución de la ingesta calórica, estrés físico o mental e infecciones (todos inductores de la enzima ALA sintetasa o ALAS1, ya sea de forma directa o por depleción del grupo hemo, eliminando el feedback negativo) (39–41). Existe una diferente tolerancia a los factores desencadenantes, incluso entre miembros de una misma familia con la misma mutación, lo que indica que el fenotipo final puede estar afectado por otros factores genéticos y no genéticos, haciendo difícil crear una correlación genotipo-fenotipo (40).

El diagnóstico se realiza midiendo los niveles de PBG y ALA, que se encuentran elevados en orina y sangre, aumentándose entre 10 y 150 veces el límite superior de la normalidad en los ataques agudos.

Se cree que los síntomas se deben al acúmulo de ALA. Entre las complicaciones a largo plazo de la porfiria aguda intermitente están la enfermedad hepática y renal crónica (hasta 70% en pacientes con ataques recurrentes), posiblemente debido al efecto tóxico de ALA, que es altamente hidrofílica y atraviesa barreras, como la hematoencefálica (15,39,42). In vitro, ALA es una neurotoxina y su oxidación genera especies reactivas de oxígeno, siendo además un potente vasoconstrictor (15,40).

7.1. Patogénesis del daño renal mediado por ALA

El riñón es el tercer órgano, tras la médula ósea (80%) y el hígado (15%), en términos de síntesis del grupo hemo, que se incorpora a las hemoproteínas necesarias para la fisiología renal (15). La ruta metabólica es la misma que en el hígado, siendo la primera enzima que interviene la ALAS1, también con feedback negativo por el grupo hemo, si bien, con menor sensibilidad a factores inhibidores (15). Dentro del riñón, la síntesis y concentración de hemoproteínas sigue un gradiente córticomedular, siendo predominante en los túbulos proximales, una región metabólicamente muy activa y expuesta a diferentes xenobióticos y otros componentes endógenos (14).

En la porfiria aguda intermitente diferenciamos dos formas de daño renal: agudo, durante los ataques, y crónico, por ataques repetidos y exceso de ALA y PBG (Figura 6). En los ataques agudos, ALA es filtrada por el glomérulo y reabsorbida por el transportador PEPT2 del túbulo proximal, así como algunos transportadores de aminoácidos neutros (15), produciendo NTA con aumento de NGAL urinario (43,44). La enfermedad renal crónica asociada a porfiria (porphyria-associated kidney disease; PAKD) ocurre en >50% de los pacientes con porfiria aguda intermitente sintomática y un 60% de los pacientes con PAKD tienen hipertensión (15). La gravedad de la PAKD se correlaciona con la frecuencia y severidad de los ataques. Existen 2 teorías principales del daño renal en porfiria aguda intermitente: 1) daño hemodinámico repetitivo por vasoconstricción e hipovolemia (por emesis); 2) daño nefrotóxico mediado por ALA.

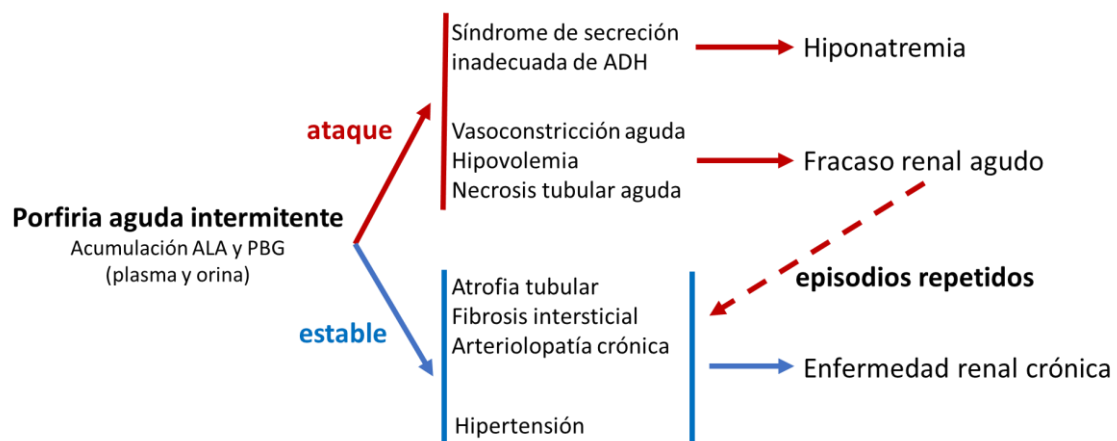


Figura 6. Los precursores porfirínicos ALA y PBG son producidos en exceso en fase estable entre ataques y más aún durante los ataques en la porfiria aguda intermitente. ALA y PBG producen vasoconstricción y citotoxicidad, causando hipertensión y daño tisular renal con fracaso renal agudo. Ataques repetidos de porfiria aguda intermitente causan fracasos renales agudos repetidos que evolucionarían a enfermedad renal crónica irreversible (PAKD). ALA: ácido delta aminolevulínico; PBG: porfobilinógeno; PAKD: enfermedad renal crónica asociada a porfiria. Adaptado de (15).

A nivel intracelular, ALA sufre una autoenolización catalizada por fosfato, convirtiéndose en un agente oxidante que reacciona con el hierro y el oxígeno para producir anión superóxido, radicales OH y radical ALA. El radical ALA, en presencia de oxígeno, reduce el hierro para producir ácido dioxovalérico (DOVA), un oxidante altamente reactivo, lo que genera daño mitocondrial con pérdida de morfología, potencial transmembrana y proteínas (14). La Figura 7 muestra el mecanismo de daño renal en las porfirias agudas intermitentes.

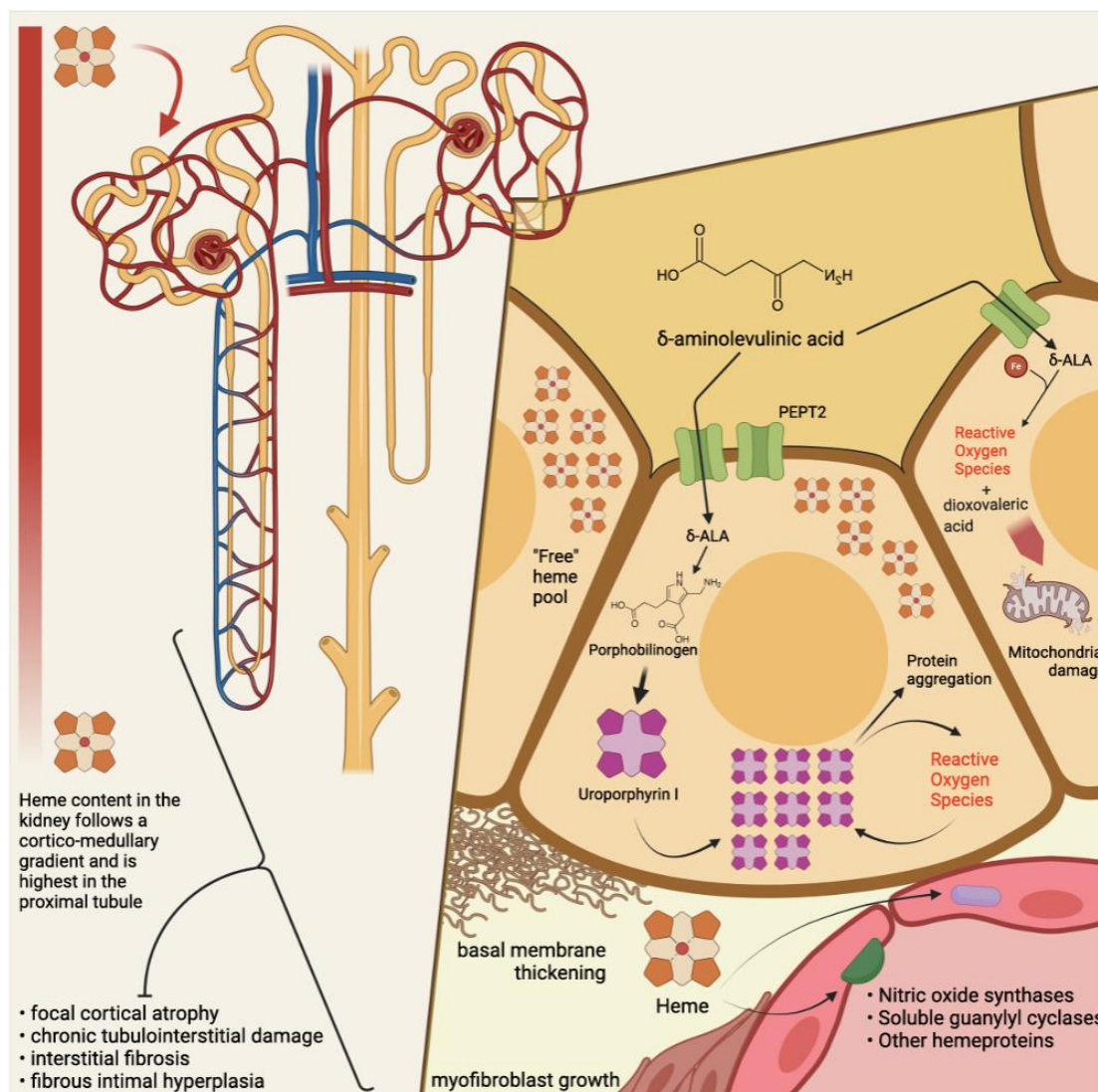


Figura 7. Mecanismos de daño renal en las porfirias agudas hepáticas. La capacidad de biosíntesis del grupo hemo es paralela a la actividad detoxificadora de los citocromos y otras funciones hemo-dependientes. El riñón podría beneficiarse de un mayor contenido de grupo hemo libre, que serviría como un buffer protector para estímulos que deplecen hemo de forma aguda. A nivel intracelular, ALA reacciona en múltiples pasos en presencia de hierro y oxígeno para producir ácido dioxovalérico, un oxidante altamente reactivo que genera daño mitocondrial. Las porfirinas producen especies reactivas de oxígeno y causan agregación proteica sin fotosensibilización previa. Este proceso puede iniciarse o acelerarse en un medio oxidante. Las depleciones relativas del grupo hemo, así como los reajustes hemodinámicos debidos a alteraciones súbitas en los niveles de ALA circulantes podrían impactar negativamente en el delicado equilibrio microcirculatorio del riñón, regulado por la sintasa de óxido nítrico, la guanilil ciclasa soluble y otras hemoproteínas con efectos vasoactivos. De (14).

En biopsias renales se observó glomeruloesclerosis difusa y daños intersticiales crónicos junto con lesiones isquémicas (arteriosclerosis grave e hiperplasia intimal fibroproliferativa), apoyando la posible toxicidad vascular y vasoconstricción mediada por ALA, pero pudiendo interpretarse también como un cuadro histológico inespecífico de ERC (15,43). Además, las secciones tubulares de las biopsias con PAKD mostraban acúmulos citoplasmáticos de β -catenina y expresaban vimentina, indicativo de transición epitelio-mesenquimal parcial (44). In

vitro, al incubar células tubulares con ALA y PBG 1 mM, una concentración que puede alcanzarse en la orina durante las crisis agudas, se vio positividad para TUNEL, indicando la presencia de apoptosis. Además, se evidenciaron otros marcadores de estrés del retículo endoplásmico y activación autofágica, la pérdida de marcadores epiteliales (indicando una transición epitelio-mesenquimal) y la expresión de citoquinas profibróticas, como TGF- β 1 y el factor de crecimiento epidérmico (EGF), y proinflamatorias como IL-6, IL-8 y la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) (44). Estos cambios también se evidenciaron con menores concentraciones de ALA y PBG (100 μ M) (44).

El túbulo proximal reabsorbe ALA por el transportador PEPT2, codificado por *SLC15A2*, en los segmentos S2 y S3 y variantes del gen *SLC15A2* que codifican transportadores con diferente afinidad por el sustrato se han relacionado con la gravedad de la PAKD (15,43). PEPT2 se expresa también en los plexos coroideos con una función protectora en las intoxicaciones por plomo, al intervenir en la extracción de ALA del interior de la barrera hematoencefálica (43).

El ataque agudo se suele tratar con hemina intravenosa, que produce mejoría al tercer o cuarto día de administración al restaurar los niveles hepáticos del grupo hemo, disminuyendo la expresión de ALAS1 mediante el feedback negativo, pero con posibles efectos adversos (flebitis, agregación plaquetaria, prolongación del tiempo de protrombina y, con tratamientos repetidos, sobrecarga hepática de hierro) (39,40). Por eso se están buscando alternativas como la terapia génica con vectores virales que transportan hidroximetilbilano sintetasa a los hepatocitos o un pequeño RNA de interferencia (siRNA; small interfering RNA) dirigido contra el RNA mensajero hepatocitario de ALAS1, llamado Givosiran.

Givosiran se administra por vía subcutánea, disminuye los niveles de ALA y PBG a las 24 horas, mantiene el efecto durante 1 mes y disminuye los síntomas y la frecuencia de ataques agudos de porfiria aguda intermitente (39,45). El Givosiran está conjugado con un ligando trivalente de N-acetilgalactosamina, que se une específicamente al receptor de asialoglicoproteína de los hepatocitos (45). ENVISION fue un ensayo clínico fase 3, doble ciego, controlado con placebo y aleatorizado, que comparó Givosiran subcutáneo mensual 2,5 mg/kg frente a placebo durante 6 meses (45). Al comienzo del estudio, 27% de los pacientes eran hipertensos y 34% tenían FGe<60 ml/min/1,73m². Tras los 6 meses, hubo un descenso del 74% en la tasa media anualizada de ataques agudos de porfiria en el grupo del Givosiran (definido como hospitalización, visita médica urgente o administración intravenosa de hemina en casa) ($p<0,001$) (45). Durante el período de intervención, la mediana de los niveles urinarios de ALA disminuyó un 86%, de

20±16,8 a 4,0±2,4 mmol/mol de creatinina (media ± DE niveles normales 0,539±0,3 mmol/mol de creatinina (46) y límite superior de la normalidad 3,8 mmol/mol de creatinina (47) y de PBG un 91%, de 50,4±34,3 a 12,9±4,6 mmol/mol de creatinina (media ± DE niveles normales 0,0281±0,0238mmol/mol de creatinina (46) y límite superior de la normalidad 1,5 mmol/mol de creatinina (47), ambos con $p<0,001$ frente a placebo (45). Los efectos adversos renales se reportaron en 7 (15%) pacientes en el grupo del Givosiran vs 3 (7%) pacientes en placebo, siendo la mayoría un aumento de creatinina o reducción del filtrado glomerular. De éstos, 5 (10%) pacientes en el grupo del Givosiran presentaron inicio o empeoramiento de su ERC frente a 1 en el grupo placebo. Dos pacientes del grupo del Givosiran que tuvieron empeoramiento de su ERC y fueron clasificados como efectos adversos graves, se sometieron a biopsia renal cuyo resultado era concordante con sus comorbilidades (hipertensión y PAKD) (45). En el estudio se evidenció un ascenso de las cifras de creatinina desde fases tempranas que fueron generalmente reversibles con el tiempo sin modificar las dosis de Givosiran (45). No queda clara la causa de la señal de seguridad de ERC del Givosiran, pero podría deberse a una acumulación en los túbulos renales, ricos en mitocondrias, favoreciendo niveles subóptimos de ALAS1, siendo los túbulos proximales los más afectados. Futuras investigaciones podrían incluir la medición del FGe, para excluir un efecto funcional sobre el transporte tubular de creatinina, y una evaluación de las consecuencias de la deficiencia de ALAS1 en los túbulos renales en condiciones de estrés similares a las de pacientes con porfiria aguda intermitente debido a la ERC subyacente y la sobrecarga de hierro (48).

8. Colistina

La colistina, también llamada polimixina E, es un antibiótico de la familia de la polimixina, aislado del *Bacillus polymyxa* var *Colistinus*. Las polimixinas tienen una ventana terapéutica muy estrecha, siendo su principal limitación la nefrotoxicidad produciendo FRA, lo que hizo que cayera en desuso (12,13). Últimamente ha vuelto a cobrar relevancia dado el aumento de infecciones por bacterias multirresistentes y la ausencia de nuevas terapias antibióticas, por lo que es la principal opción de tratamiento en infecciones por bacterias multirresistentes Gram negativas (13). Los pacientes que desarrollan FRA tienen más incidencia de ERC en el futuro, de ahí que disminuir la nefrotoxicidad tenga implicaciones a corto y largo plazo (12). Actualmente, no existen terapias apropiadas para evitarla, por lo que generalmente no se consigue la dosis terapéutica óptima y/o se tiene que interrumpir el ciclo antibiótico, facilitando la aparición de más resistencias (13).

Colistina es un heptapéptido cíclico con una cadena lateral tripeptídica acilada en su extremo aminoterminal por un ácido graso (13). A nivel clínico se usan dos formas: colistina sulfato y colistimetato de sodio (CMS; un prófarmaco no activo, menos nefrotóxico, que se transforma en colistina endógenamente) (49). Cada miligramo de CMS corresponde a 12.500 UI de CMS, y cada 2,67 mg de CMS contienen 1 miligramo de actividad de colistina base (CBA), pero para simplificar las unidades se estima que 1.000.000 UI de CMS equivale a 80 mg de CMS y a aproximadamente 33 mg de CBA (49,50).

La colistina ejerce su efecto bactericida principalmente disruptiendo la membrana celular de las bacterias Gram negativas, interaccionando con el lipopolisacárido (LPS) y aumentando la permeabilidad de membrana, lo que produce una fuga del contenido celular activando las vías de muerte celular (13). Otras posibles hipótesis son la neutralización del LPS o la inhibición de la respiración bacteriana. La Figura 8 representa el manejo renal de la colistina.

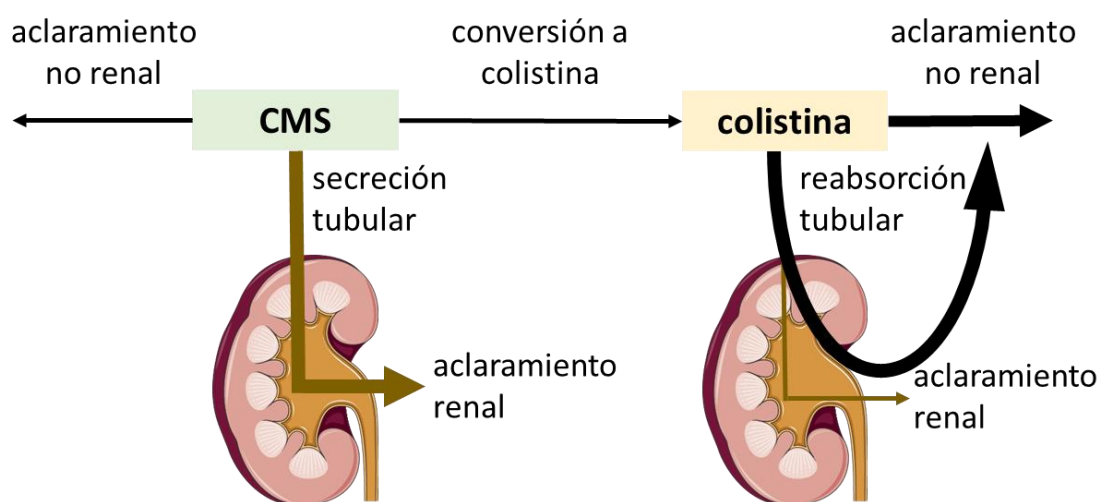


Figura 8. Representación esquemática de la disposición renal de CMS y de colistina. La gran reabsorción de colistina desde el filtrado glomerular a los capilares peritubulares expondría a las células tubulares a una alta concentración intracelular de estas moléculas. La secreción neta tubular de CMS desde el capilar peritubular a la luz tubular a través de las células epiteliales tubulares podría resultar en una conversión intracelular de CMS a colistina, potenciando la exposición de estas células a colistina. Teniendo en cuenta que la colistina necesita actuar desde la vertiente intracelular para generar daño en la membrana celular, el transporte transcelular de colistina facilita este acceso y, por tanto, el daño celular tubular. El grosor de la flecha se corresponde con la magnitud del proceso. CMS: colistimetato de sodio. Adaptado de (51).

La extrema nefrotoxicidad hizo que la colistina cayese en desuso, ya que se asociaba principalmente con la dosis, pero también con la duración de la administración y las concentraciones plasmáticas (12). La mediana de tiempo hasta desarrollar FRA es de 3 días (49). En los últimos años, el aumento en la incidencia de infecciones por bacterias multirresistentes

ha hecho necesario su uso, principalmente en *Staphylococcus aureus* meticilin-resistente, enterococos vancomicin-resistentes y algunos bacilos Gram negativos (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, familia *Enteobacteriaceae*) (13,50).

Múltiples regímenes de administración se han propuesto para disminuir la nefrotoxicidad sin evidenciar una clara reducción de la incidencia de FRA (12). En base a las concentraciones mínimas inhibitorias de los microorganismos y el riesgo de FRA, la concentración plasmática media objetivo en equilibrio estacionario debe ser 2 mg/L de colistina (50). Las últimas guías de administración de polimixinas del año 2019 recomiendan administrar una dosis de carga intravenosa de 300 mg de colistina sulfato (aproximadamente 9 millones de UI de CMS) y, tras 12-24 horas, administrar la primera dosis de mantenimiento (50). En pacientes con función renal normal, la dosis de mantenimiento diaria debería ser 300-360 mg de colistina sulfato (9-10,9 millones de UI de CMS) divididas en dos dosis administradas en períodos de 12 horas, monitorizando la función renal y ajustando la dosis acorde a ella (Tabla 2) (50).

Tabla 2. Equivalencia de las dosis de colistina según sus presentaciones. CBA: actividad de colistina base; CMS: colistimetato de sodio. Adaptada de (50).

Dosis diaria de CMS para concentración plasmática media en estado estacionario de colistina de 2 mg/L		
Aclaramiento Cr (ml/min)	mg CBA/día	Millones UI CMS/día
0	130	3,95
5-<10	145	4,40
10-<20	160	4,85
20-<30	175	5,30
30-<40	195	5,90
40-<50	220	6,65
50-<60	245	7,40
60-<70	275	8,35
70-<80	300	9,00
80-<90	340	10,3
≥90	360	10,9

La colistina produce necrosis tubular proximal aguda de forma dosis dependiente (13). La incidencia de NTA varía según estudios que usan diferentes criterios para definirlo (12,13). El uso de los criterios KDIGO para definir un FRA facilitarían la comparación. Otro factor de confusión son los diferentes regímenes de administración usados. Dada la ausencia de datos precisos sobre su farmacocinética y farmacodinámica se generan, en muchos casos, dosis infraterapéuticas. Sin embargo, en aquellos casos en los que se aumenta la dosis intentando alcanzar la actividad mínima bactericida, se registra nefrotoxicidad en hasta un 44%, impidiendo su uso (13).

En un estudio retrospectivo de 249 pacientes tratados con colistina intravenosa, la incidencia de FRA según criterios KDIGO fue 12% y 29% a los 2 y 7 días, respectivamente, tras el inicio del tratamiento, llegando a requerir TRS un 7% de los pacientes (52). En un análisis retrospectivo de 298 pacientes tratados con CMS intravenosa durante al menos 48 horas, un 46,3% (138/298) desarrolló FRA: 37,7% estadio 1, 23,9% estadio 2 y 38,4% estadio 3. Los principales predictores

de FRA fueron la edad >75 años, la presencia de ERC previa y el uso concomitante de fármacos vasopresores. Los factores predictores de la gravedad del FRA fueron la hipoalbuminemia, el uso de fármacos vasopresores y la duración del tratamiento con colistina >7 días. Sin embargo, el riesgo de FRA por colistina empezó a aumentar tras 2 días de tratamiento, y fue mayor a mayor duración. La presencia de FRA fue un factor de riesgo de mortalidad, siendo mayor en aquellos con FRA estadio 2 y 3 frente a estadio 1 (53).

8.1. Mecanismos de la nefrotoxicidad por colistina

La nefrotoxicidad por colistina disminuye el filtrado glomerular y causa proteinuria tubular, cilindruria (presencia de cilindros en la orina) y oliguria (disminución del volumen de orina). En los estudios histológicos de riñones de ratas tras 7 días de tratamiento con colistina se observó dilatación tubular, vacuolización y necrosis del epitelio celular con numerosos cilindros, pero sin datos de respuesta inflamatoria o cicatrización fibrosa (13).

Inicialmente se atribuyó la patogenia a su efecto detergente sobre la membrana celular. Sin embargo, investigaciones recientes indican que es necesario la acumulación intracelular del antibiótico y que la mitocondria puede ser una diana primaria del daño celular (13).

Teoría del detergente: la colistina, principalmente en su forma de colistina sulfato, interactúa con las cargas aniónicas de los fosfolípidos desestabilizando la membrana. Al igual que ocurre con las bacterias, la interacción colistina-fosfolípido aniónico debería producir la muerte celular en células eucarióticas. Las membranas celulares son ricas en fosfolípidos aniónicos, sin embargo, en las bacterias las cargas aniónicas quedan expuestas al medio extracelular mientras que en las células eucariotas quedan expuestas al medio intracelular, por lo que un prerrequisito para esta teoría sería la entrada de la colistina dentro de la célula, donde tendría acceso directo a la región aniónica (Figura 9) (13).

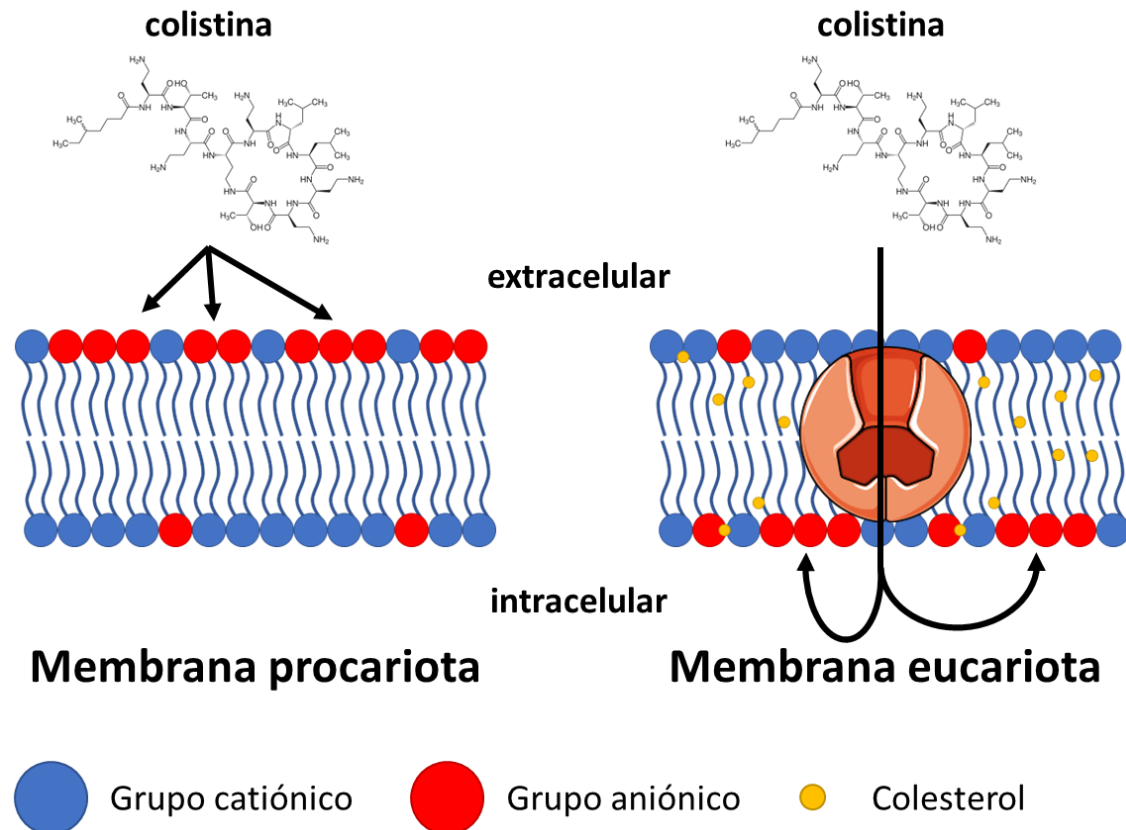
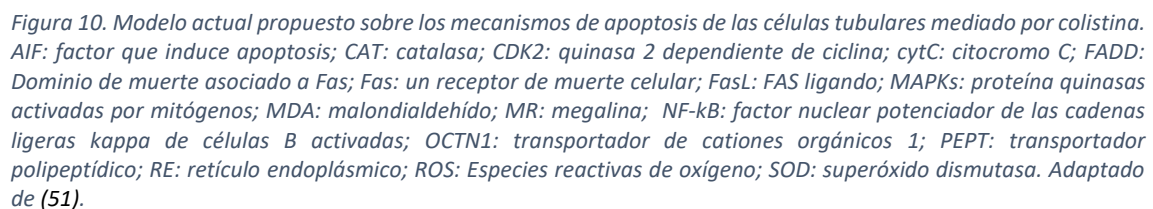


Figura 9. Composición lipídica y distribución de las cargas aniónicas de la membrana plasmática en procariotas y eucariotas. Los fosfolípidos cargados negativamente se expresan en la cara externa de las membranas procariotas y en la interna de las eucariotas, por lo que la colistina tiene que entrar en la célula eucariota a través de algún transportador para dañar la membrana. El colesterol, constituyente de las células eucariotas, estabiliza y protege la membrana de la actividad detergente de la colistina. Adaptado de (13).

Transporte de colistina al interior de la célula: las células epiteliales tubulares expresan múltiples transportadores, a nivel basolateral o en el reborde en cepillo, que son la ruta de entrada de muchos fármacos. La colistina es reabsorbida principalmente por endocitosis (megalina) y por dos transportadores: PEPT2 y OCTN2 (13,54). De ahí que el túbulo proximal, rico en estos transportadores, sea tan sensible a la toxicidad por colistina.

Efecto intracelular de colistina: diversos estudios indican un posible efecto sobre el estrés mitocondrial y del retículo endoplásmico (12,13). La morfología mitocondrial cambia de su forma filamentosa a una forma fragmentada tras exponerse a colistina (12). Este cambio conformacional genera una pérdida del potencial de membrana, aumenta la producción de superóxido, llevando a potenciar el daño mitocondrial y activar la apoptosis suprimiendo moléculas antiapoptóticas (vg Bcl2) y aumentando o activando las proapoptóticas (Bax, FAS, FAS ligando (FasL) y dominio de muerte asociado a Fas (FADD), Grp78/Bip, ATF6, GADD153/CHOP y caspasa 12) (12,13). La mitocondria presenta una membrana externa y una interna, que

delimitan el espacio intermembranoso. La composición de la membrana externa es similar a la membrana celular mientras que la membrana interna es similar a la membrana procariota, dado el origen endosimbiótico de la mitocondria (55). Es muy posible que estas teorías patogénicas estén anticuadas, dado que en la actualidad se piensa que la necrosis programada tiene un papel más relevante en el FRA que la apoptosis y un impacto sobre la necrosis programada, vía lesión mitocondrial de la cara interna de la bicapa lipídica de la membrana celular, sería más plausible dados los hallazgos histológicos y el papel fundamental de la disrupción de la membrana celular en su mecanismo de acción antibacteriano. Dado que la colistina inhibe la respiración celular en bacterias Gram positivas y negativas, podría ejercer un efecto similar en mitocondrias de células eucariotas (13). Además, la autofagia, proceso encargado de eliminar las organelas y proteínas dañadas, disminuye. Esto limita las posibilidades de eliminar mitocondrias dañadas, empeorando el control del daño celular (Figura 10) (12).



40

Múltiples compuestos se han testado in vivo en animales con relativa eficacia, pero en humanos, solo el ácido ascórbico y la vitamina E (Alfa-tocoferol) se han probado sin evidencias de disminuir el daño, a pesar de que ambos son potentes antioxidantes y que el ácido ascórbico puede reemplazar al NADH como un donante de electrones en la cadena respiratoria (13,57). Esta observación no sorprende, dado el fracaso de terapias antioxidantes en múltiples condiciones humanas después de reportarse datos positivos en animales. Otro posible factor protector sería la melatonina. Se comenzó un ensayo clínico (Clinicaltrials.gov NCT03725267) para evaluar el efecto de la melatonina en la toxicidad por colistina que tuvo que parar el reclutamiento debido a la pandemia COVID19.

9. PEPT2 (*SLC15A2*)

9.1. ¿Qué es PEPT2?

La familia *SLC15* está formada por dos transportadores: PEPT1 (codificado por *SLC15A1*) y PEPT2 (codificado por *SLC15A2*). Ambos son cotransportadores H⁺/péptido que, además de captar di- y tripéptidos, intervienen en la farmacocinética y farmacodinámica de varios fármacos peptídicos o con estructuras péptido-like como los antibióticos β-lactámicos (58). PEPT1 se localiza principalmente a nivel intestinal, representando un transportador de alta capacidad, pero poca afinidad, mientras que PEPT2 se localiza a nivel renal siendo un transportador de baja capacidad, pero de alta afinidad (59). Al principio, la función del PEPT2 como recaptador de di-/tripéptidos fue recibida con escepticismo, dada la baja concentración de estas moléculas en el plasma. En cambio, los oligopéptidos que se filtran por el glomérulo son rápidamente hidrolizados por peptidasas. Esto, junto con la reabsorción tubular proximal del 60% del agua filtrada, aumenta la concentración de di-/tripéptidos en la luz tubular muy por encima de la del plasma (60). De aquí en adelante nos centraremos en el transportador PEPT2.

9.2. Estructura y función de PEPT2

PEPT2 media un transporte activo acoplado a un protón y, usando el gradiente electroquímico de este último, transporta di- y tripéptidos en contra de gradiente de sustrato (5,61), incluyendo péptidos zwitteriónicos, aniónicos y catiónicos, así como fármacos péptido-like. Dada la

necesidad de un H^+ para el transporte, a nivel renal hay una asociación funcional del transportador PEPT2 con NHE1 y/o NHE2 (Figura 11) (61).

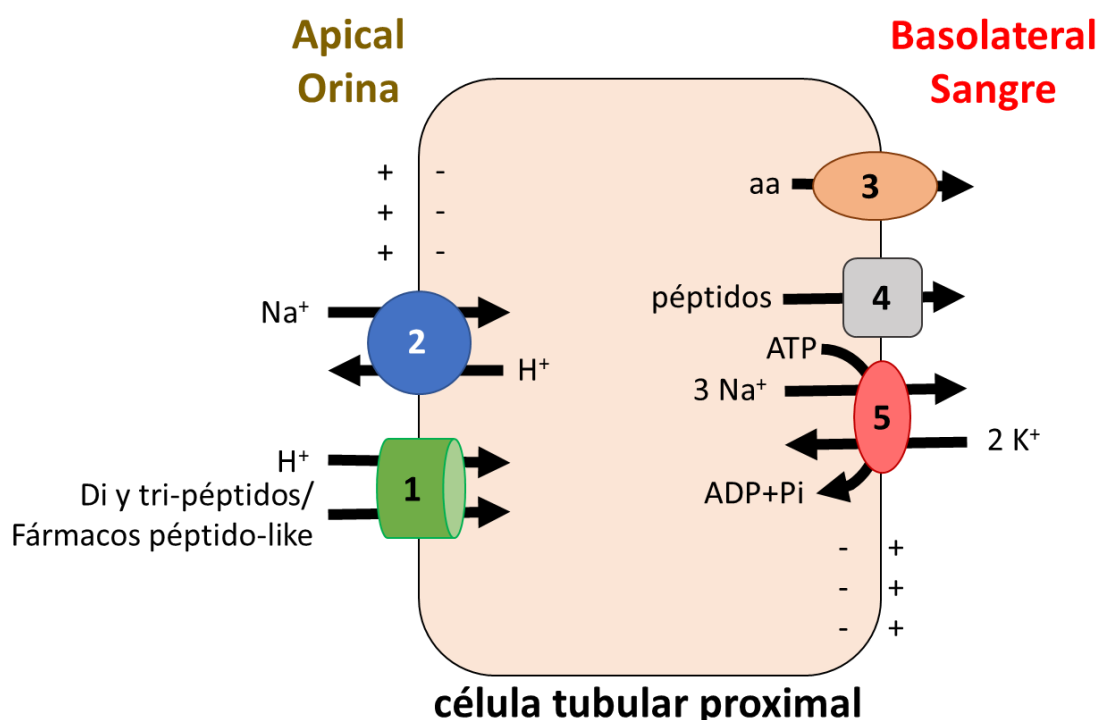


Figura 11. Localización y relación del transportador PEPT2 con otros transportadores en el túbulo renal proximal. Membrana apical: 1. PEPT2; 2. Antiportador Na^+/H^+ . Membrana basolateral: 3. Aproximadamente 9 transportadores diferentes de aminoácidos; 4. Transportador de péptidos; 5. Na^+-K^+ ATPasa. aa: aminoácidos; ADP: adenosin difosfato; ATP: adenosin trifosfato; Pi: fósforo inorgánico. Adaptado de (60).

PEPT2 tiene 729 aminoácidos con diversos sitios de glicosilación y fosforilación (58). Su estructura tridimensional ha sido determinada por AlphaFold, un sistema de inteligencia artificial capaz de predecir las estructuras proteicas. La Figura 12 muestra la localización de PEPT2 en el riñón y su topología esquemática. La Figura 13 muestra una representación esquemática del transportador PEPT1, como modelo aplicable al resto de transportadores de péptidos humanos, destacando diferentes aminoácidos esenciales para la función del transportador o que modifican la afinidad por sustrato o la dependencia del pH. La Figura 14 y Figura 15 muestran la estructura tridimensional de PEPT2, cuya región más importante es aquella orientada hacia el exterior, que es la responsable de la captura de péptidos y fármacos desde el lado extracelular de la membrana y, por tanto, la que tiene importancia para el desarrollo de fármacos (5).

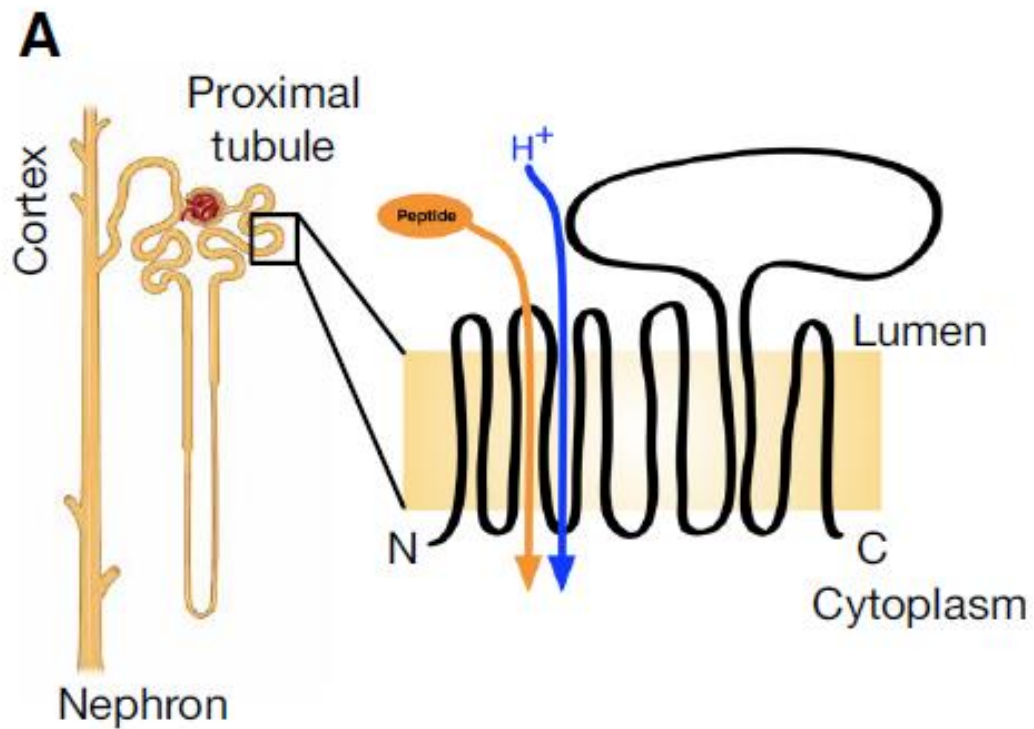


Figura 12. PEPT2: su localización en el riñón y su topología esquemática. De (5).

