

“It is better to fall in originality than to succeed in imitation”

Herman Melville



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

“La disfunción endotelial y la inflamación crónica como mecanismos en el desarrollo de fibrosis del miocardio durante la enfermedad renal crónica”

T E S I S

QUE PRESENTA

Biol. Yadira Isabel Amador Martínez

Matrícula: 2183801990

Para obtener el grado de:

maestra en Biología Experimental

COMITÉ TUTORAL

Co director: Dr. Jonatan Barrera Chimal

Co director: Dr. Julio César Almanza Pérez

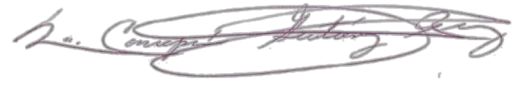
Asesor: Dr. Mario García Lorenzana

Miembros del jurado

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: “**La disfunción endotelial y la inflamación crónica como mecanismos en el desarrollo de fibrosis del miocardio durante la enfermedad renal crónica**”, que presentó la alumna: **Yadira Isabel Amador Martínez** el día 18 de diciembre del año 2020.

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruíz

Profesora-Investigadora, Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana



Presidenta

Dr. Mario García Lorenzana

Profesor titular C, Departamento de Biología de la reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana



Secretario

Dr. Fausto Sánchez Muñoz

Investigador en Ciencias Médicas, Departamento de Inmunología
Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez



Vocal

Dr. Carlo César Cortés González

Investigador en Ciencias Médicas D
Instituto Nacional de Cancerología



Vocal

Declaración de originalidad

El (La) que suscribe Yadira Isabel Amador Martínez, alumna del posgrado Biología Experimental, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autora de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: "La disfunción endotelial y la inflamación crónica como mecanismos en el desarrollo de fibrosis del miocardio durante la enfermedad renal crónica",

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante "el H. Jurado" para lo obtención del grado de Maestra en Biología Experimental es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 28 de noviembre de 2020.

Atentamente



Yadira Isabel Amador Martínez

“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

Durante mis estudios de maestría recibí una beca otorgada por CONACYT con número de registro 13876

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Jonatan Barrera Chimal en la Unidad de Investigación UNAM-INC del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. Ciudad de México, México. Periodo: 2018-2020

Este trabajo fue apoyado por donativos otorgados al Dr. Jonatan Barrera Chimal por PAPIIT/DGAPA/UNAM con el proyecto IN202919, por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología proyecto No.1768- Ciencia de Frontera 2019 y por la Fundación Miguel Alemán al Dr. Jonatan Barrera Chimal.

Se reconoce la asesoría técnica de la Biol. Lorena López Griego durante el desarrollo de este trabajo de tesis.

Miembros del Comité de tutores:

Co director externo: Dr. Jonatan Barrera Chimal

Investigador titular A, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México e Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez

Co director interno: Dr. Julio César Almanza Pérez

Investigador titular C, Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Asesor: Dr. Mario García Lorenzana

Profesor titular C, Departamento de Biología de la reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Dedicatorias

A mis padres, Rufina y Herminio, quiénes siempre me han apoyado en las metas que me planteo. Quienes me han enseñado que la vida y los retos se enfrentan con tolerancia, paciencia y con el esfuerzo constante. Gracias por darme ánimos todos los días y ayudarme a ser mejor. Gracias

A mis hermanos Lina, Marlenne, José y Roberto, tan importantes en mi vida. Gracias por motivarme cada día, por ser tan unidos y disfrutar su compañía siendo cómplices de pláticas, risas, juegos y viajes. Sé que cuento con ustedes para apoyar todos mis sueños.

A mis sobrinos Moisés y Jacob, porque son unos niños maravillosos que me impulsan a seguir adelante.

A mis abuelas Isabel y Aldegunda, porque, aunque no están ya presentes, me dieron grandes consejos y me motivaron a seguir siempre con confianza.

A Marco, por su amor y cariño. Gracias por todo el apoyo que me has brindado, por cuidarme y además motivarme a continuar con mis sueños.

Agradecimientos:

A la UAM -Iztapalapa, por todas las facilidades y apoyos brindados durante mis estudios de posgrado. Gracias

Al posgrado en Biología Experimental y su cuerpo de docentes, por formarme con competencias, aptitudes, ética y profesionalismo en el campo de la investigación. Gracias

Al Dr. Jonatan Barrera Chimal, por su impecable enseñanza, dedicación y apoyo durante estos años de mi formación profesional. Gracias por tu amistad, tus grandes consejos y por ser una guía implacable en el campo de la Ciencia. Gracias

Al Dr. Julio César Almanza Pérez por su co-tutoría y por estar siempre accesible a mis preguntas y ser parte de este logro académico. Gracias

Al Dr. Mario García Lorenzana por darme su asesoría en este trabajo, sus críticas invaluable y por brindarme su apoyo académico. Gracias

A Ceci, Johannes y Lore por su compañerismo, amistad y por ser una parte muy importante de mi aprendizaje en el laboratorio de Fisiología Cardiovascular y Trasplante Renal.

A Daniel, por su amistad, consejos y discusiones enriquecedoras en Ciencia durante su estancia por CDMX.

A mis compañeros y amigos de maestría; Diana, Mario, Pepe, Lissette, Ale, Zuly, Óscar, Carlo, Ara, Mara, Claudia, Israel, Erandi, Itzel y Samuel, por las discusiones enriquecedoras después de clases, las comidas juntos y por su valiosa amistad y apoyo. Creo que durante este camino fuimos muy unidos y crecimos juntos en distintos aspectos tanto académicos como personales. Gracias

Gracias

Resumen

La enfermedad renal crónica (ERC) es un problema de salud global que afecta a cerca de 850 millones de personas en el mundo y además se asocia con el desarrollo de alteraciones cardíacas que incrementan en más del 50% el riesgo de mortalidad prematura en los pacientes. En estudios previos, se ha mostrado que durante la ERC se desarrolla hipertrofia, fibrosis y disfunción del miocardio acompañada de la inactivación de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) a nivel cardíaco. Debido a esta problemática, en la primera parte de esta tesis se evaluó el efecto de la administración de L-arginina, como sustrato de la eNOS para la síntesis de óxido nítrico, sobre la aparición de alteraciones cardiovasculares en un modelo de ERC en ratas Wistar macho. Se encontró que algunas de las alteraciones cardíacas como hipertrofia, fibrosis y disfunción cardíaca así como la inactivación de la eNOS se previnieron cuando los animales con ERC fueron tratados con L-arginina.

En la segunda parte de esta tesis, se hizo énfasis en el estudio de la respuesta inflamatoria en etapas tempranas de la ERC sobre la aparición de alteraciones crónicas en el corazón. Se observó que en la fase temprana (72 y 120 h) de la ERC hubo un incremento en la infiltración de células inflamatorias al corazón como neutrófilos, linfocitos T CD4 + y células dendríticas. Al eliminar a los neutrófilos en la fase temprana de la ERC se observó que la hipertrofia cardíaca disminuye en los animales con ERC. Al estudiar los posibles mecanismos involucrados en el incremento del infiltrado inflamatorio en el corazón durante la ERC, encontramos que en las etapas tempranas de la ERC, se incrementa la expresión de 54 genes

relacionados a procesos de activación del sistema inmune y respuesta a interferón. Finalmente, al evaluar las modificaciones epigenéticas en los corazones de los animales con ERC igualmente en etapas tempranas, mediante secuenciación por bisulfito, se encontró que en la fase inicial de la progresión de la ERC hay 104 regiones metiladas diferencialmente (DMRs) comparado con los controles. Los genes asociados a DMRs incluyeron genes relevantes para la función cardíaca y que participan en procesos como la regulación de la estructura y metabolismo cardíaco, corrientes eléctricas del corazón y riesgo de infarto al miocardio.

En conjunto, nuestros resultados muestran que en un modelo experimental de ERC se presentan alteraciones cardíacas tempranas como la infiltración de células inflamatorias, cambios transcripcionales y epigenéticos que pueden contribuir al desarrollo de alteraciones cardiovasculares crónicas en la ERC. Además mostramos que el tratamiento con L-arginina previene el desarrollo de fibrosis e hipertrofia cardíacas crónicas durante la ERC a través de promover la activación de la eNOS.

Abstract

Chronic kidney disease (CKD) is a global health problem that affects around 850 million people in the world. CKD is associated with the development of cardiac alterations that increase in more than 50% risk of mortality. In a previous study, it was demonstrated that during CKD progression, cardiac alterations including hypertrophy, fibrosis, and myocardial dysfunction appear, and these events are related to the inactivation of the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in the heart. Because of that, in the first part of this research, we evaluated the effect of L-arginine administration, as an eNOS substrate for nitric oxide production, in the development of cardiovascular alterations in a CKD model in male Wistar rats. We found that the cardiac alterations like hypertrophy, fibrosis, cardiac dysfunction, and eNOS inactivation in the heart were prevented when the animals were treated with L-arginine, suggesting that protection may be due to enhanced nitric oxide production in the heart.

In the second part of this study, we focused on the cardiac inflammatory response during the early stages of CKD and its role on the emergence of chronic cardiac alterations. We observed that during the early phase of CKD (72h and 120h), there was an increase in the infiltration of inflammatory cells like neutrophils, T lymphocytes, and dendritic cells. By depleting neutrophils in the early phase of CKD we showed that cardiac hypertrophy was reduced in the CKD animals. Next, we studied the possible mechanisms involved in the increase of inflammatory infiltration in the heart during CKD and we found that during the early stages of CKD there was an increased expression of 54 genes related to inflammatory processes like immune system activa-

tion and interferon response. Finally, by evaluating epigenetic modifications in the hearts of CKD animals also in early stages, through bisulfite sequencing, it was found that in the initial phase of the CKD progression there were 104 differentially methylated regions (DMRs) as compared with controls. The genes associated with DMRs included relevant genes to cardiac function maintenance and some that participate in the processes like regulation of cardiac metabolism and structure, pacemaker, and myocardial infarction risk.

Taken together, our results show that early cardiac abnormalities such as infiltration of inflammatory cells, transcriptional, and epigenetic changes occur in an experimental CKD model and that these alterations can contribute to the development of chronic cardiovascular abnormalities in CKD. We also show that treatment with L-arginine prevents the development of chronic cardiac fibrosis and hypertrophy during CKD by promoting eNOS activation.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN:	1
1.1 ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA	1
1.2 ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA POR LESIÓN RENAL AGUDA (LRA)	7
1.3 ALTERACIONES CARDIOVASCULARES EN PACIENTES CON ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA	16
1.4 CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES DEL ENDOTELIO	18
1.5 DISFUNCIÓN ENDOTELIAL Y ALTERACIONES CARDIOVASCULARES	19
1.6 FUNCIONES Y SEÑALIZACIÓN DEL NO-EÑOS EN EL ENDOTELIO VASCULAR	22
1.7 LA REDUCCIÓN DE NO-EÑOS Y EL DESARROLLO DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL	24
1.8 ESTRÉS OXIDANTE Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL	26
1.9. INFLAMACIÓN Y EL DESARROLLO DE ALTERACIONES CARDIOVASCULARES DURANTE LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA	29
2.0 INFLAMACIÓN Y DAÑO CARDIACO	31
2. CAMBIOS EPIGENÉTICOS EN EL CORAZÓN Y SU PARTICIPACIÓN EN EL DESARROLLO DE ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR A TRAVÉS DE LA REGULACIÓN DE DIVERSOS GENES	35
2. ANTECEDENTES	41
3. JUSTIFICACIÓN	42
4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	45
5. HIPÓTESIS	46
6. OBJETIVOS GENERALES	47
6.1 OBJETIVOS PARTICULARES	47
7. MATERIAL Y MÉTODOS	49
7.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL DERIVADO DEL PRIMER OBJETIVO. (ESTUDIO DE LA ADMINISTRACIÓN DE L-ARGININA EN LA PREVENCIÓN DE LAS ALTERACIONES CARDIACAS EN LA ERC).	49
7.1.2 EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS FUNCIONALES	50
7.1.3 ESTUDIOS HISTOPATOLÓGICOS	51
7.1.4 ANÁLISIS DE WESTERN-BLOT Y ANTICUERPOS	52
7.1.5 EXPERIMENTOS DE INMUNOPRECIPITACIÓN	53

7.1.6 PRUEBA DE ELISA	54
7.1.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	54
7.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL DERIVADO DEL OBJETIVO 2. (ESTUDIO DEL PAPEL DE LA INFLAMACIÓN EN EL CORAZÓN DURANTE ETAPAS TEMPRANAS DE LA ERC).	54
7.2.1 ESTUDIOS FUNCIONALES EN RATONES	56
7.2.2 ESTUDIO DEL INFILTRADO INFLAMATORIO	57
7.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL DERIVADO DEL OBJETIVO 3 Y 4. (ESTUDIO DEL ESTADO TRANSCRIPTÓMICO Y DE METILACIÓN DEL DNA EN EL CORAZÓN DURANTE LA ETAPA TEMPRANA DE LA ERC.	59
7.3.1 MODELO DE NEFRECTOMÍA 5/6 (Nx)	59
7.3.2 EXTRACCIÓN DE RNA	60
7.3.3 RNA-SEQ	61
7.3.4 qRT-PCR	62
7.4.1 EXTRACCIÓN DE DNA	63
7.4.2 SECUENCIACIÓN POR BISULFITO	63
7.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	65
8. RESULTADOS	66
<hr/>	
8.1 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE L-ARGININA SOBRE LA APARICIÓN DE ALTERACIONES CARDIOVASCULARES DURANTE LA ERC.	66
8.1.2 LA ADMINISTRACIÓN DE L-ARGININA PREVINO LA HIPERTROFIA CARDIACA, LA HIPERTROFIA VENTRICULAR IZQUIERDA, LA FIBROSIS Y DISFUNCIÓN CARDIACA.	67
8.1.3 LA ADMINISTRACIÓN DE L-ARGININA DISMINUYÓ LA FOSFORILACIÓN INACTIVANTE DE ENOS (TRE-495), PROMOVIO UNA MEJOR INTERACCIÓN ENTRE ENOS Y HSP90α Y LA FORMACIÓN DEL DÍMERO DE ENOS.	70
8.2 LA INFLAMACIÓN TEMPRANA COMO MECANISMO QUE CONTRIBUYE AL DAÑO CARDIACO EN LA ERC.	75
8.2.1 RESULTADOS DEPLECIÓN DE NEUTRÓFILOS (CRÓNICO)	76
8.2.2 ANÁLISIS DE LAS MODIFICACIONES TRANSCRIPTÓMICAS CARDIACAS DE LOS ANIMALES CON DAÑO RENAL EN LA ETAPA TEMPRANA DE LA ERC	81
8.2.3 ESTADO DE LA METILACIÓN DEL DNA EN EL CORAZÓN EN LA ETAPA TEMPRANA DE LA ERC.	87
9. DISCUSIÓN	90
<hr/>	
9.1 EL PAPEL DE LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN EL DESARROLLO DE ALTERACIONES CARDIOVASCULARES DURANTE LA ERC	91
9.2 EL PAPEL DE LA INFLAMACIÓN EN EL DESARROLLO DE ALTERACIONES CARDIOVASCULARES DURANTE LA ERC.	97
9.3 ANÁLISIS DE LAS MODIFICACIONES TRANSCRIPTÓMICAS CARDIACAS DE LOS ANIMALES CON ERC EN ETAPA TEMPRANA	106
MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS CARDIACAS DURANTE LA ERC EN ETAPA TEMPRANA.	110