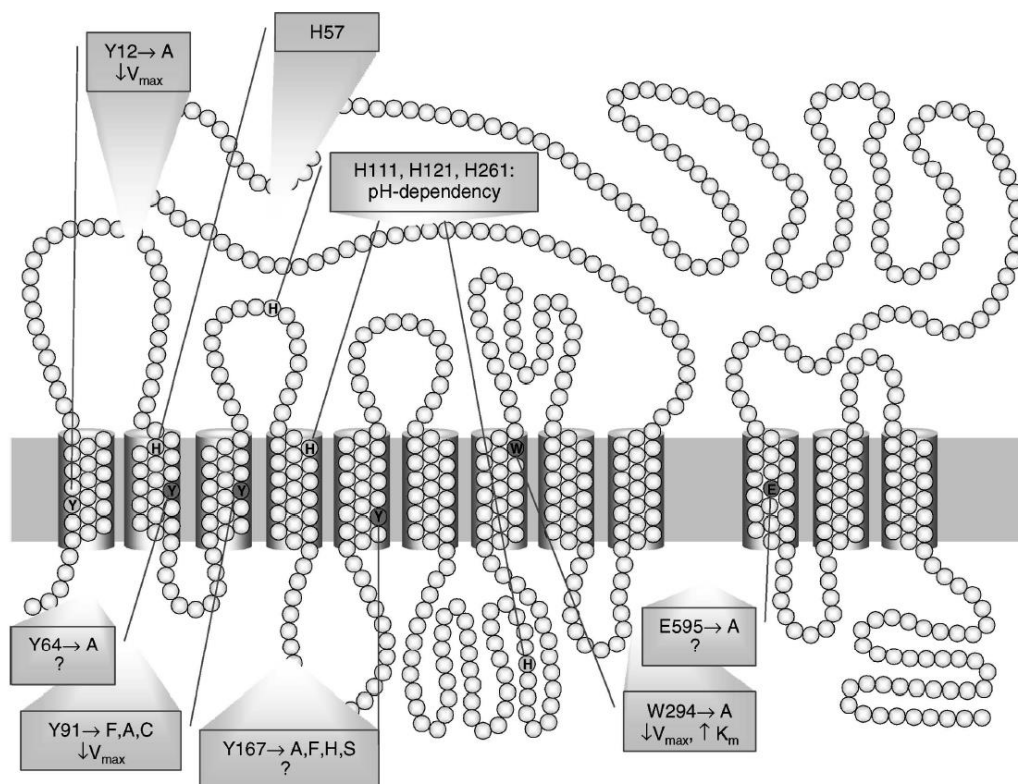


Figura 13. Representación esquemática de los dominios transmembrana de PEPT1 donde se muestran los aminoácidos esenciales para diferentes funciones, modulando la afinidad por sustrato o la dependencia del pH. Este modelo es aplicable al resto de transportadores de péptidos humanos. De (61).

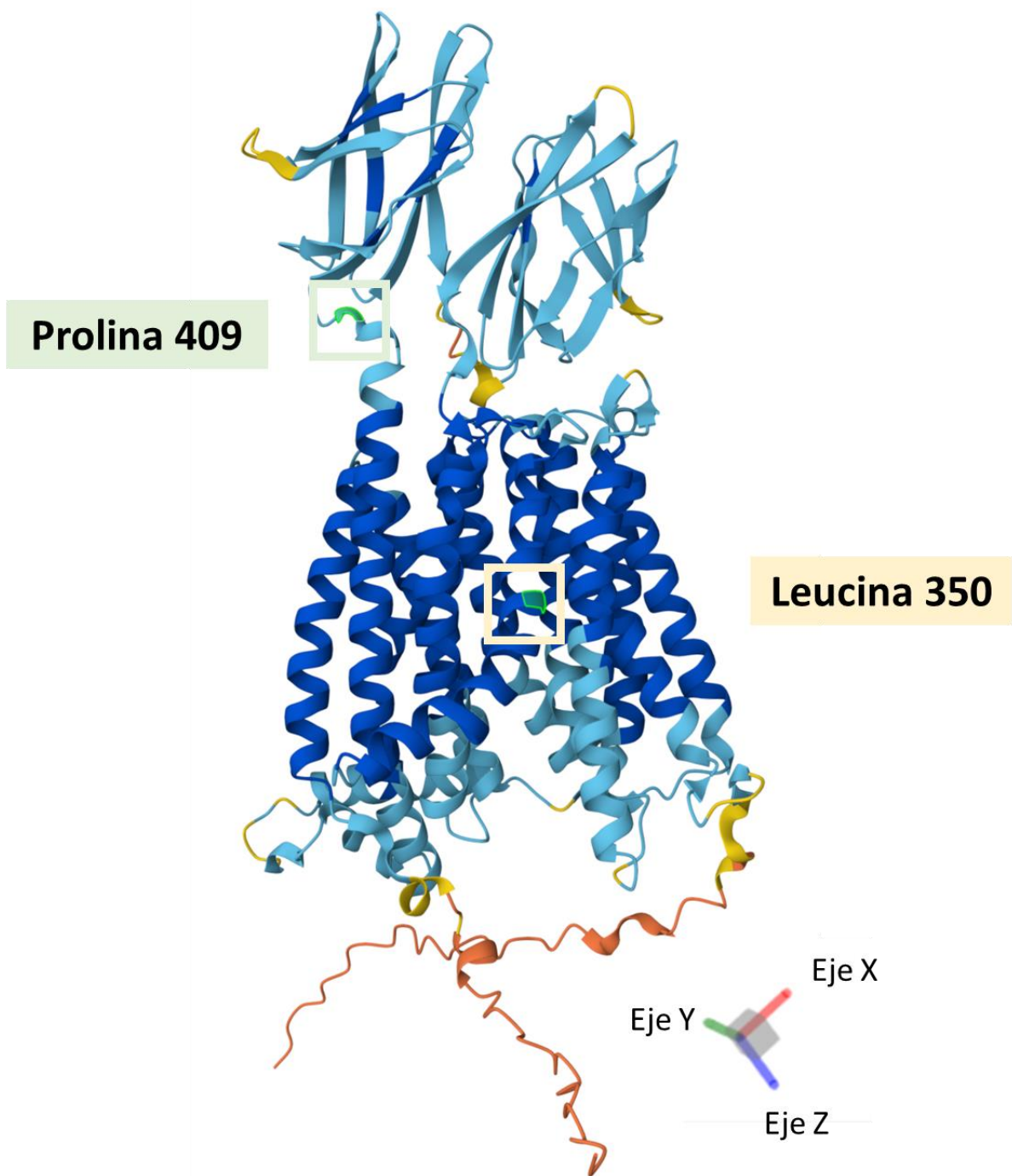


Figura 14. Estructura tridimensional del transportador PEPT2, destacando los aminoácidos leucina 350 y prolina 409, cuya modificación da lugar a las dos variantes de PEPT2. De (62), acceso agosto/2024.

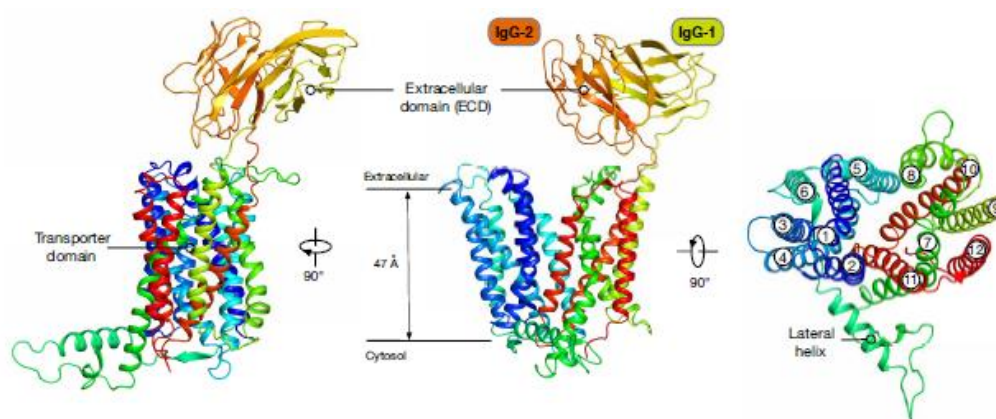


Figura 15. Representación de PEPT2, destacando el dominio transmembrana (transportador) y el dominio extracelular compuesto por dos dominios IgG en tándem. De (5).

En ratas (*R. norvegicus*), su estructura (RnPEPT2) ha sido analizada por microscopía crioelectrónica y es similar a la humana (5). Contiene 2 dominios: uno transmembrana (TM), compuesto por 12 hélices, que reconoce a los péptidos y protones, y otro extracelular entre TM9 y TM10 (Figura 12). Las hélices TM1 a TM6 conforman el grupo N-terminal y las hélices TM7-TM12 el grupo C-terminal. El dominio extracelular está formado por dos dominios de inmunoglobulina G conectadas en tándem y que asientan directamente sobre la zona C-terminal (5). Este dominio solo se une por un puente de hidrógeno al dominio transportador, de la arginina 553 a la cadena lateral carbonilo (backbone carbonyl group) de la asparagina 328 del TM7, el cual tiene un gran loop que se extiende horizontalmente desde el transportador antes de conectar con TM8 (5). Funcionalmente, se cree que el dominio extracelular se une a la tripsina extracelular (a través del aspartato 576 y glutamato 599), localizando la proteasa cerca del dominio TM para aumentar la eficiencia del transporte de péptidos catiónicos (5). Este dominio extracelular es flexible, pudiendo moverse, capturando proteasas, ya que no tiene ningún contacto substancial con el dominio TM y está unido mediante extensiones flexibles desde el TM9 y TM10 (5). En la cara citosólica, entre el grupo N- y C-terminal, hay un dominio intracelular de 42 aminoácidos con una hélice alfa que sale del transportador en un ángulo de 90°, al final de la cual hay dos cadenas laterales de arginina que ayudan a estabilizar este dominio a la cara intracelular de la membrana (5). Este dominio también interactúa con TM7, una de las hélices clave en la entrada, y se asienta cerca de la zona C-terminal del TM12. Por tanto, interacciones con este dominio pueden influir en la estabilidad del TM7 y afectar a la dinámica de entrada del transportador (Figura 15) (5). En cambio, los residuos de histidina parecen jugar un papel en la dependencia del pH (61).

PEPT2 adopta una conformación abierta hacia el exterior, dejando una cavidad de aproximadamente 37 angstrom desde el lado extracelular hacia la entrada intracelular. Esta puerta intracelular está construida por las zonas citoplásmicas de TM4, TM5, TM10 y TM11 (5). En cambio, la entrada extracelular está conformada por TM1, TM2, TM7 y TM8. La histidina 87 del TM1 forma un puente salino con la asparagina 317 del TM7, la cual realiza el cierre de la entrada extracelular tras la unión del protón y del péptido (5).

Cuando los péptidos entran en la cavidad dipolar, suelen adoptar una posición similar con interacciones similares. La parte N-terminal de los péptidos interacciona con el glutamato 622 de TM10 y, a través de puentes de hidrógeno, con dos asparaginas: Asn 192 del TM5 y Asn 348 de TM8. En el lado opuesto, las zonas C-terminales interaccionan con la arginina 57, que forma parte del motivo ExxER57 de TM1. Tanto la arginina 57 como el glutamato 622 son funcionalmente críticos en el mecanismo de transporte de péptidos y protones, y variaciones de ambos aminoácidos abolen el transporte, tanto en los transportadores de bacterias como de mamíferos (5). Además, los péptidos proyectan su grupo carbonilo N-terminal hacia la asparagina 192, lo que les permite posicionar su cadena lateral hacia el punto de unión de la entrada, facilitando las posteriores interacciones entre la zona N-terminal y las asparaginas 192 y 348 y el glutamato 622. Por tanto, un determinante de la afinidad del PEPT2 por los péptidos es la presencia de un grupo carbonilo cerca del N-terminal, ayudando a estabilizar las interacciones de la región N-terminal de los ligandos (5).

El cambio conformacional de la entrada exterior hacia la interior comienza cuando la región N-terminal del péptido entra y se une al ácido aspártico 317 del TM7. Después, se mueve hacia el interior saltando del ácido aspártico 317 al glutamato 622 del TM10. En esta posición, dada la característica dipolar de la cavidad, orienta su región C-terminal hacia la arginina 57, que forma parte del motivo ExxER (5). Una vez unido, las regiones TM1 y TM2 se acercan a TM7 y TM8, cerrando la entrada extracelular y estabilizando la interacción entre la histidina 87 y el ácido aspártico 317. En este estado cerrado, el protón de la histidina 87 se transfiere al glutamato 622 a través del ácido aspártico 317. Al unirse el protón al glutamato 622, rompe la unión con la zona N-terminal del péptido. Posteriormente, la protonación del motivo ExxER lleva a la disrupción de las interacciones con lisina 127 que mantiene a TM4 y TM5 en su sitio, permitiendo que se separen y se libere el péptido y los protones hacia el interior (Figura 16) (5). El tiempo que tarda en reiniciarse este ciclo es el principal paso limitante para el transporte (63).

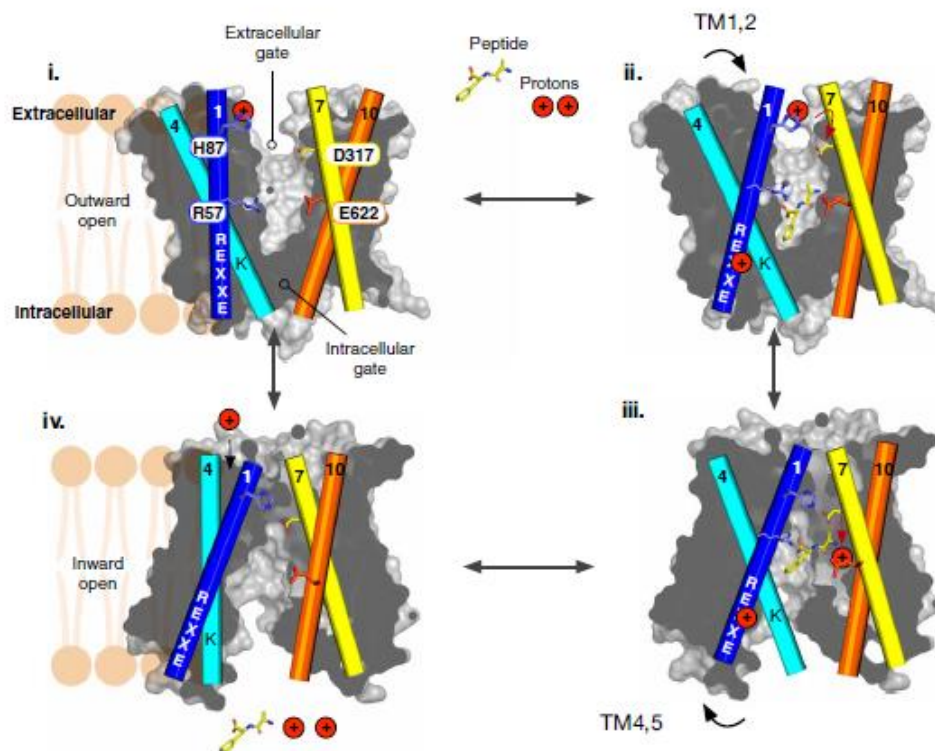


Figura 16. Representación esquemática del ciclo de transporte del PEPT2 detallado en el texto. De (5).

9.3. Sustratos

Se estima que PEPT2 reconoce 300-400 dipéptidos y más de 7000 tripéptidos, siendo uno de los transportadores proteicos más promiscuos identificados (64). Varias características parecen estar relacionadas con la afinidad por PEPT2: un grupo amino N-terminal libre, una alta densidad de electrones alrededor del grupo carboxílico en dipéptidos o alrededor del grupo carbonilo del segundo aminoácido en tripéptidos, una alta densidad de electrones en la primera y tercera cadena lateral, así como la presencia de cadenas laterales hidrofóbicas y la presencia de un grupo α - o β -amino carbonilo (58,65). Estas características clave que determinan la afinidad por PEPT2 están mostradas en la Figura 17 (61).

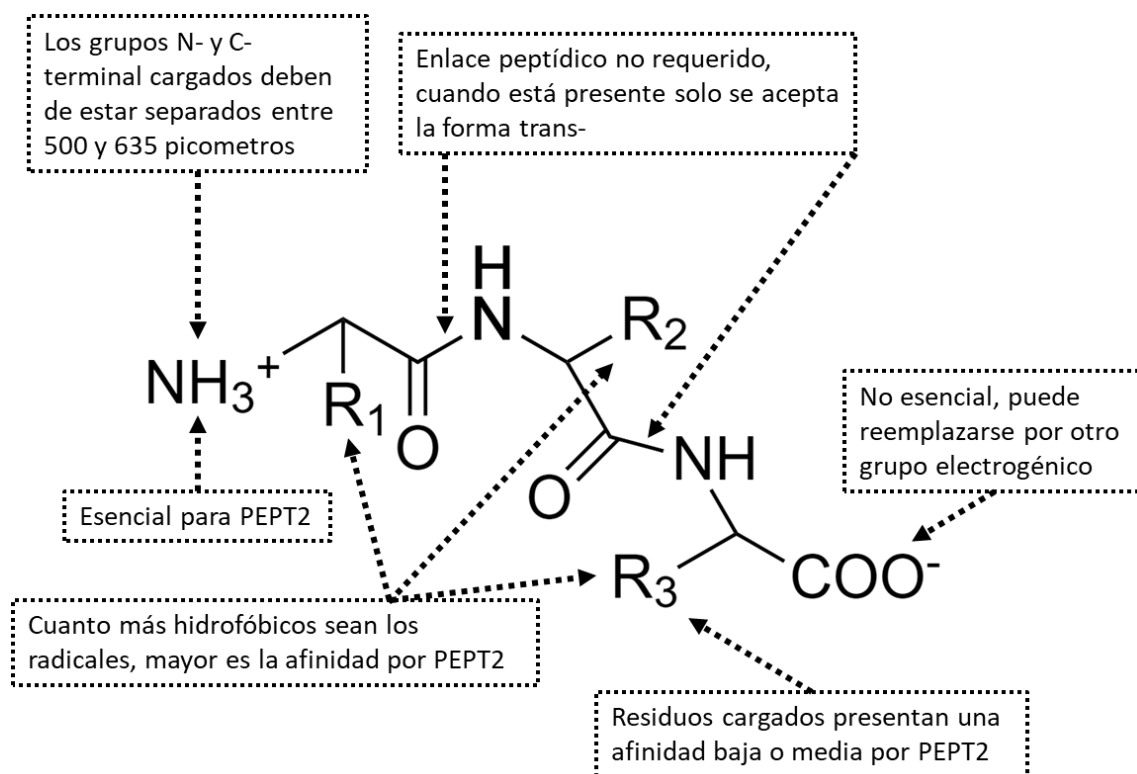


Figura 17. Características clave necesarias para el reconocimiento de péptidos por PEPT2. Adaptado de (61).

Dado que PEPT2 tiene una gran variedad de sustratos, entre ellos muchos fármacos, variaciones en su capacidad funcional influirán en el aclaramiento renal de sus sustratos. Por ejemplo, en ratones knock-out (KO) para PEPT2, las concentraciones plasmáticas de ALA y cefadroxilo son más bajas que en ratones normales (wild-type; WT) (66). Los ratones KO eliminaron más glicina y cistina en orina, posiblemente derivado del metabolismo de cys-gly, un producto de degradación de la gamma-glutamyl-cisteinil-glicina (67). La Tabla 3 muestra la gran variedad de sustratos del PEPT2.

Tabla 3. Algunos de los sustratos que reconoce el transportador PEPT2, agrupados por familias. ALA: ácido delta aminolevulínico; Cremophor EL[®]: CrEL; Lys[Z(NO₂)]-Lys[Z(NO₂)]: Lisil[Z(NO₂)]-Lisil[Z(NO₂)]; Solutol HS15[®]: SOL o macrogol 15 hidroxistearato; Tween 20[®]: Tw20 o polisorbato 20; Tween 80[®]: Tw80 o polisorbato 80. Ref: (60,61,68–81).

Sustratos	Competidores no transportables
Antibióticos Betalactámicos: - Ácido 6 aminopenicilánico - Ácido 7-aminocefalosporánico - Acidocilina - Amoxicilina	

○ Ampicilina ○ Bencilpenicilina ○ Cefaclor ○ Cefadroxilo ○ Cefalexina ○ Cefaloglicina ○ Cefaloridina ○ Cefalotina ○ Cefamandol ○ Cefamicina C ○ Cefapirina ○ Cefdinir ○ Cefepime ○ Cefixima ○ Cefmetazol ○ Cefodizime ○ Cefotaxima ○ Cefoxitina ○ Cefpirome ○ Cefpodoxima ○ Cefradina ○ Cefroxadina ○ Cefsulodin ○ Ceftazidima ○ Ceftibuten ○ Ceftriaxona ○ Cefuroxima ○ Ciclacilina ○ Cloxacilina ○ Dicloxacilina ○ Flucoxacilina ○ Metampicilina ○ Moxalactam ○ Oxacilina ● Polipectídicos: ○ Actinomicina ○ Polimixina B ○ Colistina	
Inhibidores del enzima convertidor de angiotensina: ● Quinapril ● Fosinopril ● Captopril ● Ramipril ● Lisinopril	Inhibidores del enzima convertidor de angiotensina: ● Enalapril
Antitumorales: ● Bestatina	Antagonistas del receptor de angiotensina 2: ● Losartan ● Irbesartan ● Valsartan ● Eprosartan

Otros: • ALA • Carnosina • Melatonina • Ciclo-trans-4-L-hidroxi-prolil-L-serina (JBP485)	Otros: • Alafosfalina • Lys[Z(NO₂)]-Lys[Z(NO₂)]
Antivirales: • Valaciclovir • Valganciclovir • Entecavir	Antivirales: • Aciclovir
Excipientes farmacológicos (inhiben): • Tween 20® • Tween 80® • Solutol HS15® • Cremophor EL®	Antidiabéticos orales: • Glibenclamida • Nateglinida

9.4. Distribución tisular

PEPT2 se expresa principalmente en el túbulo proximal renal. En el riñón de rata, PEPT2 se expresa principalmente, pero no exclusivamente, en la pars recta, pero no se encontró en otras regiones de la nefrona y recapta el 85% de los péptidos filtrados (59,66,67). PEPT2 se expresa también en astrocitos, células subependimales, ependimales y epiteliales del plexo coroideo de ratas, en la región en contacto con el líquido cefalorraquídeo (donde ayuda a eliminar moléculas desde el líquido cefalorraquídeo hacia el exterior del SNC, como en la intoxicación por plomo donde está aumentada la síntesis de ALA intracerebral y PEPT2 ayuda a excretar el exceso de ALA (43,61,82), en el pulmón (neumocitos alveolares tipo II, epitelio bronquial y endotelio de pequeños vasos) (83), y en macrófagos residentes del sistema nervioso entérico, bazo y glándula mamaria (58,59) (Figura 18).

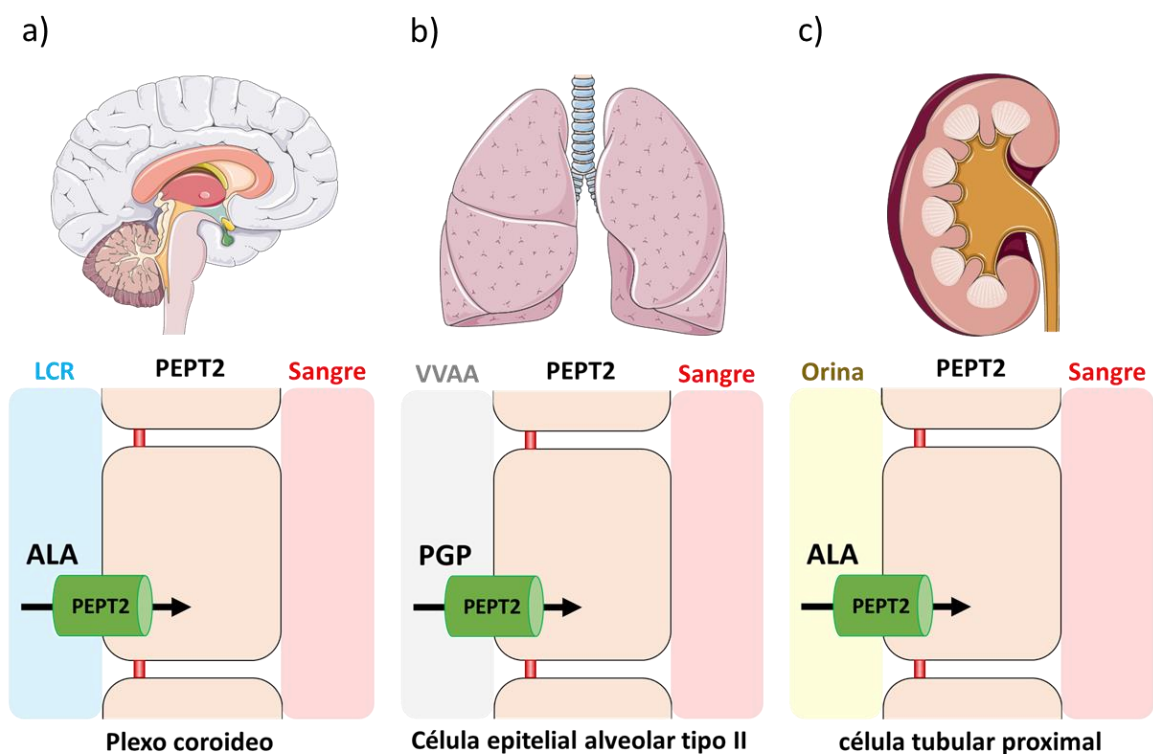


Figura 18. Distribución tisular de PEPT2. a) La expresión a nivel cerebral tiene relevancia en células epiteliales del plexo coroideo donde se expresa en la región en contacto con el líquido cefalorraquídeo (LCR), extrayendo moléculas. En este caso representamos ALA (82). b) A nivel pulmonar se expresa, entre otras células, en la célula epitelial alveolar tipo II, extrayendo la matriquina prolina-glicina-prolina (PGP) de las vías aéreas (VVAA), modulando la inflamación local por otros estímulos (83). c) Expresión de PEPT2 a nivel renal, principalmente en el túbulo renal proximal (59).

9.5. Variantes génicas de PEPT2

El gen *SLC15A2*, que codifica PEPT2, está localizado en el locus 3q13.3-q21 con 22 exones (58,66). El análisis de haplotipos detectó dos variantes alélicas principales: PEPT2*1 y PEPT2*2, distribuidas de forma muy similar en población blanca, aproximadamente 44% y 47%, respectivamente (43). Están caracterizados por dos SNPs no sinónimos muy frecuentes que se encuentran en un casi completo desequilibrio de ligamiento, es decir, se transmiten juntos (43), que son rs2257212 en el que hay una sustitución C/T en el exón 13, llamado p.Leu350Phe c.1048 C>T; y rs1143671, donde hay otra sustitución C/T en el exón 15 llamado p.Pro409Ser c.1225 C>T (Tabla 4) (43). Dado que se transmiten en desequilibrio de ligamiento, la variante PEPT2*1 presenta las sustituciones C/C y contiene los aminoácidos Leucina 350 y Prolina 409, presentando más afinidad por los sustratos, pero con misma V_{max} , siendo ésta la variante de alto riesgo para el desarrollo de ERC en la porfiria aguda intermitente (43,84). En cambio, la variante PEPT2*2 presenta las sustituciones T/T, contiene los aminoácidos Fenilalanina 350 y Serina 409, tiene menor afinidad y, por tanto, menor riesgo de desarrollar ERC en la porfiria aguda

intermitente (Tabla 4) (43,84,85). Además, ambas variantes presentan también diferente sensibilidad al pH extracelular (61). La variante PEPT2*1 presenta mayor recaptación de sustratos a un pH extracelular de 6,0 en comparación con la variante PEPT2*2, mientras que no hubo diferencias entre ambas variantes a pH 5,5, 6,5 y 6,8 (84).

*Tabla 4. Variantes de la secuencia de PEPT2. Se muestran posiciones del exón 13 y 15 con las diferentes bases y el aminoácido resultante. La variante PEPT2*1 presenta una C en ambas posiciones (C/C), con el resultado de Leucina 350 y Prolina 409, mientras que la variante PEPT2*2 presenta una T en ambas posiciones (T/T), con el resultado de Fenilalanina 350 y Serina 409. El código de colores resume su asociación con afinidad por sustrato y riesgo de ERC en la porfiria aguda intermitente (alta afinidad y alto riesgo en rojo, baja afinidad y bajo riesgo en verde). De (85), acceso mayo/2022*

Posición cromosoma	Posición mRNA	Exón	dbSNP rs# cluster id	Posición aminoácido	Alelo dbSNP	Aminoácido
121924957	1085	13	rs2257212	350	G	Valina (V)
					T	Fenilalanina (F)
					C	Leucina (L)
121928439	1262	15	rs1143671	409	G	Alanina (A)
					T	Serina (S)
					C	Prolina (P)
					A	Treonina (T)

La diferencia en la afinidad por el sustrato de las variantes PEPT2*1 y PEPT2*2 puede tener impacto clínico a nivel renal, cerebral y pulmonar.

A nivel renal, PEPT2 se localiza en la cara luminal de las células tubulares proximales, reabsorbiendo diferentes moléculas filtradas por el glomérulo. La variante PEPT2*1, con mayor afinidad, reabsorberá mayor cantidad de sustrato que la variante PEPT2*2. Si el sustrato es nefrotóxico, como ocurre con la colistina y el ALA de la PAI, la variante PEPT2*1, al reabsorber mayor nefrotoxina, generará mayor daño celular, confirmando mayor riesgo de FRA y desarrollo posterior de ERC.

A nivel cerebral, cobra importancia en la intoxicación por plomo. El plomo se une a la enzima ALA dehidratasa, creando un cuadro similar a una PAI, aumentando los niveles de ALA intracerebrales, lo que altera la activación de los canales de sodio, activa los autorreceptores GABA_A, estimula la liberación de glutamato, altera su transportador GLT-1 e inhibe irreversiblemente la recaptación de glutamato por los astrocitos. Por tanto, el aclaramiento de

ALA cerebral, dependiente de PEPT2, es importante para disminuir el daño. En este caso, la variante PEPT2*1, de alta afinidad y que aclarará ALA más rápido, parece asociarse a menos clínica y daño crónico que PEPT2*2, de baja afinidad, al contrario de lo que ocurriría en el riñón (82).

A nivel pulmonar, PEPT2 se expresa en la luz de las vías aéreas y modula el daño pulmonar agudo, que se caracteriza por una inflamación progresiva mediada por neutrófilos, pudiendo llegar a un síndrome de distrés respiratorio agudo. Una característica clave del SDRA es la degradación proteolítica de la matriz extracelular generando matriquina, que son fragmentos bioactivos de la matriz extracelular que modifican el comportamiento celular. Una matriquina derivada de la degradación del colágeno, prolina-glicina-prolina o PGP, y su versión acetilada, actúan como ligandos de los receptores CXCR1 y CXCR2 de los neutrófilos, aumentando su reclutamiento y activación. Por tanto, el acúmulo pulmonar de PGP potenciará el daño pulmonar agudo al reclutar más neutrófilos. En este sentido, al igual que ocurre en el cerebro, el aclaramiento de PGP disminuirá el daño pulmonar, por lo que la variante PEPT2*1 conferirá protección en comparación con la variante PEPT2*2 (83).

9.6. Regulación

La expresión y función del PEPT2 depende de adaptaciones fisiológicas, patológicas y tratamientos farmacológicos. Dado que requiere protones para su funcionamiento, cualquier alteración del gradiente de pH o del voltaje de membrana afectará a la actividad transportadora.

La Tabla 5 resume la modulación de PEPT2 in vitro o in vivo en mamíferos.

Tabla 5. Resumen de los modelos experimentales de PEPT2, in vitro e in vivo. BCRP: breast cancer resistance protein; EGF: factor de crecimiento epidérmico (epidermal growth factor); ERC: Enfermedad renal crónica; IP: intraperitoneal; MRP2: multidrug resistance-associated protein 2; PDZK1: Na⁺/H⁺ exchange regulatory cofactor NHE-RF3; P-gp: P-glicoproteína; Poli I:C: ácido poliinosínico: ácido policitidílico.

Especie	Modelo	Estímulo	Impacto sobre PEPT2	Tejido	Ref.
Rata	Gestante (día 18)	Poli I:C IP (5 mg/kg)	Disminuye mRNA y proteína a 24 h	Riñón	(86)
	Gestante (día 14)	Poli I:C IP (10 mg/kg)	Disminuye mRNA a 6 h pero no a 24/48 h	Riñón	(87)
	ERC (nefrectomía 5/6)		Disminución mRNA	Riñón	(88)
	ERC (nefrectomía 5/6)		Aumento actividad y mRNA	Riñón	(89)

	- Nefrectomía unilateral - Diabetes - Nefrectomía + diabetes		Aumento mRNA, proteína en nefrectomía unilateral > nefrectomía + diabetes. No cambia en diabetes	Riñón	(90)
		Hipotiroidismo	Aumento mRNA y proteína	Riñón	(91)
	Ratas jóvenes (6-7m), mediana edad (17-18m) y viejas (23-24m)	Envejecimiento	Aumento proteína en 17-18m, 23-24m. Aumento mRNA (médula renal externa) 23-24m	Riñón	(92)
	Ratas VIH-transgénicas	Endotoxinas y VIH	VIH aumenta mRNA Endotoxina disminuye mRNA	Riñón	(93)
	Donante en muerte cerebral		Disminución mRNA	Riñón	(94)
	Células SKPT0193 cl.2	EGF (10 ng/ml)	Disminución mRNA y expresión proteica a las 96 horas	Células tubulares proximales	(95)
	Células SKPT0193 cl.2	Ausencia de EGF en medio cultivo	Aumento expresión PEPT2	Células tubulares proximales	(96)
Ratón	Células renales túbulo colector cortical mpkCCD14	Aldosterona 1 μ M	Aumenta estabilidad de PEPT2		(97)
Perro	Células epiteliales renales Madin-Darby	Crecimiento en membranas Transwell	Aumenta mRNA a día 5, disminuye a día 7		(98)
	Células epiteliales renales Madin-Darby	Sobreexpresión de P-gp, MRP2 y BCRP (human efflux transporters)	Disminución mRNA		(99)
Cerdo	Células tubulares proximales LLC-PK1	EGF (0-50 ng/ml)	Sin cambios en mRNA		(100)
Humano	Células HEK293	PDZK1 vs PDZK1-E195K vs control	PDZK1-E195K disminuye transporte transcelular de [H^3]GlySar comparado con PDZK1-WT	Células embrionarias de riñón	(101)
	Células HEK293	PDZK1	PDZK1 aumenta proteína, y transporte y V_{max} de [C^{14}]glicilsarcosina	Células embrionarias de riñón	(102)

10. La Medicina de Sistemas como método para generar hipótesis validables experimentalmente

La Medicina de Sistemas se define como la aplicación del enfoque de sistemas a la prevención, comprensión, modulación y recuperación de trastornos del desarrollo y procesos patológicos en la salud humana, que considera los sistemas del cuerpo humano como parte de un todo integrado, incorporando interacciones bioquímicas, fisiológicas y medioambientales (103,104).

Es un concepto derivado de la Biología de Sistemas. Aunque los pioneros de la Biología de Sistemas fueron criticados por realizar “expediciones de pesca” a ver que encontraban, sin basar los experimentos en hipótesis a priori, la Biología de Sistemas ha demostrado ser una metodología científica disruptiva que ha permitido avanzar rápidamente el conocimiento, permitiendo identificar moléculas clave de entre miles de candidatos rápidamente y evitando los culos de saco de la investigación causados por lo extremadamente limitado del conocimiento biológico y médico.

Los métodos de la Medicina de Sistemas han ido evolucionando. El panorama científico inicial estuvo dominado por la transcriptómica. Mas recientemente se han producido avances en proteómica y genómica. En concreto, el GWAS es un análisis de una variación genética a lo largo de todo el genoma humano con el objetivo de identificar su asociación a un rasgo observable. GWAS permite obtener información sobre la asociación de variantes génicas con enfermedades humanas Si bien, en la actualidad se está generando grandes bases de datos de exomas y genomas completos que significará otro paso de gigante para la mejor comprensión de la patogenia de las enfermedades renales. En esta tesis hemos utilizado una aproximación mixta, integrando bases de datos públicas de GWAS con bases de datos propias de transcriptómica renal para caracterizar el papel de nuevas moléculas en el daño renal, con una clara visión traslacional.

Hipótesis

La Medicina de Sistemas puede ser un método poderoso para identificar moléculas de interés y dianas terapéuticas en enfermedades renales.

En concreto, la combinación del análisis de grandes bases de datos humanas de polimorfismos genéticos con bases de datos de transcriptómica renal murina puede identificar nuevas dianas terapéuticas con relevancia para la patología humana que pueden explorarse experimentalmente en modelos animales.

En base a esta aproximación inicial, hemos hipotetizado que PEPT2 puede ser una diana terapéutica en enfermedades renales y hemos abordado esta hipótesis en un modelo nefrotóxico murino con clara relevancia terapéutica clínica para un problema no resuelto: como aprovechar el poder antimicrobiano de colistina, limitando su nefrotoxicidad.

Objetivos

1. Combinar bases de datos GWAS humanas con bases de datos de transcriptómica murina para identificar nuevas potenciales dianas terapéuticas en la enfermedad renal humana que puedan caracterizarse en modelos preclínicos.
2. Combinar una revisión bibliográfica con data mining (minería de datos) para identificar una patología renal en la que se pudiera testar la relevancia terapéutica de la molécula identificada usando nuevas herramientas terapéuticas.
3. Como resultado de los dos objetivos anteriores, identificar una nueva aproximación terapéutica que ofrezca nefroprotección para resolver un problema clínico no resuelto.

Materiales y métodos

La Figura 19 resume el abordaje de investigación. Este estudio se realizó en 3 fases, una primera parte de búsqueda bibliográfica, una segunda parte de minería de datos, y una tercera parte experimental. En la **primera parte de búsqueda bibliográfica** se buscaron las publicaciones originales o metaanálisis que contuviesen datos de GWAS asociados a ERC o FRA humano. El listado de genes obtenido de dichos estudios fue comparado con los genes diferencialmente expresados una base de datos de transcriptómica en un modelo murino de FRA por ácido fólico a las 24 horas (105). Tras este proceso se seleccionó el gen *SLC15A2* y su producto, PEPT2, como objeto de estudio, ya que estaba asociado en estudios GWAS humanos a función renal (106–108) y estaba diferencialmente expresado en el FRA murino, sugiriendo relevancia clínica y experimental. Además, de entre los 81 genes que también cumplían los criterios de expresión diferencial (Fold-Change; FC >1,00 o <1,00) estadísticamente significativa (p ajustada, FDR <0,05), se priorizaron los 13 cuya expresión diferencial fuese >2,00 o <0,50. Se realizó una búsqueda bibliográfica de cada uno de los 13 genes, seleccionándose *SLC15A2* por ser una posible diana poco estudiada y modificable en ERC. Tras esto se realizó una nueva búsqueda bibliográfica para recoger y analizar lo descrito hasta este momento sobre PEPT2 y su relevancia para patologías renales, generando hipótesis sobre su posible papel en la nefrotoxicidad por colistina, en la ERC asociada a porfiria y en la Nefropatía Mesoamericana y de Sri-Lanka.

En la **segunda parte, minería de datos**, se realizó una búsqueda y análisis centrada en *SLC15A2*/PEPT2 de las bases de datos Nephroseq (<http://v5.nephroseq.org/>), Kidney Interactive Transcriptomics (KIT) (<http://humphreyslab.com/SingleCell/>) y Genome Aggregation Database (GnomAD) (<https://gnomad.broadinstitute.org/>). Nephroseq y KIT son dos motores de búsqueda de investigación de acceso público de donde se pueden extraer datos de transcriptómica de riñón total o de tipos celulares individuales, respectivamente, realizados previamente por otros investigadores, permitiendo analizar la expresión de genes en riñones humanos y animales con enfermedades renales. En esta búsqueda se identificaron todos los estudios experimentales y en humanos en los que se había medido la expresión de *SLC15A2* en tejido renal, glomérulo y túbulo-intersticio. Se analizaron y resumieron los resultados. GnomAD es otro motor de búsqueda de investigación donde están recogidas todas las variantes génicas conocidas junto con su frecuencia poblacional. De nuevo, se buscó información sobre *SLC15A2*.

La **tercera parte, experimental**, que abordó la modulación terapéutica de PEPT2 en modelos que se consideraron relevantes en base a la información obtenida de las diversas fuentes.

1. Modelos de daño renal celular in vitro (células de túbulo proximal humano HK2 y de túbulo proximal murino MCT) y de daño renal in vivo (ratones) agudo por colistina

2. Modelo de daño celular in vitro por ALA (células MCT)

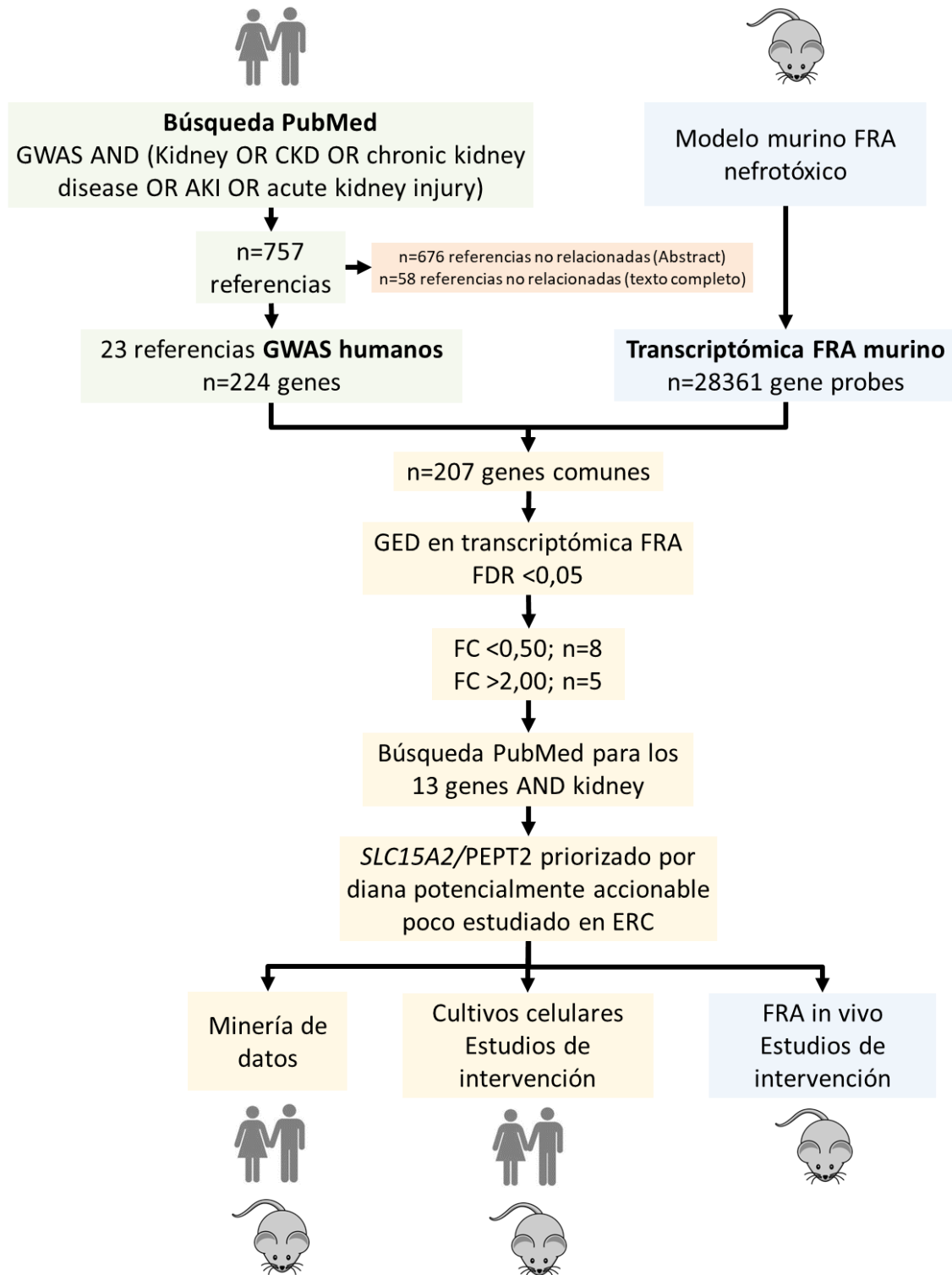


Figura 19. Abordaje de la investigación. Datos recogidos de la literatura de genes asociados con enfermedad renal, selección del gen de estudio y su producto, minería de datos y desarrollo de los modelos experimentales. ERC: enfermedad renal crónica; FC: fold change; FDR: false discovery rate; FRA: fracaso renal agudo; GED: genes expresados diferencialmente; GWAS: genome-wide association study.

1. Búsqueda bibliográfica

El objetivo de nuestro estudio fue encontrar un gen asociado a ERC y FRA humanos que haya sido identificado mediante GWAS.

El paso inicial fue una búsqueda bibliográfica a través de PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) que contuviese los términos “Genome-Wide Association Studies (GWAS) AND (Kidney OR CKD OR chronic kidney disease OR AKI OR acute kidney injury)” realizada el 7/10/2018. De los 757 resultados, 23 publicaciones originales o metaanálisis que contenían datos de GWAS y permitieron identificar 224 genes asociados con enfermedad renal en humanos. De estos, 207 fueron encontrados en una base de datos interna de transcriptómica renal publicada anteriormente correspondiente a las 24 horas de un modelo de fracaso renal agudo murino inducido por ácido fólico en comparación con ratones inyectados con vehículo (105). Para limitar el número de genes de interés, seleccionamos los genes expresados diferencialmente (GED) en FRA murino entre los 207 genes compartidos, estableciendo como criterios tanto un fold-change ($FC < 0,50$ o $> 2,00$) y un false discovery rate ($FDR < 0,05$), identificando 13 genes que se habían asociado a enfermedad renal humana mediante GWAS y estaban muy diferencialmente expresados en FRA murino, asegurando así la relevancia clínica y experimental y la posibilidad de estudiar su función y potencial como diana terapéutica en el FRA murino.

Finalmente, se realizó una nueva búsqueda bibliográfica a través de PubMed buscando las relaciones de los 13 genes priorizados con enfermedad renal. Tras analizar los resultados obtenidos, seleccionamos el gen *SLC15A2* como objeto de estudio por ser una potencial diana terapéutica en enfermedad renal que cumplía criterios de novedad, plausibilidad biológica (disponibilidad de evidencia clínica convincente que apunte a un mecanismo de acción viable) y viabilidad (existencia de enfoques intervencionistas que ya se utilizan en entornos clínicos).

2. Minería de datos

La minería de datos se realizó en bases de datos de transcriptómica de tejido renal, orientándose a caracterizar la expresión de *SLC15A2*, así como en bases de datos sobre la prevalencia poblacional de cada una de las variantes alélicas.

2.1. Acceso y búsqueda de datos en Nephroseq

El motor de búsqueda Nephroseq está dirigido por el Profesor Matthias Kretzler, un nefrólogo y médico internista de la Universidad de Michigan, quien a través de invitaciones otorga acceso a la base de datos a investigadores interesados. Nephroseq contiene bases de datos transcriptómicas globales (bulk) de riñón total, glomérulos o túbulointersticio. Con mi usuario y clave personal, junto con el Profesor Alberto Ortiz, tutor de este trabajo, accedimos los días comprendidos entre 1 de enero 2023 y el 1 de marzo 2023 (<http://v5.nephroseq.org/>).

El acceso se realizó a través de la página web: <http://v5.nephroseq.org/>; la búsqueda se realizó en el siguiente orden:

1. Se introdujo “*SLC15A2*” en la caja de búsqueda principal localizada en la esquina superior izquierda.
2. Se aplicaron dos filtros independientes dentro de la sección tipo de análisis (Analysis type):
 - 2.1. Análisis por biomarcadores clínicos: se seleccionaron análisis por filtrado glomerular estimado (GFR analyses) y por proteinuria (proteinuria analyses). En este caso los valores de p, r y FC fueron: $p < 0,05$; r-value: todos (All); FC: $> 1,50$ (Figura 20).
 - 2.2. Análisis de enfermedad frente a control (Disease vs. Control Analyses). En este caso los valores de p, r y FC fueron: $p < 0,05$; r-value: todos (All); FC: todos (All) (Figura 21).
3. Se excluyeron todos aquellos resultados que hiciesen referencia a muestras de sangre.
4. Se exploraron cada uno de los estudios en los que se realizó transcriptómica en tejido renal y se había determinado mRNA de *SLC15A2*, se clasificaron los estudios por:
 - 4.1. Estudios en humanos o experimentales.
 - 4.2. Tipo de patología glomerular.
 - 4.3. Tipo de tejido estudiado: Renal, Glomérulo o Túbulointersticio.
5. Se revisaron las comparaciones hechas de forma automática en el programa. En el análisis por filtrado glomerular y proteinuria, se extrapolaron los resultados de log en base 2 a números decimales, elevando 2 al valor correspondiente a cada muestra de filtrado glomerular y proteinuria. Posteriormente, se calculó, a través de Microsoft Excel, la media y la desviación típica para los valores de filtrado glomerular y la mediana y el rango intercuartílico para los valores de proteinuria.
6. En el análisis de enfermedad frente a control, la definición de “riñón normal” podía variar en cada estudio, pudiendo ser: nefropatía de cambios mínimos, riñones procedentes de donantes vivos o riñones con tumores renales, de una parte alejada del tumor.

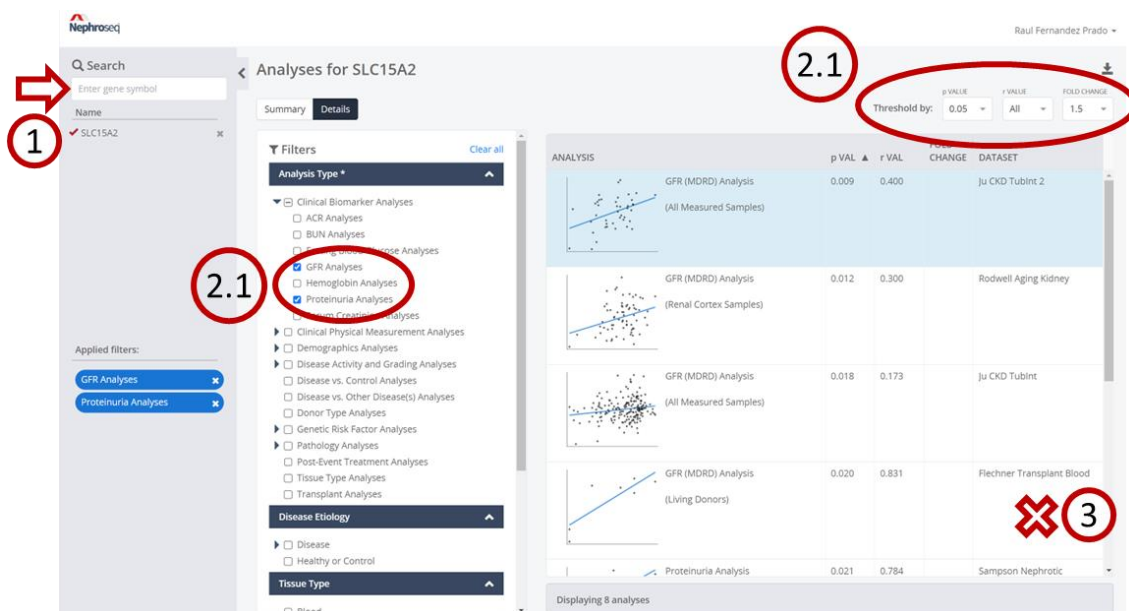


Figura 20. Orden de realización de la búsqueda en Nephroseq en el análisis por biomarcadores clínicos.

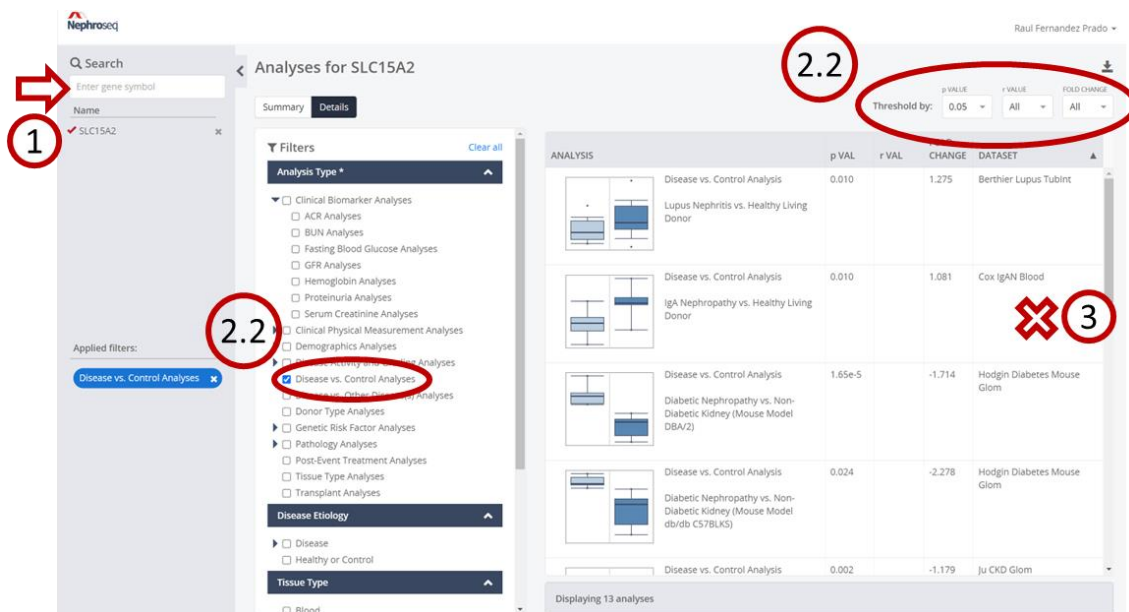


Figura 21. Orden de realización de la búsqueda en Nephroseq en el análisis de enfermedad frente a control.

2.2. Acceso y búsqueda de datos en Kidney Interactive Transcriptomics

Kidney Interactive Transcriptomics o KIT es una herramienta para consultas sobre transcriptómica de células individuales en riñones murinos y humanos, así como de organoides humanos. Todas las bibliotecas fueron creadas con células o núcleos y usando InDrop, DropSeq, sci-RNA o 10X Chromium.

El motor de búsqueda KIT está dirigido por el Profesor Benjamin D. Humphreys, un nefrólogo e internista de la Universidad de Washington en St. Louis. Accedimos a las bases de datos de transcriptómica los días comprendidos entre 1 de enero 2023 y el 1 de marzo 2023 (<http://humphreyslab.com/SingleCell/>).

El acceso se realizó a través de la página web: <http://humphreyslab.com/SingleCell/>; la búsqueda se realizó en el siguiente orden (Figura 22):

1. Se introdujo “*SLC15A2*” en la caja de búsqueda principal localizada en la parte inferior derecha.
2. Seleccionamos la base de datos de transcriptómica de la que queremos ver resultados. Repetimos este proceso por cada una de las bases de datos de interés.
3. Excluimos aquellos resultados de riñones humanos obtenidos de organoides (números 6, 7 y 9), riñones fetales humanos (número 8) y pulmón (número 12).
4. Recogimos las figuras que expresaban resultados de transcriptómica, separando los resultados obtenidos de riñones humanos de los obtenidos de modelos murinos.

KIT Kidney Interactive Transcriptomics

Kidney Interactive Transcriptomics
AN ONLINE ANALYZER FOR KIDNEY SINGLE CELL DATASETS

TERMS AND CONDITIONS

This tool allows users to query gene expression from mouse or human kidney and human kidney organoid single cell datasets. Libraries were created with either cells or nuclei as indicated, and with either the **InDrop**, **DropSeq**, **sci-RNA-seq** or **10X Chromium** platforms.
For details of each dataset in KIT, please read the original paper or visit the RBK website (<https://www.rebuildingakidney.org/>):

1. Healthy Adult Kidney - Epithelia: **Wu and Malone et al, JASN 2018.**
2. Human Rejecting Kidney Allograft Biopsy: **Wu and Malone et al, JASN 2018; and RBK RID: W-RA1C.**
3. Healthy Adult Kidney - Complete: **Wu and Uchimura et al, Cell Stem Cell 2018; and RBK RID: 14-4KPM.**
4. Mouse UUO (d14): **Wu et al, JASN 2019; and RBK RID: 14-4KBE.**
5. Healthy Mouse Dataset: **Wu et al, JASN 2019; and RBK RID: 14-4KBC.**
6. Takasato's Kidney Organoid (d26): **Wu and Uchimura et al, Cell Stem Cell 2018.**
7. Morizane's Kidney Organoid (d26): **Wu and Uchimura et al, Cell Stem Cell 2018.**
8. Human Fetal Kidney (17w): **Lindström et al, Developmental Cell 2018.**
9. Kidney Organoid (Phinsson et al 2019): **Phinsson et al, Nature Methods 2019.**
10. Human Diabetic Kidney: **Wilson et al, PNAS 2019. (*Note: The CFH+ cluster was renamed to parietal epithelial cells)**
11. Mouse IRI Kidney (Sham, 4hrs, 12hrs, 2days, 14days and 6weeks): **Kirita et al, PNAS 2020.**
12. Mouse Lung snRNA-seq versus scRNA-seq: **Koenitzer et al, Am J Respir Cell Mol Biol 2020.**
13. Human Kidney snRNA/ATAC-seq: **Muto and Wilson et al, Nat Commun 2021.**
14. Spatial Transcriptomics of Female Mouse IRI Kidney: **Dixon et al JASN 2021.**
15. 1 million cell atlas of mouse DKD and its treatments: **Wu et al, Cell Metab 2022.**
16. Human ADPKD snRNA + scATAC-seq: **Muto et al, Nat Commun 2022.**
17. Human DKD snRNA + scATAC-seq: **Wilson and Muto et al, Nat Commun 2022.**
18. Mouse kidney uni-IRI and UUO time courses profiled with sci-RNA-seq3: **Li et al, Cell Metab 2022.**
19. Multiome on K67 INTACT mouse kidney (McMahon lab): **Gerhardt et al, JASN 2023.**

Data Visualization Tool

↓ 1

2 → - Select the desired dataset -

SEARCH By using this Software, you agree to the [Terms & Conditions](#).

Please enter your gene of interest

Figura 22. Orden de realización de la búsqueda en KIT

2.3. Acceso y búsqueda de datos en GnomAD

GnomAD fue lanzado originariamente en 2014 con el nombre de Exome Aggregation Consortium (ExAC) como una asociación de investigadores buscando juntar y armonizar las secuenciaciones de genomas y exomas obtenidos de una gran variedad de proyectos de secuenciación a gran escala y resumir todos estos datos para la comunidad científica. Este proyecto es dirigido por dos codirectores, Heidi Rehm y Mark Daly. La base de datos de GnomAD se compone de secuencias de genomas y exomas de todo el mundo.

El acceso se realizó a través de la página web: <https://gnomad.broadinstitute.org/>; la búsqueda se realizó en el siguiente orden (Figura 23):

1. Se introdujo “*SLC15A2*” en la caja de búsqueda principal localizada en la parte superior central.
2. Seleccionamos la versión 2.1.1 en el desplegable presente a la izquierda de la caja de búsqueda.
3. Buscamos la sección indicada como “gnomAD variants”, donde se recogen todas las diferentes variantes.
4. Se marcaron las opciones pLoF, Missense/Inframe indel, Synonymous y Other.
5. Se marcaron las opciones Exomes, Genomes, SNVs e Indels.
6. Se ordenaron las variantes resultantes por frecuencia alélica (Allele Frequency) de mayor a menor.
7. Se exportaron las variantes a CSV.
8. Procedimos al análisis de las variantes cuya frecuencia poblacional fuese $\geq 1\%$.

gnomAD browser **2** **1** gnomAD v2.1.1 Search About Team News Changelog Downloads Policies Publications Feedback Help

SLC15A2 solute carrier family 15 member 2

Genome build GRCh37 / hg19
 Ensembl gene ID ENSG00000163406.6
 Ensembl canonical transcript ENST0000048971.1
 Other transcripts ENST00000295605.2, ENST00000469422.1, and 4 more
 Region 3:121612936-121662949
 External resources Ensembl, UCSC Browser, and more

3 gnomAD variants

gnomAD v2.1.1 variants (1252)

Viewing in table **4**

7 ☒ pLoF only ☒ Missense / Inframe indel only ☒ Synonymous only ☒ Other only ☐ all **5** ☒ Exomes ☒ Genomes ☒ SNVs ☒ Indels **6** variants Search variant table

Export variants to CSV **Configure table**

Note Only variants located in or within 75 base pairs of a coding exon are shown here. To see variants in UTRs or introns, use the region view.

The table below shows the HGVS consequence and VEP annotation for each variant's most severe consequence across all transcripts in this gene. Cases where the most severe consequence occurs in more than one transcript are denoted with †. To see consequences in a specific transcript, use the transcript view.

Variant ID	Source	HGVS Consequence	VEP Annotation	LoF Curation	Clinical Significance	Flags	Allele Count	Allele Number	Allele Frequency	Number of Homozygotes
3-121659197-G-A	 	c.1909-34G>A	● intron				210317	281640	7.47e-1	79133
3-121634410-T-A	 	c.620-53T>A	● intron				14258	31266	4.56e-1	3368
3-121641821-A-G	 	c.868-66A>G	● intron				14278	31322	4.56e-1	3370
3-121646759-G-A	 	c.1206+73G>A	● intron				14286	31342	4.56e-1	3370
3-121643303-T-A	 	c.1035+73T>A	● intron				14277	31324	4.56e-1	3369
3-121647467-C-T	 	c.1341+65C>T	● intron				14253	31300	4.55e-1	3357
3-121643143-A-AT	 	c.1003-46dupT	● intron				14155	31104	4.55e-1	3317
3-121647782-C-G	 	c.1342-47C>G	● intron				114038	268210	4.25e-1	26178
3-121642048-A-T	 	c.958-21A>T	● intron				119680	282488	4.24e-1	27378
3-121643893-T-C	 	c.1124+13T>C	● intron				119644	282484	4.24e-1	27362
3-121647286-C-T	 	p.Pro409Ser	● missense				119562	282300	4.24e-1	27342
3-121643804-C-T	 	p.Leu350Phe	● missense				119693	282618	4.24e-1	27366
3-121648168-G-A	 	p.Arg509Lys	● missense				119455	282128	4.23e-1	27343
3-121641693-G-A	 	p.Ala284Ala	● synonymous			MissV	119235	281718	4.23e-1	27235
3-121643171-A-AT	 	c.619+14dupT	● splice region				119432	282190	4.23e-1	27278
3-121643170-A-T	 	c.1003-28A>T	● intron				118725	280698	4.23e-1	27164
3-121646641-A-G	 	p.Ala387Ala	● synonymous			MissV	118474	282470	4.19e-1	26820
3-121643163-G-C	 	c.1003-35G>C	● intron				89705	278964	3.22e-1	15302
3-121631841-G-A	 	c.429-27G>A	● intron				89394	281076	3.18e-1	15120
3-121631993-T-G	 	c.528+26T>G	● intron				12860	281938	4.56e-2	740

Figura 23. Orden de realización de la búsqueda en GnomAD.

3. Estudios experimentales

3.1. Estudios in vivo. Modelos animales

El trabajo se llevó a cabo conforme directrices nacionales e internacionales y ha sido aprobado por el comité de ética de investigación animal del Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD).

Los modelos animales se realizaron en ratones hembra de la cepa C57BL/6 (Charles River, Ecully, Francia) de genotipo salvaje (WT, de sus siglas en inglés, Wild Type), de entre 12 y 14 semanas de edad. Los ratones se mantuvieron en jaulas ventiladas siguiendo un ciclo de luz oscuridad de 12 horas, temperatura constante de 25°C y con alimento (Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, 1320, Rod14, HiHyg – Maintenance Diet for Mice and Rats) y agua suministrados *ad libitum*.

3.1.1. Modelo de daño renal inducido por colistina en ratones in vivo

Se usaron cuatro grupos de ratones wild-type hembra C57BL/6 (de 12 a 14 semanas de edad) de las instalaciones para animales del IIS-FJD (n=4 para el grupo control y n=6 para el grupo de colistina). A los ratones control se les administró vehículo (solución salina) intraperitoneal (ip); a los ratones control de cefadroxilo, 34,6 mg/kg de cefadroxilo ip dos veces al día durante 7 días (109); a los ratones del grupo de colistina, 10 mg/kg de colistina ip dos veces al día (total 20 mg/kg/día) durante 7 días (110) y a los ratones con colistina + cefadroxilo, 34,6 mg/kg de cefadroxilo dos veces al día seguido, 20 minutos después de cada dosis, con 10 mg/kg de colistina durante 7 días, ambos ip (Figura 24). Las dosis de cefadroxilo y colistina se obtuvieron de la literatura (109,110).

3.1.1.1. Eutanasia y extracción de muestras.

Los ratones fueron anestesiados con una mezcla de ketamina 100 mg/kg (Ketalar®, Pfizer, Nueva York) y xilacina 15 mg/kg (Xilagesic, Laboratorios Calier, Barcelona) vía ip. Las muestras de sangre se obtuvieron en el momento de la eutanasia por punción cardíaca. Mediante centrifugación, se obtuvo el plasma utilizado para los análisis bioquímicos realizados en el Servicio de Bioquímica del Hospital Fundación Jiménez Díaz. Los riñones fueron perfundidos in situ con una solución salina al 0,9% (Braun) mediante la canalización del ventrículo izquierdo. A continuación, se

extrajeron los riñones y se decapsularon. La mitad del riñón de cada ratón se fijó en formalina tamponada y se incluyó en parafina para inmunohistoquímica y la otra mitad se congeló rápidamente en nitrógeno líquido para estudios de RNA y proteínas (Figura 24).

4 Grupos:

1. **Control:** vehículo (suero salino) n=4
2. **Cefadroxilo:** 34,6 mg/kg ip dos veces al día durante 7 días (4 horas) n=4
3. **Colistina:** 10 mg/kg ip dos veces al día durante 7 días (4 horas) n=6
4. **Cefadroxilo + Colistina:** 34,6 mg/kg ip dos veces al día durante 7 días (4 horas) + 20 min después → 10 mg/kg ip dos veces al día durante 7 días (4 horas) n=6

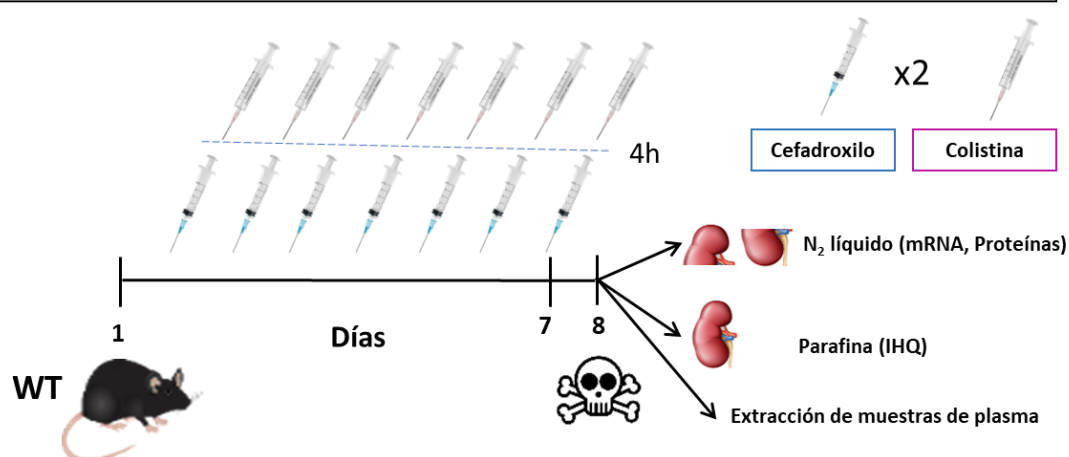


Figura 24. Modelo experimental de fracaso renal agudo inducido por colistina en ratones C57BL/6. Ip: intraperitoneal.

3.2. Estudios in vitro

3.2.1. Líneas celulares

Basándonos en la información obtenida en KIT, las células tubulares proximales son el tipo celular renal clave que expresa *SLC15A2*, por lo que se estudiaron células tubulares proximales humanas y murinas. Las células de la línea celular de túbulo proximal renal murino (en adelante, MCTs del inglés *murine cortical tubule cells*) fueron cedidas por el profesor Eric G Neilson de la Universidad de Pensilvania (111). Las células MCT fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) suplementado con un 10% de Suero Bovino Fetal depleto (SBF, Ref, F7524, Sigma-Aldrich), 2 mM L-Glutamina (Ref. 2503008, Thermofisher), 100 U/ml Penicilina (Ref, 15140122, Thermofisher), 100 µg/ml Estreptomicina (Ref, 15140122, Thermofisher). Las células se incubaron a 37°C, con una presión parcial de CO₂ del 5% y una humedad relativa del 95%. Las células de túbulo proximal humano HK2 (ATCC,

Rockville, MD, USA) fueron cultivadas en medio RPMI-1640 suplementado con un 10% de SBF de complementado, 2 mM L-Glutamina, 100 U/ml Penicilina, 100 µg/ml Estreptomicina, 5 µg/ml de insulina, 5 µg/ml de transferrina, 5 ng/ml de selenito de sodio y 5 ng/ml de hidrocortisona. Las células se incubaron a 37°C, con una presión parcial de CO₂ del 5% y una humedad relativa del 95%. Las células HK2 se genotiparon para *SLC15A2* como se detalla en la sección 3.2.1.1. Posteriormente, se deplecionaron de suero durante 24 horas antes de la estimulación y durante todo el experimento.

3.2.1.1. Genotipado de las células HK2

En humanos, *SLC15A2/PEPT2* es polimórfico. Existen dos variantes del transportador PEPT2 en células humanas, siendo la variante PEPT2*1 (C/C) aquella asociada a mayor afinidad por el sustrato y confiriendo, hipotéticamente, mayor riesgo de desarrollar ERC por nefrotóxicos que fueran sustratos que la variante PEPT2*2 (T/T) (43). Estas variantes se encuentran en los exones 13 y 15 y están en desequilibrio de ligamiento.

En colaboración con el Departamento de Genética del Hospital Fundación Jiménez Díaz se procedió a la secuenciación de las células HK2 empleadas en nuestros experimentos. El procedimiento realizado fue el siguiente:

1. Se sembraron células HK2, se recogieron a las 24 horas y se extrajo el DNA mediante el uso de un extractor automático.
2. Las variantes génicas se encuentran en los exones 13 y 15 del transportador PEPT2 (gen *SLC15A2*). Se utilizaron los siguientes primers diseñados en <https://eurofinsgenomics.eu/en/>, acorde a la metodología usada por Tchernitchko et al, (43) para la amplificación de esos exones, utilizando las condiciones y temperaturas de melting sugeridas por la casa comercial:
 - 13 forward: 5'-TGTGAGACAGAGTGTAACAAGCA-3'
 - 13 reverse: 5'-AAAACCAATCCTCACTAAGAAAA-3'
 - 15 forward: 5'ATTTTCAGAGGGAGAAACTATGTC-3'
 - 15 reverse: 5'-AATTCATTCAGGTACACACCTCAC-3'

3. Mediante la electroforesis en gel de agarosa comprobamos que los exones se amplificaron (Figura 25). Posteriormente, se purificaron los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se secuenciaron ambos exones mediante un secuenciador POP7 3130X/Genetic analyzer de Applied Biosystems de 16 capilares en el departamento de Genética.

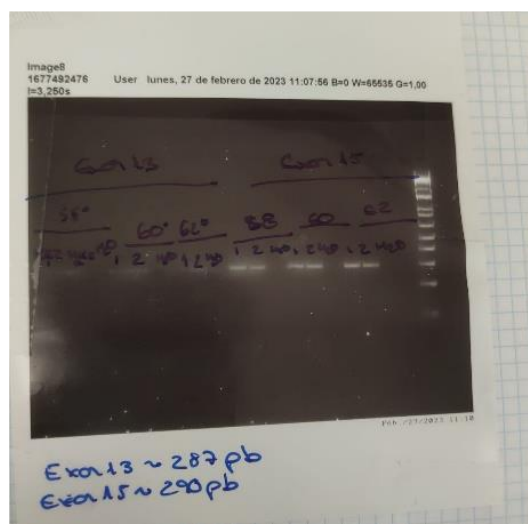


Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa

4. Los resultados de la secuenciación fueron contrastados con las bases de datos del NCBI para comprobar la variante génica y si se corresponden con los SNP descritos <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> y <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>.

3.2.2. Estímulos

El rango de concentraciones de colistina (sal de sulfato de colistina, Ref, C4461, Sigma-Aldrich), cefadroxilo (Sigma-Aldrich) y ALA (Sigma-Aldrich) utilizadas para los estudios celulares se obtuvieron inicialmente de la literatura (68,112) y, posteriormente se ajustaron según estudios de dosis-respuesta que evaluaron la muerte celular. A 25 µg/ml (equivalente a 9,36 µg/ml de actividad base de colistina), la colistina fue citotóxica tanto para las células MCT como para las HK2. Cefadroxilo no fue tóxico en las dosis entre 1 µg/ml y 2 mg/ml a las 24 h; fue tóxico a 2 mg/ml a las 48 h y a ≥250 µg/ml a las 72 h (datos no mostrados). Se probaron dosis de 25 y 50 µg/ml de cefadroxilo para determinar la protección contra 25 µg/ml de colistina, lo que corresponde a relaciones de exceso molar de 3,2:1 y 6,4:1, respectivamente, sin observar diferencias, por lo que se utilizaron 25 µg/ml en la mayoría de los experimentos. En

experimentos preliminares, las proporciones molares de cefadroxilo:colistina <1,0 no fueron protectoras.

3.2.3. Extracción de RNA

El RNA total procedente de muestras de tejido congelado en nitrógeno líquido se extrajo pulverizando el órgano en un troquel y se lisó posteriormente siguiendo las instrucciones del protocolo del fabricante para el reactivo Trizol (Invitrogen, Paisley, UK). En las muestras procedentes de cultivos celulares, se retiró el medio de cultivo y con la ayuda de un raspador, se recogieron las células para su posterior lisis en el reactivo Trizol, también siguiendo el protocolo del fabricante y, finalmente aislando y purificando el RNA mediante el método cloroformo-isopropanol. La cuantificación del RNA total se realizó en un espectrofotómetro tipo Nanodrop 1000 (Bionova Científica S.L. Implen) mediante medida de absorbancia a 260 nm (teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia corresponde a un rendimiento de 40 µg/ml de RNA). La pureza de la muestra se comprobó mediante los cocientes de absorbancia 260/280 y 260/230 nm, cuyos valores mayores de 1,8 indicaron ausencia de contaminación proteica y fenólica, respectivamente.

3.2.4. Transcripción reversa y PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)

La transcripción reversa (RT) se realizó con 1 µg de RNA total utilizando el High Capacity cDNA Archive Kit (Ref. 4368813, Applied Biosystems, Life Technologies), en un termociclador Thermo ABI Quantstudio 5 PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA) con las siguientes condiciones: 10 min a 25°C, 2 horas a 37°C y 5 minutos a 85°C.

Los niveles de cDNA de los genes a estudio se determinaron utilizando la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qPCR) mediante el sistema de detección de secuencias Real-Time FAST PCR 7500 (Life Technologies) con el software Prism 7000 System SDS (Applied Biosystems). Para ello, se empleó el preparado comercial Master Mix (Roche Diagnostics) conteniendo la TaqDNA polimerasa activada por temperatura (Ref. RR390A, Takara, Japón), así como los nucleótidos y el tampón necesarios para la reacción, junto con la muestra de cDNA y el cebador específico comercial de cada gen diana (desarrollados previamente por Applied Biosystems, Foster City, CA) (Tabla 6) (113). En la misma reacción (multiplex) se añadieron cebadores para amplificar también el cDNA del gen que codifica la Gliceraldehído-Fosfato-Deshidrogenasa

(Gapdh) como control interno de la reacción. Todas las medidas se hicieron por duplicado. Los resultados se normalizaron con sus correspondientes valores de Gapdh. El número de copias de mRNA se calculó a partir del valor Ct (ciclo umbral) mediante el método de cuantificación DeltaDelta Ct.

Tabla 6. Listado de las sondas utilizadas en la PCR cuantitativo a tiempo real.

Gen	Fluoróforo/especie	Referencia
<i>Ccl2 (MCP-1)</i>	FAM/Ratón	Mm00441242_m1
<i>Ccl5 (RANTES)</i>	FAM/Ratón	Mm01302427_m1
<i>Col1a2 (Colágeno I)</i>	FAM/Ratón	Mm00483888_m1
<i>GAPDH</i>	FAM/Ratón	Mm99999915_m1
<i>GAPDH</i>	VIC/Ratón	Mm99999915_m1
<i>Fn1 (Fibronectina I)</i>	FAM/Ratón	Mm01256744_m1
<i>Klotho</i>	FAM/Ratón	Mm00502002_m1

3.2.5. Inmunohistoquímica

Se utilizaron secciones de 3 µm de tejido incluido en parafina que fueron montados en portas de carga positiva (Envision detection kit; DAKO) (113). Los cortes fueron desparafinados a 60°C durante toda la noche e hidratadas con concentraciones de alcoholes decrecientes. Posteriormente se realizó la recuperación antigénica en una solución de citrato utilizando el sistema PT-link de Dako (pH 6 o 9, a 95°C durante 20 minutos).