10. CONCLUSIÓN	112
BIBLIOGRAFÍA	114
FIGURAS SUPLEMENTARIAS	130
ARTÍCULOS PUBLICADOS CON EL PRESENTE TRABAJO	133

Abreviaturas

ADMA: Dimetilarginina asimétrica

ANG II: Angiotensina II

AT1: Receptor tipo I de angiotensina

cGMP: Guanosín monofosfato cíclico

DMCs: Citocinas metiladas diferencialmente

DMRs: Regiones metiladas diferencialmente

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNMTs: DNA metil transferasas

eNOS: Sintasa de óxido nítrico endotelial

ERC: Enfermedad renal crónica

ERCT: Enfermedad renal crónica terminal

FSR: Flujo sanguíneo renal

GC: Guanilato ciclasa

GTP: Guanosín trifosfato

ICAM: Molécula de adhesión intracelular

IFN- γ : Interferón gamma

IL-: Interleucina

IR: Isquemia reperfusión

L[´]NMMA: NG-monometil- L-arginina

LRA: Lesión renal aguda

ME: Matriz extracelular

NO: Óxido nítrico

PPi: pirofosfato inorgánico

PRMT: Proteína arginina metil -transferasas específicas

RNA: Ácido ribonucleico, mRNA: RNA mensajero, rRNA: RNA ribosomal

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SDMA: NG,N[´]G-dimetil-L-arginina (dimetil arginina simétrica)

TET: Enzimas de translocación 7-11

TFG: Tasa de filtración glomerular

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta

TNF: Factor de necrosis tumoral

VCAM: Molécula de adhesión vascular celular

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

VSMC: Células del músculo liso vascular

5mC: 5 metil-citosina

5hmC:5- hidroximetilcitosina

1. INTRODUCCIÓN:

1.1 Enfermedad renal crónica

La enfermedad renal crónica (ERC) es un problema de salud global que ha reemplazado a la desnutrición e infecciones como las principales causas de mortalidad durante el siglo XX (Elhafeez et al., 2018). La ERC en 1990 era la causa número 36 de muerte y en 2013 se consideró como la número 19, lo que destaca que la ERC se ha instaurado como un problema de salud pública grave. La prevalencia mundial de la ERC se ha estimado en 11.1% lo que indica que aproximadamente 850 millones de personas en el mundo tienen algún grado de ERC (Jager et al., 2019). En América, la ERC afecta a más de 20 millones de personas, de las cuales, más de 500,000 personas tienen enfermedad renal en etapa terminal (ERCT). La ERCT se asocia con altas tasas de mortalidad a pesar de las intervenciones farmacológicas existentes y las terapias de reemplazo renal modernas (Draws, et al., 2015; Kumar, et al 2014). Los pacientes que comienzan la terapia de hemodiálisis como terapia de reemplazo renal, tienen mayor riesgo de morir en los primeros 4 meses y estas cifras acontecen en 27.5 muertes por cada 100 personas al año, lo que se calcula en una tasa de mortalidad anual del 20% (Kumar, et al., 2014). Dentro de estos datos, es importante mencionar que los pacientes que comienzan diálisis en un rango de edad de 25-29 años de edad tienen una esperanza de vida de solo 18.5 años, es decir, viven aproximadamente 33 años menos que alguien en el mismo grupo de edad sin ERC. Otro grupo de edad que se

afecta de forma importante en pacientes con ERC, lo representa el de 65-74 años puesto que al comenzar la diálisis se espera que tenga una esperanza de vida de 5 años, es decir, casi 50% menos que el mismo grupo en la población en general. Además, es importante destacar que los pacientes con mayor edad tienen un riesgo más alto de desarrollar ERCT y mayor riesgo de muerte (Bucaloiu et al., 2012).

Las causas más comunes de la ERC son diabetes e hipertensión, mismas que representan entre el primero y segundo lugar entre los factores de riesgo de muerte en la población mexicana y que en conjunto se destacan como unos de los principales problemas de salud a nivel mundial (Moreno-Altamirano et al., 2014). Por otro lado, se ha visto que la ERC es un factor de riesgo independiente para desarrollar enfermedad cardiovascular (Reddy, et al., 2014), alteraciones óseas, anemia, acidosis, desnutrición, desórdenes minerales, disfunción cognitiva y otras causas de muerte (Draws, et al., 2015). Aunado a estos hallazgos, se ha estimado que la prevalencia mundial de la ERCT y la mortalidad y morbilidad cardiovascular atribuible, pueden alcanzar proporciones epidémicas durante los próximos 10 años por lo que la prevención y detección temprana son absolutamente una prioridad en la salud pública (Elhafeez et al., 2018).

Las guías KDIGO (Kidney disease improvement global organization, por sus siglas en inglés) son resultado de convenciones internacionales en las que se ha establecido la definición y estratificación por grados de la ERC. Las guías KDIGO son importantes en el diagnóstico de la ERC ya que en ellas se describen las anomalías que se presentan durante la ERC y también se toman en cuenta

variables importantes como la edad, género, raza/etnia, dieta y comorbilidades asociadas, las cuales son útiles durante el diagnóstico clínico.

En las guías KDIGO se hace énfasis en medir la tasa de filtración glomerular (TFG) (volumen del filtrado glomerular que se forma por unidad de tiempo) para establecer la presencia y el grado de daño renal. La TFG es un componente de la función excretora y se utiliza como un índice de la función renal. Los valores típicos de una TFG normal son de alrededor de 180 litros/día ó 125 ml/min en humanos y se sabe que este valor se reduce después de un daño estructural extenso y que la mayoría de las funciones renales declinan en paralelo con la TFG durante la ERC (Draws & Mahboob, 2015). En términos específicos, la ERC se define como la presencia de daño renal o una disminución en la tasa de filtración glomerular (TFG) menor a 60 ml/min/1.73m² que se mantiene por más de tres meses (Draws & Mahboob, 2015). La ERC se estratifica dentro de categorías y subcategorías en las que se toma en cuenta el valor de la TFG para indicar el grado de ERC (Tabla 1) y los valores de albuminuria (Tabla 2) para establecer las categorías de la ERC (Figura 1). La estimación de la TFG se realiza con base en los valores de creatinina en suero y se puede confirmar utilizando un marcador de filtración alternativo como cistatina C, una proteína que se degrada a tasas constantes en el organismo (Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease, 2013).

Tabla 1. Categorías de la ERC con respecto a los valores de la TFG. Modificado con respecto al original. Guía KDIGO 2012 (Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease., 2013).

Categoría de la ERC	TFG (ml/min/1.73m ²)	Resultado de acuerdo a la TFG
G1	>90	Normal o alta
G2	60-89	Disminuída medianamente
G3a	45-59	Mediana a moderadamente disminuida
G3b	30-44	Moderadamente a severamente disminuida
G4	15-29	Severamente disminuida
G5	<15	Falla renal

Tabla 2. Descripción y rango de las categorías de albuminuria persistente para el diagnóstico de ERC. Guía KDIGO 2012 (Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease., 2013).

A1	A2	A3
Normal a medianamente incrementada	Moderadamente incrementada	Severamente incrementada
<30 mg/g <3 mg/mmol	30-300 mg/g 3-30 mg/mmol	>300 mg/g >30 mg/mmol

Se ha descrito que existe una relación entre la disminución de la TFG y el riesgo de mortalidad, es decir, a medida que la TFG disminuye, el riesgo de muerte incrementa en los pacientes con ERC por lo que se infiere la importancia de tomar en cuenta este parámetro en la determinación de la función renal. Las anomalías funcionales de los riñones que también se valoran para el diagnóstico de la ERC incluyen; proteinuria (incremento en las cantidades de proteínas plasmáticas en orina), albuminuria (pérdida anormal de albúmina en la orina) o irregularidades del sedimento urinario como células tubulares renales, células rojas dismórficas (Draws

et al., 2015) y la aparición de quistes celulares (Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease., 2013).

Prognosis of CKD by GFR and Albuminuria Categories: KDIGO 2012				Persistent albuminuria categories Description and range		
				A1	A2	A3
				Normal to mildly increased	Moderately increased	Severely increased
				<30 mg/g <3 mg/mmol	30-300 mg/g 3-30 mg/mmol	>300 mg/g >30 mg/mmol
GFR categories (ml/min/ 1.73m²) Description and range	G1	Normal or high	≥90			
	G2	Mildly decreased	60-89			
	G3a	Mildly to moderately decreased	45-59			
	G3b	Moderately to severely decreased	30-44			
	G4	Severely decreased	15-29			
	G5	Kidney failure	<15			

Figura 1. Parámetros de la TFG y albuminuria que se toman en cuenta para el diagnóstico de la categoría en la que se encuentra la ERC. Guías KDIGO (Kidney Disease Improve Global Organization, 2012). Verde, bajo riesgo (si no hay otros marcadores de daño renal, no hay ERC); amarillo, riesgo moderadamente incrementado; naranja, alto riesgo; rojo, muy alto riesgo.

Adicional a la importancia que tiene la ERC en la práctica clínica, es interesante mencionar que cerca del 50% de las muertes en pacientes con ERC es debido a complicaciones cardiovasculares (Kumar et al., 2014; Tsuruya et al., 2015) y se ha propuesto que la disminución de la TFG tiene una relación inversamente proporcional con el incremento en el riesgo de muerte por el desarrollo de eventos

cardiovasculares, sin embargo, los mecanismos fisiopatológicos que participan en el daño cardiovascular en pacientes con ERC no están del todo claros.

La ERC que surge como consecuencia de un episodio de lesión renal aguda (LRA) es una condición clínica que resulta en la pérdida progresiva de la función renal y se asocia con alteraciones histológicas como fibrosis tubulointersticial y esclerosis glomerular (Butler et al., 2018; Picken et al., 2016). El daño durante la ERC, se determina principalmente dentro del parénquima renal, vasos sanguíneos renales o sistemas colectores y a menudo se infiere por el uso de biomarcadores más que por examinación del tejido renal (Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease., 2013). En modelos experimentales en roedores, el desarrollo de ERC, posterior a LRA inducida por isquemia/reperfusión (IR), se caracteriza por el incremento progresivo en los niveles de proteinuria, disfunción renal, disminución de la TFG, fibrosis renal, lesión de los podocitos (se asocian en la formación de la barrera de filtración glomerular y función del glomérulo), hipertrofia y esclerosis glomerular (Barrera-Chimal et al., 2018; Picken et al., 2016). Estos mecanismos inducen la destrucción progresiva de las nefronas y la falla o insuficiencia irreversible de la función renal por lo que los pacientes requieren de diálisis, hemodiálisis o trasplante renal para sobrevivir (Kumar et al., 2014).

Es por estos antecedentes, que consideramos que el modelo de ERC inducida por isquemia/reperfusión renal en roedores será de gran utilidad en el estudio de las

alteraciones cardiovasculares que se desarrollan durante la ERC por lo que en la siguiente sección se detallará la fisiopatología de esta enfermedad.

1.2 Enfermedad renal crónica por lesión renal aguda (LRA)

La lesión renal aguda (LRA) es un síndrome clínico que se caracteriza por una reducción rápida (48h) de la función renal identificada por la disminución de la TFG. La LRA aparece como consecuencia de un daño isquémico, séptico o nefrotóxico y se caracteriza por necrosis tubular aguda, puesto que las células epiteliales tubulares son el principal segmento de daño después de la LRA, en particular, las del túbulo proximal ya que dependen la respiración aerobia y tienen altas demandas metabólicas (reabsorción de fluidos y electrolitos) (Bonventre & Yang, 2011). De acuerdo a las guías KDIGO (Moore et al., 2018), en la práctica clínica, la LRA se define con base en los niveles de creatinina en suero (un producto del metabolismo de la creatina) y la producción de orina. Existen tres parámetros utilizados en la clínica para diagnosticar LRA y son los siguientes; 1) cuando hay un aumento de la creatinina en suero mayor a 0.3mg/dl dentro de 48 horas, 2) cuando la creatinina incrementa en suero durante los primeros 7 días más de 1.5 veces con respecto al valor basal, ó 3) cuando el volumen urinario es menor a 0.5ml/kg/h por 6 horas. Además, la LRA se ha estratificado en 3 estados dependiendo de la fluctuación de los valores de la creatinina en el suero (Tabla 3) (Moore et al., 2018).

Tabla 3. Estratificación del estado de lesión renal aguda con base en la producción de orina y los niveles de creatinina en suero. Guías KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes). Tabla modificada de (Moore, et al., 2018). SCr: Creatinina en suero.

Estado de LRA	Producción de orina	Valor de creatinina en suero según las guías KDIGO
1	<0.5mL/Kg/h por 6-12 h	SCr a 1.5-1.9 x la basal por 7 días o incremento absoluto ≥ 0.3 mg/dL por más de 48 h.
2	<0.5mL/Kg/h por ≥ 12 h	Scr a 2.0-2.9 x la basal.
3	<0.3 mL/Kg/h por ≥ 24 h o anuria por ≥ 12 h	Scr a ≥ 3.0 x la basal, o incremento en Scr a ≥ 4.0 mg/dL o inicio de terapia de reemplazo renal.

La lesión renal aguda es frecuente en los pacientes hospitalizados (5-15%), su incidencia ha ido en incremento y se asocia con altas tasas de mortalidad y morbilidad en todo el mundo (Picken et al., 2016), especialmente, en pacientes que se encuentran en la unidad de cuidados intensivos en donde la tasa de mortalidad es mayor al 50% (Barrera-Chimal et al., 2012; Ferenbach et al., 2015). La incidencia de la LRA ha crecido de forma constante debido al envejecimiento de la población, el incremento en el número de intervenciones invasivas que comprometen la hemodinámica renal y la presencia de comorbilidades como diabetes, obesidad e hipertensión (Barrera-Chimal et al., 2011; Picken et al., 2016; Sharfuddin et al., 2011)

La fisiopatología de la LRA no es conocida completamente y existe una falta de agentes terapéuticos que la puedan tratar en la práctica clínica cotidiana. Un insulto renal agudo o la disminución en el volumen corporal debido a episodios de diarrea, deshidratación o sangrado pueden producir la disminución de la perfusión

renal y causar LRA, lo que predispone a ERC (Draws et al., 2015; Ferenbach et al., 2015). Dentro de las principales etiologías que causan la LRA, se encuentran complicaciones por sepsis, cirugías mayores, uso de agentes de radiocontraste y fármacos nefrotóxicos (Sharfuddin et al., 2011) que convergen en un fenómeno de isquemia reperfusión IR e hipoxia renal localizada o generalizada que produce inflamación, daño en la oxigenación tisular, disminución de óxido nítrico (NO) local, aumento de citocinas pro fibróticas y proinflamatorias, factores de crecimiento y especies reactivas de oxígeno (ROS) deletéreas (Barrera-Chimal et al., 2018; Picken et al., 2016; Tsuruya et al., 2015).

Una vez que se presenta un episodio de LRA, se ha mostrado que una proporción importante de los pacientes progresan a ERC en los cinco primeros años posteriores al episodio agudo de daño renal. La transición de la LRA a ERC depende de distintos factores como la severidad, duración y frecuencia de los episodios de LRA o bien, ERC preexistente y la coexistencia de otros factores de riesgo como diabetes e hipertensión (Barrera-Chimal et al., 2011; Picken et al., 2016; Tan et al., 2016). En un estudio retrospectivo, se observó que el 6.6% de una muestra de pacientes con LRA quienes recuperaron la función renal completamente, exhibieron mayor riesgo de muerte y desarrollaron ERC después de 2-4 años de seguimiento, lo que destaca que la LRA no se recupera totalmente (Barrera-Chimal et al., 2012; Bucaloiu et al., 2012). Por otro lado, en diferentes estudios epidemiológicos con un gran número de pacientes se ha demostrado que los pacientes con LRA desarrollan ERC y posteriormente ERCT por lo que los pacientes requieren diálisis, hemodiálisis

o trasplante renal para sobrevivir (Picken et al., 2016; Sud et al., 2014; Tan et al., 2016). Es por la evidencia anterior que en los últimos años se ha reconocido que la lesión renal aguda puede no ser tan inocua como se pensaba y es capaz de inducir alteraciones renales a largo plazo que conllevan al desarrollo de ERC.

La LRA altera diferentes tipos de células a lo largo de la longitud de la nefrona (Figura 2) (la unidad funcional del riñón) y produce diferentes patrones de daño heterogéneos. Entre las características más visibles a nivel histológico en la transición de LRA a ERC destacan: fibrosis tubulointersticial, especialmente dentro de regiones medulares externas e internas, necrosis y apoptosis de células epiteliales tubulares y endoteliales microvasculares que conducen a la pérdida entera de las nefronas (Figura 3) (Picken et al., 2016).

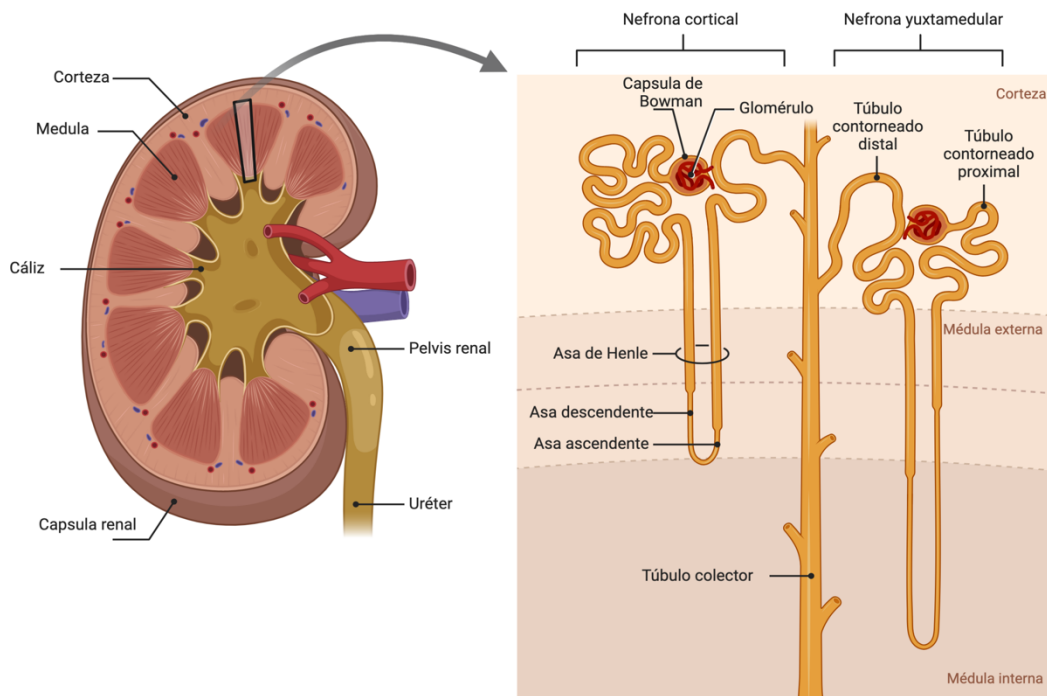


Figura 2. Anatomía del riñón. En el lado izquierdo se muestra un corte sagital de riñón en el que se aprecian zonas como la corteza, la médula y la pelvis renal. En el lado derecho se hace un acercamiento de la nefrona, la unidad funcional del riñón, en donde se llevan a cabo los procesos de filtración, absorción y excreción que producirán la orina. Imagen modificada del programa BioRender.com

A nivel fisiológico y bioquímico existe vasoconstricción persistente, desbalance de factores vasoconstrictores como endotelina, angiotensina II, tromboxano A₂, disminución de agentes vasodilatadores como NO, prostaglandina I, ácidos epxieicosatrienoicos (Daiber et al., 2019), producción y liberación de ROS, arresto en el ciclo celular en la fase G₂/M de células epiteliales dañadas (Bonventre et al., 2011), proliferación celular descontrolada en los túbulos renales, transdiferenciación de pericitos a miofibroblastos productores de colágena tipo III (fibrosis) (Ferenbach & Bonventre, 2015), inflamación renal sostenida, hipoxia y senescencia celular que contribuyen a la pérdida de nefronas y empeoran la fibrosis tubulointersticial (Barrera-Chimal et al., 2012; Daiber et al., 2019; Ferenbach & Bonventre, 2015).

La rarefacción vascular (pérdida de vasos sanguíneos) es un fenómeno importante para la progresión de la ERC. El daño de las células endoteliales en los capilares peritubulares en el riñón en contextos como la isquemia-reperfusión pueden inducir rarefacción vascular que conducen al desarrollo de hipoxia crónica y de fibrosis renal y subsecuente ERC (Jourde-Chiche et al., 2019). Después de que ocurre una lesión renal, la microcirculación se compromete y hay un desbalance en la producción de NO, ROS y aporte de O₂ que culmina en hipoxia y estrés oxidante.

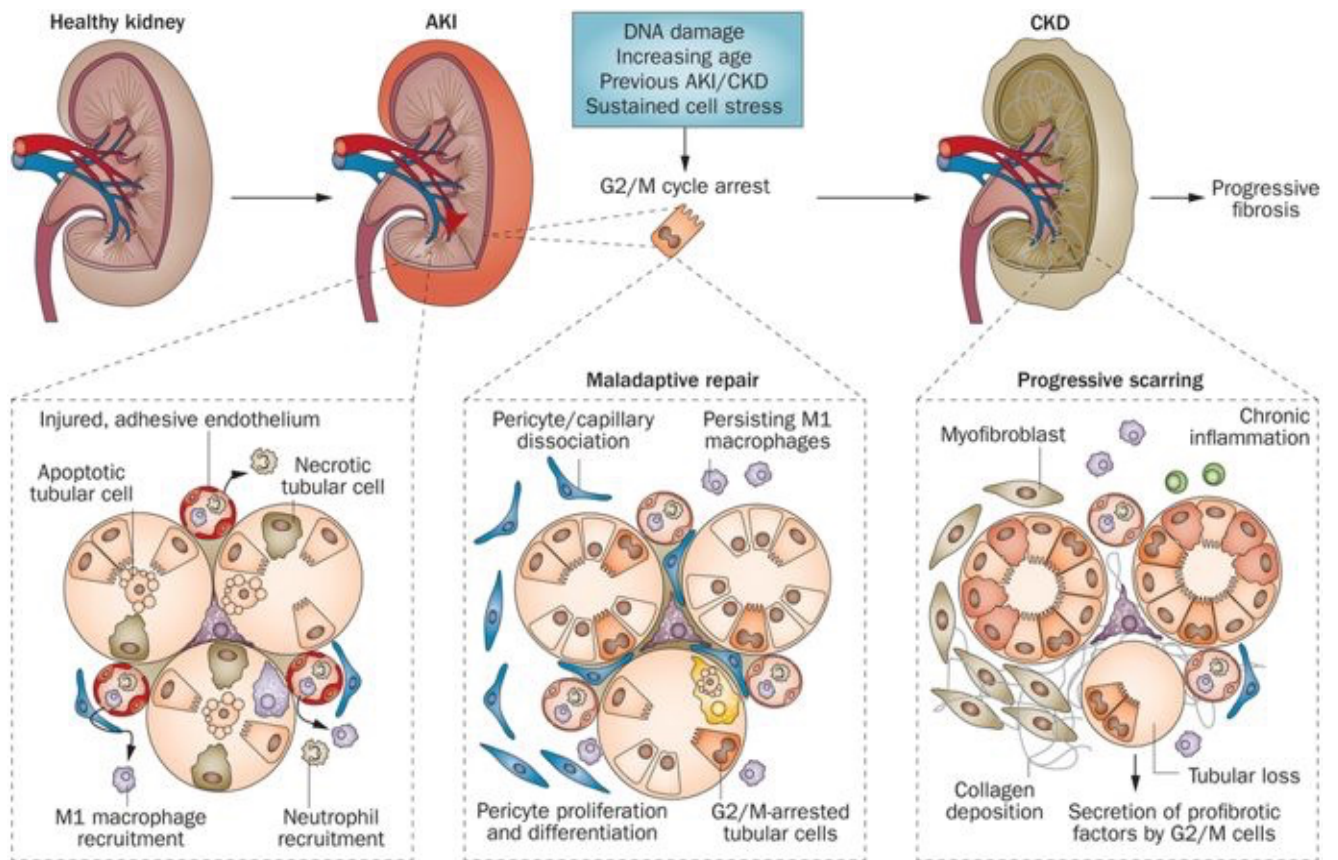


Figura 3. Mecanismos de la transición de la LRA a ERC. De izquierda a derecha se muestran las alteraciones estructurales que se manifiestan después de que un riñón sano se expone a un fenómeno de LRA y la progresión a ERC. Imagen tomada de Bonventre, et al., 2015 Nat Rev Nephrol.

La microvasculatura carece de capacidad regenerativa y después de una lesión se produce rarefacción vascular que induce hipoxia focal, activación de cascadas de inflamación y desarrollo de fibrosis intersticial (Kramann et al., 2014). Se ha visto que durante la ERC la pérdida de capilares correlaciona con la severidad de la fibrosis. Además se ha demostrado que durante la ERC existe una reducción global en la perfusión de los capilares peritubulares y cambios en la perfusión glomerular (Lubas et al., 2015). El grado de severidad de la lesión inicial incide en el desarrollo de la rarefacción capilar peritubular y en respuesta a la LRA los capilares que sobreviven tienen una reducción del tamaño o se pierden, lo que conduce a un

mecanismo de hipoxia crónica que afecta de forma severa al riñón. En este escenario hay un incremento en la permeabilidad vascular, edema intersticial y compromiso del flujo sanguíneo que empeoran el pronóstico de la ERC. La consecuencia a largo plazo de la lesión microvascular es una reducción de la densidad de capilares peritubulares, en parte, por la respuesta a la disminución del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y por otro lado, por el incremento del factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), lo que produce hipoxia y fibrosis renal (Zuk et al., 2016).

Las células del epitelio tubular proximal son el principal segmento de daño durante la LRA debido a la alta demanda metabólica de procesos de reabsorción de electrolitos, glucosa y aminoácidos (Bonventre & Yang, 2011). Además, en la mayoría de los modelos animales, la IR daña principalmente el segmento S3 del túbulo proximal, mientras que en humanos se ha demostrado que la lesión es tanto en las células de los túbulos proximal y distal, asociándose con incrementos de biomarcadores respectivos de estas células como KIM1 (kidney injury molecule-1) y NGAL (neutrophil gelatinase- associated lipocalin) (Kramann et al., 2015). A pesar del potencial regenerativo que existe en los túbulos, existe evidencia que muestra que la LRA no se recupera completamente debido a la reparación incompleta o defectuosa, lo que conduce al desarrollo de fibrosis intersticial y de ERC. La fibrosis es una característica de la reparación no-adaptativa durante la LRA (Yang et al., 2011). La fibrosis se origina principalmente, por la activación de miofibroblastos que producen fibronectina y colágena (proteínas de matriz extracelular (ME)) y es la vía

final común para casi todas las enfermedades renales progresivas por lo que se ha propuesto que su inhibición podría mejorar el pronóstico de la ERC, sin embargo, es un campo que permanece activamente en estudio.

Durante la transición de la LRA a ERC producida por un fenómeno de isquemia y reperfusión, se activan vías inflamatorias y moleculares que inician diversos procesos que conducirán al desarrollo de fibrosis y la pérdida de nefronas funcionales (Yang et al., 2011). Se sabe que el infiltrado de células inflamatorias al riñón después de la lesión por isquemia-reperfusión, contribuye al daño del parénquima y provee una respuesta protectora, sin embargo, esto depende de las diferentes poblaciones celulares y su respectiva contribución. La inflamación puede resultar en necrosis o lesión tubular aguda y morfológicamente se puede observar en la parte más alejada de la médula externa del riñón (Ferenbach et al., 2015). Las células que fueron dañadas letalmente o la recuperación inadecuada de células subletalmente dañadas denota la transición de la LRA a ERC (Bonventre & Yang, 2011; Ferenbach & Bonventre, 2015). La transición de LRA a ERC se caracteriza además por la lesión y la pérdida de nefronas que no fueron lesionadas durante LRA o tuvieron una recuperación esencial desde el episodio de LRA y esto posteriormente procede hacia la pérdida de la función renal y correlaciona con un agravamiento de la fibrosis tubulointersticial y el pronóstico de la ERC (Ferenbach et al., 2015; Kramann et al., 2015; Picken et al., 2016). Se ha reportado ampliamente, que el desarrollo de fibrosis durante la ERC se asocia con niveles elevados de citocinas proinflamatorias como IL-6, TNF- α e IL-1 β que correlacionan con la progresión de la enfermedad, es

decir, incrementan con la agudización de la ERC. El TNF- α es un potente inductor de moléculas de adhesión celular como la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión celular vascular (VCAM-2) que se expresan en el endotelio de vasos sanguíneos, plaquetas y leucocitos y esto facilita la migración de las células inmunes desde la circulación dentro de áreas de inflamación en el tejido. Además, estas moléculas incrementan en relación con el grado de la ERC (Colombo et al., 2008).

Adicionalmente, existen mecanismos hemodinámicos renales que contribuyen a la transición de LRA a ERC, entre éstos se encuentran la disminución del flujo sanguíneo renal (FSR), vasoconstricción de la arteriola eferente para mantener la TFG adecuada, hiperfiltración de las nefronas no dañadas e hipertrofia renal que en conjunto conducen al desarrollo de daño hipóxico tubular, apoptosis de las células renales, pérdida de la masa de nefronas y disfunción renal (Obi et al., 2016; Sharfuddin et al., 2011). La IR renal se caracteriza por la reducción sostenida en el FSR y el aporte de oxígeno a los riñones. La reducción en la perfusión renal se desencadena por la vasoconstricción producida por un desbalance en factores vasoactivos, entre ellos, la reducción en la biodisponibilidad de NO que juega un papel esencial en la homeostasis endotelial (Jourde-Chiche et al., 2019). También, hay una sobreactivación del sistema nervioso simpático como resultado de la IR debido a que incrementan los niveles de angiotensina II y se suprime el NO (Daiber et al., 2019; Kumar et al., 2014; Tsuruya et al., 2015). En relación con esto, en un estudio en pacientes postoperatorios sometidos a múltiple reemplazo valvular se

observó que la transición de LRA a ERC se redujo gracias a la suplementación con NO durante un año posterior a las cirugías (Lei et al., 2018).

A pesar de que en los últimos años se ha avanzado en el conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares renales que participan en la progresión de la ERC por LRA, se conoce muy poco sobre los efectos de la ERC en otros órganos como el corazón. Debido a esto, consideramos de suma importancia el caracterizar que ocurre en el corazón durante la progresión de la ERC debido al alto porcentaje (aprox 50%) de pacientes con ERC que fallecen por complicaciones cardiovasculares (Kumar et al., 2014).