A continuación, se bloqueó la peroxidasa endógena incubando las muestras durante 30 minutos con una solución de H₂O₂ al 3% en metanol-H₂O. Las uniones inespecíficas del anticuerpo primario se bloquearon utilizando la solución PBS/BSA 4%/suero 10% (de la misma especie en que se produjo el anticuerpo secundario). Tras ello, los tejidos se incubaron con el anticuerpo primario específico, un anticuerpo policlonal de rata contra el antígeno F4/80 (1:50; Serotec, Oxford, UK), durante toda la noche diluido en PBS/BSA 2%/suero 2% a 4°C y en condiciones de humedad. Al día siguiente, se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente 1 hora a temperatura ambiente diluido en PBS/BSA 2%. Tras lavar el exceso de anticuerpo secundario biotinilado con PBS1x, se incubaron los cortes con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain Elite ABC HRP system; Vector laboratories, CA) durante 30 minutos a

temperatura ambiente. Este complejo se había preparado 30 minutos antes en condiciones de oscuridad y humedad. Como controles negativos, las muestras se incubaron con una inmunoglobulina no específica del mismo isotipo que el anticuerpo primario. La detección del anticuerpo se determinó mediante adición del cromógeno 3,3'-diaminobencidina (DAB, Dako). Finalmente, los cortes se contrastaron con hematoxilina de Carazzi (Ref. 10034813, Fisher), se deshidrataron, se fijaron en xilol y se montaron utilizando DPX (Merck). Las preparaciones fueron analizadas mediante microscopía óptica usando un sistema de puntuación cuantitativa, el software Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Bethesda, MD).

En el caso de los macrófagos (F4/80), las células positivas fueron cuantificadas usando también el software Image-Pro Plus y a ciegas en 15 campos por sección de la corteza renal elegidos aleatoriamente a un aumento de 20x de magnificación. Los resultados se expresaron como porcentaje de área teñida versus área total cuantificada.

3.2.6. Estudios de muerte celular y apoptosis

Para estos estudios, las células fueron cultivadas en placas de doce pocillos. La apoptosis fue medida por citometría de flujo. Para la evaluación de la muerte celular mediante tinción con anexina V/7-amino-actinomicina D (7-AAD), se emplearon 5×10^5 células por pocillo. Las células se levantaron, se lavaron con PBS frío, se resuspendieron en 60 μ l de tampón de unión y se tiñeron con 2,5 μ l de PE-anexina V y 5 μ l de 7-AAD. Las células se incubaron durante 15 minutos a 37°C en la oscuridad. Posteriormente se añadieron 240 μ l de tampón de unión (justo antes de la citometría de flujo). Las células se analizaron utilizando el citómetro FACS Canto y el programa informático FACS Diva (BD Biosciences). La tinción con anexina V (conjugada con PE) es un proceso previo a la pérdida de integridad de la membrana que ocurre en las últimas etapas de la muerte celular como resultado de procesos apoptóticos o necróticos. La tinción con Anexina V se usa típicamente junto con un colorante vital como el 7-AAD. Por lo tanto, las células teñidas sólo con anexina V se evaluaron como si se encontrasen en una fase temprana de muerte celular, mientras que las células teñidas con anexina V y 7-AAD fueron evaluadas como si se encontrasen en un estadio de muerte celular tardía (114).

3.3. Análisis estadístico

Los ensayos in vitro fueron replicados un mínimo de 3 veces y en los modelos in vivo se emplearon 4-6 ratones por cada situación experimental. El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism 8 (CA, EE. UU.). Los resultados se expresan como media $\pm$ desviación típica (DT). La significancia en el nivel $p < 0,05$ se evaluó mediante la prueba t de Student para dos grupos de datos con distribución normal o test de Mann-Whitney para dos grupos de datos con distribución asimétrica y ANOVA para tres o más grupos con corrección post-hoc de Bonferroni y Kruskal-Wallis, respectivamente, para distribución normal y asimétrica.

Resultados

1. Primera parte: búsqueda bibliográfica

El 7/10/2018 se realizó la siguiente búsqueda en PubMed: “GWAS AND (Kidney OR CKD OR chronic kidney disease OR AKI OR acute kidney injury)”. De los 757 resultados, recogimos 23 publicaciones originales o metaanálisis que contenían datos de GWAS y permitieron identificar 224 genes asociados (Tabla suplementaria 1) con enfermedad renal en humanos. De estos, 207 fueron encontrados en una base de datos interna de transcriptómica renal publicada anteriormente correspondiente a las 24 horas de un modelo de FRA murino inducido por ácido fólico en comparación con ratones inyectados con vehículo (105) (Tabla suplementaria 1). Para priorizar genes de interés, seleccionamos los genes expresados diferencialmente (GED) en FRA murino entre los 207 genes compartidos, estableciendo como criterios un FC <0,50 o >2,00 y un false discovery rate (FDR) <0,05 (Tabla 7), lo que limitó el número de genes de interés a 8 genes infraexpresados en el FRA nefrotóxico murino y 5 sobreexpresados. Un criterio menos restrictivo (FC<1,00 y >1,00) identificó 55 genes con FC<1,00 y 26 con FC>1,00 (Tabla 8).

Tabla 7. Priorización de genes compartidos por estudios de GWAS humanos identificando genes asociados a la enfermedad renal y genes diferencialmente expresados en el FRA murino nefrotóxico cuya expresión disminuyó más de la mitad (FC<0,50) o aumentó a más del doble (FC>2,00) con FDR<0,05. FC: fold-change; FDR: false discovery rate.

FC <0,50 n=8	FC	FDR	FC >2,00 n=5	FC	FDR
ACACB	0,4525	0,0082	CTSS	2,0696	0,0125
ACSM5	0,2992	0,0072	ICAM1	2,0009	0,0049
CNDP1	0,2601	0,0213	ITGAX	2,7455	0,0034
DPEP1	0,3145	0,0091	ITGAM	3,5908	0,0088
GATM	0,3473	0,0196	PPM1J	3,4702	0,0057
SLC6A12	0,3509	0,0101			
AGXT2L1	0,4105	0,0198			
SLC15A2	0,3748	0,0122			

Tabla 8. Priorización de genes compartidos por estudios de GWAS humano identificando genes asociados a la enfermedad renal y genes diferencialmente expresados en el FRA murino nefrotóxico cuya expresión disminuyó ($FC < 1,00$) o aumentó ($FC > 1,00$) con $FDR < 0,05$. FC: fold-change; FDR: false discovery rate.

Fold Change <1,00 n=55			Fold Change >1,00 n=26	
ACACB	HNF4A	SLC24A5	ALMS1	SASH1
ACE	HOXD8	SLC15A2	ARL15	SIK1
ACSM5	IRF5	SLC22A2	CARS	SND1
ALDH2	KCNMA1	SLC22A4	CD2AP	SORBS1
ANXA9	KLHDC7A	SLC2A9	CTSS	SPATA5L1
APH1B	KNG1	SLC34A1	ELMO1	WDR67
ARHGAP24	L2HGDH	SLC47A1	EMP2	WDR72
BCAS3	LRP2	SLC6A12	HORMAD2	
BMP4	MMP2	SLC7A9	ICAM1	
CGNL1	MPPED2	SLC8A1	ITGAX	
CLDN8	MTMR3	STON2	ITGAM	
CNDP1	ACAD11	TFDP2	ITIH4	
COL4A3	OVOL1	TPRKB	MAMSTR	
CUBN	PCK1	UBE2Q2	MCPH1	
CWH43	PCMTD2	UMOD	MKL1	
DPEP1	PDILT	VEGFA	MYH9	
EPB4.1L5	PLCB1	WNK4	PIGU	
AGXT2L1	PLEKHH2		PIK3R1	
GATM	R3HDM2		PPM1J	

El listado de 13 genes, más restrictivo, mostrado en la Tabla 7, sufrió una segunda ronda de priorización mediante una búsqueda bibliográfica a través de PubMed buscando las relaciones de cada uno de los 13 genes con enfermedad renal en enero/2020, que recogía el nombre del gen y sus variantes AND kidney. Por ejemplo, (acetyl-Coenzyme A carboxylase beta OR HACC275 OR acac OR AI597064 OR AW743042 OR Acc2 OR accb) AND kidney. Los resultados de la búsqueda se muestran en la Tabla 9. No se realizó búsqueda de *ICAM1* al ser una molécula muy estudiada y carente de originalidad.

Tabla 9. Resultados de búsqueda bibliográfica de los genes compartidos por estudios de GWAS humano identificando genes asociados a la enfermedad renal y cuya expresión está disminuida a menos de la mitad ($FC < 0,50$) o aumentada a más del doble ($FC > 2,00$) con $FDR < 0,05$ en el FRA murino por ácido fólico a las 24 horas. FC: fold-change.

FC<0,50 n=8		FC>2,00 n=5	
Gen	artículos recogidos/total	Gen	artículos recogidos/total
ACACB	15/52	CTSS	12/44
ACSM5	0/0	ICAM1	no realizada
CNDP1	17/37	ITGAX	9/161
DPEP1	9/228	ITGAM	30/524
GATM	21/91	PPM1J	1/1
SLC6A12	15/255		
AGXT2L1	2/2		
SLC15A2	24/125		

Tras analizar los resultados obtenidos, seleccionamos el gen *SLC15A2* como objeto de estudio como potencial diana terapéutica en enfermedad renal. Los criterios aplicados fueron novedad, plausibilidad biológica (disponibilidad de evidencia clínica convincente que apunte a un mecanismo de acción viable) y viabilidad (existencia de enfoques intervencionistas que ya se utilizan en entornos clínicos) (Tabla 10).

Tabla 10. Cumplimiento de los criterios de selección de los 13 genes preseleccionados, eligiéndose SLC15A2 como objeto de estudio por cumplir los 3 criterios. FC: fold-change; FDR: false discovery rate.

Gen	FC	FDR	Novedad	Plausibilidad biológica	Viabilidad
ACACB	0,4525	0,0082		X	X
ACSM5	0,2992	0,0072	NA	NA	NA
CNDP1	0,2601	0,0213		X	X
DPEP1	0,3145	0,0091		X	
GATM	0,3473	0,0196		X	
SLC6A12	0,3509	0,0101		X	X
AGXT2L1	0,4105	0,0198			
SLC15A2	0,3748	0,0122	X	X	X
CTSS	2,0696	0,0125		X	X
ICAM1	2,0009	0,0049	NA	NA	NA
ITGAX	2,7455	0,0034		X	X
ITGAM	3,5908	0,0088		X	X
PPM1J	3,4702	0,0057	X		X

Una vez priorizado SLC15A2/PEPT2 para estudio, se realizó una búsqueda bibliográfica en PubMed con el término “SLC15A2” obteniéndose 342 resultados el 6 mayo 2020. En estos resultados, identificamos la interacción de PEPT2 con ALA, colistina, y matriquina como clínicamente relevantes.

La estructura del PEPT2 se extrajo de (62).

2. Minería de datos identifica a *SLC15A2* como un gen expresado por células tubulares proximales y diferencialmente expresado en múltiples nefropatías humanas y experimentales

Mediante minería de datos se recolectó primero la información sobre la expresión génica de *SLC15A2* en las bases de datos de transcriptómica renal Nephroseq y KIT. Buscamos todos los estudios de transcriptómica, tanto experimentales como en humanos, realizados previamente por otros investigadores, en diferentes tipos de enfermedades renales, en donde se hubiese medido la expresión de *SLC15A2* en tejido renal, glomérulo o túbulointersticio.

2.1. Expresión génica de *SLC15A2* en transcriptómica de riñón total en Nephroseq

En la primera parte de la búsqueda en Nephroseq, se analizó la correlación entre la expresión génica (niveles de mRNA) de *SLC15A2* en humanos con dos biomarcadores clínicos: filtrado glomerular estimado y proteinuria, todos con $p < 0,05$ y $FC > 1,50$ (Tabla 11)

La Tabla 11 muestra una correlación positiva entre el filtrado glomerular y la expresión de *SLC15A2* en las diferentes bases de datos analizadas salvo en aquellas muestras obtenidas de riñones de donante cadáver. En cada estudio, recogimos los filtrados glomerulares de cada paciente y calculamos su media y DT.

Además, en muestras de pacientes con nefropatía membranosa, se ve una correlación positiva con la proteinuria, es decir, a mayor proteinuria, mayor expresión de *SLC15A2*. Sin embargo, en muestras obtenidas de pacientes con Enfermedad de cambios mínimos, la correlación fue negativa. Es importante destacar que la mediana de proteinuria en pacientes con cambios mínimos está dentro del rango de la normalidad, esto es, correspondería a 4 pacientes en remisión.

Tabla 11. Análisis de expresión de *SLC15A2* con relación a FGe y proteinuria con los siguientes valores: p-Value: 0,05; r-Value: 0; Fold change: 1,5 en diferentes bases de datos obtenidos de (115) acceso enero/2023. DT: desviación típica; IQR: rango intercuartílico; TubInt: túbulointersticio.

Filtrado glomerular estimado					
Base de datos	Análisis	N	r-Value	p-Value	Media (DT)
Ju CKD TubInt	Tubulointersticio	186	0,173	0,018	70,87 (38,43)
Ju CKD TubInt 2	Tubulointersticio	42	0,4	0,009	76,31 (50,75)
Rodwell Aging Kidney	Corteza y médula renal	69	0,3	0,012	74,31 (23,67)
Reich IgAN TubInt	Nefropatía IgA; TubInt	24	0,446	0,029	75,94 (37,85)
Flechner Transplant Kidney	Donantes cadáver; riñón completo	12	-0,594	0,042	43,66 (24,17)
Proteinuria					
Base de datos	Análisis	N	r-Value	p-Value	Mediana (IQR)
Sampson Nephrotic Syndrome TubInt	Nefropatía membranosa; TubInt	8	0,784	0,021	40,49 (289,19)
Schmid Diabetes TubInt	Enf. de cambios mínimos; TubInt	4	-0,958	0,042	4,2 (4,5)

En la segunda parte de la búsqueda en Nephroseq, se analizó la expresión génica de *SLC15A2* entre las diferentes patologías mencionadas y los riñones “sanos”, todos con $p < 0,05$ (Tabla 12). Los datos se han separado según correspondan a humanos o modelos animales, y si el tejido es túbulointersticio o glomérulo.

En cuatro estudios se analizaron muestras correspondientes a túbulointersticio, comparando la expresión de mRNA en nefritis lúpica, nefropatía diabética, glomeruloesclerosis focal y segmentaria y vasculitis con riñón normal. En un estudio, la definición de riñón normal fue una Enfermedad de cambios mínimos y en otros estudios, riñones de donantes vivos. La expresión túbulointersticial de *SLC15A2* aumenta en nefritis lúpica y glomeruloesclerosis focal y segmentaria, en comparación con riñones de donantes sanos, y en nefropatía diabética en comparación con Enfermedad de cambios mínimos. Sin embargo, se produce un descenso de la expresión de *SLC15A2* en riñones de pacientes con vasculitis en relación con donantes vivos sanos. Acorde con los datos de Nakagawa CKD Kidney, la expresión de *SLC15A2* disminuye en ERC frente a riñones normales. En el resto de los estudios con muestras humanas y en los

modelos murinos, los datos se analizaron en glomérulo, y *SLC15A2* tiene una expresión principal en el túbulo proximal.

Tabla 12. Análisis de expresión de *SLC15A2* en relación con diferentes enfermedades versus riñones normales (donantes vivos sanos, enfermedad de cambios mínimos o controles) con los siguientes valores: p Value: 0,050; r Value: All; Fold change: All en diferentes bases de datos de (115) acceso enero/2023. FC: Fold Change.

Humano				
Base de datos	Análisis	N	FC	p-Value
Berthier Lupus TubInt	Nefritis lúpica vs. Donantes vivos sanos	47	1,275	0,01
Schmid Diabetes TubInt	Nefropatía diabética vs. Enfermedad de cambios mínimos y control	22	1,321	0,025
Ju CKD TubInt	Glomerulosclerosis focal y segmentaria vs. Donantes vivos sanos	48	1,109	0,036
Ju CKD TubInt	Vasculitis vs. Donantes vivos sanos	52	-1,076	0,047
Nakagawa CKD Kidney	Enfermedad renal crónica vs. Riñón normal	53	-1,428	0,000726
Reich IgAN Glom	Nefropatía IgA vs. Donantes vivos sanos	33	-1,133	0,002
Neusser Hypertension Glom	Nefrosclerosis vs. Nefrectomía tumoral	18	-1,410	0,002
Ju CKD Glom	Vasculitis vs. Donantes vivos sanos	44	-1,179	0,002
Ju CKD Glom	Hipertensión arterial vs. Donantes vivos sanos	36	-1,132	0,018
Ju CKD Glom	Enfermedad de cambios mínimos vs. Donantes vivos sanos	35	-1,097	0,04
Ratón				
Base de datos	Análisis	N	FC	p-Value
Hodgin Diabetes Mouse Glom	Nefropatía diabética vs. Riñón no diabético (Modelo ratón db/db C57BLKS)	10	-2,278	0,024
Hodgin Diabetes Mouse Glom	Nefropatía diabética vs. Riñón no diabético (Modelo ratón DBA/2)	17	-1,714	0,0000165

2.2. Localización de la expresión de *SLC15A2* en transcriptómica de células individuales en KIT

En esta sección describimos los resultados de transcriptómica renal de células individuales en diferentes riñones humanos y murinos. Los datos están expresados como promedio de la expresión (average expression scale o avg.exp.scale) y en porcentaje de células que expresan dicho gen (pct.exp)

2.2.1. Transcriptómica en riñones humanos

La Figura 26 muestra los diferentes patrones de expresión de *SLC15A2* en riñón humano. El panel a) corresponde a la expresión de *SLC15A2* medido por scRNA-seq en un riñón sano de un donante varón de 70 años con creatinina 1,1 mg/dl. La expresión de *SLC15A2* es alta en la mitad proximal de la nefrona (túbulo proximal y asa de Henle) frente a la nefrona distal (116,117). El panel b) muestra la expresión de *SLC15A2* medido por snRNA-seq en un riñón trasplantado con rechazo agudo mixto (rechazo mediado por células T con células plasmáticas gradado con Banff1B junto con rechazo mediado por anticuerpos C4d-negativo). El gen *SLC15A2* se expresa en células plasmáticas y también, pero en menor medida, en el túbulo proximal y asa de Henle (116,117). Los paneles c) y d) muestran la expresión de *SLC15A2* medida por snRNA-seq en 4525 núcleos de células renales de riñón sano. El panel c) identifica una baja expresión de *SLC15A2* en la mayoría de células de los segmentos S1 y S2 del túbulo proximal y del asa ascendente de Henle, sin embargo, algunos clusters de células presentan una expresión mayor, entre 1 y 3 desviaciones típicas mayor. El panel d) muestra resultados similares al panel a), alta expresión principalmente en los segmentos más iniciales del túbulo proximal (S1 y S2) así como en la región ascendente del asa de Henle en comparación con el resto de tipos celulares y segmentos tubulares (117,118).

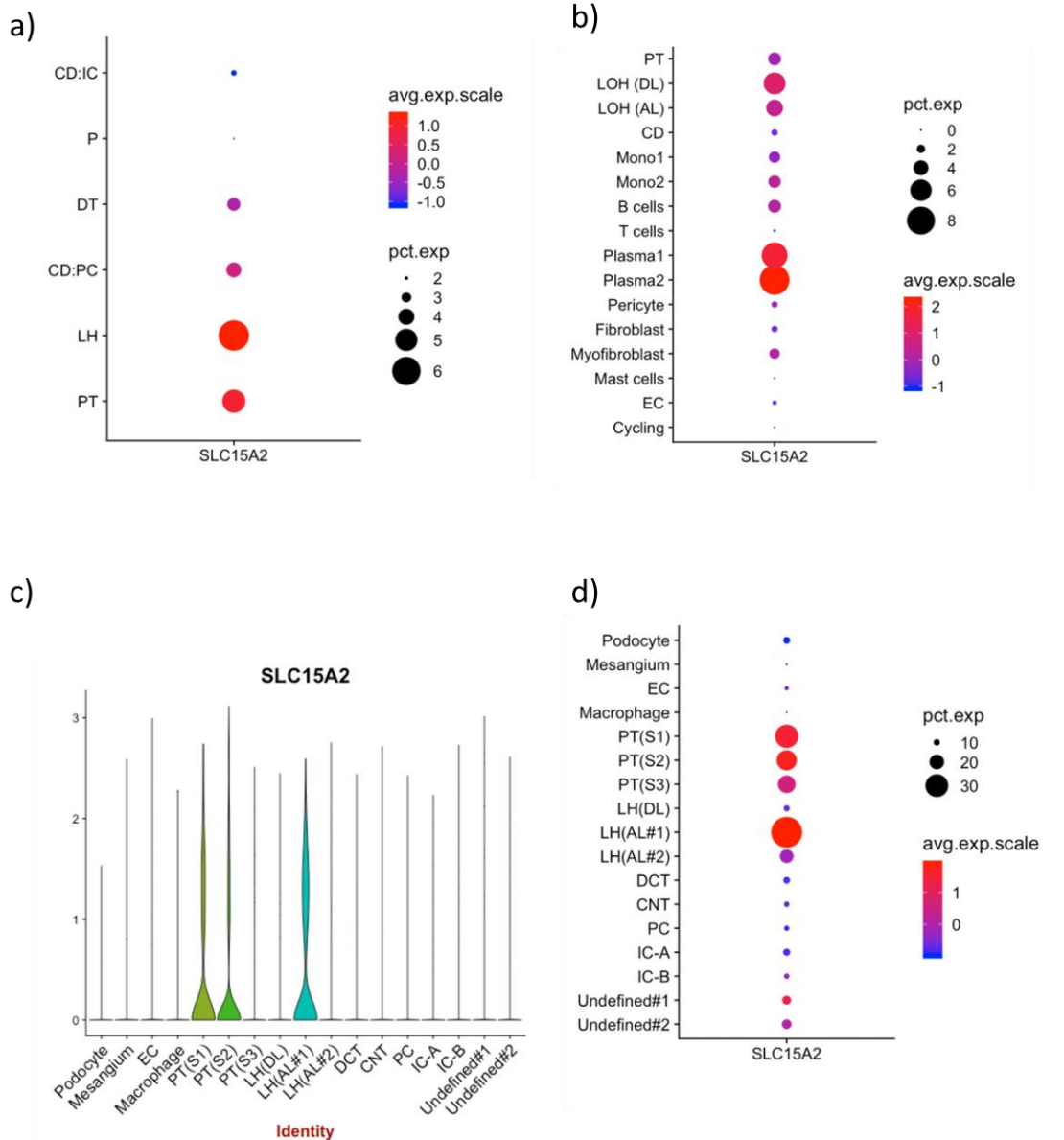


Figura 26. Expresión de SLC15A2 en riñón humano. a) Expresión de SLC15A2 medida por scRNA-seq en células de un riñón sano (116,117). b) Expresión de SLC15A2 medida por scRNA-seq en células de riñón trasplantado durante un rechazo agudo mixto (n=1) (rechazo mediado por células T con células plasmáticas gradado como Banff1B junto con rechazo mediado por anticuerpos C4d-negativo) (116,117). c) y d) Expresión de SLC15A2 medida por snRNA-seq en 4.524 núcleos de células renales de riñón sano (117,118). B cell: linfocito B; CD: túbulo colector; CNT: túbulo colector; CD:IC: células intercaladas del túbulo colector; CD:PC: célula principal del túbulo colector; DT: túbulo distal; DCT: túbulo contorneado distal; EC: célula endotelial; Fibroblast: fibroblasto; IC-A: célula intercalada A del túbulo colector; IC-B: célula intercalada B del túbulo colector; LH: asa de Henle; LOH (AL): porción ascendente del asa de Henle; LH (AL): porción ascendente del asa de Henle; LH(DL): porción descendente del asa de Henle; LOH (DL): porción descendente del asa de Henle; Macrophage: macrófago; Mast cells: mastocitos; Mesangium: mesangio; Mono: monocitos; myofibroblast: miofibroblasto; P: podocito; PC: célula principal del túbulo colector; Pericyte: pericito; Plasma: célula plasmática; Podocyte: podocito; PT: túbulo proximal; PT(S1): segmento S1 del túbulo proximal; PT(S2): segmento S2 del túbulo proximal; PT(S3): segmento S3 del túbulo proximal; scRNA-seq: secuenciación de RNA usando la célula completa (single cell; sc); snRNA-seq: secuenciación del RNA celular usando sólo el núcleo aislado (single nuclei; sn); T cell: linfocito T.

La Figura 27 muestra la expresión de SLC15A2 en riñones sanos obtenidos mediante nefrectomía total o parcial por masa renal. La expresión medida por snRNA-seq fue muy leve o nula en casi

todos los tipos celulares y segmentos tubulares salvo en el túbulo proximal y en el asa ascendente gruesa de Henle (117,119) acceso febrero/2023).

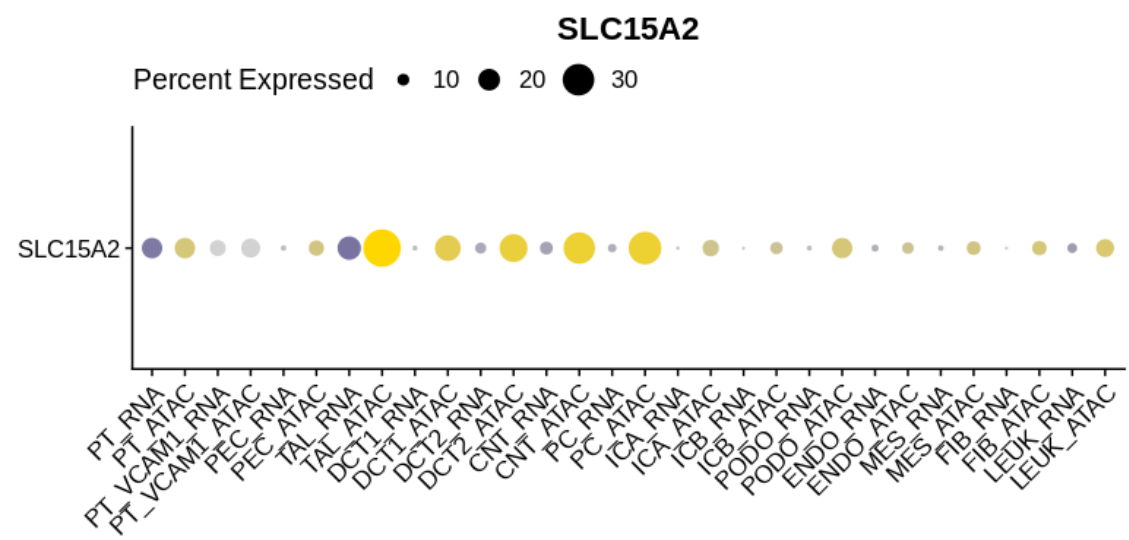


Figura 27. Expresión de *SLC15A2* medida mediante snRNA-seq en células de 5 riñones humanos adultos sanos obtenidos por nefrectomía total o parcial por masa renal (117,119). CNT: túbulo conector; DCT1 y DCT2: túbulo contorneado distal; ENDO: célula endotelial; FIB: fibroblastos; ICA: células intercaladas A del túbulo colector; ICB: células intercaladas B del túbulo colector; LEUK: leucocitos; MES: células mesangiales; PC: célula principal del túbulo colector; PEC: célula epitelial parietal; PODO: podocito; PT: túbulo proximal; PT_VCAM1: células del túbulo proximal con aumento de expresión de VCAM1; snRNA-seq: secuenciación del RNA celular usando sólo el núcleo aislado (single nuclei; sn); TAL: porción ascendente gruesa del asa de Henle.

2.2.1.1. Expresión de *SLC15A2* en riñones humanos diabéticos

La Figura 28 compara la expresión de *SLC15A2* medida por snRNA-seq en 23.980 núcleos de riñones sanos (empleados como controles) o con nefropatía diabética temprana, obtenidos mediante nefrectomía por masa renal. En la Figura 28 a), la expresión de *SLC15A2* es similar en el asa de Henle de pacientes control y diabéticos. Sin embargo, parece haber un leve aumento de la expresión en el túbulo contorneado proximal en pacientes diabéticos frente a los controles. La Figura 28 b) muestra que el porcentaje de células que expresan *SLC15A2* en el túbulo contorneado proximal es mayor en diabéticos frente a controles, mientras que en el asa de Henle es mayor en controles que en diabéticos (117,120) acceso febrero/2023).

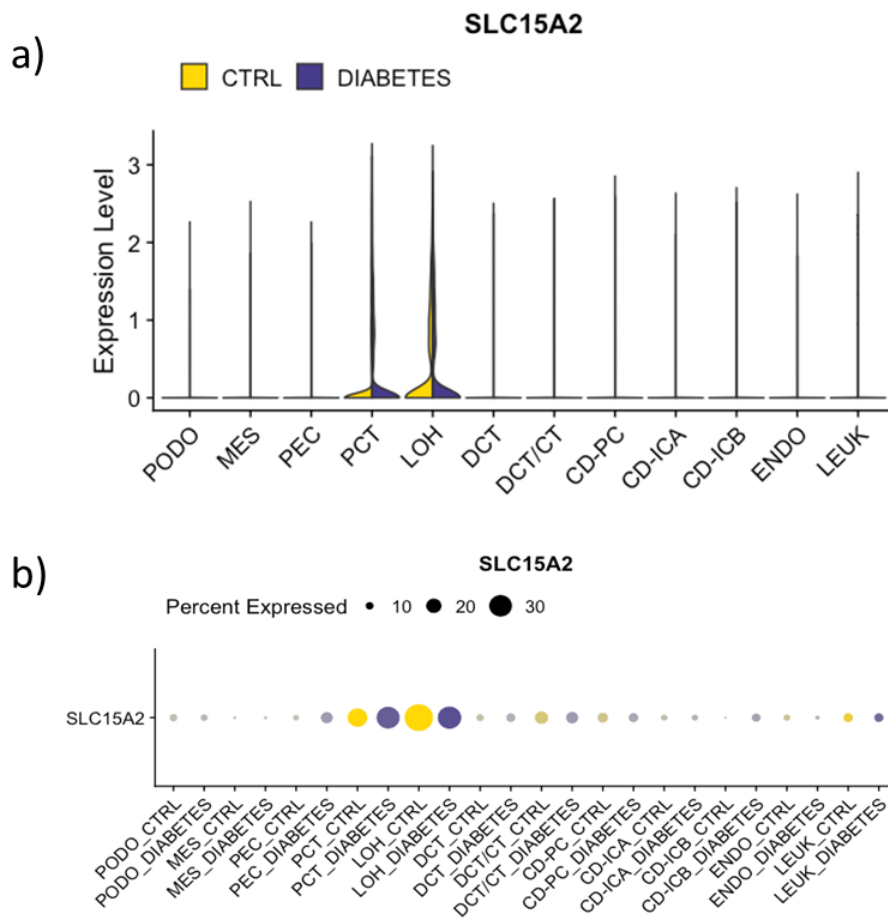


Figura 28. Expresión de *SLC15A2* medido por snRNA-seq en 23980 núcleos de células de riñones humanos sanos ($n=3$) o con nefropatía diabética temprana ($n=3$) obtenidos mediante nefrectomía por masa renal (117,120). CD: túbulo colector; CD-ICA: células intercaladas A del túbulo colector; CD-ICB: células intercaladas B del túbulo colector; CD-PC: célula principal del túbulo colector; CT: túbulo conector; DCT: túbulo contorneado distal; ENDO: célula endotelial; LEUK: leucocitos; LOH: asa de Henle; MES: células mesangiales; PCT: túbulo contorneado proximal; PEC: célula epitelial parietal; PODO: podocito; snRNA-seq: secuenciación del RNA celular usando sólo el núcleo aislado (single nuclei; sn);

En la Figura 29 se muestra la expresión de *SLC15A2* medida por snRNA-seq en 7 riñones humanos con enfermedad renal diabética y 6 riñones humanos sanos obtenidos mediante nefrectomía por masa renal o de riñones de donantes empleados como controles. La expresión de *SLC15A2* es similar en riñones controles y en nefropatía diabética en células negativas para claudina 16 de la porción ascendente gruesa del asa de Henle (TAL1) y en el túbulo proximal con expresión de VCAM1 (células de túbulo proximal con fenotipo de reparación fallida) pero con leve sobreexpresión en riñones diabéticos a nivel del túbulo proximal y de las células positivas para claudina 16 de la porción ascendente gruesa del asa de Henle (TAL2) en comparación con los controles (117,121) acceso febrero/2023).

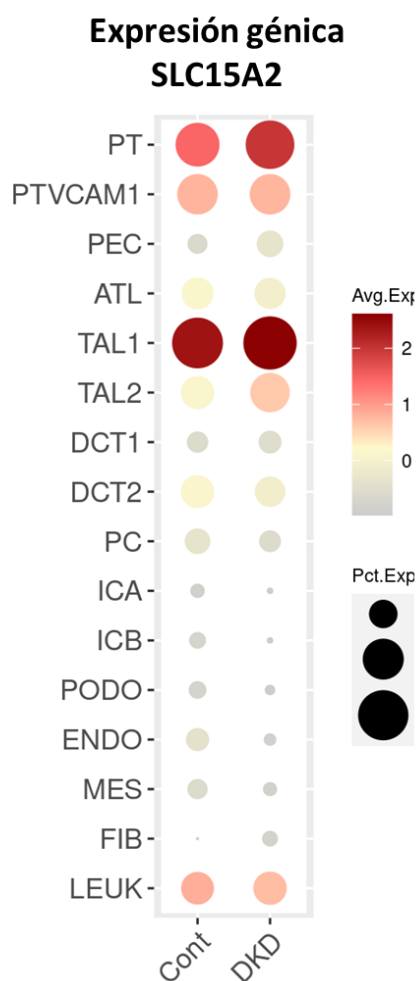


Figura 29. Expresión génica de *SLC15A2* medida mediante *snRNA-seq* y *snATAC-seq* en 7 riñones humanos con enfermedad renal diabética y 6 controles de riñones humanos sanos obtenidos mediante nefrectomía por masa renal o de riñones de donantes (117,121). ATL: porción ascendente fina del asa de Henle; Cont: Control; DCT1: segmento inicial del túbulo contorneado distal; DCT2: segmento distal del túbulo contorneado distal; DKD: enfermedad renal diabética; ENDO: célula endotelial; FIB: fibroblastos; ICA: células intercaladas A del túbulo colector; ICB: células intercaladas B del túbulo colector; LEUK: leucocitos; MES: células mesangiales; PC: célula principal del túbulo colector; PCT: túbulo contorneado proximal; PEC: célula epitelial parietal; PODO: podocito; PT: túbulo proximal; PT_VCAM1: células del túbulo proximal con aumento de expresión de VCAM1 descritas como células tubulares proximales con reparación fallida (failed-repair, FR);; *snRNA-seq*: secuenciación del RNA celular usando sólo el núcleo aislado (single nuclei; sn); TAL1: células *CLDN16* (claudina 16) negativas de la porción ascendente gruesa del asa de Henle; TAL2: células *CLDN16* (claudina 16) positivas de la porción ascendente gruesa del asa de Henle.

2.2.1.2. Expresión de *SLC15A2* en enfermedad renal poliquística autosómica dominante humana

La Figura 30 muestra la expresión de *SLC15A2* medida mediante *snRNA-seq* en 8 riñones humanos con enfermedad poliquística autosómica dominante obtenidos mediante nefrectomía y 5 controles de riñones humanos sanos obtenidos mediante nefrectomía por masa renal. La expresión génica es mayor y el porcentaje de células que expresan *SLC15A2* también en el túbulo

proximal sano (en comparación con las células del túbulo proximal con reparación fallida) y de la porción ascendente gruesa del asa de Henle en los controles, frente a los riñones poliquísticos, donde la expresión es menor de forma comparativa (117,122)acceso febrero/2023).

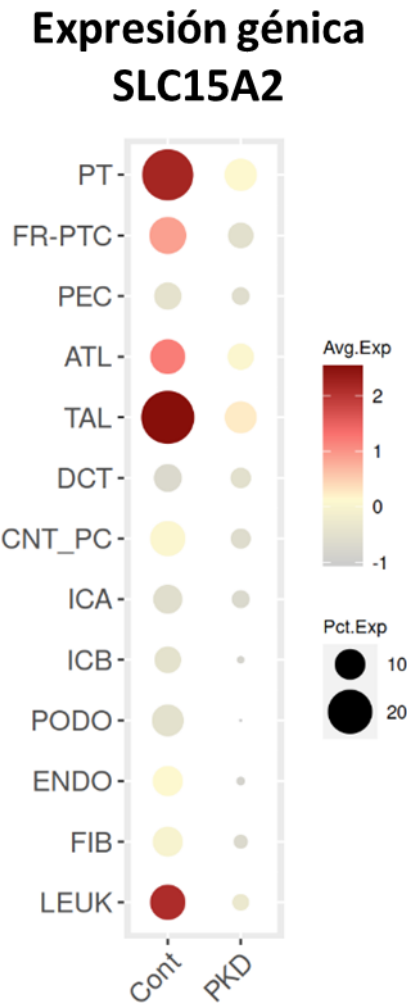


Figura 30. Expresión de SLC15A2 medida mediante snRNA-seq en 8 riñones humanos con enfermedad poliquística autosómica dominante obtenidos mediante nefrectomía y 5 controles de riñones humanos sanos obtenidos mediante nefrectomía por masa renal (117,122). ATL: porción ascendente fina del asa de Henle; CNT_PC: túbulo conector y células principales; DCT: túbulo contorneado distal; ENDO: célula endotelial; FIB: fibroblastos; ICA: células intercaladas A del túbulo colector; ICB: células intercaladas B del túbulo colector; LEUK: leucocitos; PEC: célula epitelial parietal; PODO: podocito; PT: túbulo proximal; FR-PTC: células del túbulo proximal con aumento de expresión de VCAM1 descritas como células tubulares proximales con reparación fallida (failed-repair, FR); snRNA-seq: secuenciación del RNA celular usando sólo el núcleo aislado (single nuclei; sn); TAL: porción ascendente gruesa del asa de Henle.

2.2.2. Expresión de *Slc15a2* en transcriptómica de nefropatías murinas experimentales

La Figura 31 muestra la expresión de *Slc15a2* medida mediante snRNA-seq en dos modelos murinos diferentes. En la Figura 31 a), correspondiente a riñones sanos de ratones adultos, se evidencia que la expresión de *Slc15a2* es mayoritaria en el segmento S3 del túbulo proximal, en la porción ascendente del asa de Henle, en el túbulo contorneado distal y en el túbulo conector (117,123) acceso febrero/2023). La Figura 31 b) muestra un modelo murino de riñones fibróticos a los 14 días de una obstrucción ureteral unilateral (UUO). La expresión de *Slc15a2* es también mayoritaria en el segmento S3 del túbulo proximal y en la porción ascendente gruesa del asa de Henle, observándose también expresión en podocitos. En el resto de células estudiadas la expresión es mínima o inexistente (117,123) acceso febrero/2023).