1.3 Alteraciones cardiovasculares en pacientes con enfermedad renal crónica

Aunado a las alteraciones renales anteriormente mencionadas, es importante destacar que numerosos estudios observacionales han demostrado un exceso de riesgo cardiovascular asociado a ERC (Moody et al., 2012). Se ha estimado que cerca del 50% de los fallecimientos en la población con ERC, se atribuye al desarrollo de alguna consecuencia cardiovascular (Kumar et al., 2014; Picken et al., 2016) incluso en etapas tempranas de la ERC (Moody et al., 2012). Los pacientes sometidos a diálisis tienen de 10 a 20 veces incremento en el riesgo de muerte cardiovascular a diferencia de los controles pareados por sexo y edad en la población en general. En pacientes más jóvenes, es decir, de menos de 45 años de edad y que son sometidos a diálisis la mortalidad por riesgo cardiaco es más de 100

veces. En el caso del trasplante renal, el riesgo cardiovascular se reduce, sin embargo persiste con un riesgo de muerte de 3 a 5 veces en comparación con la población en general (Kumar et al., 2014). Se ha descrito que las alteraciones cardiovasculares que se presentan después del daño renal incluyen el desarrollo de aterosclerosis, hipertrofia cardíaca, microangiopatía, incremento de la rigidez arterial y calcificaciones coronarias por lo que el pronóstico de los pacientes empeora de forma progresiva (Rubattu et al., 2013). También, se conoce que los pacientes con ERC normalmente cursan con fenómenos de remodelación cardíaca, disfunción diastólica, dilatación del ventrículo izquierdo y reducción de la fracción de eyección ventricular izquierda. La remodelación cardíaca consiste en cambios moleculares, celulares, intersticiales y de expresión génica que se manifiestan como hipertrofia de los miocitos, fibrosis y reducción de los capilares (Kumar et al., 2014; Pinheiro da Silva & Vaz da Silva, 2016; Rubattu et al., 2013). La fibrosis del miocardio altera la arquitectura cardíaca, lo que favorece arritmias y falla cardíaca. La fibrosis intersticial incrementa la rigidez pasiva del miocardio y origina disfunción diastólica, disminución de la conducción eléctrica del corazón, arritmias y muerte cardíaca repentina (Nevers et al., 2015). Cabe destacar que se han invertido recursos para la detección temprana de la enfermedad renal, ya que incluso se ha visto que el daño cardiovascular puede presentarse en etapas muy tempranas de la ERC y esto podría favorecer un tratamiento temprano para la prevención del riesgo cardiovascular. Entre las terapias más efectivas más conocidas se encuentra el control de la presión sanguínea y el colesterol, mientras que otras terapias como el bloqueo del receptor mineralocorticoides y los aglutinantes de fosfato se encuentran aún bajo investigación.

1.4 Características funcionales del endotelio

El endotelio es un conjunto de células que se alinea dentro de los vasos sanguíneos y se somete a una tensión por fuerzas de “cizallamiento” tangencial y circunferencial durante el paso de sangre (Chatterjee, 2018). El endotelio cumple diversas funciones como la regulación del tono vascular, la trombosis, la hemostasis, la permeabilidad y adhesión celular. También se sabe que el endotelio libera sustancias vasodilatadoras como óxido nítrico, prostaciclina, péptido natriurético tipo C y factor de hiperpolarización derivado del endotelio, así como, vasoconstrictores como endotelina-1 (ET-1), Ang II y tromboxano A2 (Moody et al., 2012). Por una parte, la desregulación de del “cizallamiento” regular o laminar puede convertirse en un factor que conduce a la activación de cascadas de señalización que causan disfunción vascular, inflamación y lesión tisular (Chatterjee, 2018). Por otra parte, la disfunción endotelial o activación endotelial, es un mecanismo que se produce por una disminución en los niveles de NO, el incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la disminución de enzimas antioxidantes (Jourde-Chiche et al., 2019). La disfunción endotelial, se considera un paso prematuro en el inicio de la aterogénesis y también contribuye a la aparición de rigidez arterial. Los pacientes con ERC muestran un desbalance entre células endoteliales dañadas y células en reparación y también se caracterizan por presentar una acumulación de toxinas urémicas en sangre (como consecuencia del daño en la depuración renal durante la ERC) y altos niveles de estrés oxidante que contribuyen al desarrollo de disfunción endotelial (Jourde-Chiche et al., 2019).

1.5 Disfunción endotelial y alteraciones cardiovasculares

A pesar de que la asociación cardio-renal es conocida, los mecanismos fisiopatológicos que conducen a las alteraciones cardiovasculares durante ERC no son del todo claros. En diversos estudios clínicos se ha observado que los pacientes con ERC tienen niveles reducidos de NO y niveles altos de citocinas proinflamatorias (Daiber et al., 2019; Reddy et al., 2014), por lo que se ha sugerido que la reducción en la vasodilatación aunada a la presencia de inflamación vascular crónica podrían ser responsables de las alteraciones cardíacas. Debido a esto, consideramos que sería interesante y de importante contribución, el estudio de la disfunción endotelial y la inflamación en el conocimiento de estrategias terapéuticas que puedan prevenir o disminuir las alteraciones cardiovasculares en el contexto de la enfermedad renal.

La disfunción endotelial en pacientes se ha caracterizado en diversas formas de enfermedad cardiovascular que incluyen; la dislipidemia, enfermedad arterial coronaria, falla cardíaca congestiva y enfermedad arterial periférica (Moody et al., 2012). En estudios con modelos animales de falla renal crónica, se ha confirmado que el incremento en la generación de ROS conduce a la disminución en la biodisponibilidad de NO (Daiber et al., 2019; Lei et al., 2018; Reddy et al., 2014) y ,en relación con estos hallazgos, existen otros estudios con animales en los que se ha demostrado que la inhibición farmacológica de la síntesis de NO con L-NAME (L-dimetil arginina asimétrica), un inhibidor competitivo de la eNOS, induce disfunción endotelial, hipertensión severa y lesiones vasculares renales que son similares a las

observadas en pacientes con hipertensión dañina (Hu Peng et al., 2015; Sibal et al., 2010). Asimismo, los pacientes con ERC en pre-diálisis manifiestan altos niveles de dimetil -arginina asimétrica (ADMA) (un inhibidor endógeno del NO) y la depuración de creatinina es inversamente proporcional a los niveles de ADMA (Daiber et al., 2019), lo que finalmente puede conducir al desarrollo de hipertensión, hipertrofia ventricular izquierda y dilatación ventricular izquierda progresiva con lo que se destaca el papel que juega la reducción de NO en la progresión de la ERC y en el desarrollo de alteraciones cardiovasculares.

Otro de los mecanismos involucrados en el desarrollo de alteraciones cardiovasculares posteriores a la ERC, son la disfunción mitocondrial y citoplásmica que puede ser inducida por la angiotensina II (ANGII) y el incremento de las ROS, fenómenos que se relacionan con disfunción endotelial y arterosclerosis. La disfunción endotelial renal conduce a una disminución de vasodilatadores derivados del endotelio como endotelina B (ET_B), ANGII y tromboxano A₂, lo cual, contribuye a la disminución de la homeostasis vascular local e incrementa la vasoconstricción y al mismo tiempo se promueve hipoxia, inflamación y fibrosis. La disfunción endotelial no solo altera el riñón sino que se relaciona con complicaciones macrovasculares como hipertensión, enfermedad arterial coronaria, disfunción microvascular cardíaca, derrame cerebral y rigidez arterial (Cuenca et al., 2019). Además, se conoce que la disfunción endotelial conduce a consecuencias en la vasoconstricción y expone a la vasculatura mediante alteraciones en el flujo sanguíneo, incremento en el riesgo de isquemia glomerular e hipoxia tisular, que empeoran el pronóstico de la ERC (Jourde-Chiche et al., 2019).

Las dimetil-argininas son el resultado de la degradación de proteínas metiladas. Los grupos metil son derivados de S-adenosilmetionina e involucra la acción de enzimas proteína arginina metil transferasas específicas tipo 1 y 2 (PRMT-1, PRMT-2). La PRMT-1 cataliza la formación de NG-monometil- L-arginina (LNMMA) y NG-dimetil-Larginina asimétrica (ADMA) mientras que PRMT-2 metila proteínas para producir NG,N´G-dimetil-L-arginina (dimetil arginina simétrica SDMA) y L-NMMA. Los residuos de ADMA son inhibidores competitivos de las sintasas de óxido nítrico y su liberación desde las células endoteliales se incrementa en presencia de lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas, por lo que el riesgo cardiovascular incrementa en condiciones de hipertrigliceridemia (Saurabh et al., 2002). Se ha visto que durante falla renal, los niveles de ADMA y SDMA incrementan y se asocian con otros factores de riesgo en condiciones patológicas como edad, hipercolesterolemia, hipertensión, hipertrigliceridemia, diabetes mellitus, resistencia a insulina y falla renal (Lu et al., 2011; Reddy et al., 2014; Sibal et al., 2010).

ADMA es eliminada por el riñón y durante la falla renal la excreción de esta sustancia disminuye con lo que primero, se produce un aumento de los niveles plasmáticos y después, se origina la perpetuación del daño renal para finalmente, producir daño cardiovascular ya que además ADMA se ha establecido como un factor de riesgo independiente para la progresión de arterosclerosis, muerte cardiovascular y mortalidad (Reddy et al., 2014; Sibal et al., 2010).

1.6 Funciones y señalización del NO-eNOS en el endotelio vascular

El óxido nítrico (NO) es un gas de vida corta que se difunde libremente a través de las membranas y realiza funciones de señalización importantes en mamíferos (Khalaf et al., 2019). El NO regula la contractilidad cardíaca y dilata los vasos sanguíneos ya que al entrar en el músculo liso adyacente al endotelio activa a la enzima guanilato ciclasa soluble (sGC), la cual cataliza la conversión de guanosín trifosfato (GTP) a guanosín monofosfato cíclico (cGMP) y pirofosfato inorgánico (PPi). El cGMP activa la proteína quinasa G (PKG) y esto resulta en una disminución de la concentración intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$). La $[Ca^{2+}]_i$ reducida previene la activación de la quinasa de la cadena ligera de miosina por el complejo calcio-calmodulina y se incrementa la actividad de la fosfatasa de esta misma cadena, algo que resulta en la relajación del músculo liso (Khalaf et al., 2019) y la liberación de calcio Ca^{2+} produciéndose sus efectos de vasodilatación que inciden en una adecuada perfusión de los tejidos (Barrera-Chimal et al., 2014; Daiber et al., 2019).

El NO es una molécula clave en la función endotelial puesto que juega un papel importante en mantener la homeostasis cardiovascular a través de modular el tono vascular, la proliferación de las células del músculo liso, la migración y adhesión de leucocitos, la agregación plaquetaria (Barrera-Chimal et al., 2014; Chen et al., 2017; Siragusa et al., 2016) y la inflamación vascular al suprimir la expresión y actividad de moléculas de adhesión y quimiocinas (Sibal et al., 2010).

La sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) es una enzima que se encuentra unida a la caveola de la membrana plasmática de las células endoteliales y produce NO a partir de su sustrato aminoácido, la L-arginina (L-arg). En esta reacción la eNOS, incorpora oxígeno molecular (O_2) dentro del grupo guanidino de la L-arginina y se producen NO y L-citrulina (Siragusa et al., 2016). Adicionalmente, en diversos estudios se ha observado que la eNOS, requiere de un acople con proteínas chaperonas Hsp 90 para promover la producción de NO (Barrera-Chimal et al., 2014; Kupatt C. et al., 2004) puesto que cuando la interacción eNOS-Hsp 90 se pierde, la eNOS modifica su estructura y se convierte en una enzima que produce anión superóxido (O_2^-) y disminuye la producción de NO (Chen et al., 2017; Siragusa et al., 2016). Por otra parte, se sabe que la fosforilación del residuo de Tre-495 de eNOS, mediada por la proteína quinasa C β II (PKC β II) o la quinasa Rho (RhoK) inactiva a eNOS y esta fosforilación previene la asociación de eNOS con calmodulina.

En respuesta a un estímulo apropiado (por ejemplo estrés por “cizallamiento”), la eNOS disocia de la proteína caveolina- 1 y esto facilita la interacción con Hsp 90. Esta interacción promueve un cambio conformacional en eNOS que expone el residuo de Ser-1177 a la proteína quinasa C α (PKC- α) o la proteína quinasa B (Akt) lo que conduce a que la eNOS forme correctamente su dímero y se produzca el aumento en la producción de NO (Barrera-Chimal et al., 2014).

1.7 La reducción de NO-eNOS y el desarrollo de disfunción endotelial

La eNOS es fuertemente regulada por múltiples procesos que incluyen: la localización subcelular específica de eNOS, la interacción de eNOS con otras proteínas, la dimerización de eNOS y la fosforilación en múltiples sitios (Barrera-Chimal et al., 2014; Jourde-Chiche et al., 2019). Existen diferentes causas que pueden generar la disminución o pérdida del NO, entre las que se encuentran, el daño a la vía de señalización del NO, cambios en el endotelio vascular (Khalaf et al., 2019), la deficiencia de L-arginina, el incremento en inhibidores endógenos de las NOS (como ADMA o L-NAME), la disminución en la actividad de las NOS (Reddy, et al., 2014), la reducción en la disponibilidad de cofactores y el desacople de la enzima por la pérdida de su interacción con proteínas chaperonas como la proteína de choque térmico de 90 KDa (Hsp 90) (Siragusa et al., 2016). La capacidad de la eNOS para generar NO es finamente regulada puesto que la enzima está acoplada a cambios en los niveles de calcio intracelular y un aumento en la concentración de calcio no es suficiente para afectar la actividad de la enzima ya que la unión a calmodulina y el flujo de electrones del dominio reductasa al dominio oxigenasa de eNOS es dependiente de la fosforilación y desfosforilación de la proteína (Barrera-Chimal et al., 2014). El dominio de Ser-1177 en el dominio reductasa que activa a la enzima y otro de Tre-495 localizado en el dominio de unión a calmodulina que inactiva a la enzima, son de suma importancia en la regulación de la actividad de la enzima. Las proteínas que se asocian a eNOS, como la caveolina y la proteína de

choque térmico 90 KDa son también de suma importancia para su regulación (Barrera-Chimal et al., 2014; Chen et al., 2017).

Por otra parte, la disfunción endotelial es una alteración compleja que involucra múltiples mecanismos como la reducción en la síntesis de NO, la disminución en la biodisponibilidad de NO o bien la reducción de NO debido a su reacción con radicales libres (Cachofeiro et al., 2008). En diversos estudios se ha mostrado que la disminución de NO se presenta en enfermedades como hipertensión, diabetes o arterosclerosis (Khalaf et al., 2019). También se ha propuesto que la disfunción endotelial es un evento temprano de arterosclerosis y actúa como el principal mecanismo fisiopatológico que provee una asociación importante en la enfermedad renal y el incremento en el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular (Reddy et al., 2014). De forma interesante, en estudios con animales se ha destacado que la falla renal aguda isquémica se acompaña por alteraciones en la expresión de enzimas clave de la vía del NO y que la suplementación con L-arginina reduce la producción de anión O^{2-} y mejora de forma significativa la expresión de proteínas de señalización de eNOS, así como la fase de recuperación de la falla renal aguda isquémica (Schneider et al., 2003).

La pérdida de la interacción entre eNOS y proteínas chaperonas como Hsp 90 (Heat shock protein 90 KDa) causa el desacople de la eNOS y se ha visto que se convierte en una enzima productora de anión superóxido (O^{2-}), (Barrera-Chimal et al., 2014). El anión O^{2-} reacciona con el NO e inactiva el efecto vasodilatador al formar

un poderoso agente nitrosante, el peroxinitrito (ONOO^-), que contribuye al estrés oxidante al oxidar lípidos, DNA y proteínas (Daiber et al., 2019; Rubattu et al., 2013).