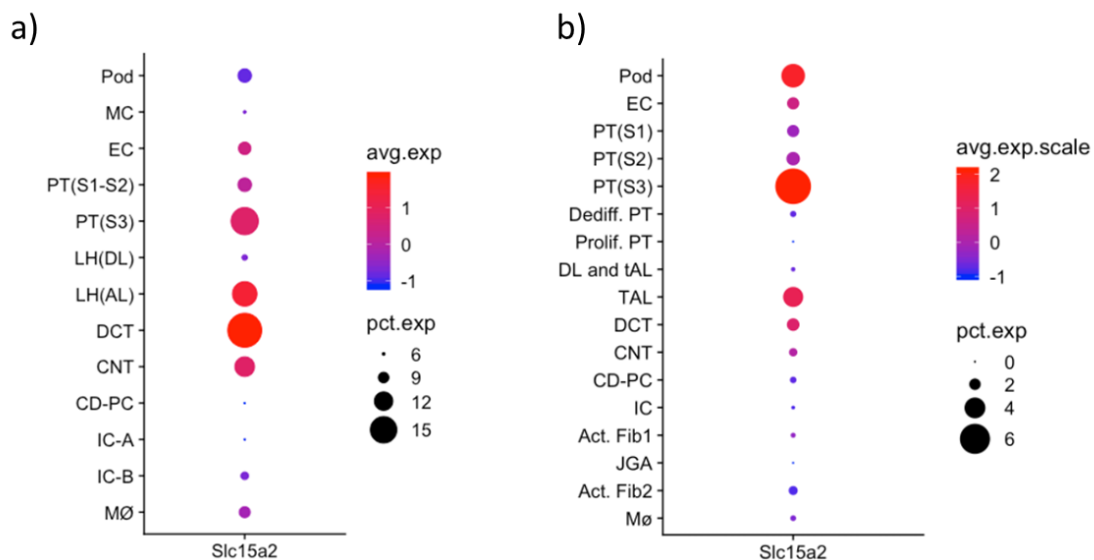


Figura 31. Expresión de *Slc15a2* en dos modelos murinos experimentales. a) Expresión de *Slc15a2* medida mediante snRNA-seq en riñones sanos de ratones adultos (117,123). b) Expresión de *Slc15a2* medida mediante snRNA-seq en riñones fibróticos de ratones 14 días después de cirugía de obstrucción ureteral unilateral (117,123). Act. Fib: fibroblasto activador; CD-PC: célula principal del túbulo colector; CNT: túbulo conector; DCT: túbulo contorneado distal; Dediff. PT: túbulo proximal desdiferenciado; DL + tAL: porción descendente y ascendente fina del asa de Henle; EC: célula endotelial; IC: células intercaladas del túbulo colector; IC-A: células intercaladas A del túbulo colector; IC-B o ICB: células intercaladas B del túbulo colector; JGA: aparato yuxtaglomerular; LH(AL): porción ascendente del asa de Henle; LH(DL): porción descendente del asa de Henle; MC: células mesangiales; MØ: macrófagos; Pod: podocito; Prolif. PT: túbulo proximal en proliferación; PT(S1): túbulo proximal segmento 1; PT(S2): túbulo proximal segmento 2; PT(S3): túbulo proximal segmento 3; snRNA-seq: secuenciación del RNA celular usando sólo el núcleo aislado (single nuclei; sn); TAL: asa ascendente gruesa de Henle.

La Figura 32 muestra la expresión de *Slc15a2* medida mediante snRNA-seq en riñones de ratones sin daño y tras isquemia-reperfusión renal (IRI) bilateral. El panel a) muestra la expresión de *Slc15a2* medida mediante snRNA-seq en riñones de ratones sanos, sin daño, y a las 4h, 12h, 2

días, 14 días y 42 días tras IRI bilateral. La expresión de *Slc15a2* en riñones sanos es principalmente en el segmento S3 del túbulo proximal, pero a las 4 horas tras el daño renal agudo, la expresión de *Slc15a2* disminuye en el segmento S3 del túbulo proximal y aumenta transitoriamente en la porción ascendente gruesa del asa de Henle cortical y medular, así como en la mácula densa, desapareciendo a las 48 horas en todos los segmentos y tipos celulares. A partir del día 14 tras el daño renal agudo reaparece la expresión de *Slc15a2* en el segmento S3 del túbulo proximal (117,124) acceso febrero/2023). El panel b) expone la expresión de *Slc15a2* medida mediante snRNA-seq en riñones de ratones sin daño y a las 4h, 12h, 2 días y 42 días tras IRI bilateral, pero usando sólo ratones hembra. En las células renales de ratones hembra sin daño la expresión de *Slc15a2* es mayoritaria en el segmento S3 del túbulo proximal y la sección desde el segmento S3 del túbulo proximal hasta la porción ascendente gruesa del asa de Henle. La expresión de *Slc15a2* en ratones hembra disminuye significativamente ya desde las 4 horas tras el daño renal agudo, no volviendo a reaparecer hasta el día 42 (117,125) acceso febrero/2023).

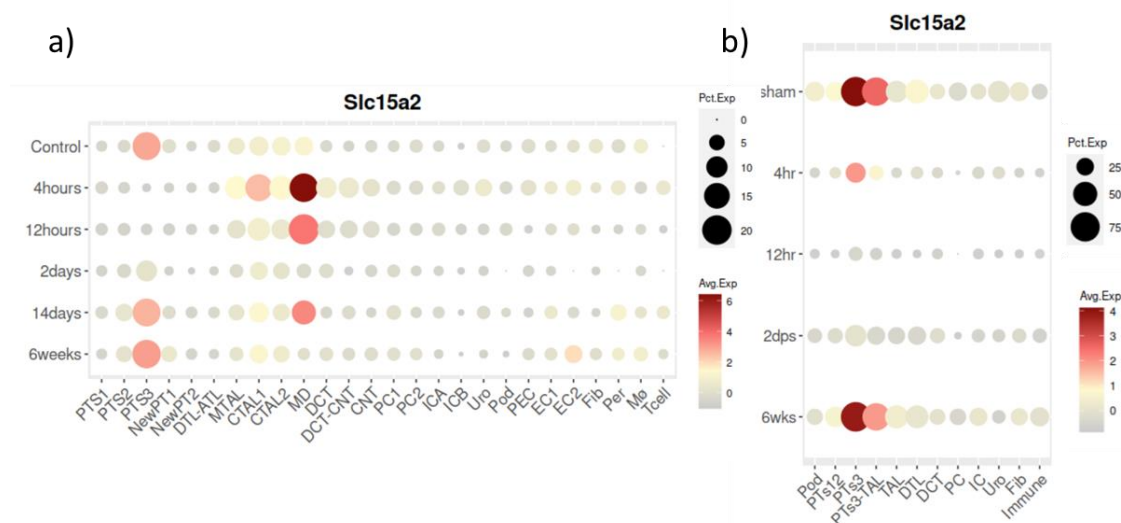


Figura 32. Expresión de *Slc15a2* en dos modelos experimentales murinos de IRI bilateral. a) Expresión de *Slc15a2* medida mediante snRNA-seq en riñones de ratones sin daño y a las 4h, 12h, 2 días, 14 días y 42 días tras IRI bilateral (117,124). b) Expresión del *Slc15a2* medida mediante snRNA-seq en riñones de ratones hembra sin daño y a las 4h, 12h, 2 días y 42 días tras IRI bilateral (117,125). ATL: porción ascendente fina del asa de Henle; CNT: túbulo conector; CTAL: porción ascendente gruesa del asa de Henle cortical; DCT: túbulo contorneado distal; DTL: porción descendente fina del asa de Henle; EC: célula endotelial; Fib: fibroblastos; IC: células intercaladas del túbulo colector; ICA: células intercaladas A del túbulo colector; ICB: células intercaladas B del túbulo colector; MD: macula densa; MTAL: porción ascendente gruesa del asa de Henle medular; MΦ: macrófagos; PC: célula principal del túbulo colector; PEC: célula epitelial parietal; Per: pericitos; Pod: podocito; PT(S1): túbulo proximal segmentos 1; PT(S2): túbulo proximal segmento 2; PT(S3): túbulo proximal segmento 3; PTS3-TAL: desde el segmento 3 del túbulo proximal hasta la porción ascendente gruesa del asa de Henle; snRNA-seq: secuenciación del RNA celular usando sólo el núcleo aislado (single nuclei; sn); TAL: porción ascendente gruesa del asa de Henle; TCELL: linfocito T; Uro: células uroteliales.

La Figura 33 muestra la expresión de *Slc15a2* medida por snRNA-seq en 83.315 núcleos de células renales en un modelo de IRI bilateral en ratones $Ki67^{cre/ERT2}$; INTACT vs control. Se inyectó tamoxifeno en los días 2 y 3 post-IRI para inducir el marcaje con proteína verde fluorescente (GFP) de la membrana nuclear de todas las células en ciclo celular en la inducción de la reparación renal y permitir el seguimiento de estas células hasta 4 semanas y 6 meses después de la IRI. En el momento de la recogida, se separaron las células GFP+ y GFP-. En total se procesaron 12 muestras: 3 muestras GFP+ (AKI_GFP+_4weeks) y 1 muestra GFP- (AKI_GFP-_4weeks) a las 4 semanas post-IRI; 4 muestras GFP+ (AKI_GFP+_6months) y 1 muestra GFP- (AKI_GFP-_6months) a los 6 meses post-IRI; 2 controles a las 4 semanas (Ctrl_4weeks) y 1 control a los 6 meses (Ctrl_6months) (para los controles no se realizó separación de núcleos GFP+ y GFP-). La expresión génica de *Slc15a2* en ratones control es predominante en el segmento S3 del túbulo proximal, tanto en la semana 4 como en el mes 6, aumentando su expresión en las células de la porción ascendente gruesa del asa de Henle cortical y medular, túbulo distal y el segmento del túbulo distal y túbulo conector a los 6 meses. En el modelo de FRA en ratones GFP+ a las 4 semanas, la expresión de *Slc15a2* disminuye en el segmento S3 del túbulo proximal, recuperándose a los 6 meses, pero sin llegar a ser tan elevada como en el grupo control. Además, a los 6 meses se evidencia expresión en podocitos y, en menor medida, en la porción ascendente gruesa del asa de Henle cortical y medular, túbulo distal y el segmento entre el túbulo distal y túbulo conector, de forma similar a la expresión en los controles a los 6 meses. En el modelo de FRA en ratones GFP-, la expresión de *Slc15a2* está muy disminuida en todas las células renales analizadas a las 4 semanas, reapareciendo a los 6 meses en la porción ascendente gruesa del asa de Henle cortical y medular, túbulo distal, en el segmento entre el túbulo distal y túbulo conector, así como en el propio túbulo conector y en las células principales del túbulo colector, en todos ellos de forma más intensa que en los controles a los 6 meses (117,126) acceso febrero/2023).

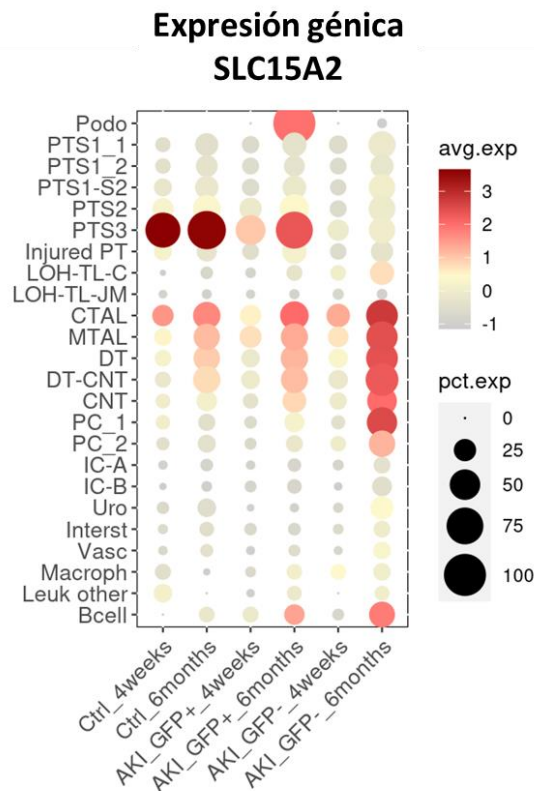


Figura 33. Expresión de *Slc15a2* medida mediante snRNA-seq en 83.315 núcleos de células renales de modelo de IRI bilateral en ratones *Ki67^{cre/ERT2}*; INTACT vs control a las 4 semanas y 6 meses (117,126). AKI: fracaso renal agudo; Bcell: linfocitos B; CNT: túbulo conector; Ctrl: control; CTAL: porción ascendente gruesa del asa de Henle cortical; DT: túbulo distal; GFP: proteína fluorescente verde; IC-A: células intercaladas A del túbulo colector; IC-B: células intercaladas B del túbulo colector; Injured PT: túbulo proximal dañado; Interst: células intersticiales; Leuk other: leucocitos; LOH-TL-C: rama delgada del asa de Henle de nefronas corticales; LOH-TL-JM: rama delgada del asa de Henle de nefronas yuxtamedulares; MTAL: porción ascendente gruesa del asa de Henle medular; Macroph: macrófagos; PC: célula principal del túbulo colector; Podo: podocito; PTS1: túbulo proximal segmento 1; PTS2: túbulo proximal segmento 2; PTS3: túbulo proximal segmento 3; snRNA-seq: secuenciación del RNA celular usando sólo el núcleo aislado (single nuclei; sn); Uro: células uroteliales; Vasc: células vasculares.

La Figura 34 presenta la expresión de *Slc15a2* medida por sci-RNA-seq3 en células renales del túbulo proximal de ratón de un modelo de IRI unilateral y de UUO a diferentes tiempos (0, 6 h, 2, 7, 14 y 28 días para IRI con n=2 para cada tiempo y 0, 2, 4, 6, 10 y 14 días para UUO con n=2 para cada tiempo). En este modelo se definen diferentes estados celulares que ocurren tras el daño renal: estado sano, en inglés indicado en la figura como Healthy S1/S2/S3, el daño agudo (Acute injury), el reparador (repairing), el de reparación fallida (failed repair) y dos estados intermedios entre sanos y de reparación fallida, llamados células dañadas tipo 1 y tipo 2 (type 1 and type 2 injury). La Figura 34 a) muestra como la expresión de *Slc15a2* disminuye tras el daño renal agudo por IRI desde las 6 horas hasta el día 7, se recupera hasta valores basales en el día 14 y se sobreexpresa en comparación con el control al día 28. En el modelo de UUO, la expresión disminuye desde el día 2 hasta el día 6, posteriormente se evidencia un aumento de expresión

al día 10 en comparación con el control, volviendo a disminuir hasta valores basales en el día 14. La Figura 34 b) muestra la expresión de *Slc15a2* según el tipo celular renal juntando ambos modelos experimentales. Se evidencia que la expresión es mayor en el túbulo proximal y en las células intercaladas B del túbulo colector. En la Figura 34 c) se pueden ver los diferentes estados de las células tubulares proximales en el modelo del daño renal agudo por IRI donde, a las 6 horas, un gran porcentaje de células presentan un estado de daño tipo 1, y un menor porcentaje, daño tipo 2 y daño agudo, que empiezan a descender desde el día 2, destacando que al día 28, la gran mayoría de células vuelven a los estados sanos en los 3 segmentos del túbulo proximal (S1, S2 y S3). La Figura 34 d) expone los diferentes estados celulares en el modelo de daño renal por UUO. En este caso, al día 2 el estado de daño que predomina es el tipo 2, con menor porcentaje de daño tipo 1 y células en reparación, pero al día 14, aproximadamente un 50% de las células presentan un estado de reparación fallida, persistiendo otro 30% con estado de daño tipo 2 y sólo un 10%, aproximadamente, de células con estado sano en los 3 segmentos del túbulo proximal (S1, S2 y S3). La Figura 34 e) muestra la expresión de *Slc15a2* en cada estado celular, siendo mayoritaria en el segmento S3 del túbulo proximal sano, estando marcadamente disminuido en el resto de estados o segmentos, salvo el segmento S2 sano y en el segmento S3 con daño tipo 2 donde presenta una expresión intermedia (117,127) acceso febrero/2023).

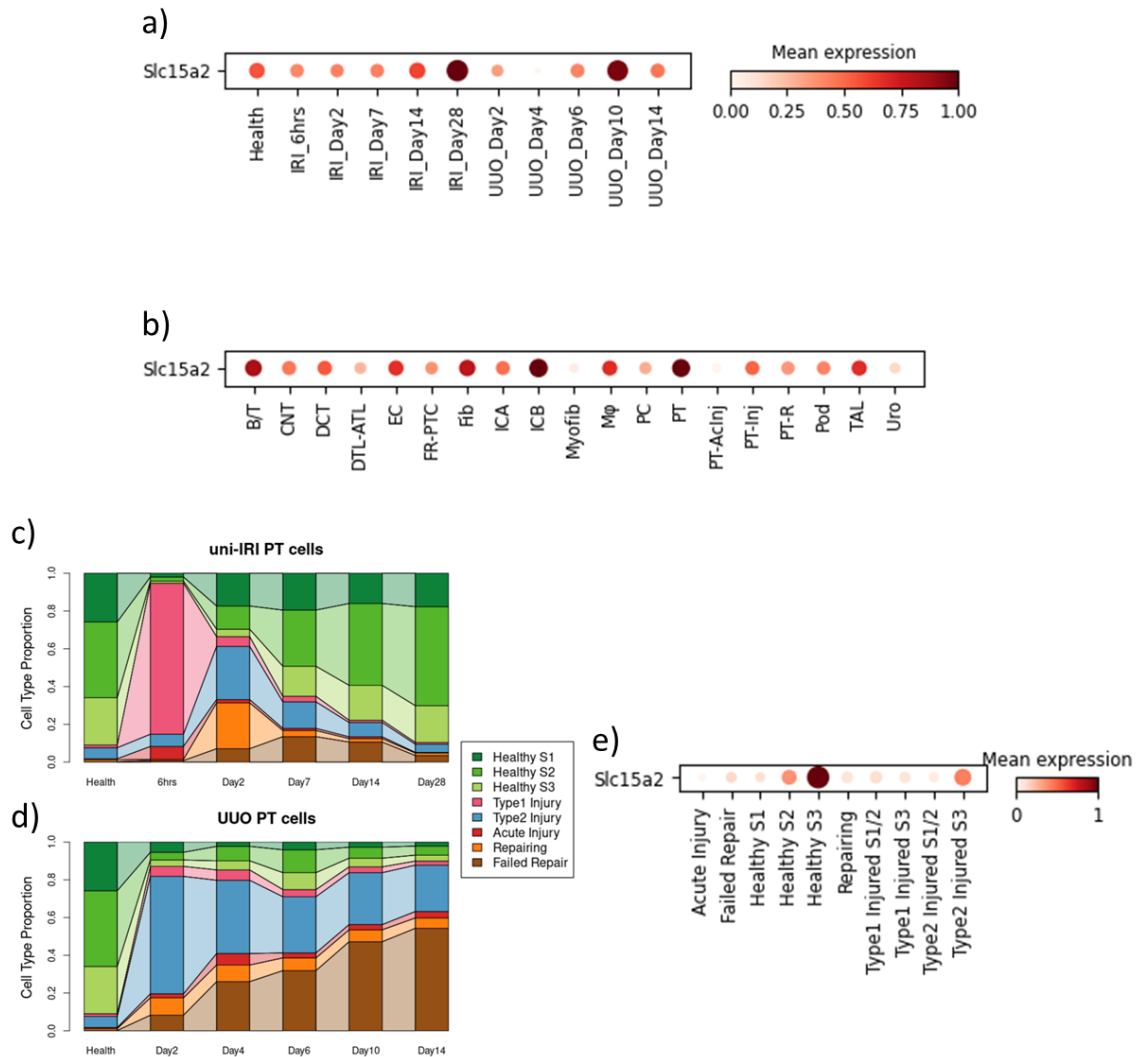


Figura 34. Expresión de *Slc15a2* medida por *sci-RNA-seq3* en dos modelos experimentales murinos. a) Expresión media de *Slc15a2* en células renales murinas en modelo de isquemia-reperfusión unilateral (IRI) y de uropatía obstructiva unilateral (UOO) a diferentes tiempos (0, 6 h, 2, 7, 14 y 28 días para IRI con $n=2$ para cada tiempo y 0, 2, 4, 6, 10 y 14 días para UUO con $n=2$ para cada tiempo) frente a control. b) Expresión media de *Slc15a2* según el tipo celular renal en ambos modelos conjuntamente. c y d) Representación de los diferentes estados de las células tubulares proximales en modelo IRI y UOO, respectivamente. e) Expresión media de *Slc15a2* en cada estado celular (117,127). ATL: porción ascendente fina del asa de Henle; B/T: células inmunes; CNT: túbulo conector; DCT: túbulo contorneado distal; DTL: porción descendente fina del asa de Henle; EC: célula endotelial; Fib: fibroblastos; FR-PTC: células del túbulo proximal con aumento de expresión de VCAM1 descritas como células tubulares proximales con reparación fallida (failed-repair, FR); ICA: células intercaladas A del túbulo colector; ICB: células intercaladas B del túbulo colector; IRI: daño por isquemia-reperfusión; Myofib: miofibroblastos; Mφ: macrófagos; PC: célula principal del túbulo colector; Pod: podocito; PT: túbulo proximal; PT-Acinj: túbulo proximal con daño agudo; PT-Inj: túbulo proximal dañado; PT-R: túbulo proximal en reparación; *sci-RNA-seq3*: single-cell combinatorial indexing RNA sequencing o secuencia de ARN de indexación combinatoria de una sola célula; TAL: porción ascendente gruesa del asa de Henle; UUO: uropatía obstructiva unilateral; Uro: células uroteliales.

3. Data mining colocaliza variantes humanas de alto riesgo de ERC a *SLC15A2* como prevalentes en zonas de alto riesgo de ERCd

En un segundo ejercicio de minería de datos se analizó la distribución geográfica de las principales variantes de *SLC15A2* en la base genómica humana GnomAD, con la hipótesis de que pudiera aportar información sobre la causa de nefropatías endémicas de causa desconocida. En concreto, con su función como transportador, podría explicar por qué había agrupación intrafamiliar y afectación infantil en nefropatías descritas de causa desconocida (ERCd) recientemente, lo que sería compatible, entre otras posibilidades, con una predisposición genética preexistente y la aparición reciente de una nefrotoxina ambiental (¿pesticida?), que, hipotéticamente, fuera sustrato de PEPT2.

3.1. Variantes génicas humanas de *SLC15A2* en GnomAD

Aunque la prevalencia de ambas variantes del PEPT2 sea muy similar en población europea, a nivel mundial es heterogénea (Figura 35) (128)acceso junio/2022).

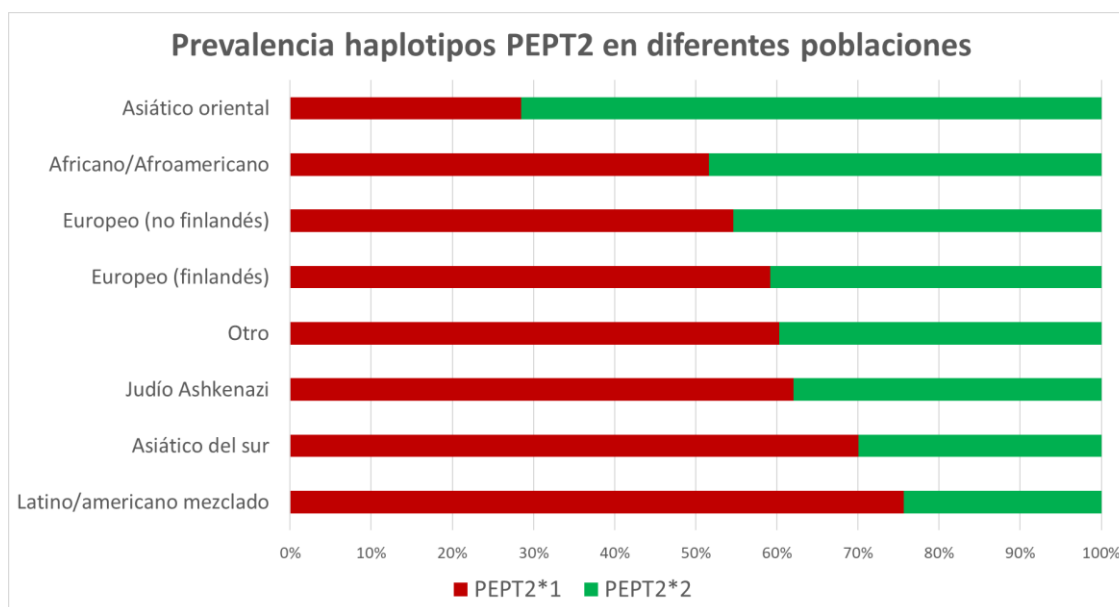


Figura 35. Prevalencia de la expresión de los haplotipos de PEPT2 en diferentes poblaciones a nivel mundial. Destaca la escasa prevalencia de PEPT2*1 en asiáticos orientales, en comparación con la gran prevalencia en asiáticos del sur y en latinoamericanos. De (128) acceso junio/2022.

Cabe destacar que la variante PEPT2*1, que es la que presenta mayor riesgo de desarrollo de ERC, tiene mayor prevalencia en el sur asiático y en Latinoamérica. Estas dos zonas son las que

presentaban mayor prevalencia de ERCd, en concreto de la Nefropatía Mesoamericana y la Nefropatía de Sri-Lanka. Dado que existe una asociación familiar de estas nefropatías, hipotetizamos que los portadores de la variante PEPT2*1/*1, es decir, los que tengan los dos alelos de alta afinidad, pudieran ser más susceptibles a un hipotético componente ambiental no descubierto o a diferentes toxinas del entorno (Figura 36).

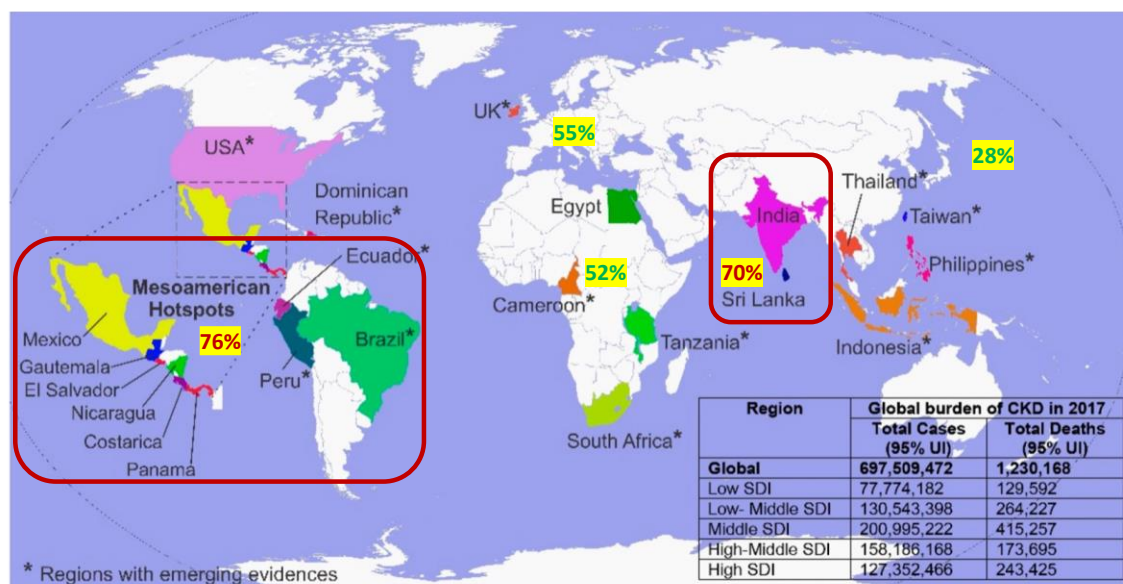


Figura 36. Asociación de la prevalencia de PEPT2*1 en la población mundial (porcentaje en verde o rojo con fondo amarillo) y las áreas calientes de ERCd. Nótese que la prevalencia de PEPT2*1 es alta en Sri-Lanka y en Mesoamérica (porcentaje en rojo con fondo amarillo). De (20) con datos de (128).

A fin de evaluar nuestra hipótesis, contactamos con el profesor Daniel R. Brooks (Epidemiólogo y profesor asociado en Boston University School of Public Health) y con Dr. David Friedman (profesor asociado de Medicina en Harvard Medical School) quienes están realizando estudios genéticos de la Nefropatía Mesoamericana, y nos informaron de que no tenían datos que apoyaran la asociación de variantes génicas de *SLC15A2*/PEPT2 con esta nefropatía, por lo que abandonamos esta línea de investigación.

En este sentido, los pacientes con porfiria aguda intermitente tendrán diferente gravedad de PAKD según la variante alélica que presenten: PEPT2*1 (de alta afinidad) y PEPT2*2 (de baja afinidad). En 122 pacientes con porfiria aguda intermitente: 26 presentaban el genotipo PEPT2*1/*1, 62 el PEPT2*1/*2 y 32 el PEPT2*2/*2 para una distribución de 47% y 52% de PEPT2*1 y PEPT2*2, respectivamente. Dos pacientes se clasificaron como PEPT2*3 y se excluyeron del análisis final (43). Tras un seguimiento de 10 años, los portadores del genotipo PEPT2*1/*1 (alta afinidad/alta afinidad) presentaban una ERC más grave, teniendo el 65% una

ERC G3-G5, en comparación con el 29% y 22% de los PEPT2*1/*2 (alta afinidad/baja afinidad) y PEPT2*2/*2 (baja afinidad/baja afinidad), respectivamente (43). La proteinuria era el doble en los PEPT2*1/*1 comparado con los portadores del genotipo PEPT2*2. Además, la ERC progresó más rápido en el grupo PEPT2*1/*1 comparado con el PEPT2*2 ($-11,0 \pm 3,3$ ml/min/1,73m² en el grupo PEPT2*1/*1 comparado con $-2,4 \pm 1,9$ ml/min/1,73m² en el grupo PEPT2*1/*2 y $+3,4 \pm 2,6$ ml/min/1,73m² en el PEPT2*2/*2, $p=0,001$), siendo el genotipo PEPT2*1/*1 un factor predictor de la gravedad de la ERC (OR 6,85; IC 95% 1,34-46,20) y de la caída de la función renal (OR 3,64; IC 95% 1,37-9,91) (43). La observación fue similar en los pacientes portadores de mutaciones en la hidroximetilbilano sintetasa sin ataques de porfiria aguda intermitente, indicando que incluso los niveles levemente elevados de ALA podrían ser tóxicos para el túbulo renal (porcentaje de pacientes con ERC G3-G5: 54% vs 2% y caída del FGe $-13,0 \pm 18,0$ ml/min/1,73m² vs $-4,8 \pm 14,8$ ml/min/1,73m², en el grupo PEPT2*1/*1 frente a portadores de 1 o 2 alelos del PEPT2*2, respectivamente, $p<0,05$) (43). Estos resultados se atribuyeron a una mayor reabsorción tubular de ALA (y exposición a su toxicidad) en los portadores de PEPT2*1, dado que ALA es sustrato de PEPT2 (43). Por tanto, los portadores de PEPT2*2 (que tiene menos afinidad por ALA) tienen una ERC menos grave y una progresión más lenta de la PAKD (Figura 37) (15,39,43). Además de las variaciones del PEPT2 que afectan a su Km, otros polimorfismos pueden afectar a la expresión del transportador, añadiendo más complejidad a la interacción con sustratos y a su impacto clínico (43).

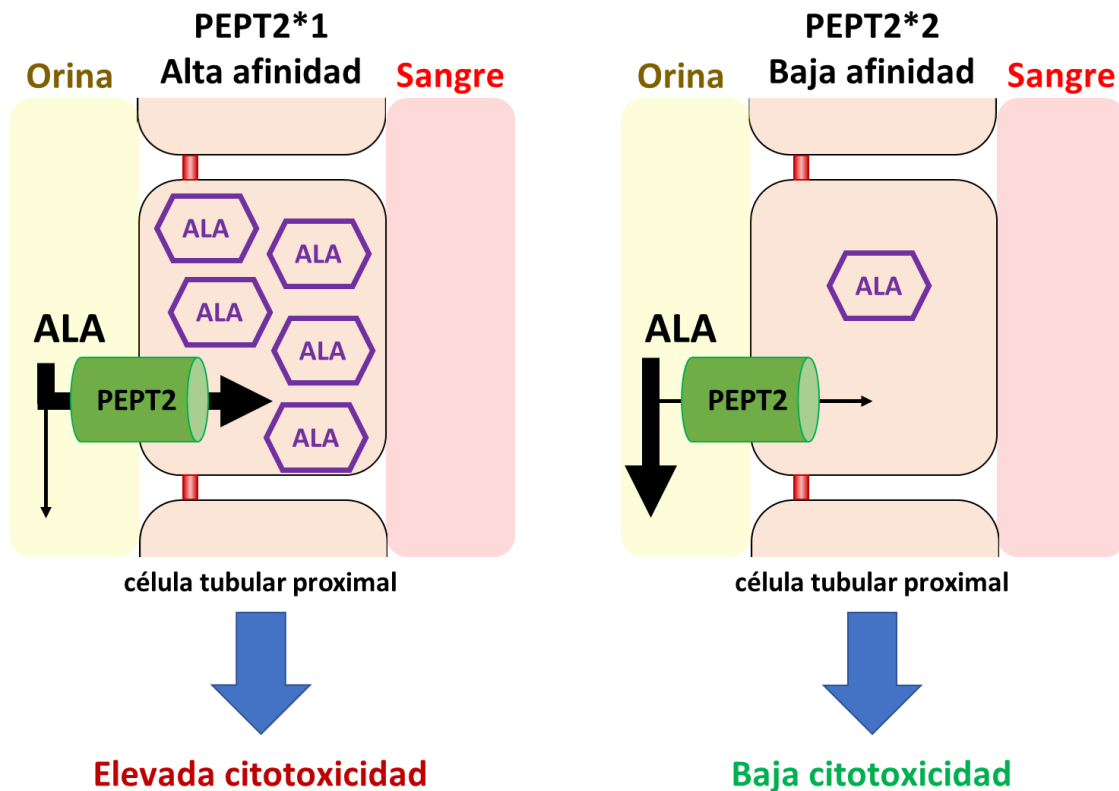


Figura 37. Propuesta sobre la influencia de PEPT2 en la toxicidad tubular por ALA. El transportador PEPT2 se expresa en la membrana apical de las células del túbulo proximal. La variante PEPT2*1 tiene mayor afinidad por ALA que PEPT2*2, y como consecuencia, la reabsorción de ALA desde la orina a las células tubulares que expresan PEPT2*2 es menor que en las que expresan PEPT2*1, generando menor toxicidad tubular. El grosor de la flecha corresponde a la magnitud del proceso. Adaptado de (15).

4. Prueba de concepto: PEPT2 como diana terapéutica en el FRA experimental

A continuación, exploramos las repercusiones terapéuticas de la interferencia con cefadroxilo del transporte tubular de nefrotoxinas (usando colistina como ejemplo clínicamente relevante) por PEPT2. Elegimos un antibiótico (cefadroxilo) dado que, en el contexto de uso de colistina, podría ser interesante administrar un segundo antibiótico. Además, sería viable realizar estudios observacionales de práctica clínica retrospectivos que permitieran evaluar si el uso combinado de cefadroxilo (u otro antibiótico que interfiera con el transporte a través de PEPT2) y colistina se asocia a menos nefrotoxicidad que colistina sola o asociada a otros antibióticos no nefrotóxicos, de forma similar al análisis realizado por Alberto Tejedor y colegas como prueba de concepto del efecto nefroprotector de cilastatina (129).

4.1. Daño renal inducido por colistina en ratones

En este modelo experimental se estudiaron 4 grupos: control, colistina, grupo pretratado con cefadroxilo antes de la colistina y grupo al que solo se administró cefadroxilo. Primero comprobamos que la administración de colistina producía daño renal en ratones. La Figura 38 muestra que los ratones que recibieron colistina presentaron peor función renal, evidenciado por el ascenso de los niveles de urea y creatinina plasmáticos frente a los controles ($p<0,005$ para Urea y $p<0,05$ para Creatinina vs vehículo). Sin embargo, la administración de colistina en los ratones pretratados con cefadroxilo produjo un menor ascenso de urea que la administración de colistina aislada ($p<0,05$), por lo que parece disminuir o prevenir el daño renal por colistina. La administración aislada de cefadroxilo no tuvo efectos sobre la función renal.

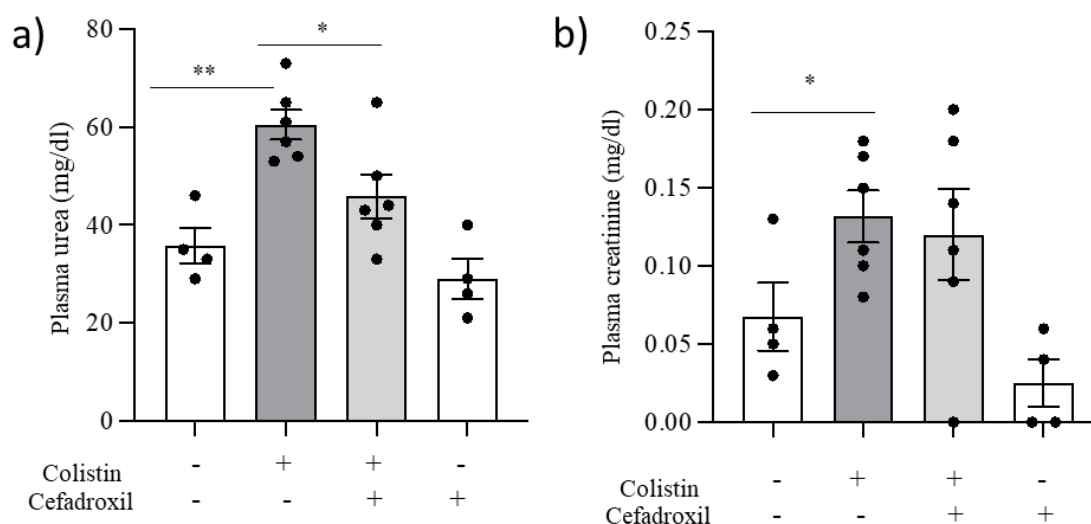


Figura 38. Cefadroxilo protege del fracaso renal agudo causado por colistina en ratones. a) urea plasmática. b) creatinina plasmática. Ambas mediciones se realizaron al día 7 de la administración diaria de vehículo, colistina y/o cefadroxilo. * $p<0,05$ vs colistina o vehículo; ** $p<0,005$ vs vehículo.

La colistina es un nefrotóxico tubular. Evaluamos la toxicidad tubular analizando la expresión de dos moléculas asociadas a daño tubular agudo, KIM1 y NGAL, mediante cuantificación de mRNA. KIM1, llamada también kidney injury molecule 1, es un marcador muy temprano de daño renal, sobre todo en fracaso renal agudo por IRI y en nefrotoxicidad por fármacos (130). En la Figura 39 se observa un aumento de la expresión renal de KIM1 y NGAL en el grupo de colistina ($p<0,0005$ frente al control), confirmando que el daño renal se asocia a toxicidad tubular. En el grupo pretratado con cefadroxilo, la colistina produce una menor elevación en la expresión de ambos marcadores, siendo esta diferencia estadísticamente significativa frente a colistina sola ($p<0,005$ para KIM1 y $p<0,05$ para NGAL), indicando que el bloqueo del transportador PEPT2 con

cefadroxilo disminuye el daño tubular. La administración aislada de cefadroxilo no tuvo efecto sobre la expresión de ambos marcadores.

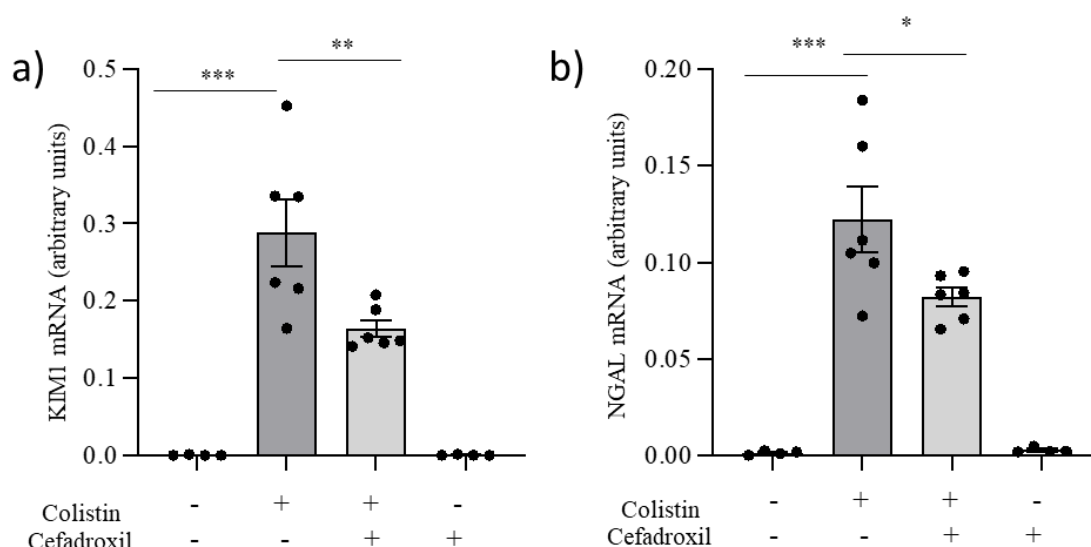


Figura 39. Cefadroxilo protege del daño tubular agudo mediado por colistina en ratones. a) mRNA de KIM-1 a nivel renal. b) mRNA de NGAL a nivel renal. Ambas mediciones se realizaron al día 7 de la administración diaria de vehículo, colistina y/o cefadroxilo. * $p < 0,05$ vs colistina o vehículo; ** $p < 0,005$ vs vehículo; *** $p < 0,0005$ vs vehículo. KIM1: kidney injury molecule 1; NGAL: neutrophil gelatinase-associated lipocalin o lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos.

Dentro de las funciones renales, el túbulo renal produce Klotho, una hormona antienvjecimiento que, además, a nivel renal tiene efectos antiinflamatorios, antifibróticos, antioxidantes y antiapoptóticos (131). La disminución en la expresión renal de Klotho es una de las consecuencias más tempranas tras un daño renal agudo (132). En la Figura 40 se muestra como la colistina produce una disminución significativa en la expresión renal de Klotho en comparación con los controles. Sin embargo, el pretratamiento con cefadroxilo no conservó la expresión renal de Klotho.

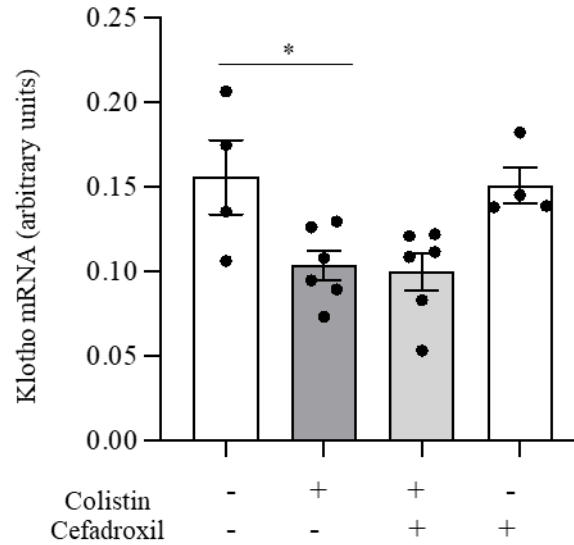


Figura 40. Cefadroxilo no protege de la disminución renal de Klotho mediada por colistina en ratones. Cuantificación de la expresión renal de Klotho determinado mediante mRNA al día 7 de la administración diaria de vehículo, colistina y/o cefadroxilo. * $p < 0,05$ vs colistina o vehículo.

Con respecto a la inflamación, la Figura 41 muestra que la colistina aumenta la expresión de citoquinas proinflamatorias como MCP-1, RANTES e IL-6 ($p < 0,0005$ para MCP-1 y RANTES vs control; $p < 0,005$ para IL-6 vs control). Los ratones pretratados con cefadroxilo desarrollaron una inflamación más leve tras administrar colistina, evidenciado por un menor ascenso en los niveles de mRNA de las citoquinas proinflamatorias ($p < 0,005$ para MCP-1 vs Colistina; $p < 0,05$ para RANTES e IL-6 vs Colistina).

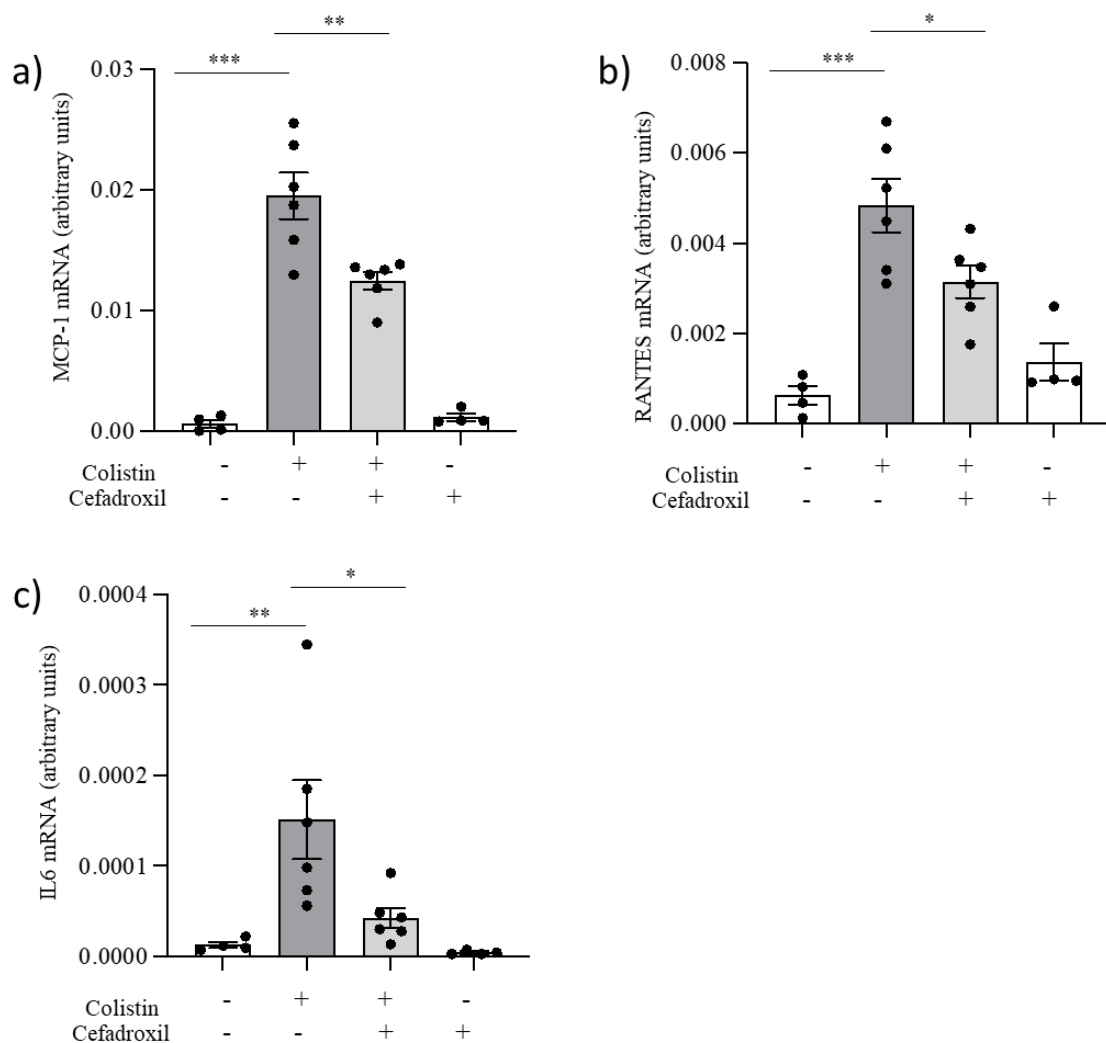


Figura 41. Cefadroxilo disminuye la respuesta proinflamatoria renal mediada por colistina en ratones. a) mRNA de MCP-1 a nivel renal. b) mRNA de RANTES a nivel renal. c) mRNA de IL-6 a nivel renal. Todas las mediciones se realizaron al día 7 de la administración diaria de vehículo, colistina y/o cefadroxilo. * $p < 0,05$ vs colistina o vehículo; ** $p < 0,005$ vs colistina o vehículo; *** $p < 0,0005$ vs vehículo. IL-6: interleuquina 6; MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1 o proteína quimiotáctica de monocitos 1; RANTES: regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted o quimiocina de regulación por activación expresada y secretada por los linfocitos T.

Para determinar si el aumento de citoquinas proinflamatorias producía alteraciones histológicas, se realizó una inmunohistoquímica renal. La Figura 42 muestra los cortes histológicos teñidos con anti-F4/80 para detectar macrófagos murinos y la cuantificación de la infiltración renal por macrófagos expresada como número de células F4/80 positivas por campo de gran aumento. En ambas podemos observar un aumento de la infiltración intersticial renal por macrófagos tras la administración de colistina y una reversión parcial con el pretratamiento con cefadroxilo ($p < 0,005$ vs vehículo o colistina).

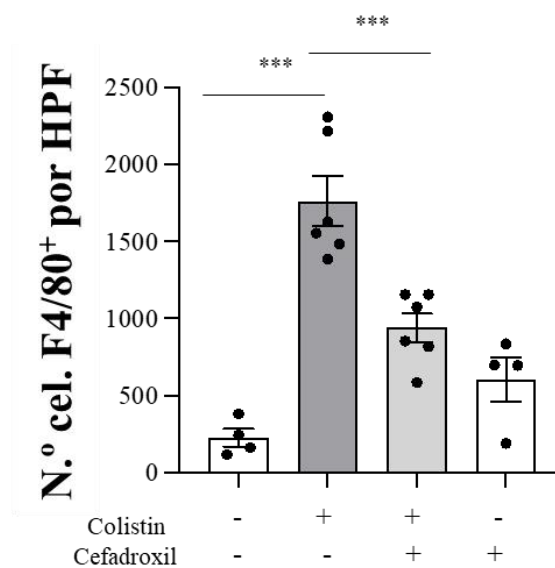
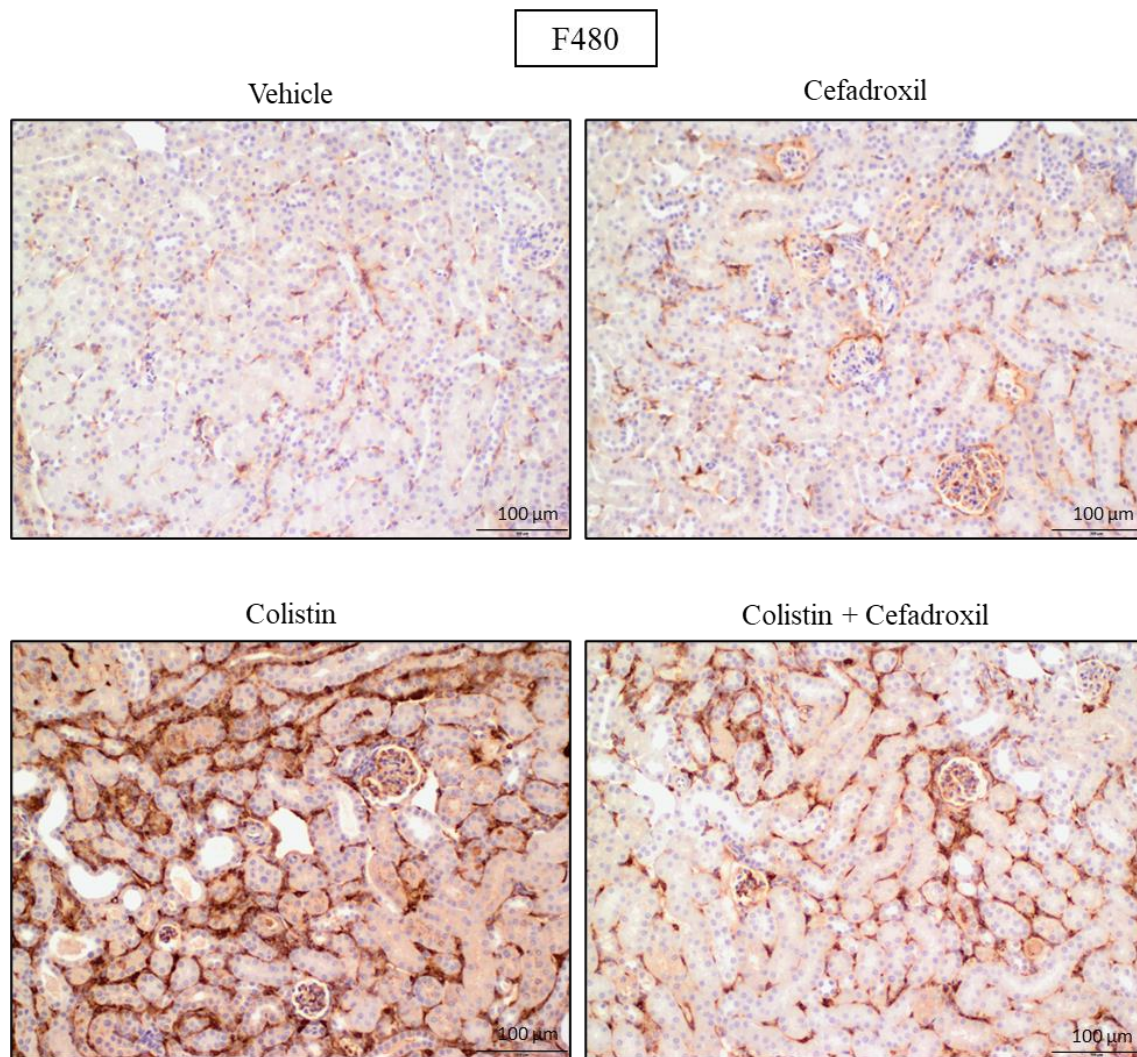


Figura 42. Cefadroxilo protege de la inflamación renal inducida por colistina en ratones. Inmunohistoquímica renal para macrófagos murino F4/80 positivos medidos al día 7 de la administración diaria de vehículo, colistina y/o cefadroxilo. Imágenes representativas y cuantificación. Aumento original 20x. *** $p < 0,005$ vs vehículo o colistina. HPF: campo de gran aumento.

Una vez evidenciado que la toxicidad por colistina implica un daño tubular renal agudo asociado a inflamación, el siguiente paso fue determinar si había aumento de la expresión de moléculas profibróticas, indicando una transición de daño tubular agudo a enfermedad renal crónica. Medimos la expresión de fibronectina 1 (Fn1) y de Colágeno 1a2 (Col1a2). La fibronectina forma parte de los componentes de la matriz mesangial y extracelular, junto con el colágeno I y IV, laminina y proteoglicanos. Tras un daño renal tubular, se produce activación de los fibroblastos intersticiales que aumentan la producción de diversos componentes de la matriz extracelular intersticial como fibronectina y colágeno tipo I y III. En las fases iniciales de la fibrosis renal, el depósito de fibronectina precede a la producción de las fibras de colágeno (133). Por tanto, el aumento de la expresión de Fn1 es un marcador temprano de fibrosis. Con respecto al Col1a2, su expresión se relaciona con la fibrosis túbulointersticial, aumentando su expresión en células epiteliales tubulares dañadas (134). En la Figura 43 se observa que la colistina aumenta la expresión de Fn1 y Col1a2 ($p < 0,0005$ vs vehículo) y como el pretratamiento con cefadroxilo revierte parcialmente este incremento ($p < 0,05$ vs colistina). El tratamiento con cefadroxilo aislado no modificó la expresión de ambas moléculas. Por lo tanto, el daño tubular renal agudo por colistina implica el desarrollo posterior de fibrosis y enfermedad renal crónica y el bloqueo con cefadroxilo reduce este fenómeno.

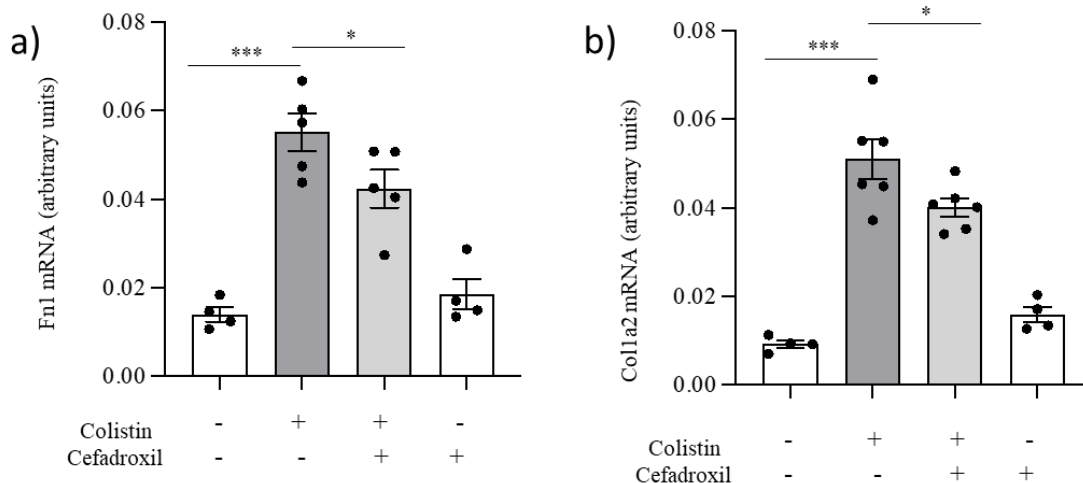


Figura 43. Cefadroxilo protege de la respuesta profibrótica renal inducida por colistina en ratones. a) mRNA de Fibronectina 1 a nivel renal. b) RNA de colágeno 1a2 a nivel renal. Todas las mediciones se realizaron al día 7 de la administración diaria de vehículo, colistina y/o cefadroxilo * $p < 0,05$ vs colistina o vehículo; *** $p < 0,0005$ vs vehículo. Col1a2: colágeno 1a2; Fn1: Fibronectina 1.

4.2. Daño celular inducido por colistina en células MCT in vitro

Con las concentraciones de 25 $\mu\text{g/ml}$ de colistina y cefadroxilo, realizamos un experimento in vitro con células tubulares proximales de ratón (MCT). La Figura 44 muestra la apoptosis celular medida por citometría de flujo tras el estímulo con colistina, con o sin pretratamiento con cefadroxilo, así como el grupo control (vehículo) y el grupo de tratamiento con cefadroxilo de forma aislada. Podemos observar como la apoptosis celular está aumentada a las 24 horas (Figura 44 a) tras la exposición a colistina ($p < 0,05$ vs vehículo), siendo aún mayor a las 48 horas (Figura 44 b) ($p < 0,0005$ vs vehículo). El pretratamiento con cefadroxilo disminuye la apoptosis celular observada a las 48 horas ($p < 0,005$ vs colistina) (Figura 44 b).

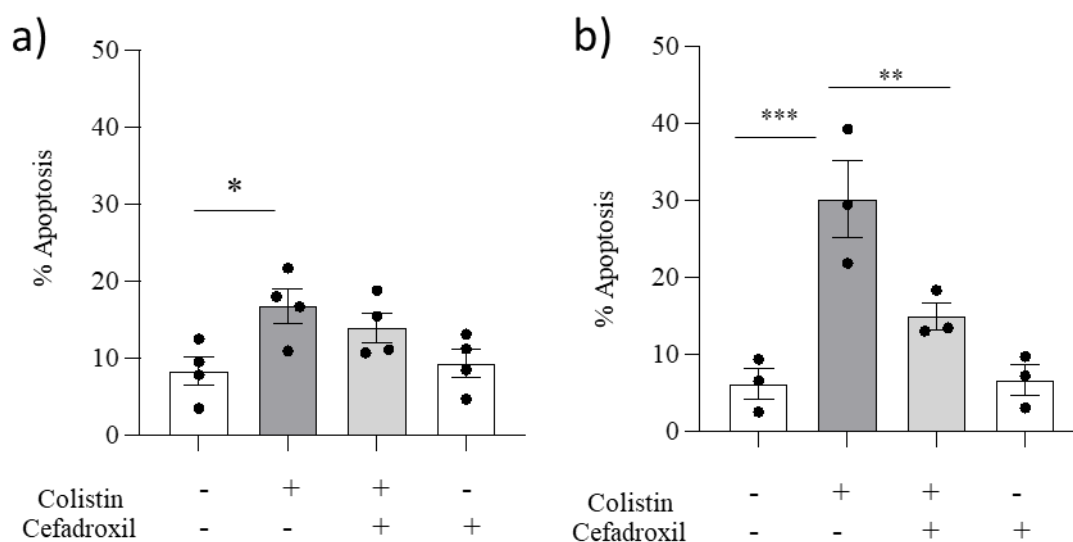


Figura 44. Cefadroxilo protege las células de túbulo proximal murino de la muerte inducida por colistina. a, b) Cuantificación de la apoptosis en cultivo de células MCT mediante citometría de flujo tras la estimulación con colistina, cefadroxilo o ambos a las 24 h (a) o 48 h (b). Colistina y cefadroxilo fueron usadas a dosis de 25 $\mu\text{g/ml}$ que corresponde a un ratio molar cefadroxilo:colistina de 3,2:1. * $p < 0,05$ vs colistina o vehículo; ** $p < 0,005$ vs colistina o vehículo; *** $p < 0,0005$ vs vehículo.

Al igual que en el modelo in vivo, se determinó la expresión de citoquinas proinflamatorias (MCP-1 y RANTES) a las 24 horas tras los diferentes estímulos (Figura 45). La colistina aumentó la expresión génica de ambas moléculas ($p < 0,005$ para MCP-1 y $p < 0,0005$ para RANTES vs vehículo), mientras que el pretratamiento con cefadroxilo evitó el aumento ($p < 0,005$ para MCP-1 y RANTES vs colistina).

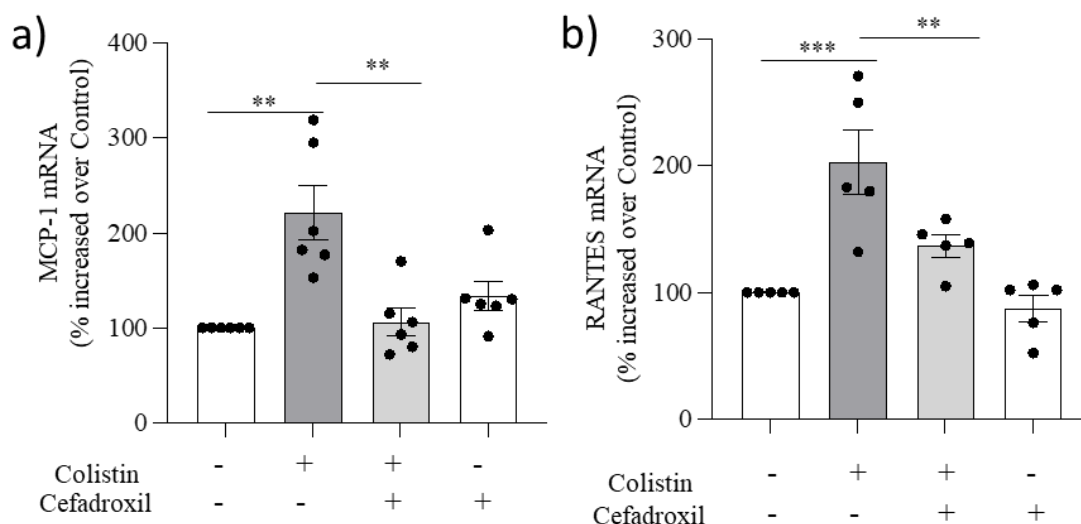


Figura 45. Cefadroxilo protege las células de túbulo proximal murino de la respuesta proinflamatoria inducida por colistina. a) Cuantificación de la respuesta proinflamatoria en cultivo de células MCT tras estimulación con colistina, cefadroxilo o ambos, medida como la expresión de mRNA de MCP-1 a las 24 horas. b) Cuantificación de la respuesta proinflamatoria en células MCT cultivadas tras estimulación con colistina, cefadroxilo o ambos, medida como la expresión de mRNA de RANTES a las 24 horas. Colistina y cefadroxilo fueron usadas a dosis de 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ que corresponde a un ratio molar cefadroxilo:colistina de 3,2:1. ** $p < 0,005$ vs colistina o vehículo; *** $p < 0,0005$ vs vehículo. MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1 o proteína quimiotáctica de monocitos 1; RANTES: regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted o quimiocina de regulación por activación expresada y secretada por los linfocitos T.

4.3. Daño celular inducido por colistina en células HK2 in vitro

Como primera aproximación traslacional a un futuro impacto clínico de estos estudios, realizamos un experimento in vitro con células tubulares proximales humanas (HK2), usando las mismas concentraciones de colistina y cefadroxilo (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Las Figura 46 y Figura 47 muestran la apoptosis celular medida por citometría de flujo tras el estímulo con colistina, con o sin pretratamiento con cefadroxilo, así como el grupo control (vehículo) y el grupo de tratamiento con cefadroxilo de forma aislada. La Figura 46 representa la apoptosis celular medida por citometría de flujo a las 48 horas de la exposición a los diferentes estímulos. Se representan cuatro cuadrantes (Q) en base a la expresión en la superficie celular de Anexina V (reflejado como PE-A) o 7-AAD (reflejado como PerCP-Cy5-5A). El cuadrante Q1 refleja las células necróticas (Anexina V negativas y 7-AAD positivas), el Q2 las células con apoptosis tardía (Anexina V positivas y 7-AAD positivas), en Q3 las células vivas (Anexina V negativas y 7-AAD negativas) y en Q4 las células con apoptosis temprana (Anexina V positivas y 7-AAD negativas). Se puede observar que a las 48 horas tras el estímulo con colistina hay un aumento de células apoptóticas (tanto tempranas, Q4, como tardías, Q2) y el pretratamiento con cefadroxilo las disminuye visiblemente. La Figura 47 refleja la cuantificación de la apoptosis total (apoptosis

temprana y tardía conjuntamente) a las 24 horas (a) y 48 horas (b). Podemos observar como la apoptosis celular está aumentada a las 24 horas tras aplicar colistina ($p < 0,05$ vs vehículo), siendo aún mayor a las 48 horas ($p < 0,0005$ vs vehículo). El pretratamiento con cefadroxilo disminuye la apoptosis celular observada a las 48 horas ($p < 0,0005$ vs colistina), no siendo significativa la disminución de la apoptosis a las 24 horas.

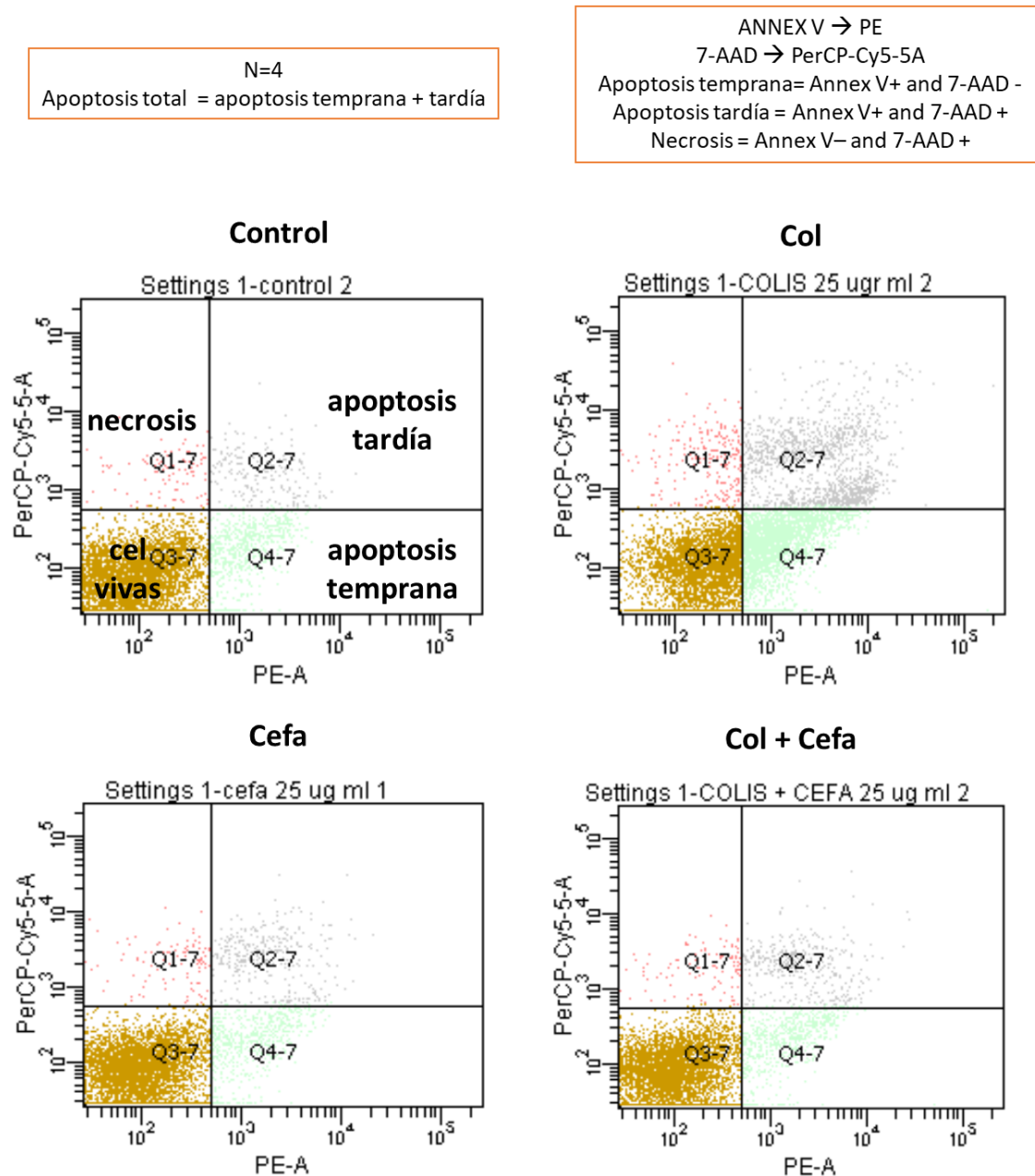


Figura 46. Citometría de flujo donde se muestra la apoptosis celular en células HK2 in vitro a las 48 horas tras la estimulación con colistina, cefadroxilo o ambos, medida mediante la expresión en superficie de Anexina V y 7-AAD. La apoptosis total es la suma de apoptosis temprana y tardía (cuadrantes Q2 y Q4). PE-A equivale a Anexina V y PerCP-Cy5-5A equivale a 7-AAD. Se diferencian cuatro cuadrantes: Q1: células necróticas (Anexina V negativas y 7-AAD positivas); Q2: apoptosis tardía (Anexina V positivas y 7-AAD positivas); Q3: células vivas (Anexina V negativas y 7-AAD negativas) y Q4: apoptosis temprana (Anexina V positivas y 7-AAD negativas). Cefa: Cefadroxilo; Col: Colistina; PerCP-Cy5-5A: 7-Aminoactinomicina D.

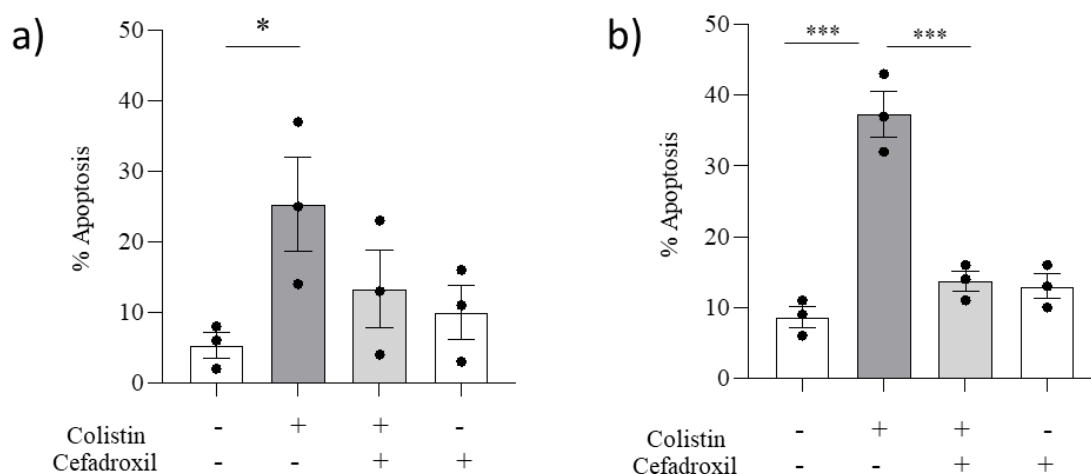


Figura 47. Cefadroxilo protege las células de túbulo proximal humano de la muerte inducida por colistina. Cuantificación de la apoptosis en cultivo de células HK2 mediante citometría de flujo tras la estimulación con colistina, cefadroxilo o ambos a las 24 h (A) o 48 h (B). Colistina y cefadroxilo fueron usadas a dosis de 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ que corresponde a un ratio molar cefadroxilo:colistina de 3,2:1. * $p<0,05$ vs colistina o vehículo; *** $p<0,0005$ vs Colistina o vehículo.

Posteriormente, determinamos la expresión de citoquinas proinflamatorias (MCP-1 y RANTES) a las 24 y 48 horas tras los diferentes estímulos (Figura 48). A las 24 horas, la colistina aumentó la expresión de ambas moléculas ($p<0,005$ para MCP-1 y RANTES vs vehículo), mientras que el pretratamiento con cefadroxilo disminuyó el aumento de ambas moléculas ($p<0,05$ para MCP-1 y RANTES vs colistina). A las 48 horas, se observan los mismos efectos, un aumento aún mayor de la expresión de MCP-1 tras colistina y una disminución tras pretratamiento con cefadroxilo ($p<0,05$ vs vehículo o colistina).

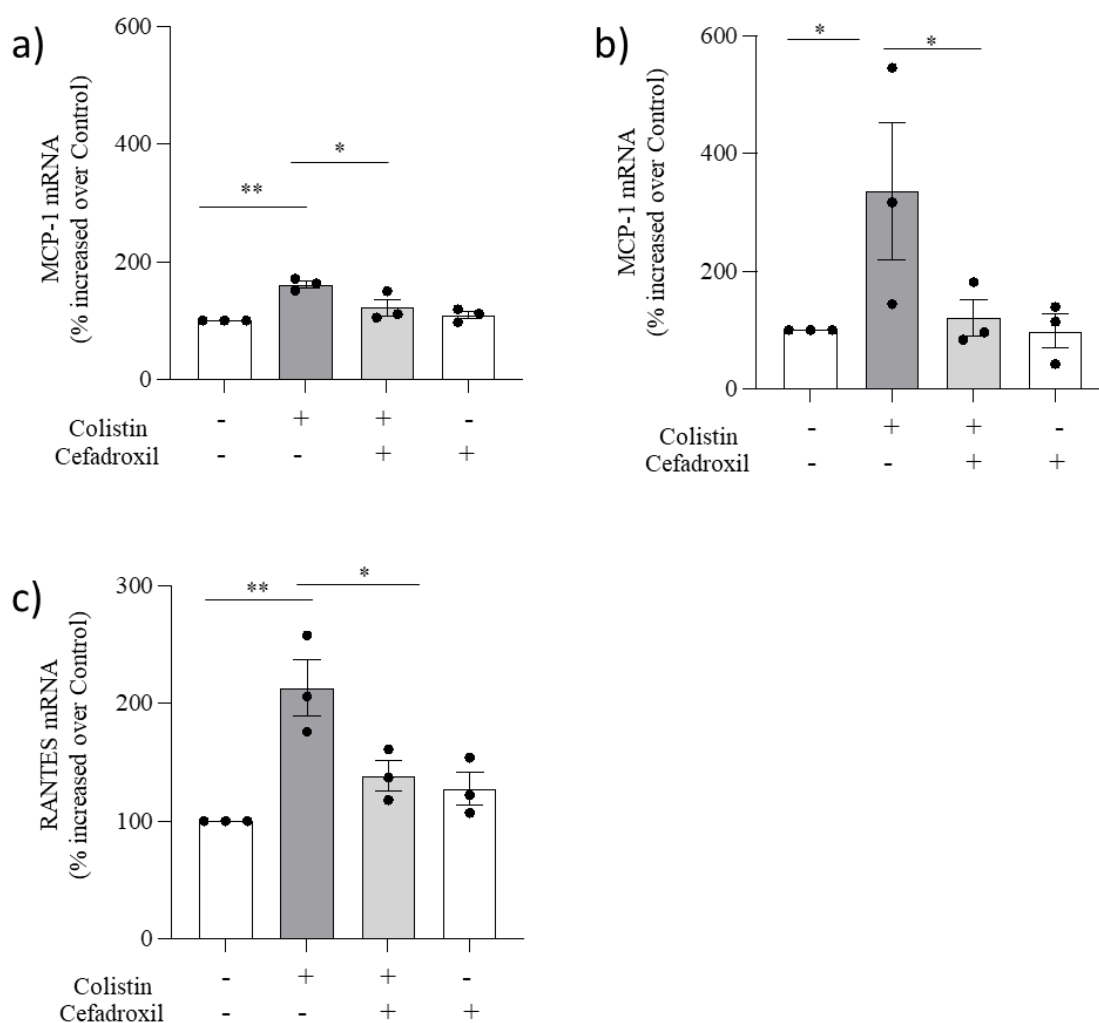


Figura 48. Cefadroxilo protege las células de túbulo proximal humano de la respuesta proinflamatoria inducida por colistina. a, b) Cuantificación de la respuesta proinflamatoria en cultivo de células HK2 tras estimulación con colistina, cefadroxilo o ambos, medida como la expresión de mRNA de MCP-1 a las 24 h (a) y 48 h (b). c) Cuantificación de la respuesta proinflamatoria en células HK2 cultivadas tras estimulación con colistina, cefadroxilo o ambos, medida como la expresión de mRNA de RANTES a las 24 horas. Colistina y cefadroxilo fueron usadas a dosis de 25 $\mu\text{g/ml}$ que corresponde a un ratio molar cefadroxilo:colistina de 3,2:1. * $p < 0,05$ vs colistina o vehículo; ** $p < 0,005$ vs colistina o vehículo. MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1 o proteína quimiotáctica de monocitos 1; RANTES: regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted o quimiocina de regulación por activación expresada y secretada por los linfocitos T

4.4. Secuenciación de las células HK2

Dada la existencia de dos variantes del transportador PEPT2 humano, siendo la variante PEPT2*1 (C/C) la asociada a mayor afinidad por el sustrato y presentando, hipotéticamente, mayor riesgo de desarrollar ERC que la variante PEPT2*2 (T/T), determinamos la variante presente en las células HK2 para interpretar los resultados obtenidos.

De los primers usados, la lectura en Reverse obtuvo mejores resultados y de ella se realizó la reversa complementaria de los exones 13 y 15, que sería equivalente a la versión forward, y se alineó con las de las bases de datos usando BLAST (135). En el exón 13 se detectó una base que no alinea, presentando, en homocigosis, una T donde debería haber una C, correspondiendo al código de Fenilalanina 350 (Figura 49) (136).

Homo sapiens solute carrier family 15 member 2 (SLC15A2), transcript variant 2, mRNA					
Sequence ID: NM_001145998.2 Length: 5354 Number of Matches: 1					
Range 1: 1016 to 1107 GenBank Graphics			▼ Next Match ▲ Previous Match		
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
165 bits(89)	3e-38	91/92(99%)	0/92(0%)	Plus/Plus	
Query 95	CAGGTTCTAAATCCCTTTCTGGTTC	TTATCTTCATCCCGTTGTTGACTTTGTCATTTAT	154		
Sbjct 1016	CAGGTTCTAAATCCCTTTCTGGTTC	TTATCTTCATCCCGTTGTTGACTTTGTCATTTAT	1075		
Query 155	CGTCTGGTCTCCAAGTGTGGAATTA	ACTTCTC	186		
Sbjct 1076	CGTCTGGTCTCCAAGTGTGGAATTA	ACTTCTC	1107		

Figura 49. Resultados del BLAST de la secuenciación del exón 13. La flecha indica la base no alineada, evidenciándose una T correspondiendo, por tanto, a la presencia de Fenilalanina.