1.8 Estrés oxidante y disfunción endotelial

Otro de los mecanismos que se relacionan con el desarrollo de enfermedad cardiovascular es el desacople de la eNOS mediado por el incremento en la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). El estrés oxidante aparece cuando la formación de ROS excede la capacidad del cuerpo para metabolizarlas o cuando los mecanismos de defensa antioxidante se depletan (Cuenca et al., 2019). Las ROS son moléculas pequeñas derivadas del oxígeno o del nitrógeno que comprenden radicales libres como superóxido (O^{2-}), hidroxilo (OH), peroxilo (ROO^-), alcoxilo (RO^-) y no radicales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Ratliff et al., 2016; Rubattu et al., 2013). La producción de ROS es importante porque son un subproducto en distintos procesos celulares, unos de los más comunes se representan en la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial durante la respiración aerobia (Rubattu et al., 2013) y en la eliminación de patógenos por las células inmunes (Ratliff et al., 2016). La mayoría de las enfermedades cardiovasculares se acompañan de un desbalance entre la formación de ROS y la detoxificación por antioxidantes de bajo peso molecular o enzimas degradadoras de ROS como glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa. El radical superóxido O^{2-} y el peroxinitrito ONOO^- provenientes de enzimas NADPH oxidasas

fagocíticas, disfunción mitocondrial y NADPH oxidasas representan otro de los mecanismos para el desacople de eNOS (Khalaf et al., 2019) y la disminución en la producción de NO. En relación con esto, se sabe que el sistema renina-angiotensina-aldosterona se regula a la alza durante la ERC y esto tiene efectos deletéreos en la disfunción endotelial por acciones de la Ang II y la aldosterona. La aldosterona disminuye el NO endotelial al incrementar la actividad de NADPH oxidasa y la generación de ROS (Moody et al., 2012). La regulación de la actividad de los cambios redox de la eNOS es de gran interés, debido a que representa objetivos para la terapia cardiovascular, por ejemplo; la depleción oxidante de tetrahidrobiopterina, la disminución oxidante del complejo dimérico de eNOS por oxidación del complejo zinc-sulfuro, la S-glutacionilación de residuos de cisteína en el dominio reductasa, la fosforilación en residuos de Treonina 495 ó Tirosina 657 (Moody et al., 2012; Siragusa et al., 2016) y la disminución en niveles de ADMA (Dobrian 2012; Schneider et al., 2003) se han propuesto como algunas de las posibles terapias que tratan de inhibir o disminuir el desarrollo de disfunción endotelial y, por lo tanto, incidir en la estrategia de prevención de alteraciones cardiovasculares durante la ERC, sin embargo, su uso no ha sido totalmente establecido (Chen et al., 2017; Flaherty et al., 2007; Siragusa et al., 2016).

En pacientes con falla cardíaca se daña la capacidad de bombeo cardíaco y se reduce el flujo sanguíneo cardíaco debido al daño en la vasodilatación dependiente del endotelio (Miller et al., 2003). En un estudio reciente de Adejare et al., 2020; se observó que la suplementación oral con L-arginina en un modelo de hipertensión

inducida por sal en ratas Sprague-Dawley, incrementó la expresión génica de eNOS en la aorta abdominal en las ratas y mejoró la relajación del endotelio dependiente de acetilcolina (Adejare et al., 2020). Adicional a estos efectos benéficos de la L-arginina, se ha observado que la suplementación crónica de L-arginina en pacientes con falla cardiaca crónica, incrementa la vasodilatación dependiente del endotelio (Hambrecht et al., 2000) con lo que se destaca que la suplementación exógena puede servir como una estrategia terapéutica en el desarrollo de alteraciones cardiovasculares durante la ERC.

En otro estudio en el que utilizaron un modelo de LRA en ratones similar al que se utiliza en el presente estudio, se observó que aparecieron alteraciones del perfil metabólico del corazón por la reducción en la producción de energía (ATP) tanto en la glucólisis como en el ciclo de Krebs y que esto se relaciona con la disminución de metabolitos, aminoácidos y sustratos energéticos, hallazgos que coinciden con que la suplementación con aminoácidos como la L-arginina, podría ser una buena estrategia farmacológica durante la transición de la LRA a ERC en el contexto de las alteraciones cardiacas (Fox et al., 2019). También, se ha mostrado que los pacientes con ERC tienen niveles reducidos de NO plasmáticos y a medida que este vasodilatador disminuye, el grado de ERC incrementa (Reddy et al., 2014). Finalmente, se ha observado que los pacientes con ERC mostraron una disminución de L-arginina e incrementos en los niveles de ADMA, por lo que la suplementación con L-arginina podría mejorar algunas de las alteraciones producidas durante la disfunción endotelial al incrementar la cantidad del sustrato de la eNOS.

1.9. Inflamación y el desarrollo de alteraciones cardiovasculares durante la enfermedad renal crónica

Otro de los mecanismos importantes que se han relacionado con el surgimiento de alteraciones cardiovasculares como consecuencia de la ERC es la inflamación. En diversos estudios se ha destacado que durante la ERC los pacientes cursan con niveles elevados de citocinas proinflamatorias y que esto es un potencial desencadenante de las alteraciones cardiovasculares observadas (Cachofeiro et al., 2008; Chang et al., 2015; Linthout & Tschöpe, 2017). Durante la ERC, el endotelio sufre diferentes modificaciones como la producción de moléculas de adhesión celular solubles (I-CAM y V-CAM) (mediadas por la activación del factor nuclear kappa B (NFKB)), activación de citocinas proinflamatorias y de factores de transcripción angiogénicos que eventualmente conducen a inflamación endotelial, vascularización y remodelación (Chatterjee, 2018). Este mecanismo conduce al incremento de metaloproteinasas de matriz que destruyen las interacciones célula-célula y célula-matriz del tejido (Sharfuddin et al., 2011), posteriormente, conducen a una reorganización del citoesqueleto de actina F y se producen fibras de estrés que resultan en cambios en la morfología de las células endoteliales (Vila Cuenca et al., 2019). La inflamación crónica es un factor de riesgo que induce alteraciones severas en el miocardio y esto se relaciona con el aumento de estrés oxidante, disfunción endotelial, modificación en la expresión de proteínas y modificaciones transcripcionales durante la ERC (Ramírez et al., 2011; Zanolli et al., 2019). Los pacientes con ERC tienen niveles elevados de citocinas proinflamatorias tales como $TNF\alpha$ e IL-6 (Reddy et al., 2014; Zanolli et al.,

2019) y los pacientes con falla cardiaca crónica muestran aumento en la expresión de quimiocinas, ligandos de la superfamilia del factor de necrosis tumoral y citocinas inflamatorias como interferón gamma (IFN- γ) e interleucina 18 (IL-18) (Grabie et al., 2003; Ma et al., 2013; Yndestad, 2003). Las diferentes causas de la inflamación son diversas y complejas debido a que elevados niveles circulantes de moléculas inflamatorias como IL-6, IL-18, albúmina-S, leucocitos, fibrinógeno, hialuronano, mieloperoxidasa, proteína C reactiva y pentraxina- 3 han sido consistentemente asociados con morbilidad y mortalidad cardiovascular durante la ERC (Stenvinkel et al., 2008; Winterberg et al, 2019), pero no todas estas moléculas tienen un papel proinflamatorio en la patogénesis de la conexión cardiorrenal, lo que dificulta un pronóstico absoluto en este contexto. Sin embargo, se sugiere que la inflamación puede ser un mecanismo importante para desarrollar daño cardiovascular como consecuencia de la ERC.

2.0 Inflamación y daño cardiaco

En diversos modelos de daño cardiaco, se ha observado que un incremento en la actividad inflamatoria se correlaciona con mayor daño al tejido del corazón. Durante el infarto miocárdico la primera línea de defensa son los leucocitos y monocitos y esto genera un fenotipo esencial para la recuperación del tejido (Puhl S-L y Steffens et al, 2019). El corazón está generalmente desprovisto de células T y durante escenarios como infecciones, trasplante cardiaco, infarto miocárdico y tolerancia disminuida en autoinmunidad, las células T pueden infiltrarse al corazón y afectar negativamente la función cardiaca (Nevers et al., 2015; Yndestad, 2003). A pesar de este conocimiento, el papel de las células T en el desarrollo de hipertrofia del ventrículo izquierdo, remodelación y disfunción en respuesta a patologías más comunes como ocurre en la falla cardiaca aún son motivo de estudio. Se sabe que la falla cardiaca es una consecuencia de la ERC y que esta se caracteriza por la activación de fibroblastos a miofibroblastos que producen actina- α y colágena- 1 α 1, lo que desencadena fibrosis y disfunción cardiaca (Prud'homme et al., 2019), sin embargo, cuál es el papel inflamatorio en esta modificación no se conoce del todo.

Las células TCD4⁺ que expresan citocinas inflamatorias correlacionan con disfunción ventricular izquierda en pacientes con falla cardiaca y promueven remodelación cardiaca en ratones con falla cardiaca (Nevers et al., 2015). Además, las células T CD4⁺ obtenidas de células mononucleares de sangre periférica derivadas de pa-

cientes con falla cardiaca congestiva, muestran incremento en la expresión génica de ligandos de la superfamilia TNF- α y ligandos Fas y las citocinas inflamatorias IFN- γ e interleucina-18 y también en la expresión génica de la proteína inflamatoria (MIO)-21 α así como en la activación temprana del marcador CD69 que actúa como una molécula coestimuladora para la activación de células T y proliferación (Yndestad, 2003). Algunas de las moléculas antes mencionadas promueven hipertrofia, rigidez, apoptosis y piroptosis en cardiomiocitos, lo cual agrava la enfermedad cardiaca (Linthout & Tschöpe, 2017). En un estudio de Mühlstedt et al., 2016, se observó que la quimiocina CXCL12/SDF-1 se involucra en el desarrollo de los efectos adversos producidos en el corazón después de inducir infarto miocárdico tales como; inflamación y fibrosis del tejido. Asimismo, la depleción específica de CXCL12/SDF-1 en cardiomiocitos se relaciona con la mejora del tejido cardiaco, disminución de la respuesta de células Th1 y fibrosis (Mühlstedt et al., 2016). En otro estudio, se observó que durante un infarto miocárdico, diferentes quimiocinas como la proteína-2 alfa inflamatoria de macrófagos (MIP-2 α , CXCL2, GRO), el leucotrieno B4 (LTB4), la CXCL1 e IL-8 (CXCL8) reclutan neutrófilos a los sitios de isquemia y promueven la lesión del tejido cardiaco (Puhl & Steffens, 2019).

En otra patología como la isquemia cardiaca se conoce claramente el papel de la inflamación en el desarrollo de daño cardiaco puesto que se desarrolla una infiltración aguda de neutrófilos y el reclutamiento y activación de células T CD8+. Las células TCD8+ promueven inflamación aguda al secretar citocinas como IFN- γ y TNF- α lo cual induce moléculas de adhesión celular vascular y quimiocinas que promueven el

reclutamiento de neutrófilos al tejido (Ma et al, 2013). Además, se ha visto que los niveles de TWEAK (inductor débil de apoptosis), un miembro de la familia de citocinas TNF, se asocian con el grado de disfunción renal en ERC diabética. TWEAK, regula la expresión de moléculas de adhesión y citocinas proinflamatorias al unirse a su receptor Fn14 para mediar crecimiento celular, proliferación, migración, angiogénesis y apoptosis (Moody et al., 2012) con lo que se observa que el desarrollo de inflamación por diferentes recursos es importante durante la ERC.

Los neutrófilos Ly6G⁺ son células inflamatorias que influyen en la severidad de las enfermedades que dependen de las células TCD8⁺ e influyen en la severidad del daño al corazón. Se ha observado que tras la depleción de células Ly6G⁺ con el uso de anticuerpos específicos IgG2b en un modelo de miocarditis, existe una reducción efectiva en la acumulación de neutrófilos en el corazón y una reducción en la formación de focos necróticos, lo que se destaca, es que la inhibición de este tipo de células inflamatorias es importante en el desarrollo de miocarditis (Grabie et al., 2003). En otro modelo en el que se observó la remodelación patológica en falla cardiaca isquémica se determinó que los linfocitos T CD4⁺ se extienden y se activan globalmente en la falla cardiaca crónica isquémica y que la depleción de células TCD4⁺ con un anticuerpo monoclonal redujo la infiltración cardiaca de estas células y previno la dilatación ventricular izquierda progresiva y la hipertrofia cardiaca (Bansal et al., 2018).

Con los hallazgos anteriormente mencionados, sería interesante y notablemente importante el conocer los mecanismos inflamatorios cardiacos que se están

desarrollando en etapas tempranas de la progresión de la ERC y que hasta la actualidad no han sido explorados. También, sería interesante evaluar si el bloqueo/inhibición de estos procesos inflamatorios puede tener un efecto benéfico contra la aparición de daño cardiovascular durante la ERC.

2. Cambios epigenéticos en el corazón y su participación en el desarrollo de enfermedad cardiovascular a través de la regulación de diversos genes

Anteriormente se mencionaron algunos antecedentes sobre el papel que juegan tanto la disfunción endotelial y la inflamación en el desarrollo de alteraciones cardiacas durante la ERC, pero podría inferirse que existe además una interrelación en la conexión de señales hacia las células de distintos órganos que mantienen un papel esencial durante procesos patológicos y de reparación a niveles celulares y moleculares. Existe, por tanto, otro mecanismo que es importante destacar y que juega un papel relevante durante el desarrollo de alteraciones cardiovasculares posteriores a la ERC y este campo de estudio que nos interesa es el de la epigenética.

La epigenética es un campo de estudio que se define como el mecanismo que afecta cambios heredables en la expresión y función génica sin la alteración de la secuencia genómica. La epigenética se encarga de regular la estructura de la cromatina y, por lo tanto, de controlar la expresión de genes con lo que se mantiene la identidad celular, la diferenciación y los procesos normales del desarrollo. Los mecanismos de control epigenético más conocidos son la metilación del DNA, las modificaciones de histonas, la remodelación de la cromatina dependiente de ATP y los niveles de expresión de RNAs no codificantes (Lan & Evans, 2019; Liu & Tang, 2019). De forma particular, se conoce que la metilación del DNA es un proceso epigenético cuya función es mantener adecuadamente la expresión de genes en relación con las necesidades del cuerpo y en respuesta al medio ambiente cambiante (Glezeva et al.,

2019) se dirigen o se modifican las redes transcripcionales que finalmente al alterarse pueden conducir al desarrollo de enfermedad cardiovascular (Liu & Tang, 2019).

La metilación del DNA es la marca epigenética más estudiada y evalúa principalmente la frecuencia con la cual un grupo metilo es agregado al carbono 5' de una citosina (5mC) en un dinucleótido CpG (citosina-fosfato-guanina) (Tabish et al., 2019; Ward-Caviness et al., 2018). La metilación del DNA en regiones promotoras de los genes se relaciona principalmente con inactivación de los genes y la metilación de DNA en regiones intergénicas se relaciona con la activación de la expresión génica, estabilidad genómica y procesos de splicing (Liu & Tang, 2019). El proceso de metilación del DNA es mediado por enzimas DNA metiltransferasas (DNMTs) que catalizan la transferencia de grupos metilo desde donadores S-adenosil metionina y forman 5mC (Liu & Tang, 2019).