Dado que ambas alteraciones se transmiten en desequilibrio de ligamiento, si hay una T en el exón 13, debería haber una T en el exón 15. Tras secuenciar el exón 15, se observa, de nuevo en homocigosis, una T donde debería haber una C, correspondiendo al código de Serina 409 (Figura 50) (137).

Homo sapiens solute carrier family 15 member 2 (SLC15A2), transcript variant 2, mRNA

Sequence ID: [NM_001145998.2](#) Length: 5354 Number of Matches: 1

Range 1: 1187 to 1309 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
196 bits(106)	1e-47	118/123(96%)	3/123(2%)	Plus/Plus
Query 133	AAGGAAATGGCCCCAGCCAGT	CAGGTC	CCCCAGGAGGTTTCTCTACAAGTCTTGAATCTG	192
Sbjct 1187	AATGAAATGGCCCCAGCCAGT	CAGGTC	CCCCAGGAGGTTTCTCTACAAGTCTTGAATCTG	1246
Query 193	GCAGATGATGAGGTGAAGGTGACAGTGGTGGGAAATGAAACAAT-CTCTGT-GATAGA-		249	
Sbjct 1247	GCAGATGATGAGGTGAAGGTGACAGTGGTGGGAAATGAAACAATTCTCTGTTGATAGAG		1306	
Query 250	TCC	252		
Sbjct 1307	TCC	1309		

Figura 50. Resultados del BLAST de la secuenciación del exón 15. La flecha indica la base no alineada, evidenciándose una T correspondiendo, por tanto, a la presencia de Serina.

Por tanto, las células HK2 presentan la variante PEPT2*2 (T/T) con Fenilalanina 350 y Serina 409, la que presenta menor afinidad por sustratos. Ello implica que en estas células estaríamos

infraestimando el potencial lesivo renal de nefrotóxicos transportados por PEPT2 y el eventual impacto terapéutico de interferir con este transportador.

5. Impacto traslacional: uso clínico de colistina

En un siguiente paso evaluamos la viabilidad de un estudio observacional retrospectivo para evaluar el impacto de la asociación de bloqueantes del transporte por PEPT2 sobre la nefrotoxicidad de la colistina intravenosa. Con la ayuda del Servicio de Farmacia del Hospital Fundación Jiménez Díaz se recogieron todas las prescripciones de colistina hospitalaria entre marzo/2022 y febrero/2024 y ambulatorio entre 2010 y 2023. Los servicios prescriptores fueron la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) y la Unidad de Cuidados Intermedios Respiratorios (UCIR). La vía de administración fue inhalada para erradicar colonizaciones bacterianas en pacientes con diversas enfermedades respiratorias, sin registrarse ningún uso intravenoso.

En definitiva, el patrón de uso inhalatorio de colistina, destinado disminuir su nefrotoxicidad, impidió evaluar en un estudio observacional retrospectivo el potencial nefroprotector de la asociación de colistina intravenosa con cefadroxilo u otro bloqueante del transporte a través de PEPT2. Estamos buscando centros donde se use la colistina intravenosa a fin de plantear un estudio colaborativo.

6. Modelo de daño celular inducido por ALA en células MCT in vitro

En experimentos de prueba de concepto con células tubulares proximales murinas, ALA no generó una respuesta proinflamatoria significativa sugerente de stress celular o citotoxicidad (Figura 51). De acuerdo con publicaciones previas, observamos poca evidencia de citotoxicidad por ALA 1 mM, una concentración clínicamente relevante, a las 24 horas en células tubulares proximales murinas (44). No obstante, es probable que ALA coopere con otras toxinas como PBG para producir nefrotoxicidad y que la toxicidad aumente a partir de la 48h (44). En este sentido, en algún experimento se observó un aumento de la expresión de MCP-1, RANTES y, sobre todo, IL-6 a las 48h (Figura 51). Ante estos datos, no continuamos esta línea experimental.

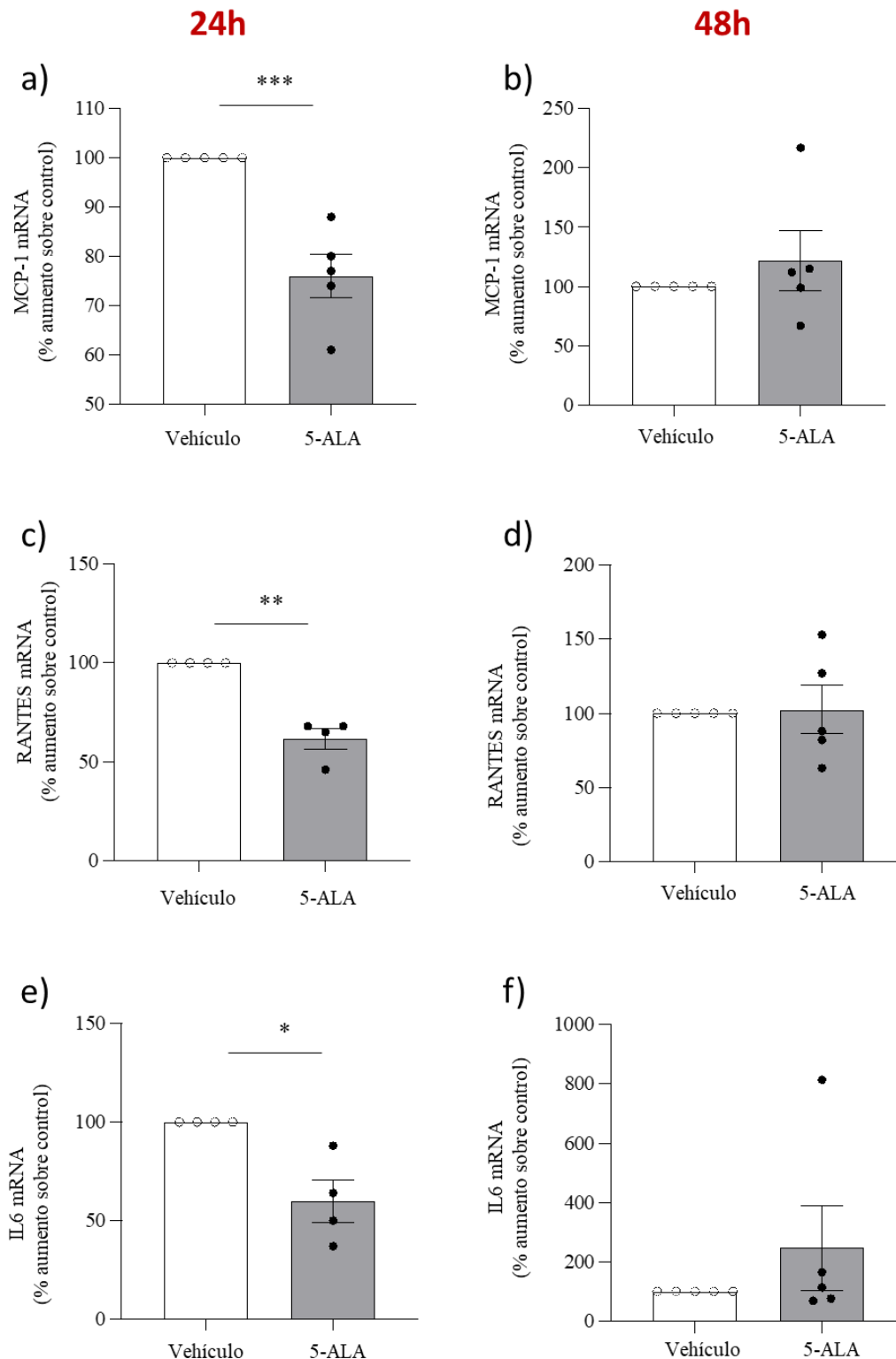


Figura 51. ALA no produce respuesta proinflamatoria significativa en las primeras 48 h en células de túbulo proximal murino. a, b) Cuantificación de la respuesta proinflamatoria en cultivo de células MCT tras estimulación con ALA, medida como la expresión de mRNA de MCP-1 a las 24 horas (a) y 48 horas (b). c, d) Cuantificación de la respuesta proinflamatoria en células MCT cultivadas tras estimulación con ALA medida como la expresión de mRNA de RANTES a las 24 horas (c) y 48 horas (d). e, f) Cuantificación de la respuesta proinflamatoria en cultivo de células MCT tras estimulación con ALA, medida como la expresión de mRNA de IL-6 a las 24 horas (e) y 48 horas (f). * $p < 0,05$ vs vehículo; ** $p < 0,005$ vs vehículo; *** $p < 0,0005$ vs vehículo. IL-6: Interleuquina 6; MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1 o proteína quimiotáctica de monocitos 1; RANTES: regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted o quimiocina de regulación por activación expresada y secretada por los linfocitos T.

Discusión

Los principales resultados de esta tesis son:

1. La minería de datos reveló que *SLC15A2*, un gen que codifica el transportador de péptidos y moléculas pequeñas PEPT2, se expresa principalmente en células tubulares proximales humanas y murinas, encontrándose un aumento de expresión en la diabetes humana.
2. En experimentos de prueba de concepto con células tubulares proximales humanas y murinas, la colistina, un antibiótico transportado por PEPT2, indujo citotoxicidad y respuestas proinflamatorias, que se evitaron o mejoraron con cefadroxilo, un antibiótico que inhibe el transporte mediado por PEPT2.
3. En experimentos de prueba de concepto en ratones, el cefadroxilo previno la nefrotoxicidad por colistina, disminuyendo la inflamación renal y la respuesta profibrótica inicial, es decir, un inhibidor del transporte mediado por PEPT2 disminuyó la nefrotoxicidad de una nefrotoxina que es transportada por PEPT2.

El impacto potencial de esta tesis es:

1. Estos resultados sientan las bases para ensayos clínicos de prevención de la nefrotoxicidad de la colistina mediante combinaciones inteligentes de antibióticos con potencial para bloquear el transporte de colistina por *SLC15A2*/PEPT2.
2. Además, proporcionan una prueba de concepto de la implicación potencialmente accionable de *SLC15A2* en la patogénesis de la enfermedad renal a través del transporte de compuestos nefrotóxicos dentro de las células tubulares proximales.
3. Por último, los presentes resultados sientan las bases para futuras investigaciones encaminadas a identificar genes accionables entre aquellos cuyas variantes están asociadas a la enfermedad renal.

1. El cefadroxilo previene la nefrotoxicidad por colistina

En nuestro modelo murino in vivo, el cefadroxilo disminuyó la nefrotoxicidad por colistina, disminuyendo los marcadores de daño tubular agudo, de citoquinas proinflamatorias, la infiltración renal por macrófagos y la progresión a fibrosis. Sin embargo, no revirtió el descenso en los niveles de *Klotho* evidenciados tras colistina. En células murinas MCT cultivadas, cefadroxilo disminuyó la apoptosis inducida por colistina, así como una disminución de las

citoquinas proinflamatorias, en concordancia con lo observado in vivo. En células humanas HK2, al igual que las células MCT, el cefadroxilo previene la apoptosis producida por colistina y disminuye la expresión de citoquinas proinflamatorias. Cabe destacar que la variante del transportador PEPT2 en las células HK2 es PEPT2*2, la variante con menor afinidad por sustrato. A pesar de ser la variante con menor afinidad, la administración de colistina produjo daño renal significativo que fue prevenido con la coadministración de cefadroxilo. Podemos inferir que en la variante de mayor afinidad (PEPT2*1), el daño producido sería mayor y, siguiendo el modelo de inhibidor competitivo, la coadministración con cefadroxilo podría ser igual de eficaz. En resumen, el cefadroxilo, un inhibidor del transporte a través de PEPT2 protege de la nefrotoxicidad por colistina, un sustrato de PEPT2, en modelos preclínicos in vitro e in vivo, estableciendo la prueba de concepto para futuros estudios traslacionales. Así, el efecto protector del cefadroxilo podría ser de utilidad clínica para la administración de colistina intravenosa en pacientes con bacterias multirresistentes dado que la limitación es su nefrotoxicidad. Acorde a los datos presentados en la ficha técnica de la FDA sobre colistimetato de sodio parenteral (138), tras la administración intravenosa de 1 vial, que equivale a 150 mg de CBA, la concentración media urinaria de CBA es de 270 µg/ml a las 2 horas, descendiendo hasta 15 µg/ml a las 8 horas. En nuestro experimento demostramos que la concentración de 25 µg/ml de CMS (equivalente a 9,36 µg/ml de CBA) resultaba tóxica para células MCT y HK2. La Figura 52 muestra la farmacocinética de colistina donde observamos que tras una dosis de 150 mg intravenosos de CBA, las concentraciones urinarias permanecen por encima de 9,36 µg/ml durante, aproximadamente, las primeras 10 horas, es decir, en concentraciones nefrotóxicas. Si bien el proceso real es más complejo, ya que el flujo tubular proximal presentaría una concentración de colistina más similar a la plasmática, pero constante, que se vería modificada por la reabsorción de agua, la reabsorción de colistina por las células tubulares proximales y el aclaramiento renal de colistina con el tiempo.

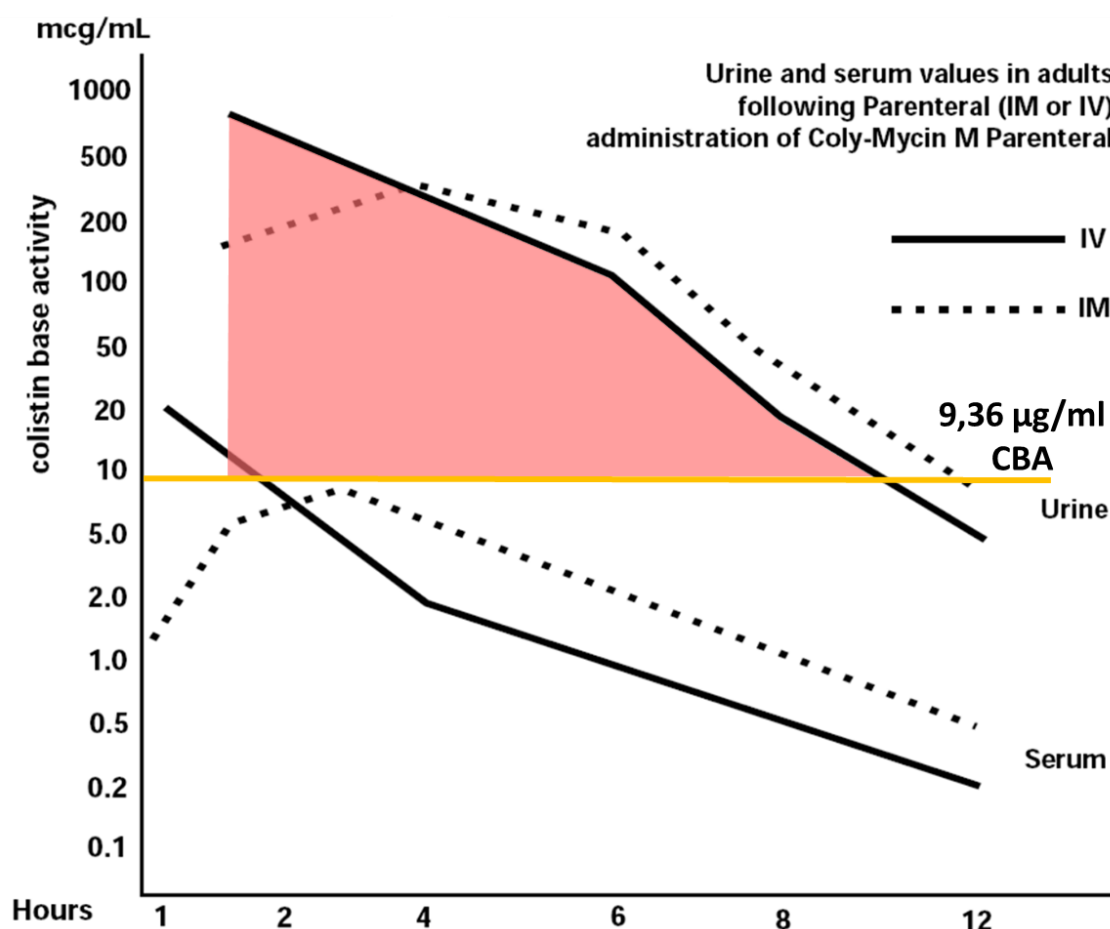


Figura 52. Farmacocinética de la colistina tras su administración intravenosa e intramuscular. Durante las primeras 10 horas tras la administración, las concentraciones urinarias de CBA se encuentran por encima de 9,36 $\mu\text{g/ml}$, dosis usadas en nuestros experimentos produciendo nefrotoxicidad. Adaptado de (138).

Múltiples estudios han analizado la incidencia de FRA por colistina. Shields et al. estudiaron retrospectivamente 249 pacientes tratados con colistina intravenosa. La incidencia de FRA, según criterios KDIGO, fue 12% y 29% a los 2 y 7 días, respectivamente, tras el inicio del tratamiento con colistina, llegando a requerir TRS un 7% de los pacientes (52). Moghnieh et al. analizaron retrospectivamente 298 pacientes tratados con CMS intravenosa durante al menos 48 horas, registrando la incidencia y gravedad del FRA, la mortalidad y analizando los factores de riesgo asociados. Un 46,3% (138/298) de los pacientes desarrollaron FRA, siendo 37,7% estadio 1, 23,9% estadio 2 y un 38,4% estadio 3. Los principales predictores de FRA fueron la edad >75 años, la presencia de ERC previa y el uso concomitante de fármacos vasopresores. Los factores predictores de la gravedad del FRA fueron la hipoalbuminemia, el uso de drogas vasopresoras y una duración del tratamiento con colistina >7 días. Sin embargo, el riesgo de FRA por colistina empezó a aumentar tras 2 días de tratamiento, siendo mayor a mayor duración. La presencia de FRA fue un factor de riesgo de mortalidad, siendo mayor en aquellos con FRA

estadio 2 y 3 frente a estadio 1 (53). En el estudio de Moghnieh, el uso de CMS en terapia combinada con otros antibióticos fue de un 85,9%, pero no describen los antibióticos asociados (53). Para intentar recopilar información sobre si usaron cefalosporinas y si, además, su uso combinado protegió de nefrotoxicidad, intentamos contactar repetidamente con los Drs Moghnieh y Sayegh, autores de la publicación, sin éxito.

Ahumada et al, en su revisión sobre la incidencia de FRA en pacientes tratados con colistina, describen la gran variedad de diseños de estudios (prospectivos, retrospectivos, metaanálisis y estudios aleatorizados con ciego simple) y de la incidencia de FRA reportada (desde 15,1 a 68,5%) (139). Sin embargo, la mayoría de los estudios que analizan los factores de riesgo de la nefrotoxicidad por colistina son retrospectivos. El uso de vasopresores, diuréticos, otros nefrotóxicos administrados junto a colistina, la edad avanzada (≥ 65 años), obesidad ($\text{IMC} \geq 30$), puntuación elevada en APACHE II, ERC previa (aclaramiento de creatinina < 50 ml/min) y la hipoalbuminemia fueron factores más frecuentes en pacientes con FRA. Además, en la mayoría de los estudios mencionados, la presencia de FRA por colistina se asoció con aumento de la mortalidad (12,53,140–147). Por lo tanto, existe la necesidad de buscar estrategias que disminuyan la nefrotoxicidad asociada al uso de colistina.

En nuestro estudio, el cefadroxilo previno la nefrotoxicidad por colistina. La Tabla 3 muestra que la gran mayoría de cefalosporinas son sustratos del PEPT2, por lo tanto, buscamos en la literatura si existiese alguna publicación donde se usase colistina de forma concomitante con alguna cefalosporina. Zheng et al, en su estudio retrospectivo sin grupo control, recoge 31 pacientes tratados con la asociación de ceftazidima/avibactam (2,5 g c/8h) y colistina (750.000 UI, equivalente a 25 mg de CBA, cada 12 horas) por infecciones multirresistentes por bacilos Gram negativos (148). De 31 pacientes, 7 desarrollaron FRA (22,5%), incidencia acorde a la presentada por Ahumada (139). Es el único estudio que recoge un tratamiento antimicrobiano con una combinación de cefalosporinas con colistina, pero sin tener un grupo control de colistina en monoterapia. Acorde a la ficha técnica de ceftazidima, tras la administración intravenosa de 2 g, la concentración sérica alcanzada es de 170 $\mu\text{g/ml}$, con una excreción urinaria de aproximadamente 99% (149). La farmacocinética de la colistina es compleja a nivel renal, por lo que solo podemos inferir aproximaciones en base a la farmacocinética mostrada en la Figura 52, según la cual, tras administrar 150 mg de CBA, las concentraciones urinarias de CBA pueden alcanzar los 1000 $\mu\text{g/ml}$. En base a ella, si la dosis de CBA administrada en este estudio es 25 mg (6 veces menor que la dosis usada en la Figura 52), el pico máximo urinario podría estimarse en una sexta parte, es decir, 166 $\mu\text{g/ml}$, y en base a la tendencia de eliminación, durante las

primeras 6 horas, la concentración urinaria de CBA estaría por encima de 9,36 µg/ml, dosis usada por nosotros, generando nefrotoxicidad. La ceftazidima también es sustrato de PEPT2, pero su K_i es aproximadamente 18 mM mientras que la K_i de cefadroxilo es 0,003 mM (68). Dado que la K_i de ceftazidima es 6000 veces mayor que la de cefadroxilo, para que la ceftazidima realizase un efecto nefroprotector la dosis debería ser mucho más elevada para bloquear el transportador PEPT2 y proteger del FRA.

Con respecto a otros antibióticos, hay dos ensayos clínicos que asocian meropenem a colistina. Paul et al, realizaron un ensayo clínico abierto, aleatorizado y de superioridad que incluyó 406 pacientes adultos con bacteriemia, neumonía asociada a ventilador, neumonía nosocomial o urosepsis por bacterias Gram negativas resistentes a carbapenémicos. Comparó el tratamiento con colistina intravenosa (9 millones de UI, equivalente a 300 mg de CBA, en dosis de carga, y posteriormente 4,5 millones de UI, equivalente a 150 mg de CBA, dos veces al día) y meropenem (2 g cada 8 horas) frente a colistina en monoterapia. No hubo diferencias en el fallo clínico a los 14 días ni en la mortalidad a los 28 días. Sin embargo, con el tratamiento combinado hubo menos incidencia de FRA y, además, de menor gravedad (según escala RIFLE, 29% vs 48%, $p=0,001$, para terapia combinada vs colistina) a los 14 días, diferencia que desaparece a los 28 días (20% vs 35%, $p=0,075$, para terapia combinada vs colistina) (150). El ensayo clínico OVERCOME (aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo) comparó el tratamiento de neumonías y/o bacteriemias por *A. baumannii* y *P. Aeruginosa* extensamente resistentes a antibióticos y enterobacterias resistentes a carbapenémicos con colistina (CBA 5 mg/kg en dosis de carga y 1,67 mg/kg cada 8 horas) y meropenem (1 g cada 8 horas) frente a colistina en monoterapia en 464 participantes. No hubo diferencias en mortalidad a los 28 días (37% vs 43%; $p=0,17$, para terapia combinada vs colistina), ni incidencia o gravedad del FRA (según escala RIFLE, 49% vs 52%, $p=0,55$, para terapia combinada vs colistina) (151). Ambos estudios usan prácticamente la misma dosis de CBA. En el estudio OVERCOME (151) la dosis está ajustada por peso (CBA 5 mg/kg en la dosis de carga y 5 mg/kg/día dividida en 3 dosis en mantenimiento) y, dado que la mediana (IQR) de peso de los pacientes era 60 Kg (52-75), las dosis de CBA eran en torno a 300 mg (260-375 mg), tanto en la dosis de carga como en la dosis total diaria. La dosis usada en el otro ensayo (150) fue 9 millones de UI en carga y 9 millones de UI al día dividida en dos dosis o, lo que es lo mismo, 300 mg de CBA tanto en dosis de carga como a diario en mantenimiento. Llama la atención que ambos ensayos usaron la misma dosis de CBA pero la incidencia de FRA fue menor en el ensayo de Paul et al, que usó mayor dosis de meropenem (150,151). Meropenem no es sustrato conocido de PEPT2 y, en teoría, no debería bloquear la entrada intracelular de colistina a nivel del túbulo proximal. Un estudio retrospectivo muestra, también, que la asociación de

colistina con carbapenémicos tiene un efecto protector sobre el FRA con un OR ajustado (IC95%) de 0,09 (0,01-0,8); $p=0,03$ (152). Una hipótesis podría ser que, al combinar ambos fármacos, puede obtenerse una mayor efectividad microbiológica resultando en una respuesta inflamatoria más leve y/o una recuperación más temprana de la sepsis y, por tanto, disminuyendo la disfunción orgánica, incluyendo los riñones (12).

En 2024, Mathew SK et al, describen por primera vez la influencia de variantes genéticas en los transportadores de colistina (OCTN2, PEPT2, megalina y glicoproteína-P) sobre la nefrotoxicidad por colistina (153). Tras secuenciar a 42 pacientes con Next Generation Sequencing, se identificaron 12 SNPs que presentaban una asociación significativa con FRA. De estos 12 SNPs, 10 están presentes en la secuencia del gen *SLC15A2* y presentaban desequilibrio de ligamiento: rs2257212, rs2257214, rs1143670, rs1143671, rs874741, rs7637569, rs2293616, rs1316397, rs3817601, y rs2257109 (Pearson $r>0.8$), mientras que rs13397109 y rs1339067, correspondientes a megalina y PEPT1 respectivamente, no lo presentaban. Sin embargo, solo 3 SNPs fueron considerados de alta predisposición a desarrollar FRA por colistina y se usaron en análisis posteriores: rs2257212 (*SLC15A2* y su producto PEPT2), rs13397109 (*LRP2* y megalina) y rs1339067 (*SLC15A1* y PEPT1). Aunque la dosis de colistina varió entre los pacientes, la mediana del primer día era 500 mg de CBA seguido de 300 mg de CBA diarios en mantenimiento. Los pacientes con alta predisposición tenían el SNP rs2257212 de forma aislada o la asociación de 2 o más de los 3 SNPs mencionados. De los 42 pacientes secuenciados, 6 desarrollaron FRA al séptimo día de tratamiento con colistina, de los cuales 4 fueron clasificados como de alta predisposición a FRA por colistina. Los dos pacientes clasificados como baja predisposición y que desarrollaron FRA tuvieron exposición a concentraciones más elevadas de colistina, a otros fármacos que pueden aumentar la creatinina sérica y/o presentaban hipoalbuminemia. En esta publicación se nombran los dos SNPs que definen las dos variantes de PEPT2: rs2257212 y rs1143671. Sin embargo, las sustituciones que describen no se relacionan con las variantes PEPT2*1 ni PEPT2*2. En la publicación describen, para el SNP rs2257212, la sustitución c.1048C>G, cambiando leucina por valina (p.Leu350Val) y en el SNP rs1143671, la sustitución c.1225C>A, cambiando prolina por treonina (p.Pro409Thr) (153), mientras que la variante PEPT2*1 presenta una C y la variante PEPT2*2 una T en ambas posiciones (1048 y 1225). Llamativamente, aunque Mathew SK et al reporta dichos SNPs, la frecuencia poblacional registrada para ambos SNPs, es decir, presencia de guanina en posición 1048 y de adenina en posición 1225, tanto en GnomAD (154) como en PubMed ((136) para rs2257212 y (137) para rs1143671) es 0,000000% a nivel global.

En el hospital Fundación Jiménez Díaz, la administración de colistina es principalmente inhalada/nebulizada en pacientes con infecciones agudas o colonizaciones crónicas de *Pseudomona Aeruginosa* en el tracto respiratorio, generalmente en bronquiectasias. La ausencia del uso intravenoso es debido al riesgo de nefrotoxicidad. Clínicamente se podría obtener beneficio en el tratamiento de las infecciones por *Acinetobacter*, pero no tenemos infecciones por dicho germen en nuestra Unidad de Vigilancia Intensiva. Con respecto a la farmacocinética de la colistina inhalada, tras administrar 66 mg de CBA (158 mg de CMS) con un nebulizador, la concentración máxima sérica fue de 0,13 µg/ml a las 2 horas, con una excreción urinaria media correspondiente al $4,3 \pm 1,3\%$ de la dosis inhalada (155). En 2012, la EMA aprobó Colobreathe, colistimetato de sodio administrado por vía inhalada, para erradicar las infecciones pulmonares crónicas por *P. Aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística. A pesar de que a nivel pulmonar también existe PEPT2 que realizaría el paso del colistimetato del árbol bronquial a la sangre, la absorción de colistimetato es mínima. Tras la administración de 1.662.500 UI de CMS (equivalente a 125 mg de CMS y a 55 mg de CBA) dos veces al día durante 7 días consecutivos, la concentración plasmática máxima media alcanzada es de 455 ng/ml. La excreción urinaria es menor del 3%, por lo que no requiere ajuste por función renal y no se han evidenciado datos de nefrotoxicidad (156). En nuestros experimentos usamos una concentración aproximadamente 1831 veces mayor (25 µg/ml de CMS) de la concentración urinaria alcanzada tras la administración nebulizada (3% de 455 ng/ml $\approx$ 13,65 ng/ml), por lo que es esperable que no genere daño renal al ser administrada por vía inhalada.

Un estudio retrospectivo analizó la incidencia de FRA por colistina inhalada (75 mg de CBA 3 o 4 veces al día) o intravenosa (2,5-5 mg/kg/día de CBA en 2-4 dosis). Hubo más FRA en el grupo intravenoso (63/311; 20,26%) que en el grupo inhalado (12/153; 7,84%) ($p < 0,001$). En el grupo intravenoso se administró una mayor dosis diaria (366,27 vs 240,71 mg; $p < 0,001$) y mayor dosis acumulada (4388,03 vs 3112,85 mg; $p = 0,001$) de CBA, así como mayor uso de anfotericina B liposomal y vancomicina que en el grupo inhalado (157). Dentro del grupo de colistina inhalada, los pacientes con FRA recibieron una mayor dosis acumulada de CBA debido a una mayor duración del tratamiento, ya que la dosis diaria no presentaba diferencias estadísticamente significativas. Es probable que los FRA en el grupo inhalado sean debidos a otras causas ajenas a la colistina, dada la escasa absorción de esta forma de administración acorde a su ficha técnica (156).

A fecha marzo/2024, solo dos artículos mencionan el gen *SLC15A2* en GWAS. En muchos GWAS se han identificado numerosas variantes genéticas asociadas a ERC, pero, generalmente, sin

poder identificar genes causales. En 2016, para intentar solucionar este problema, el CKDGen Consortium combinó los resultados de GWAS con estudios de genoma murino extraídos de “The Mouse Genome Informatics” para identificar SNPs que influyan en alteraciones del FGe, de la fisiología o la morfología renal. El gen *Slc15a2* murino se encontró asociado con alteraciones de la fisiología renal. Al analizar los GWAS humanos del CKDGen Consortium, se encontró un SNP del gen *SLC15A2* que, al contrario que en ratones, solo era sugestivo de influir en el FGe, con rsID rs1143670 y posición cromosómica 121646641 (108). Este SNP también fue descrito por Mathew SK (153) dentro de las variantes genéticas que pueden influir en el transporte de colistina, pero sin llegar a incluirlo en el análisis final.

Wuttke et al. publicó, en 2019, un metaanálisis de GWAS sobre filtrado glomerular estimado en individuos de diferentes ascendencias. Encontraron la asociación de 308 loci con FGe, de los cuales 200 eran nuevos y 108 ya eran conocidos de GWAS previos. En dicho metaanálisis se recoge una alteración intrónica dentro del gen *SLC15A2*, ya conocida previamente, cuyo rsID es rs9868185 y cuya posición dentro del cromosoma 3 es 121938746, que difiere de las posiciones cromosómicas que definen las variantes de *SLC15A2* en los exones 13 (121924957) y 15 (121928439). Este SNP implica un cambio de guanina por adenina y su asociación con el FGe fue $+0,026 \pm 0,0003$ con $p=5 \times 10^{-17}$ y un OR para ERC de 0,97 (IC95%: 0,96-0,99; $p=0,00074$). En cambio, al analizar este SNP por etnias, el efecto sobre el FGe solo fue significativo en individuos de ascendencia europea ($p=1,5 \times 10^{-14}$) y del este de Asia ($p=8,9 \times 10^{-4}$), al contrario que en afroamericanos ($p=0,15$) e individuos del sur de Asia ($p=0,7$) (107).

El transportador PEPT2 también está presente a nivel pulmonar y meníngeo. A nivel pulmonar interviene en el transporte de moléculas desde las vías aéreas hacia la sangre, es decir, aclarando moléculas depositadas a nivel alveolar. Aunque la absorción sistémica de colistina inhalada es muy escasa con una excreción urinaria menor del 3%, podría surgir el planteamiento de administrar cefadroxilo junto con colistina para disminuir aún más dicha absorción y potenciar el efecto local de la colistina. La administración por vía intratraqueal de cefadroxilo disminuyó la absorción de PGP acetilada, una matriquina derivada de la degradación del colágeno con efecto quimioatrayente de neutrófilos que influye en la inflamación pulmonar aguda y que es aclarada del pulmón por el transportador PEPT2 (83). La disminución del aclaramiento de PGP acetilado aumentó la inflamación pulmonar. Dado que la colistina se administra en infecciones agudas pulmonares y en erradicaciones de infecciones crónicas, estados en los que hay producción de PGP, disminuir el aclaramiento sería contraproducente al aumentar la lesión pulmonar.

A nivel meníngeo, el transportador PEPT2 elimina moléculas desde el líquido cefalorraquídeo a la sangre. La colistina, en forma de CMS, es uno de los fármacos más usado para la administración intratecal (12). La coadministración de cefadroxilo y colistina intratecal podría ser teóricamente beneficiosa al disminuir el aclaramiento de colistina del líquido cefalorraquídeo.

2. Porfiria aguda intermitente o ERCd

Más de un 50% de los pacientes con PAI sintomática presentan ERC, denominada PAKD. La PAKD se caracteriza por un daño agudo, durante los ataques con marcado aumento de ALA y PBG, y crónico, por el cúmulo de ataques repetidos y el exceso de ALA y PBG en períodos intercríticos como nefrotóxicos (15). En ambos supuestos, ALA y PBG juegan un papel predominante siendo, a priori, las moléculas causantes del daño tubular agudo. En dos estudios, las variantes de PEPT2 influyeron en el riesgo de progresión de la ERC (15,43). Tchernitchko et al, tras genotipar 122 pacientes con PAI demostró que aquellos portadores del genotipo PEPT2*1/*1 (alta afinidad/alta afinidad) presentaban una ERC más grave y con mayor progresión que los portadores del genotipo PEPT2*1/*2 (alta afinidad/baja afinidad) y PEPT2*2/*2 (baja afinidad/baja afinidad), siendo el genotipo PEPT2*1/*1 un factor predictor de gravedad (43). La presencia de niveles elevados de ALA y del genotipo de riesgo incrementan el riesgo de desarrollar PAKD. Por lo tanto, bloquear in vitro el transporte intracelular de ALA a través de PEPT2 con cefadroxilo para prevenir la citotoxicidad era plausible biológicamente.

Sin embargo, en nuestro sistema experimental con células MCT, no observamos evidencia de citotoxicidad por ALA que pudiera ser inhibida con cefadroxilo. De acuerdo con publicaciones previas (44), observamos poca evidencia de citotoxicidad por ALA a 1 mM, una concentración clínicamente relevante, a las 24 horas en las células tubulares proximales murinas. Es probable que ALA coopere con otras toxinas como PBG para producir nefrotoxicidad y que el periodo de latencia pueda ser mayor que las 48 h que usamos en nuestro sistema experimental (44). Futuros estudios deberían abordar si el uso combinado de ALA y PBG o la exposición más prolongada a ALA o el empleo de líneas celulares que expresan la variante de riesgo de PEPT2 permitirían objetivar evidencia de citotoxicidad que permita abordar el posible impacto protector de cefadroxilo.

A diferencia de la PAI, sí pudimos seguir la hipótesis de una posible asociación de *SLC15A2* con la Nefropatía Mesoamericana, ya que encontramos un grupo que había realizado estudios genéticos. Sin embargo, no observaron una asociación con el gen *SLC15A2*.

3. Limitaciones

Entre las limitaciones, se trata de un estudio preclínico, que para adquirir pleno significado traslacional, debería ser validado en un estudio clínico. Además, los resultados se han obtenido con un solo bloqueador de *SLC15A2* y un solo nefrotóxico. El plan inicial fue testar al menos dos agentes nefrotóxicos, pero en las condiciones del ensayo, no se observó toxicidad directa de ALA sobre células tubulares renales cultivadas.

4. Fortalezas

El estudio se debe considerar una prueba de concepto generado a partir de una observación clínica, y abordado en ensayos preclínicos en células cultivadas e in vivo, que puede tener relevancia para otros agentes nefrotóxicos en el futuro, así como servir de base para el diseño de ensayos clínicos que permitan ampliar el uso clínico seguro de colistina para infecciones por organismos multirresistentes. El agente nefroprotector identificado, el cefadroxilo es representativo de una familia de inhibidores que ya están en uso clínico, se consideran seguros y, al ser antibióticos, podrían contribuir a aumentar el impacto terapéutico de colistina en sus escenarios más habituales de uso clínico.

Conclusiones

1. La combinación de bases de datos GWAS humanas con bases de datos de transcriptómica murina permitió identificar *SLC15A2/PEPT2* como una nueva potencial diana terapéutica en la enfermedad renal humana.
2. La combinación de una revisión bibliográfica con minería de datos identificó a las células tubulares proximales como dianas claves de *SLC15A2/PEPT2* y de la nefrotoxicidad por colistina y a cefadroxilo como una herramienta terapéutica que permitiría testar la relevancia terapéutica de *SLC15A2/PEPT2*.
3. Hemos generado una prueba de concepto de la implicación potencialmente accionable de *SLC15A2/PEPT2* en la patogenia de la nefrotoxicidad por colistina, ya que cefadroxilo protegió a ratones de la nefrotoxicidad por colistina.
4. Estos resultados sientan las bases para ensayos clínicos de prevención de la nefrotoxicidad por colistina mediante combinaciones inteligentes de antibióticos con potencial para bloquear el transporte de colistina por *SLC15A2/PEPT2*, especialmente en pacientes con variantes genéticas que predisponen a la nefrotoxicidad por colistina.

Conclusions

1. Combining human GWAS databases with murine transcriptomics databases allowed the identification of *SLC15A2/PEPT2* as a new potential therapeutic target in human kidney disease.
2. Combining a literature review with data mining identified proximal tubular cells as key targets of *SLC15A2/PEPT2* and colistin nephrotoxicity and cefadroxil as a therapeutic drug that would allow testing the therapeutic relevance of *SLC15A2/PEPT2*.
3. In proof-of-concept experiments, we demonstrated the potentially actionable involvement of *SLC15A2/PEPT2* in the pathogenesis of colistin nephrotoxicity, as cefadroxil protected mice from colistin nephrotoxicity.
4. These results lay the groundwork for clinical trials to prevent colistin nephrotoxicity using smart combinations of antibiotics with the potential to block colistin transport by *SLC15A2/PEPT2*, especially in patients with genetic variants predisposing to colistin nephrotoxicity.