Durante la falla cardiaca existe remodelación funcional y estructural del miocardio, pérdida o daño de los cardiomiocitos y alteración de los mecanismos de contractilidad cardiaca. Estos fenómenos son causa de la reprogramación transcripcional y genómica de los cardiomiocitos y otras células cardiacas, pues se ha visto que el “paisaje genético” cardiaco se modifica de forma drástica durante la enfermedad cardiovascular. También se ha visto que los factores de riesgo cardiovascular tales como fumar o dietas altas en grasa resultan en la desregulación de la metilación del DNA (Lan & Evans, 2019). Asimismo, existen cambios en los patrones de metilación del DNA que contribuyen a la patogénesis de la enfermedad cardiovascular como sucede en la cardiomiopatía dilatada, cardiomiopatía isquémica y falla cardiaca (Liu

& Tang, 2019). La metilación global del DNA en pacientes cardiomiopáticos en etapa final cambia de forma drástica al originar patrones de metilación que se reducen significativamente en los promotores de genes regulados a la alza, pero que no cambian en los promotores de genes regulados a la baja, es decir, durante la etapa de la enfermedad se pierde la metilación en los promotores lo que genera un mayor acceso a que los genes asociados con la enfermedad cardiovascular sean transcritos (Wu et al., 2020). Por otra parte, en un estudio de Glezeva et al., (Glezeva et al., 2019) en el que se utilizó una plataforma de captura de secuenciación de bisulfito, se determinó de forma específica que durante la falla cardiaca, originada por diferentes eventos cardiovasculares, existen marcas de hipermetilación en genes relacionados con el desarrollo (*HEY2*) y con la respuesta inflamatoria (*MSR1*) y de hipometilación en genes relacionados con la homeostasis y estabilidad de la matriz extracelular (*MMP2* y *CTFG*) que definen el resultado de la alteración. En otro estudio, se mostró que la ocurrencia de un incidente como un infarto miocárdico (MI) se asoció con un amplio escenario de cambios epigenéticos y que un subconjunto de *loci* se propuso como una huella epigenética durante el MI. Además, se determinaron 9 sitios CpG con 8 genes relacionados. Dos de estos 8 genes son asociados con enfermedad cardiovascular; proteína 8 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (*LRP8*) y el miembro 1 de la subfamilia N del canal de potasio activado por calcio (*KCNN1*) que origina remodelamiento eléctrico del corazón durante la fibrilación atrial crónica. Además, se encontró el gen *GLIPR1L2* que es asociado con células del sistema inmune y diferenciación de macrófagos y se regula por metilación del DNA (Ward-Caviness et al., 2018).

Es interesante mencionar que otros de los genes cardiacos en los que se ha visto alterada la expresión en distintas patologías cardiovasculares son *DUX4* en falla cardiaca en etapa final, un gen que se activa en el desarrollo temprano y que se silencia en la mayoría de las células adultas y tejidos, *LY75* que actúa como un receptor endocítico que dirige la captura de antígenos desde el espacio extracelular a un compartimento especializado de procesamiento de antígenos y *ADORA2* en cardiopatía dilatada, en la cual se ha demostrado en un modelo de pez cebra *knockdown* para estos genes, inducen disfunción cardiaca (Lan & Evans, 2019). Todos estos resultados, sugieren principalmente, que el daño cardiovascular es mediado de forma evidente por modificaciones epigenéticas que actúan sobre la expresión de diversos genes.

Otro factor importante de destacar es el que juegan las enzimas que participan en el proceso de metilación del DNA, como la Dnmt1 que es importante durante los procesos tempranos de desarrollo embrionario y que se ha demostrado que su inhibición en un modelo de toxicidad por adriamicina, que induce cardiotoxicidad, cardiomiopatía y falla cardiaca, reduce los cambios patológicos y confiere protección a nivel organizacional y molecular en respuesta al estrés patológico. Además, se ha visto que la deficiencia de Dnmt1 en el miocardio resulta en la reprogramación reducida de la expresión génica y la activación de vías involucradas en la protección miocárdica y anti-apoptóticas (Wu et al., 2020). Otro de los mecanismos que participan activamente en la metilación del DNA, es la acción de enzimas de translocación 7-11 (TET). Las TET conducen a la formación de 5-metil citosina (5mC) y 5-

hidroximetilcitosina (5hmC), marcas epigenéticas que se han estudiado con gran interés. La 5hmC, es un subproducto de la oxidación de 5mC y se ha demostrado que los niveles de 5hmC disminuyen durante la hipertrofia cardiaca lo que sugiere que la alteración cardiovascular se encuentra regida por estas modificaciones epigenéticas, sin embargo, el entendimiento de la regulación de la metilación de DNA durante este escenario permanece limitada (Tabish, et al., 2019). En otro estudio en el que se caracterizó el contenido de 5mC y 5hmC por secuenciación genómica de DNA inmunoprecipitado en un modelo de cardiopatía dilatada en ratón, se observó que el contenido de estas modificaciones aumenta en regiones intrónicas y que un gran número de genes son afectados, principalmente, por el contenido de 5hmC en comparación con 5mC. Además, el enriquecimiento de 5mC y 5hmC en regiones intrónicas podría implicar una interacción potencial entre el splicing del RNA y la maquinaria epigenética por lo que el conocimiento preciso de la modulación de estas marcas en regiones intrónicas podría regular el splicing alternativo y los procesos de enfermedad conduciendo a estrategias terapéuticas personalizadas (Lan & Evans, 2019).

Dado que la disfunción endotelial, la inflamación y las modificaciones epigenéticas son mecanismos importantes por los cuales se puede generar el desarrollo de alteraciones cardiacas, en este trabajo nos propusimos evaluar el papel de la disfunción endotelial y la inflamación en el desarrollo de alteraciones cardiovasculares durante la ERC. En primer lugar, evaluamos el efecto de la suplementación con L-arginina como un precursor de NO en prevenir o reducir las alteraciones cardiacas que se observan en la ERC. En segundo lugar, evaluamos el infiltrado inflamatorio

temprano en el corazón y riñón para caracterizar como es la activación de la inflamación durante la etapa aguda en la conexión cardiorrenal y observar si la depleción de neutrófilos que se infiltran en el corazón de forma temprana previene o reduce las alteraciones crónicas observadas en un modelo de ERC inducida por isquemia-reperfusión. Finalmente, evaluamos el estado de metilación global del DNA mediante secuenciación por bisulfito para observar de forma general la modificación de sitios CpG y encontrar genes asociados con la alteración de vías importantes en el desarrollo de la enfermedad.

2. ANTECEDENTES

Se sabe que durante la ERC hay una acumulación de toxinas urémicas debida a la disfunción renal y que contribuye al desarrollo de disfunción endotelial y carga cardiovascular en los pacientes con ERC (Larsen et al., 2012). En relación con esto, existen estudios en los que se ha mostrado que los pacientes con ERC tienen niveles reducidos de NO y que los niveles de L-arginina, un sustrato de eNOS, disminuyen en los pacientes con daño cardiovascular (Kumar et al., 2014; Ochodnický et al., 2006). Existen otros estudios en los que se ha mostrado que la suplementación con L-arginina aumenta la relajación dependiente del endotelio en ratas con hipertensión inducida por cantidades altas de sal (Adejare et al., 2020) y también incide en la disminución de la presión arterial en pacientes con daño renal, sin embargo, no se sabe si este efecto es mediado por una mayor activación de NO o por la acción en otros mecanismos (Khalaf et al., 2019). Adicionalmente, se sabe que la disfunción endotelial mediada por ADMA, un análogo de L-arginina e inhibidor competitivo de eNOS, precede la enfermedad arterial coronaria, disminuye los niveles de NO y se relaciona con otros factores de riesgo cardiovascular (Sibal et al., 2010). En un estudio previo de nuestro laboratorio, demostramos que durante la transición de la LRA a ERC en ratas Wistar macho se desarrollaron alteraciones cardiovasculares de forma conjunta a partir del tercer y hacia el quinto mes de seguimiento. En este modelo de daño observamos que los animales presentaron fibrosis cardiaca, hipertrofia ventricular e incrementos en el péptido natriurético cerebral BNP, que se utiliza como un marcador de disfunción ventricular. Estos cambios se relacionaron

con alteraciones en la activación de la eNOS ya que los animales con isquemia reperusión renal tuvieron una mayor fosforilación en el residuo de Tre-495 que inactiva a la eNOS a nivel cardiaco. También, se observó una reducción de la interacción de eNOS con la proteína Hsp 90 alfa en corazón, la cual es necesaria para que se lleve a cabo de forma adecuada el acople de la proteína (Amador-Martínez et al., 2019). Debido a estos antecedentes consideramos que el desarrollo de alteraciones cardiacas durante la ERC se puede prevenir o reducir a través del uso de una maniobra terapéutica que promueva una mayor activación de eNOS y la síntesis de NO, aunado a que podremos obtener resultados relevantes que incidan en el conocimiento del papel que tiene la disfunción endotelial en este contexto.

3. JUSTIFICACIÓN

En México, la ERC es una condición que afecta a personas en un amplio rango de edad (10-84 años) y las principales causas que la originan son diabetes mellitus, hipertensión arterial, glomerulopatías crónicas y otras enfermedades metabólicas que en sí mismas representan serios problemas de salud en nuestro país debido a su alta prevalencia. Adicional a este reto de salud, se sabe que una de las principales consecuencias de muerte en la población con ERC es la aparición de alteraciones cardiovasculares y en la actualidad no se cuenta con estrategias terapéuticas que inhiban o disminuyan estas complicaciones que enfrentan los pacientes con ERC. Aunque estas enfermedades están dentro de un campo de estudio activo, no se han logrado establecer los mecanismos adecuados para

salvaguardar exitosamente la vida de los pacientes con ERC que desarrollan alteraciones cardíacas y la mayoría muere en un tiempo mucho más reducido en comparación con personas de la misma edad en condiciones normales. Esta problemática actual produce altos costos a los sistemas de salud pública para el cuidado de los pacientes y exige el desarrollo de maniobras terapéuticas confiables que preserven la función cardiorrenal puesto que se afecta de manera importante la esperanza de vida de los pacientes con ERC. Con el desarrollo de este proyecto se busca estudiar cual es el papel de algunos mecanismos celulares y moleculares de nuestro interés en un modelo murino de ERC; la disfunción endotelial, la inflamación, el estado transcripcional y la metilación global del DNA. Con este nuevo conocimiento se pretende obtener información acerca del papel de la disfunción endotelial en el desarrollo de las alteraciones cardíacas posteriores a ERC en un modelo que simule lo más apegado posible tal patología como ocurre en los humanos y además se propone estudiar mecanismos fisiológicos, moleculares y celulares adicionales para incidir en la obtención de datos relevantes de ayuda en el campo de la medicina. En un sentido, proponemos que la administración oral del sustrato aminoácido, L-arginina, previene o reduce las alteraciones cardiovasculares durante la ERC al promover la mayor activación de la eNOS. Por otra parte, consideramos que el estudio de la infiltración de células inflamatorias en etapas tempranas de la ERC nos podrá dar información valiosa acerca de la participación de la inflamación desencadenada por células inflamatorias en el desarrollo de las alteraciones cardiovasculares durante la ERC y se podrán abordar estrategias terapéuticas de depleción, reducción o inhibición inflamatoria específica puesto que

en diversas patologías, la inflamación es un desencadenante importante de otras alteraciones crónicas. Finalmente, se pretende encontrar de forma más concreta qué modificaciones transcripcionales y epigenéticas ocurren en el corazón en etapas tempranas de la ERC y si esto se relaciona con las consecuencias cardiacas que aparecen a largo plazo. En la actualidad, este tipo de estudios se involucran en enfoques como la medicina traslacional con el fin de que esto pueda trasladarse y dirigirse de forma personalizada hacia las terapias requeridas por los pacientes con daño cardiovascular inducido por ERC, esto con el fin de que el lapso de tiempo para el tratamiento sea lo más corto posible y que las herramientas generadas mejoren la salud humana al reducir la morbilidad y la mortalidad.

4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

1.- ¿Cuál es la contribución de la disfunción endotelial y la inactivación de la sintasa de óxido nítrico endotelial en el desarrollo de alteraciones cardíacas en un modelo de enfermedad renal crónica (ERC) inducida por lesión renal aguda?. ¿Las alteraciones cardíacas en la ERC se previenen o se reducen cuando se administra L-arginina, un sustrato para la producción de óxido nítrico?

2.- ¿Cómo se encuentra el patrón de infiltración de células inflamatorias en el corazón durante etapas tempranas de la ERC y si habrá una protección contra la fibrosis, hipertrofia y disfunción cardíaca, al eliminar a las células inflamatorias en fases tempranas de la ERC?

3.- ¿Los cambios transcripcionales que existen en el corazón durante la etapa temprana de la ERC se asocian con el incremento en el infiltrado inflamatorio?.

4.-¿Cuál es el estado de metilación global del DNA en el corazón en la etapa temprana de la ERC?

5. HIPÓTESIS

- El tratamiento con un sustrato de la eNOS, L-arginina, evitará las alteraciones cardíacas que aparecen durante la progresión de la ERC en un modelo de ratas Wistar macho.
- La depleción temprana de células inflamatorias, por ejemplo, los neutrófilos, incidirá en la reducción de la respuesta patológica hacia el corazón durante la ERC en un modelo en ratón.
- Durante la etapa temprana de la ERC se presentarán cambios transcripcionales y epigenéticos importantes que se relacionarán con la respuesta inflamatoria cardíaca anticipada.

6. OBJETIVOS GENERALES

- 1) Determinar el papel de la disfunción endotelial en el desarrollo de alteraciones cardíacas en un modelo de ERC inducida por lesión renal aguda (LRA), así como el papel preventivo de un sustrato para la producción de NO, la L-arginina.
- 2) Observar cual es el patrón de infiltración de células inflamatorias hacia el corazón durante la etapa temprana de la ERC inducida por LRA e investigar si al depletar la población inflamatoria más incrementada, se previenen las alteraciones cardíacas.
- 3) Estudiar como es el panorama transcripcional en el corazón de los animales con ERC en etapa temprana.
- 4) Observar el patrón de metilación global del DNA en el corazón durante la etapa temprana de la ERC y conocer cuales son los posibles genes asociados con el desarrollo de alteraciones cardíacas durante la ERC.

6.1 Objetivos particulares

- Examinar la prevención o disminución de las alteraciones cardíacas observadas como; hipertrofia, fibrosis, disfunción y alteración de la vía de eNOS al administrar un sustrato para la producción de NO, la L-arginina.

- Analizar el patrón de infiltración de diferentes poblaciones celulares pro y anti-inflamatorias en el corazón y riñón durante las etapas tempranas de la ERC.
- Estudiar cuales mediadores pro-inflamatorios son responsables de la migración diferenciada de células inflamatorias hacia el corazón y su efecto deletéreo sobre la estructura cardíaca.
- Evaluar el efecto de la eliminación temprana y transitoria de neutrófilos sobre la aparición de alteraciones cardiovasculares en la ERC y si esta estrategia previene el desarrollo de fibrosis e hipertrofia cardíaca.
- Investigar las modificaciones transcripcionales y de metilación en sitios específicos del DNA en el corazón durante la fase temprana de la ERC.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Protocolo experimental derivado del primer objetivo. (Estudio de la administración de L-arginina en la prevención de las alteraciones cardiacas en la ERC).

Se utilizaron 32 ratas Wistar macho (280-320 gramos). Los animales se mantuvieron en un ciclo de luz-oscuridad 12:12 h y se les permitió el libre acceso a comida y agua. Las ratas se dividieron en 4 grupos (n=8): cirugía falsa (sham), sham+L-arg, ratas sometidas a isquemia/reperfusión de 45 min y progresión a ERC (IR-ERC) e IR-ERC+L-arg. Las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (30 mg/kg) y se les hizo una incisión abdominal para posteriormente someterlas a isquemia reperfusión renal bilateral de 45 minutos mediante la colocación de clips vasculares no traumáticos en el pedículo renal de cada riñón para interrumpir el flujo sanguíneo de los riñones por un periodo de 45 minutos. El grupo sham se sometió al mismo procedimiento quirúrgico solo que sin la colocación de clips vasculares (protocolo aprobado por CICUAL INCMNSZ NMM-1845-6/18-1). La incisión abdominal fue cerrada en dos capas con suturas 3-0. Todos los animales se dejaron progresar hasta los 5 meses para establecer la ERC. En el tercer mes de seguimiento se comenzó con la administración de L-arg en el agua de beber a una dosis de 2g/L que se estableció con base en estudios previos de Ono, et al., 1999; Can, et al., 2000. Cada mes después de la inducción de la IR, las ratas se colocaron en cajas metabólicas para recolectar la orina de 24 horas y determinar la excreción urinaria de proteínas. Los niveles de

proteinuria fueron cuantificados con el método turbidimétrico con TCA (Henry et al., 1956), (Figura 4).

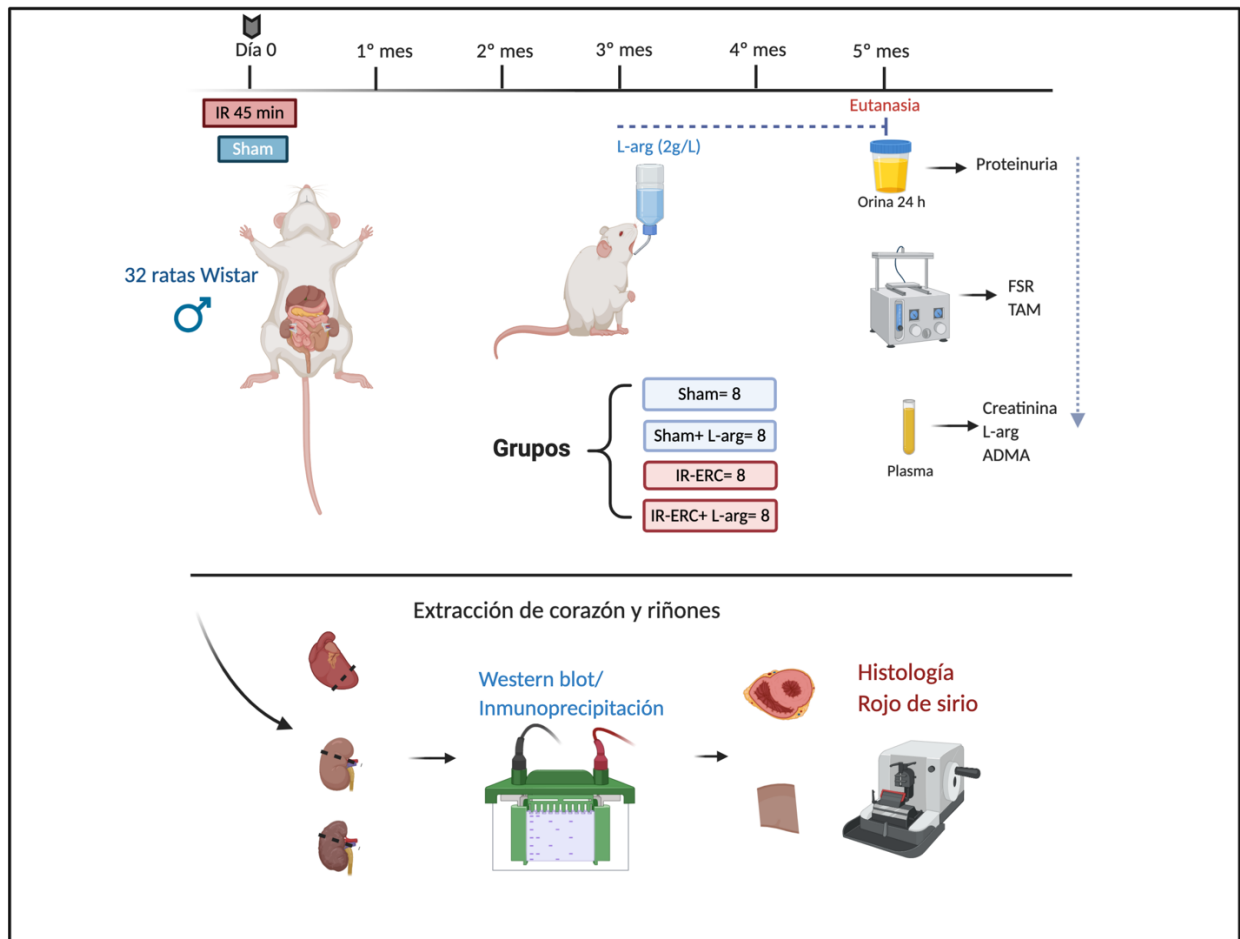


Figura 4. Protocolo experimental utilizado para el estudio de la administración de L-arginina en la prevención de las alteraciones cardiacas en la ERC. Imagen realizada con el programa Bio-Render.com (Autor: Y. Isabel Amador Martínez).

7.1.2 Evaluación de los parámetros funcionales

Después del periodo experimental las ratas se anestesiaron con pentobarbital de sodio (30 mg/kg) y se colocaron en camas para mantener la temperatura corporal

a 37°C. La tráquea se cateterizó con tubo de polietileno (PE-240, BD Intramedic) para mantener la ventilación normal. La arteria femoral derecha se cateterizó con tubo de polietileno (PE-50, BD Intramedic) para medir la presión arterial media (PAM) utilizando un transductor de presión (p23 db, Gould) conectado a un polígrafo (Grass Instruments) por 15 min. Los registros de PAM se obtuvieron bajo anestesia con pentobarbital. La arteria renal izquierda se disecó y el flujo sanguíneo renal se registró mediante una prueba de flujo ultrasónico (Transonic) embebida en gel ultrasónico alrededor de la arteria por 15 min. Se tomó una muestra de sangre de la arteria femoral al final del experimento. El riñón izquierdo y el corazón se extrajeron de los animales. Se hizo un corte ventral en la parte media del riñón que incluyó corteza y médula y se fijó con formaldehído al 4% recién preparado. Una porción del ventrículo izquierdo del corazón se congeló inmediatamente para realizar estudios moleculares. La creatinina en plasma se determinó con un kit comercialmente disponible (Quantichrom DICT-500). Durante el experimento se obtuvo el peso del corazón y el riñón y la medida del grosor de la pared ventricular izquierda.

7.1.3 Estudios histopatológicos

La parte media de los riñones (corteza y médula) y la porción ventricular de los corazones se fijaron en formaldehído al 4% recién preparado y posteriormente se procesaron con la técnica histológica estándar y se incluyeron en parafina (paraplast). Después, se prepararon secciones de 4µm en un plano transversal y se tiñe-

ron con rojo de sirio. Las fotomicrográficas se tomaron en un microscopio AxioScan.Z1 (Zeiss) equipado con una cámara AxioCam MRc5 (Zeiss, amplificación original: 200X). Las imágenes se procesaron con el software ZEN2.3 (blue edition, 2001, Carl Zeiss Microscopy). El porcentaje de fibrosis se cuantificó con el software ImageJ mediante la cuantificación del porcentaje de área teñida con rojo tanto en los corazones como en los riñones. Los análisis se realizaron de forma cegada.

7.1.4 Análisis de western-blot y anticuerpos

Las muestras de corazón se homogenizaron en 4 volúmenes de buffer de lisis [50mM NaCl, 5mM EDTA, 0.1% Nonidet P-40 y cocktail de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Roche)]. Los extractos fueron centrifugados a 13,000 rpm por 5 min a 4°C y la concentración de proteína en el sobrenadante se determinó por el método de Lowry. La proteína requerida se cargó en geles SDS-PAGE del 8-15% de concentración. Los geles SDS-PAGE se transfirieron en membranas de PVDF. Los anticuerpos primarios se incubaron a 4°C toda la noche y los anticuerpos secundarios se incubaron por 90 min a temperatura ambiente. Las membranas a las cuales se les determinó la proteína fosforilada se sometieron a stripping para detectar la cantidad de proteína total. Las diluciones de anticuerpos se utilizaron de la siguiente forma: péptido natriurético cerebral (BNP; ab19645, 1:500), fosfo-Tre495 eNOS (no. 9574S, Cell Signaling, 1:2,000), eNOS (no. 610297, BD Transduction Laboratory, 1:5,000), Hsp 90 α (ab2928, Abcam, 1:10,000), Hsp 90 β (no.2927, Abcam, 1:5,000), fibronectina (sc-69682, Santa Cruz Biotechnology, 1:500), Hsp72 (ADI-SPA-810-F, Enzo Life

Sciences, 1:5,000), 4-hidroxinonenal (4-HNE; MBS168532, MyBioSource, 1:5000) y GAPDH-horseradish peroxidase se utilizó como control de carga. La cantidad de proteínas se detectó con un kit de quimioluminiscencia (Millipore) con un sistema de ChemiDoc (Bio-Rad).

Para la cuantificación del dímero de eNOS, se utilizaron muestras con 50µg de proteína total no calentadas y se cargaron en geles SDS-PAGE-Stain Free (Bio-Rad) al 6% en condiciones de bajo voltaje y a 4°C. Las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF y el análisis de western blot para eNOS se realizó como se describió anteriormente. La cantidad de dímero de eNOS se normalizó con respecto a la proteína total obtenida en el análisis Stain Free.

7.1.5 Experimentos de inmunoprecipitación

Para la inmunoprecipitación de eNOS se utilizaron 4 µg de anticuerpo anti-eNOS (no. 610297, BD Transduction Laboratory) y se incubaron a 4°C con 60 ml de perlas de agarosa acopladas a proteína G por 5 horas. Posteriormente, se agregaron 400µg de proteína de cada rata y se incubaron a 4°C toda la noche. Se realizaron 3 lavados con PBS y para eluir las proteínas se agregaron 80µl de buffer Laemmli y se procedió a hacer una incubación a 95°C por 10 minutos. Después de la elución las proteínas se corrieron en un gel SDS-PAGE 8.5% y se transfirieron en membranas de PVDF para la detección de la señal con anticuerpos contra eNOS, Hsp 90α o Hsp 90β.

7.1.6 Prueba de ELISA

Los niveles de L-arginina y ADMA en plasma se determinaron mediante un kit de ELISA disponible comercialmente y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron los siguientes kits para L-arginina en rata (MBS2601052, MyBioSource) y ADMA en rata (MBS703256, MyBioSource).

7.1.7 Análisis estadístico

Los resultados se reportaron como la media \pm SE. Los análisis de datos se realizaron con GraphPad Prism (v.6.04, GraphPad Software). Se realizó una prueba ANOVA de una vía con una post-prueba de Bonferroni para la comparación de más de dos grupos. Además, se realizó una prueba de t no-pareada para la comparación de dos grupos. Los valores de $P < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

7.2 Protocolo experimental derivado del objetivo 2. (Estudio del papel de la inflamación en el corazón durante etapas tempranas de la ERC).

Se utilizaron 20 ratones C57BL/6 macho. Los ratones se anestesiaron con pentobarbital sódico (60 mg/Kg). Una vez anestesiados, los animales se colocaron

en una cama termorregulada y se realizaron dos incisiones, una en la parte posterior izquierda y otra en la parte posterior derecha del animal para acceder al riñón y diseccionar el paquete vascular renal. Posteriormente, se procedió a interrumpir el flujo sanguíneo a los riñones mediante la colocación de clips vasculares no traumáticos en cada paquete vascular durante 25 min (protocolo aprobado por CICUAL INCICH 18-1079). Los animales fueron suturados de músculo y piel con vicryl 5-0. Se esperó a que los animales se recuperaran de la anestesia tratando de mantener su temperatura corporal a 36.5-37°C. Los ratones se dejaron por un periodo de 72 o 120 horas (n=5 en el grupo IR y n =5 en el grupo sham). El grupo sham fue sometido al mismo procedimiento quirúrgico, pero sin la colocación de los clips vasculares. Al tercer o quinto día se obtuvo el corazón y riñón para caracterizar el infiltrado inflamatorio mediante citometría de flujo (Figura 5).

En otro protocolo de estudio, se incluyeron 18 ratones C57BL/6 macho (25-30 g, 4-6 semanas) que fueron sometidos al mismo procedimiento de isquemia-reperfusión de 25 minutos (IR-ERC, n=6) y de cirugía falsa (sham, n=5). En otro grupo experimental, al tercer día posterior a la inducción de la isquemia, se administraron 200 µg de un anticuerpo monoclonal anti-Ly6G para depletar transitoriamente a los neutrófilos (IR-ERC-N, n=7) Todos los animales se siguieron por un periodo de dos meses (Figura 5).

7.2.1 Estudios funcionales en ratones

Después de cada periodo experimental los ratones se anestesiaron con pentobarbital de sodio (60 mg/kg) y se obtuvieron muestras de sangre por punción cardiaca. Posteriormente, se determinaron las concentraciones de creatinina y urea en plasma mediante el uso de kits disponibles comercialmente, siguiendo fielmente el protocolo del fabricante (QuantiChrom™ Creatinine Assay Kit #DICT-500 Bioassay Systems y QuantiChrom™ Urea Assay Kit #100T Bioassay Systems, respectivamente).