Material suplementario

Tabla suplementaria 1. Listado de los 224 genes asociados con enfermedad renal en humanos identificados en estudios GWAS en la literatura. En negrita y rojo, los genes no encontrados en una base de datos interna de transcriptómica correspondiente a las 24 horas de un modelo de fracaso renal agudo murino inducido por ácido fólico en comparación con ratones inyectados con vehículo (105). En negrita y negro, el gen estudiado.

A1CF	CARS	ELMO1	IRF5	MYBPHL	PVT1	SOX11
A4GALT	CASP9	EMP2	ITGA2	MYH9	QSOX2	SPATA5L1
ACACB	CCDC123	EPB4.1L3	ITGAM	MYO19	R3HDM2	SPATA7
ACAD11	CD2AP	EPB4.1L5	ITGAX	NAT8	RGMA	SPTBN1
ACCS	CDCAT	EXOGE	ITIH4	NCALD	RIN3	ST6GALNAC2
ACE	CDH23	EYA4	KCNMA1	NDOR1	RPL3L	STC1
ACOXL	CDK12	FAM122A	KCTD7	NEB	RREB1	STON2
ACSM5	CFHR1	FAM47E	KIAA1614	NFATC1	RSPO3	SVIL
AFF3	CFHR3	FGF5	KLHDC7A	NOS3	SASH1	TBX1
AGMAT	CGNL1	FRMD3	KNG1	NPHP3	SDCCAG8	TFDP2
AGTR1	CHD9	GABRR1	L2HGDH	NRG4	SEMA6D	TNFSF13
AGXT2L1	CHMP1A	GALNT11	L3MBTL3	NT5C3	SERPINA4	TPRKB
AHR	CISD2	GALNTL5	LAMA5	OVOL1	SERPINA5	TRAP1
AKR1A1	CLDN14	GATM	LARP4B	PARG	SH3YL1	TSPAN14
ALDH2	CLDN8	GCKR	LASS2	PAX9	SHROOM3	TSPAN9
ALMS1	CNDP1	GCKR	LRP2	PCK1	SIK1	TTC21B
ANXA9	COL4A3	GPR111	MAGI2	PCMTD2	SIK3	UBE2Q2
APH1B	CPS1	GRM7	MAMSTR	PDILT	SLC12A3	UMOD
APOE	CST3	GSTA2	MANBA	PGAP3	SLC15A2	UNCX
ARG1	CST4	GUCY1A3	MARVELD3	PIGR	SLC22A2	VEGFA
ARHGAP24	CST9	HLA-A	MCPH1	PIGU	SLC22A4	WDR37
ARL15	CTSS	HLA-DQA	MCTP2	PIK3R1	SLC24A5	WDR67
ASTN2	CUBN	HLA-DQB	METTL10	PIP5K1B	SLC2A9	WDR72
ATXN2	CWH43	HLA-DRB1	MKL1	PLCB1	SLC34A1	WDR73
BBS9	CYP26A1	HNF4A	MLLT3	PLDN	SLC47A1	WHAAM
BCAS3	DAB2	HORMAD2	MMP2	PLEKHH2	SLC6A12	WNK4
BCL2	DACH1	HOXD8	MOSC1	PLXDC1	SLC7A6	WNT4
BCL2L14	DDX1	ICAM1	MPDU1	PLXNB1	SLC7A9	WWP2
BLK	DEFA	IGF2	MPPED2	PPM1J	SLC8A1	ZFH3
BMP4	DLEU2	IGHMBP2	MSC	PRKAG2	SMAD7	ZMIZ1
C1GALT1	DPEP1	INO80	MTHFS	PRKAR1A	SND1	ZNF641
CACNA1S	EDEM3	IRF2	MTMR3	PRRX1	SORBS1	ZNF781

Bibliografía

1. Fernandez-Prado R, Castillo E, Ortiz A. Fisiología del riñón. In: Hernando Nefrología Clínica. 5th ed. 2022. p. 47–68.
2. Curthoys NP, Moe OW. Proximal tubule function and response to acidosis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014 Sep 5;9(9):1627–38.
3. Arévalo Gómez MA. Anatomía del riñón. In: Hernando Nefrología Clínica. 5th ed. 2022. p. 39–46.
4. Nigam SK, Wu W, Bush KT, Hoenig MP, Blantz RC, Bhatnagar V. Handling of Drugs, Metabolites, and Uremic Toxins by Kidney Proximal Tubule Drug Transporters. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015 Nov 6;10(11):2039–49.
5. Parker JL, Deme JC, Wu Z, Kuteyi G, Huo J, Owens RJ, et al. Cryo-EM structure of PepT2 reveals structural basis for proton-coupled peptide and prodrug transport in mammals. *Sci Adv*. 2021 Aug;7(35).
6. Chapter 1: Definition and classification of CKD. *Kidney Int Suppl* (2011). 2013 Jan;3(1):19–62.
7. Ortiz A, Roger M, Jiménez VM, Perez JCR, Furlano M, Atxer LS, et al. RICORS2040: the need for collaborative research in chronic kidney disease. *Clin Kidney J*. 2022 Feb 22;15(3):372–87.
8. GBD Chronic Kidney Disease Collaboration. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2020 Feb 29;395(10225):709–33.
9. Foreman KJ, Marquez N, Dolgert A, Fukutaki K, Fullman N, McGaughey M, et al. Forecasting life expectancy, years of life lost, and all-cause and cause-specific mortality for 250 causes of death: reference and alternative scenarios for 2016-40 for 195 countries and territories. *Lancet*. 2018 Nov 10;392(10159):2052–90.
10. Section 2: AKI Definition. *Kidney Int Suppl* (2011). 2012 Mar;2(1):19–36.
11. Moore PK, Hsu RK, Liu KD. Management of Acute Kidney Injury: Core Curriculum 2018. *Am J Kidney Dis*. 2018 Jul;72(1):136–48.
12. Nation RL, Rigatto MHP, Falci DR, Zavascki AP. Polymyxin Acute Kidney Injury: Dosing and Other Strategies to Reduce Toxicity. *Antibiotics (Basel)*. 2019 Mar 14;8(1).
13. Gai Z, Samodelov SL, Kullak-Ublick GA, Visentin M. Molecular Mechanisms of Colistin-Induced Nephrotoxicity. *Molecules*. 2019 Feb 12;24(3).
14. Ricci A, Guida CC, Manzini P, Cuoghi C, Ventura P. Kidney Involvement in Acute Hepatic Porphyrrias: Pathophysiology and Diagnostic Implications. *Diagnostics (Basel)*. 2021 Dec 10;11(12).

15. Pallet N, Karras A, Thervet E, Gouya L, Karim Z, Puy H. Porphyria and kidney diseases. *Clin Kidney J.* 2018 Apr;11(2):191–7.
16. Perez-Gomez MV, Martin-Cleary C, Fernandez-Fernandez B, Ortiz A. Meso-American nephropathy: what we have learned about the potential genetic influence on chronic kidney disease development. *Clin Kidney J.* 2018 Aug;11(4):491–5.
17. Blasco M, Quiroga B, García-Aznar JM, Castro-Alonso C, Fernández-Granados SJ, Luna E, et al. Genetic Characterization of Kidney Failure of Unknown Etiology in Spain: Findings From the GENSEN Study. *Am J Kidney Dis.* 2024 Jul 6;
18. Lata S, Marasa M, Li Y, Fasel DA, Groopman E, Jobanputra V, et al. Whole-Exome Sequencing in Adults With Chronic Kidney Disease: A Pilot Study. *Ann Intern Med.* 2018 Jan 16;168(2):100–9.
19. Obrador GT, Levin A. CKD Hotspots: Challenges and Areas of Opportunity. *Semin Nephrol.* 2019 May;39(3):308–14.
20. Gunasekara TDKSC, De Silva PMCS, Herath C, Siribaddana S, Siribaddana N, Jayasumana C, et al. The Utility of Novel Renal Biomarkers in Assessment of Chronic Kidney Disease of Unknown Etiology (CKDu): A Review. *Int J Environ Res Public Health.* 2020 Dec 18;17(24).
21. Johnson RJ, Wesseling C, Newman LS. Chronic Kidney Disease of Unknown Cause in Agricultural Communities. *N Engl J Med.* 2019 May 9;380(19):1843–52.
22. Weiner DE, McClean MD, Kaufman JS, Brooks DR. The Central American epidemic of CKD. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2013 Mar;8(3):504–11.
23. Peraza S, Wesseling C, Aragon A, Leiva R, García-Trabanino RA, Torres C, et al. Decreased kidney function among agricultural workers in El Salvador. *Am J Kidney Dis.* 2012 Apr;59(4):531–40.
24. Sanoff SL, Callejas L, Alonso CD, Hu Y, Colindres RE, Chin H, et al. Positive association of renal insufficiency with agriculture employment and unregulated alcohol consumption in Nicaragua. *Ren Fail.* 2010;32(7):766–77.
25. Villalvazo P, Carriazo S, Martin-Cleary C, Ortiz A. Aguascalientes: one of the hottest chronic kidney disease (CKD) hotspots in Mexico and a CKD of unknown aetiology mystery to be solved. *Clin Kidney J.* 2021 Nov;14(11):2285–94.
26. González-Quiroz M, Pearce N, Caplin B, Nitsch D. What do epidemiological studies tell us about chronic kidney disease of undetermined cause in Meso-America? A systematic review and meta-analysis. *Clin Kidney J.* 2018 Aug;11(4):496–506.

27. Leibler JH, Ramirez-Rubio O, Velázquez JJA, Pilarte DL, Obeid W, Parikh CR, et al. Biomarkers of kidney injury among children in a high-risk region for chronic kidney disease of uncertain etiology. *Pediatr Nephrol*. 2021 Feb;36(2):387–96.
28. Jayasumana C. Chronic Interstitial Nephritis in Agricultural Communities (CINAC) in Sri Lanka. *Semin Nephrol*. 2019 May;39(3):278–83.
29. Vervaet BA, Nast CC, Schreurs G, Jayasumana C, Herath C, Kojc N, et al. Chronic interstitial nephritis in agricultural communities: a new perspective on etiology, diagnosis and mechanism. *Nephrol Ther*. 2021 Apr;17S:S45–50.
30. Wijkström J, Jayasumana C, Dassanayake R, Priyawardane N, Godakanda N, Siribaddana S, et al. Morphological and clinical findings in Sri Lankan patients with chronic kidney disease of unknown cause (CKDu): Similarities and differences with Mesoamerican Nephropathy. *PLoS One*. 2018;13(3):e0193056.
31. Hettithanthri O, Sandanayake S, Magana-Arachchi D, Wanigatunge R, Rajapaksha AU, Zeng X, et al. Risk factors for endemic chronic kidney disease of unknown etiology in Sri Lanka: Retrospect of water security in the dry zone. *Sci Total Environ*. 2021 Nov 15;795:148839.
32. Surendran SN, Jude PJ, Weeraratne TC, Parakrama Karunaratne SHP, Ramasamy R. Variations in susceptibility to common insecticides and resistance mechanisms among morphologically identified sibling species of the malaria vector *Anopheles subpictus* in Sri Lanka. *Parasit Vectors*. 2012 Feb 10;5:34.
33. Dharmaratne RW. Fluoride in drinking water and diet: the causative factor of chronic kidney diseases in the North Central Province of Sri Lanka. *Environ Health Prev Med*. 2015 Jul;20(4):237–42.
34. Pett J, Mohamed F, Knight J, Linhart C, Osborne NJ, Taylor R. Two decades of chronic kidney disease of unknown aetiology (CKDu) research: Existing evidence and persistent gaps from epidemiological studies in Sri Lanka. *Nephrology (Carlton)*. 2022 Mar;27(3):238–47.
35. Nanayakkara S, Senevirathna STMLD, Abeysekera T, Chandrajith R, Ratnatunga N, Gunaratne EDL, et al. An integrative study of the genetic, social and environmental determinants of chronic kidney disease characterized by tubulointerstitial damages in the North Central Region of Sri Lanka. *J Occup Health*. 2014;56(1):28–38.
36. Nanayakkara S, Senevirathna STMLD, Karunaratne U, Chandrajith R, Harada KH, Hitomi T, et al. Evidence of tubular damage in the very early stage of chronic kidney disease of uncertain etiology in the North Central Province of Sri Lanka: a cross-sectional study. *Environ Health Prev Med*. 2012 Mar;17(2):109–17.

37. Kaur P, Gunawardena N, Kumaresan J. A Review of Chronic Kidney Disease of Unknown Etiology in Sri Lanka, 2001-2015. *Indian J Nephrol.* 2020;30(4):245–52.
38. Bashir B, Sharma SG, Stein HD, Sirota RA, D'Agati VD. Acute kidney injury secondary to exposure to insecticides used for bedbug (*Cimex lectularis*) control. *Am J Kidney Dis.* 2013 Nov;62(5):974–7.
39. Bissell DM, Anderson KE, Bonkovsky HL. Porphyrria. *N Engl J Med.* 2017 Aug 31;377(9):862–72.
40. Bustad HJ, Kallio JP, Vorland M, Fiorentino V, Sandberg S, Schmitt C, et al. Acute Intermittent Porphyrria: An Overview of Therapy Developments and Future Perspectives Focusing on Stabilisation of HMBS and Proteostasis Regulators. *Int J Mol Sci.* 2021 Jan 12;22(2).
41. Ramanujam VMS, Anderson KE. Porphyrria Diagnostics-Part 1: A Brief Overview of the Porphyrrias. *Curr Protoc Hum Genet.* 2015 Jul 1;86:17.20.1-17.20.26.
42. Sardh E, Barbaro M. Acute Intermittent Porphyrria. 1993.
43. Tchernitchko D, Tavernier Q, Lamoril J, Schmitt C, Talbi N, Lyoumi S, et al. A Variant of Peptide Transporter 2 Predicts the Severity of Porphyrria-Associated Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol.* 2017 Jun;28(6):1924–32.
44. Pallet N, Mami I, Schmitt C, Karim Z, François A, Rabant M, et al. High prevalence of and potential mechanisms for chronic kidney disease in patients with acute intermittent porphyrria. *Kidney Int.* 2015 Aug;88(2):386–95.
45. Balwani M, Sardh E, Ventura P, Peiró PA, Rees DC, Stölzel U, et al. Phase 3 Trial of RNAi Therapeutic Givosiran for Acute Intermittent Porphyrria. *N Engl J Med.* 2020 Jun 11;382(24):2289–301.
46. Agarwal S, Habtemariam B, Xu Y, Simon AR, Kim JB, Robbie GJ. Normal reference ranges for urinary δ -aminolevulinic acid and porphobilinogen levels. *JIMD Rep.* 2021 Jan;57(1):85–93.
47. Sardh E, Harper P, Balwani M, Stein P, Rees D, Bissell DM, et al. Phase 1 Trial of an RNA Interference Therapy for Acute Intermittent Porphyrria. *N Engl J Med.* 2019 Feb 7;380(6):549–58.
48. Gomá-Garcés E, Pérez-Gómez MV, Ortiz A. Givosiran for Acute Intermittent Porphyrria. *N Engl J Med.* 2020 Nov 12;383(20):1989.
49. Heybeli C, Oktan MA, Çavdar Z. Rat models of colistin nephrotoxicity: previous experimental researches and future perspectives. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019 Aug;38(8):1387–93.

50. Tsuji BT, Pogue JM, Zavascki AP, Paul M, Daikos GL, Forrest A, et al. International Consensus Guidelines for the Optimal Use of the Polymyxins: Endorsed by the American College of Clinical Pharmacy (ACCP), European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), Infectious Diseases Society of America (IDSA), International Society for Anti-infective Pharmacology (ISAP), Society of Critical Care Medicine (SCCM), and Society of Infectious Diseases Pharmacists (SIDP). *Pharmacotherapy*. 2019 Jan;39(1):10–39.
51. Azad MAK, Nation RL, Velkov T, Li J. Mechanisms of Polymyxin-Induced Nephrotoxicity. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1145:305–19.
52. Shields RK, Anand R, Clarke LG, Paronish JA, Weirich M, Perone H, et al. Defining the incidence and risk factors of colistin-induced acute kidney injury by KDIGO criteria. *PLoS One*. 2017;12(3):e0173286.
53. Moghnieh R, Husni R, Helou M, Abdallah D, Sinno L, Jadayel M, et al. The Prevalence and Risk Factors of Acute Kidney Injury during Colistin Therapy: A Retrospective Cohort Study from Lebanon. *Antibiotics (Basel)*. 2023 Jul 13;12(7).
54. Vaara M. Polymyxins and Their Potential Next Generation as Therapeutic Antibiotics. *Front Microbiol*. 2019;10:1689.
55. van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Feb;9(2):112–24.
56. Sisay M, Hagos B, Edessa D, Tadiwos Y, Mekuria AN. Polymyxin-induced nephrotoxicity and its predictors: a systematic review and meta-analysis of studies conducted using RIFLE criteria of acute kidney injury. *Pharmacol Res*. 2021 Jan;163:105328.
57. Samsami M, Shabani M, Hajiesmaeili M, Tavakoli-Ardakani M, Ardehali SH, Fatemi A, et al. The effects of vitamin E on colistin-induced nephrotoxicity in treatment of drug-resistant gram-negative bacterial infections: A randomized clinical trial. *J Infect Chemother*. 2021 Aug;27(8):1181–5.
58. Terada T, Inui K ichi. Peptide transporters: structure, function, regulation and application for drug delivery. *Curr Drug Metab*. 2004 Feb;5(1):85–94.
59. Smith DE, Cléménçon B, Hediger MA. Proton-coupled oligopeptide transporter family SLC15: physiological, pharmacological and pathological implications. *Mol Aspects Med*. 2013;34(2–3):323–36.
60. Brandsch M, Knütter I, Bosse-Doenecke E. Pharmaceutical and pharmacological importance of peptide transporters. *J Pharm Pharmacol*. 2008 May;60(5):543–85.
61. Rubio-Aliaga I, Daniel H. Peptide transporters and their roles in physiological processes and drug disposition. *Xenobiotica*. 2008 Jul;38(7–8):1022–42.

62. <https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q16348>.
63. Newstead S. Recent advances in understanding proton coupled peptide transport via the POT family. *Curr Opin Struct Biol*. 2017 Aug;45:17–24.
64. Newstead S. Towards a structural understanding of drug and peptide transport within the proton-dependent oligopeptide transporter (POT) family. *Biochem Soc Trans*. 2011 Oct;39(5):1353–8.
65. Biegel A, Gebauer S, Brandsch M, Neubert K, Thondorf I. Structural requirements for the substrates of the H⁺/peptide cotransporter PEPT2 determined by three-dimensional quantitative structure-activity relationship analysis. *J Med Chem*. 2006 Jul 13;49(14):4286–96.
66. Van Aubel RA, Masereeuw R, Russel FG. Molecular pharmacology of renal organic anion transporters. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000 Aug;279(2):F216–32.
67. Frey IM, Rubio-Aliaga I, Siewert A, Sailer D, Drobyshev A, Beckers J, et al. Profiling at mRNA, protein, and metabolite levels reveals alterations in renal amino acid handling and glutathione metabolism in kidney tissue of Pept2^{-/-} mice. *Physiol Genomics*. 2007 Feb 12;28(3):301–10.
68. Luckner P, Brandsch M. Interaction of 31 beta-lactam antibiotics with the H⁺/peptide symporter PEPT2: analysis of affinity constants and comparison with PEPT1. *Eur J Pharm Biopharm*. 2005 Jan;59(1):17–24.
69. Zhang J, Wang C, Liu Q, Meng Q, Cang J, Sun H, et al. Pharmacokinetic interaction between JBP485 and cephalexin in rats. *Drug Metab Dispos*. 2010 Jun;38(6):930–8.
70. Guo X, Meng Q, Liu Q, Wang C, Sun H, Kaku T, et al. Construction, identification and application of HeLa cells stably transfected with human PEPT1 and PEPT2. *Peptides (NY)*. 2012 Apr;34(2):395–403.
71. Zhu T, Chen XZ, Steel A, Hediger MA, Smith DE. Differential recognition of ACE inhibitors in *Xenopus laevis* oocytes expressing rat PEPT1 and PEPT2. *Pharm Res*. 2000 May;17(5):526–32.
72. Otter M, Oswald S, Siegmund W, Keiser M. Effects of frequently used pharmaceutical excipients on the organic cation transporters 1-3 and peptide transporters 1/2 stably expressed in MDCKII cells. *Eur J Pharm Biopharm*. 2017 Mar;112:187–95.
73. Knütter I, Kottra G, Fischer W, Daniel H, Brandsch M. High-affinity interaction of sartans with H⁺/peptide transporters. *Drug Metab Dispos*. 2009 Jan;37(1):143–9.
74. Lu X, Chan T, Xu C, Zhu L, Zhou QT, Roberts KD, et al. Human oligopeptide transporter 2 (PEPT2) mediates cellular uptake of polymyxins. *J Antimicrob Chemother*. 2016 Feb;71(2):403–12.

75. Kim HY, Veal GJ, Zhou F, Boddy A V. The role of solute carrier (SLC) transporters in actinomycin D pharmacokinetics in paediatric cancer patients. *Eur J Clin Pharmacol*. 2018 Dec;74(12):1575–84.
76. Fujiwara K, Shin M, Yoshizaki Y, Miyazaki T, Saita T. Immunocytochemistry for bestatin and its application to drug accumulation studies in rat intestine and kidney. *J Mol Histol*. 2011 Dec;42(6):589–96.
77. Biegel A, Knütter I, Hartrodt B, Gebauer S, Theis S, Luckner P, et al. The renal type H⁺/peptide symporter PEPT2: structure-affinity relationships. *Amino Acids*. 2006 Sep;31(2):137–56.
78. Terada T, Sawada K, Saito H, Hashimoto Y, Inui K. Inhibitory effect of novel oral hypoglycemic agent nateglinide (AY4166) on peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *Eur J Pharmacol*. 2000 Mar 24;392(1–2):11–7.
79. Xu Q, Wang C, Meng Q, Liu Q, Sun P, Sun H, et al. The oligopeptide transporter 2-mediated reabsorption of entecavir in rat kidney. *Eur J Pharm Sci*. 2014 Feb 14;52:41–7.
80. Jappar D, Hu Y, Keep RF, Smith DE. Transport mechanisms of carnosine in SKPT cells: contribution of apical and basolateral membrane transporters. *Pharm Res*. 2009 Jan;26(1):172–81.
81. Zhao D, Lu K. Substrates of the human oligopeptide transporter hPEPT2. *Biosci Trends*. 2015 Aug;9(4):207–13.
82. Sobin C, Parisi N, Schaub T, Gutierrez M, Ortega AX. δ -Aminolevulinic acid dehydratase single nucleotide polymorphism 2 and peptide transporter 2*2 haplotype may differentially mediate lead exposure in male children. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2011 Oct;61(3):521–9.
83. Robison SW, Li J, Viera L, Blackburn JP, Patel RP, Blalock JE, et al. A mechanism for matrikine regulation in acute inflammatory lung injury. *JCI Insight*. 2021 Apr 8;6(7).
84. Pinsonneault J, Nielsen CU, Sadée W. Genetic variants of the human H⁺/dipeptide transporter PEPT2: analysis of haplotype functions. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004 Dec;311(3):1088–96.
85. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=6565.
86. Karimian Pour N, Piquette-Miller M. Dysregulation of renal transporters in a rodent model of viral infection. *Int Immunopharmacol*. 2020 Mar;80:106135.
87. Karimian Pour N, McColl ER, Piquette-Miller M. Impact of Viral Inflammation on the Expression of Renal Drug Transporters in Pregnant Rats. *Pharmaceutics*. 2019 Nov 22;11(12).

88. Nakamura N, Masuda S, Takahashi K, Saito H, Okuda M, Inui K ichi. Decreased expression of glucose and peptide transporters in rat remnant kidney. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2004 Feb;19(1):41–7.
89. Takahashi K, Masuda S, Nakamura N, Saito H, Futami T, Doi T, et al. Upregulation of H(+)-peptide cotransporter PEPT2 in rat remnant kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001 Dec;281(6):F1109-16.
90. Tramonti G, Xie P, Wallner EI, Danesh FR, Kanwar YS. Expression and functional characteristics of tubular transporters: P-glycoprotein, PEPT1, and PEPT2 in renal mass reduction and diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006 Nov;291(5):F972-80.
91. Döring F, Schmitt R, Bernhardt WM, Klapper M, Bachmann S, Daniel H, et al. Hypothyroidism induces expression of the peptide transporter PEPT2. *Biol Chem*. 2005 Aug;386(8):785–90.
92. Alghamdi OA, King N, Andronicos NM, Jones GL, Chami B, Witting PK, et al. Molecular changes to the rat renal cotransporters PEPT1 and PEPT2 due to ageing. *Mol Cell Biochem*. 2019 Feb;452(1–2):71–82.
93. Karimian Pour N, Piquette-Miller M. Endotoxin Modulates the Expression of Renal Drug Transporters in HIV-1 Transgenic Rats. *J Pharm Pharm Sci*. 2018;21(1s):117s–29s.
94. Kusaka M, Yamada K, Kuroyanagi Y, Terauchi A, Kowa H, Kurahashi H, et al. Gene expression profile in rat renal isografts from brain dead donors. *Transplant Proc*. 2005;37(1):364–6.
95. Bravo SA, Nielsen CU, Amstrup J, Frokjaer S, Brodin B. Epidermal growth factor decreases PEPT2 transport capacity and expression in the rat kidney proximal tubule cell line SKPT0193 cl.2. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004 Feb;286(2):F385-93.
96. Bravo SA, Nielsen CU, Frokjaer S, Brodin B. Characterization of rPEPT2-mediated Gly-Sar transport parameters in the rat kidney proximal tubule cell line SKPT-0193 cl.2 cultured in basic growth media. *Mol Pharm*. 2005;2(2):98–108.
97. Wu Q, Aroankins TS, Cheng L, Fenton RA. SUMOylation Landscape of Renal Cortical Collecting Duct Cells. *J Proteome Res*. 2019 Oct 4;18(10):3640–8.
98. Quan Y, Jin Y, Faria TN, Tilford CA, He A, Wall DA, et al. Expression Profile of Drug and Nutrient Absorption Related Genes in Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) Cells Grown under Differentiation Conditions. *Pharmaceutics*. 2012 Jun 18;4(2):314–33.
99. Wang Z, Pal D, Patel A, Kwatra D, Mitra AK. Influence of overexpression of efflux proteins on the function and gene expression of endogenous peptide transporters in MDR-transfected MDCKII cell lines. *Int J Pharm*. 2013 Jan 30;441(1–2):40–9.

100. S ndergaard HB, Bravo SA, Nielsen CU, Frokjaer S, Brodin B. Cloning of the pig PEPT2 (pPEPT2) and characterization of the effects of epidermal growth factor (EGF) on pPEPT2-mediated peptide uptake in the renal porcine cell line LLC-PK1. *Eur J Pharm Sci.* 2008 Apr 23;33(4–5):332–42.
101. Sugiura T, Kato Y, Kubo Y, Tsuji A. Mutation in an adaptor protein PDZK1 affects transport activity of organic cation transporter OCTNs and oligopeptide transporter PEPT2. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2006 Oct;21(5):375–83.
102. Noshiro R, Anzai N, Sakata T, Miyazaki H, Terada T, Shin HJ, et al. The PDZ domain protein PDZK1 interacts with human peptide transporter PEPT2 and enhances its transport activity. *Kidney Int.* 2006 Jul;70(2):275–82.
103. Clermont G, Auffray C, Moreau Y, Rocke DM, Dalevi D, Dubhashi D, et al. Bridging the gap between systems biology and medicine. *Genome Med.* 2009 Sep 29;1(9):88.
104. Federoff HJ, Gostin LO. Evolving from reductionism to holism: is there a future for systems medicine? *JAMA.* 2009 Sep 2;302(9):994–6.
105. Vali  o-Rivas L, Cuarental L, Agustin M, Husi H, Cannata-Ortiz P, Sanz AB, et al. MAGE genes in the kidney: identification of MAGED2 as upregulated during kidney injury and in stressed tubular cells. *Nephrol Dial Transplant.* 2019 Sep 1;34(9):1498–507.
106. Liu H, Doke T, Guo D, Sheng X, Ma Z, Park J, et al. Epigenomic and transcriptomic analyses define core cell types, genes and targetable mechanisms for kidney disease. *Nat Genet.* 2022 Jul;54(7):950–62.
107. Wuttke M, Li Y, Li M, Sieber KB, Feitosa MF, Gorski M, et al. A catalog of genetic loci associated with kidney function from analyses of a million individuals. *Nat Genet.* 2019 Jun;51(6):957–72.
108. Jing J, Pattaro C, Hoppmann A, Okada Y, CKDGen Consortium, Fox CS, et al. Combination of mouse models and genomewide association studies highlights novel genes associated with human kidney function. *Kidney Int.* 2016 Oct;90(4):764–73.
109. Shen H, Ocheltree SM, Hu Y, Keep RF, Smith DE. Impact of genetic knockout of PEPT2 on cefadroxil pharmacokinetics, renal tubular reabsorption, and brain penetration in mice. *Drug Metab Dispos.* 2007 Jul;35(7):1209–16.
110. Samodelov SL, Visentin M, Gai Z, H usler S, Kullak-Ublick GA. Renal glycosuria as a novel early sign of colistin-induced kidney damage in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019 Sep 9;63(12).
111. Haverty TP, Kelly CJ, Hines WH, Amenta PS, Watanabe M, Harper RA, et al. Characterization of a renal tubular epithelial cell line which secretes the autologous

- target antigen of autoimmune experimental interstitial nephritis. *J Cell Biol.* 1988 Oct;107(4):1359–68.
112. Lee S hyo, Kim J sun, Ravichandran K, Gil HW, Song H yeon, Hong S yong. P-Glycoprotein Induction Ameliorates Colistin Induced Nephrotoxicity in Cultured Human Proximal Tubular Cells. *PLoS One.* 2015;10(8):e0136075.
 113. Valiño-Rivas L, Cuarental L, Ceballos MI, Pintor-Chocano A, Perez-Gomez MV, Sanz AB, et al. Growth differentiation factor-15 preserves Klotho expression in acute kidney injury and kidney fibrosis. *Kidney Int.* 2022 Jun;101(6):1200–15.
 114. Cuarental L, Ribagorda M, Ceballos MI, Pintor-Chocano A, Carriazo SM, Dopazo A, et al. The transcription factor Fosl1 preserves Klotho expression and protects from acute kidney injury. *Kidney Int.* 2023 Apr;103(4):686–701.
 115. <http://v5.nephroseq.org/>.
 116. Wu H, Malone AF, Donnelly EL, Kirita Y, Uchimura K, Ramakrishnan SM, et al. Single-Cell Transcriptomics of a Human Kidney Allograft Biopsy Specimen Defines a Diverse Inflammatory Response. *J Am Soc Nephrol.* 2018 Aug;29(8):2069–80.
 117. <http://humphreyslab.com/SingleCell/>.
 118. Wu H, Uchimura K, Donnelly EL, Kirita Y, Morris SA, Humphreys BD. Comparative Analysis and Refinement of Human PSC-Derived Kidney Organoid Differentiation with Single-Cell Transcriptomics. *Cell Stem Cell.* 2018 Dec 6;23(6):869-881.e8.
 119. Muto Y, Wilson PC, Ledru N, Wu H, Dimke H, Waikar SS, et al. Single cell transcriptional and chromatin accessibility profiling redefine cellular heterogeneity in the adult human kidney. *Nat Commun.* 2021 Apr 13;12(1):2190.
 120. Wilson PC, Wu H, Kirita Y, Uchimura K, Ledru N, Rennke HG, et al. The single-cell transcriptomic landscape of early human diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019 Sep 24;116(39):19619–25.
 121. Wilson PC, Muto Y, Wu H, Karihaloo A, Waikar SS, Humphreys BD. Multimodal single cell sequencing implicates chromatin accessibility and genetic background in diabetic kidney disease progression. *Nat Commun.* 2022 Sep 6;13(1):5253.
 122. Muto Y, Dixon EE, Yoshimura Y, Wu H, Omachi K, Ledru N, et al. Defining cellular complexity in human autosomal dominant polycystic kidney disease by multimodal single cell analysis. *Nat Commun.* 2022 Oct 30;13(1):6497.
 123. Wu H, Kirita Y, Donnelly EL, Humphreys BD. Advantages of Single-Nucleus over Single-Cell RNA Sequencing of Adult Kidney: Rare Cell Types and Novel Cell States Revealed in Fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2019 Jan;30(1):23–32.

124. Kirita Y, Wu H, Uchimura K, Wilson PC, Humphreys BD. Cell profiling of mouse acute kidney injury reveals conserved cellular responses to injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020 Jul 7;117(27):15874–83.
125. Dixon EE, Wu H, Muto Y, Wilson PC, Humphreys BD. Spatially Resolved Transcriptomic Analysis of Acute Kidney Injury in a Female Murine Model. *J Am Soc Nephrol*. 2022 Feb;33(2):279–89.
126. Gerhardt LMS, Koppitch K, van Gestel J, Guo J, Cho S, Wu H, et al. Lineage Tracing and Single-Nucleus Multiomics Reveal Novel Features of Adaptive and Maladaptive Repair after Acute Kidney Injury. *J Am Soc Nephrol*. 2023 Apr 1;34(4):554–71.
127. Li H, Dixon EE, Wu H, Humphreys BD. Comprehensive single-cell transcriptional profiling defines shared and unique epithelial injury responses during kidney fibrosis. *Cell Metab*. 2022 Dec 6;34(12):1977-1998.e9.
128. <https://gnomad.broadinstitute.org/>.
129. Tejedor A, Torres AM, Castilla M, Lazaro JA, de Lucas C, Caramelo C. Cilastatin protection against cyclosporin A-induced nephrotoxicity: clinical evidence. *Curr Med Res Opin*. 2007 Mar;23(3):505–13.
130. Marquez-Exposito L, Tejedor-Santamaria L, Santos-Sanchez L, Valentijn FA, Cantero-Navarro E, Rayego-Mateos S, et al. Acute Kidney Injury is Aggravated in Aged Mice by the Exacerbation of Proinflammatory Processes. *Front Pharmacol*. 2021;12:662020.
131. Salanova Villanueva L, Sánchez González C, Sánchez Tomero JA, Aguilera A, Ortega Junco E. Bone mineral disorder in chronic kidney disease: Klotho and FGF23; cardiovascular implications. *Nefrologia*. 2016;36(4):368–75.
132. Sanchez-Niño MD, Fernandez-Fernandez B, Ortiz A. Klotho, the elusive kidney-derived anti-ageing factor. *Clin Kidney J*. 2020 Apr;13(2):125–7.
133. Liu Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nat Rev Nephrol*. 2011 Oct 18;7(12):684–96.
134. Fragiadaki M, Witherden AS, Kaneko T, Sonnylal S, Pusey CD, Bou-Gharios G, et al. Interstitial fibrosis is associated with increased COL1A2 transcription in AA-injured renal tubular epithelial cells in vivo. *Matrix Biol*. 2011 Sep;30(7–8):396–403.
135. https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LAST_SPEC=&LINK_LOC=blasttab&LAST_PAGE=tblastn.
136. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2257212>.
137. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1143671>.
138. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/050108s033lbl.pdf.

139. Ahumada Topete VH, de Dios Sanchez KJ, Casas Aparicio GA, Hernandez Silva G, Lopez Vejar CE, Torres Espíndola LM, et al. Adverse Events and Drug Resistance in Critically Ill Patients Treated with Colistimethate Sodium: A Review of the Literature. *Infect Drug Resist.* 2023;16:1357–66.
140. Deniz M, Alişık M. Risk factors and prognosis for the development of acute kidney injury in patients using colistin in the intensive care unit: A retrospective cohort study. *Medicine.* 2024 Jan 12;103(2):e36913.
141. Ballı FN, Ekinci PB, Kurtaran M, Kara E, Dizman GT, Sönmezer MÇ, et al. Battle of polymyxin induced nephrotoxicity: Polymyxin B versus colistin. *Int J Antimicrob Agents.* 2024 Feb;63(2):107035.
142. Kilic I, Ayar Y, Ceylan İ, Kaya PK, Caliskan G. Nephrotoxicity caused by colistin use in ICU: a single centre experience. *BMC Nephrol.* 2023 Oct 13;24(1):302.
143. Sangthawan P, Geater AF, Naorungroj S, Nikomrat P, Nwabor OF, Chusri S. Characteristics, Influencing Factors, Predictive Scoring System, and Outcomes of the Patients with Nephrotoxicity Associated with Administration of Intravenous Colistin. *Antibiotics (Basel).* 2021 Dec 21;11(1).
144. Gunay E, Kaya S, Baysal B, Yuksel E, Arac E. Evaluation of prognosis and nephrotoxicity in patients treated with colistin in intensive care unit. *Ren Fail.* 2020 Nov;42(1):704–9.
145. Hassan MM, Gaifer Z, Al-Zakwani IS. Incidence and risk factors of nephrotoxicity in patients on colistimethate sodium. *Int J Clin Pharm.* 2018 Apr;40(2):444–9.
146. Sisay M, Hagos B, Edessa D, Tadiwos Y, Mekuria AN. Polymyxin-induced nephrotoxicity and its predictors: a systematic review and meta-analysis of studies conducted using RIFLE criteria of acute kidney injury. *Pharmacol Res.* 2021 Jan;163:105328.
147. Kucuk M, Heybeli C, Ozturk MC, Ergun B, Yakar MN, Gokmen AN, et al. Dexmedetomidine may reduce the risk of acute kidney injury development in critically ill patients during colistin therapy. *J Infect Chemother.* 2023 Jul;29(7):673–7.
148. Zheng Z, Shao Z, Lu L, Tang S, Shi K, Gong F, et al. Ceftazidime/avibactam combined with colistin: a novel attempt to treat carbapenem-resistant Gram-negative bacilli infection. *BMC Infect Dis.* 2023 Oct 20;23(1):709.
149. https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/66863/66863_ft.pdf.
150. Paul M, Daikos GL, Durante-Mangoni E, Yahav D, Carmeli Y, Benattar YD, et al. Colistin alone versus colistin plus meropenem for treatment of severe infections caused by carbapenem-resistant Gram-negative bacteria: an open-label, randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis.* 2018 Apr;18(4):391–400.

151. Kaye KS, Marchaim D, Thamlikitkul V, Carmeli Y, Chiu CH, Daikos G, et al. Colistin Monotherapy versus Combination Therapy for Carbapenem-Resistant Organisms. *NEJM evidence*. 2023 Jan;2(1).
152. Rabi R, Enaya A, Sweileh MW, Aiesh BM, Namrouti A, Hamdan ZI, et al. Comprehensive Assessment of Colistin Induced Nephrotoxicity: Incidence, Risk Factors and Time Course. *Infect Drug Resist*. 2023;16:3007–17.
153. Mathew SK, Chapla A, Venkatesan P, Eriyat V, Aruldas BW, Prabha R, et al. Genetic predisposition and high exposure to colistin in the early treatment period as independent risk factors for colistin-induced nephrotoxicity. *Clin Transl Sci*. 2024 Mar;17(3):e13764.
154. https://gnomad.broadinstitute.org/gene/ENSG00000163406?dataset=gnomad_r2_1.
155. Ratjen F, Rietschel E, Kasel D, Schwiertz R, Starke K, Beier H, et al. Pharmacokinetics of inhaled colistin in patients with cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother*. 2006 Feb;57(2):306–11.
156. https://www.ema.europa.eu/es/documents/product-information/colobreathe-epar-product-information_es.pdf.
157. Min KL, Son ES, Kim JS, Kim SH, Jung SM, Chang MJ. Risk factors of colistin safety according to administration routes: Intravenous and aerosolized colistin. *PLoS One*. 2018;13(11):e0207588.