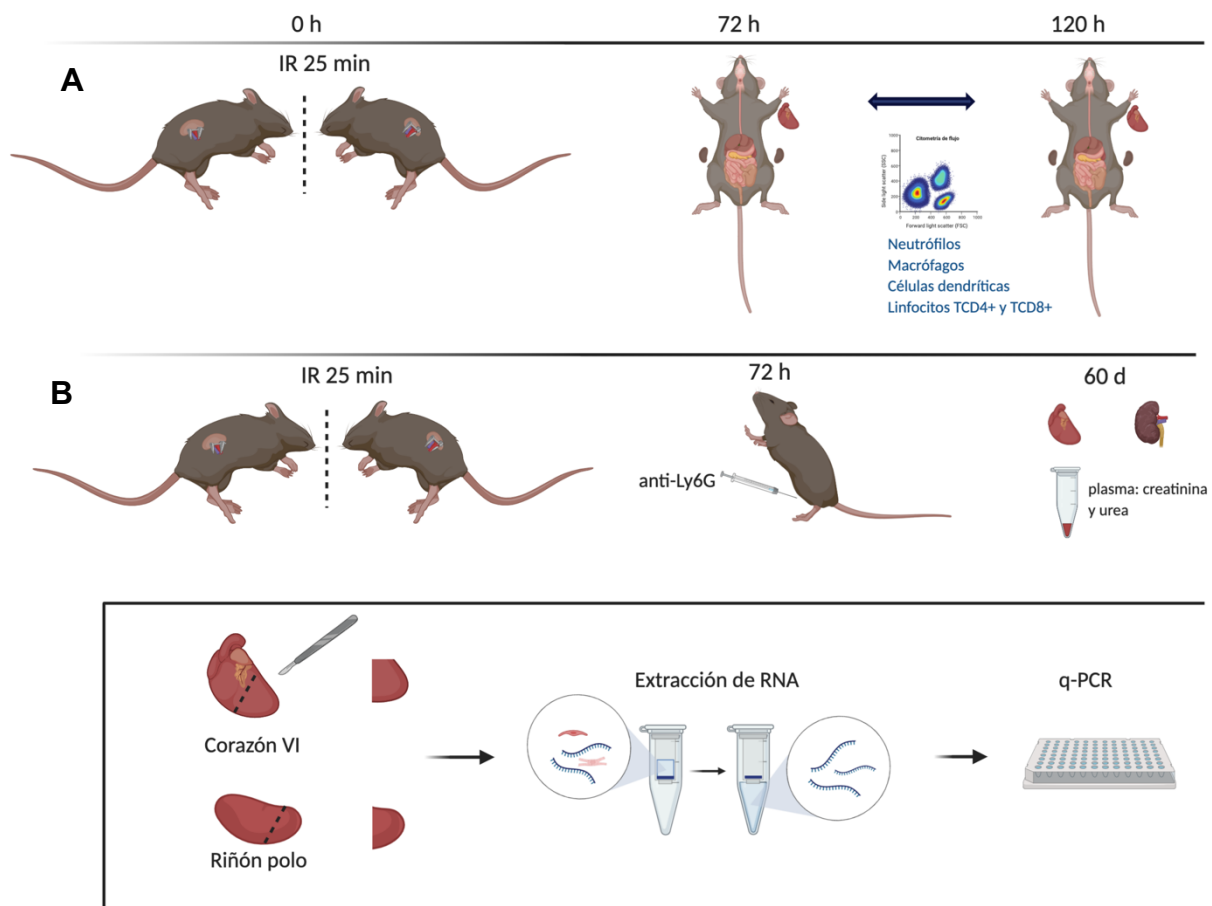


Figura 5. Protocolo experimental utilizado para el estudio del papel de la inflamación en el corazón durante etapas tempranas de la ERC (A) y para evaluar el efecto de la depleción de neutrófilos en el desarrollo de alteraciones cardiovasculares durante la ERC (B). Se utilizó un modelo de ERC inducida por isquemia-reperfusión de 25 minutos en ratones y se hizo la evaluación de la infiltración temprana (72h y 120h) de células inflamatorias como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos TCD4+ y TCD8+ por citometría de flujo (ver marcadores en métodos). En el mismo modelo, se hizo una eliminación temprana de neutrófilos (72h) para observar la prevención del desarrollo de alteraciones crónicas cardiovasculares. A los dos meses de seguimiento se hizo la evaluación renal y cardíaca de los niveles de mRNA de genes profibróticos como Colágena 1, fibronectina, α -SMA, TGF- β , PDGF y PAI-1 (ver detalles en texto). Imagen realizada con el programa Bio-Render.com (Autor: Y. Isabel Amador Martínez).

7.2.2 Estudio del infiltrado inflamatorio

El corazón y el riñón se colocaron en cajas petri con solución salina al 4°C. Posteriormente, los órganos se maceraron en 1mL de medio de cultivo RPMI libre de suero que contenía colagenasa I (15 mg/mL) y DNAsa (1 mg/mL). La digestión del tejido se realizó a 37°C por 30 minutos en agitación baja y constante. El tejido disociado se pasó a través de un filtro de nylon de 70 μ m. Se obtuvo una suspensión celular y por medio de un gradiente de Percoll se recuperó la porción de células polimorfonucleares. Los eritrocitos fueron lisados con buffer de lisis ACK. Finalmente, las células fueron recolectadas por centrifugación y lavadas dos veces con PBS (SFB 2%). Para realizar la tinción, las células se resuspendieron a 4°C en PBS con SFB 2% y anti CD16/32 para bloquear el receptor Fc. Después, las células se incubaron en oscuridad por 30 minutos con anticuerpos etiquetados con fluorescencia para detectar macrófagos (CD45-APC y F4/80-PE/Cy7), células T (CD3-PE, CD4-FITC y CD8-APC), células dendríticas (CD45-APC, CD11c-FITC y CD123-PE) y neutrófilos (CD45-APC, Ly6G-FITC y CD11b-APC/Cy7). Los datos de fluorescencia de al menos

10,000 eventos se recolectaron en vivo utilizando un citómetro FACScalibur™ (BD Biosciences) y todos los datos se analizaron con un software CellQuest Pro (BD Biosciences).

7.3 Protocolo experimental derivado del objetivo 3 y 4. (Estudio del estado transcriptómico y de metilación del DNA en el corazón durante la etapa temprana de la ERC.)

7.3.1 Modelo de nefrectomía 5/6 (Nx)

Se utilizaron 24 ratones C57BL/6 macho. Los ratones se anestesiaron con pentobarbital sódico (60 mg/Kg). Una vez anestesiados, los animales se colocaron en una cama termorregulada para mantener la temperatura alrededor de 37°C. Se expuso el riñón izquierdo y se realizó el ligamiento del polo superior y el polo inferior con lo que se permitió la detención del flujo sanguíneo hacia tales polos de forma permanente (protocolo aprobado por CICUAL Instituto de Investigaciones Biomédicas, ID: 6317). Después de una semana de recuperación, los animales fueron sometidos a nefrectomía del riñón derecho. La remoción del riñón derecho representó el tiempo cero. En ambas cirugías, el músculo y la piel fueron suturadas y los animales se regresaron a sus cajas. Los ratones sham se sometieron al mismo procedimiento, pero sin el ligamiento de los polos y sin nefrectomía. Todos los animales se sacrificaron después de cinco días desde el tiempo cero para obtener muestras de sangre y tejidos. De los 24 ratones, 12 se utilizaron para el grupo sham y 12 para el grupo con ERC en etapa temprana. Cuatro ratones de cada grupo fueron utilizados para RNA-Seq y para secuenciación por bisulfito.

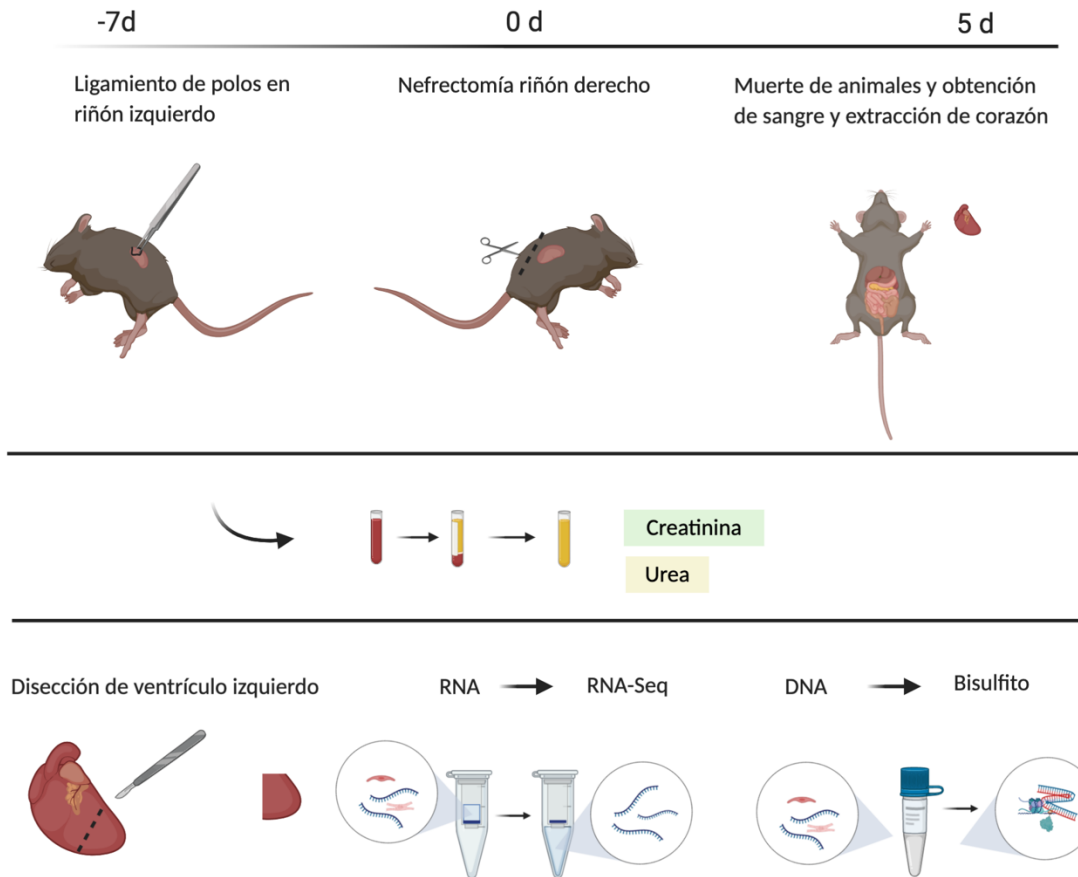


Figura 6. Protocolo experimental para evaluar el estado transcriptómico y de metilación del DNA en el corazón durante la etapa temprana de la ERC. Imagen realizada con el programa Bio-Render.com (Autor: Y. Isabel Amador Martínez).

7.3.2 Extracción de RNA

Al quinto día de seguimiento, se obtuvo el ventrículo izquierdo de los corazones y se extrajo el RNA con el kit Miniprep Quick-RNA (Zymo Research) que incluyó el tratamiento con DNasa I. El RNA se utilizó para RNA-Seq y para análisis posterior por PCR. Se replicaron al menos cuatro muestras biológicas independientes y se usaron para análisis (downstream) “corriente abajo”.

7.3.3 RNA-seq

Las bibliotecas totales de RNA-Seq se construyeron con aproximadamente 100 ng de RNA total. Para remover el rRNA, se siguió un método descrito por (Bogdanova et al., 2011) pero con algunas modificaciones. Las bibliotecas se prepararon con el kit de RNA Total de Zymo-Seq RiboFree (No. R3000) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las bibliotecas de RNA-Seq se secuenciaron en un NovaSeq de Illumina con una profundidad de secuenciación de al menos 70 millones de pares de lectura (secuenciación de extremo emparejado de 150 pares de bases (bp) por muestra. Se obtuvo un análisis MultiQC y un reporte FastQC en donde se observó que las lecturas tuvieron una alta calidad de secuenciación mayor a un puntaje de 30. Todas las muestras tuvieron una única longitud de 150-bp. Estas primero fueron emparejadas con Nova Seq del total de los datos de RNA-Seq y se ajustaron al adaptador para después realizar el alineamiento de las lecturas con el programa STAR (versión 2.6.1d) al genoma de referencia del ratón *Mus musculus* -mm10 de Ensembl. Los conteos de los transcritos fueron inferidos de los archivos de alineamiento. Todos los transcritos con 0 o 1 conteos se removieron. La expresión génica se midió utilizando el programa EdgeR. También se utilizó el paquete DESeq2 para el análisis de expresión diferencial con ayuda de las características del gen. Los genes expresados diferencialmente se seleccionaron con un valor p ajustado: $p < 0.05$ y > 1.5 veces de cambio. El análisis de enriquecimiento gene ontology (GO) se realizó con la herramienta g: profiler (figura suplementaria 2). La red de interacción del procesado biológico enriquecido se obtuvo con la herramienta libre disponible ShinyGO (v0.61). La anotación de la red de asociación proteína-proteína se realizó con la he-

ramienta de búsqueda para la recuperación de genes que interactúan STRING-database (v11.0).

7.3.4 qRT-PCR

Se realizó la extracción de RNA de polos renales y ápex cardiaco con el método de Trizol (Invitrogen) siguiendo el procedimiento estándar. Se midió la pureza e integridad a través de nanodrop (relación 260/280 nm) y se hizo la caracterización y cuantificación de la integridad y pureza del RNA mediante nanodrop. Los genes y primers utilizados se enlistan en la tabla 4.

Tabla 4. Primers sentido (5' - 3') y antisentido (3' - 5') que se utilizaron para qRT-PCR.

Gene	Sentido (5' - 3')	Antisentido (3' - 5')
<i>Irf7</i>	GGTGTGTCCCCAGGATCATT	GGTTCCTCGTAAACACGGTC
<i>Ccl8</i>	TGCTGCTCATAGCTGTCCCT	CCATGGGGCACTGGATATTGT
<i>Stat2</i>	GTCATCCCGCAGAGAGAACG	AGGGTATGGAGCAGAGCTGA
<i>Irgb7</i>	CACACCCGTGCCATCATACT	GGGGTTGACAGTGGTTGTGA
<i>Hcn4</i>	TGGTCAGCGTGCTCACTAAG	CCCTCCGCATCATGGGATAC
<i>Wwtr1</i>	CCCGAGTCCCCAGAAAGATG	GGGAGGATCTTTTTCCGCCA
<i>SerpinF2</i>	ACTCTGTACCATCCCTCGCT	ATGTTGCACGCTAGACACCA
<i>18S</i>	CGCCGCTAGAGGTGAAATTC	TCTTGCAAATGCTTTCGC
<i>GAPDH</i>	TGAGGCCGGTGCTGAGTATGTCG	CCACAGTCTTCTGGGTGGCAGTG
<i>TGF-β</i>	CAACAATTCCTGGCGTTACCTTGG	GAAAGCCCTGTATTCCGTCTCCTT
<i>PDGF-A</i>	GTCCAGGTGAGGTTAGAGG	CACGGAGGAGAACAAGAC
<i>CTGF</i>	CTCCACCCGAGTTACCAATGACAA	CCAGAAAGCTCAAAGTTGACAGGC
<i>PAI-1</i>	ACGTTGTGGAAGTCCCTAC	GCCAGGGTTGCACTAAACAT
<i>MMP-9</i>	CAGGAGTCTGGATAAGTTGG	CTGGAAGATGTCGTGTGAGT
<i>α-SMA</i>	GTACCACCATGTACCCAGGC	GCTGGAAGGTAGACAGCGAA

7.4.1 Extracción de DNA

Se realizó la extracción de DNA genómico de alta calidad en los corazones de los animales sham e IR-25 minutos con un kit de extracción de DNA (Quick-DNA Miniprep Plus kit, Zymo Research) siguiendo fielmente el protocolo del fabricante. La calidad del DNA se verificó por fluorescencia.

7.4.2 Secuenciación por bisulfito

Posterior a la extracción de DNA genómico de alta calidad se procedió a realizar un análisis para observar el patrón global de metilación del DNA de los corazones, por medio de secuenciación con el método de bisulfito. Las muestras de DNA se sujetaron a cuantificación de DNA por fluorescencia, después se procedió a la digestión enzimática (MSP1+Taq). Primero se hizo una digestión por dos horas con la enzima MSP1 a 37°C y se siguió por una digestión con la enzima Taq por dos horas a 65°C. En el DNA digerido se seleccionaron fragmentos de DNA con un tamaño <300pb enriquecidos de CGI para someterlos al proceso de conversión de bisulfito con el kit de conversión de bisulfito Methylamp (Epigentek Cat. #P-1001). Posteriormente, se determinó la eficiencia de la conversión de bisulfito del DNA tratado por PCR en tiempo real utilizando un par de *primers* contra DNA convertido por bisulfito (β -actina) y un segundo par de *primers* contra el DNA no convertido por bisulfito (GAPDH-control). El DNA mostró una conversión >98%. Se preparó una biblioteca y se verificó en un bioanalizador QC y la cuantificación en una biblioteca KAPA qPCR.

Se utilizaron 10 nM de las muestras de las bibliotecas y fueron sujetas a secuenciación de nueva generación con Illumina HiSeq 4000. El análisis bioinformático se realizó para los datos en crudo utilizando el programa Trim Galore, versión 0.5.0. Las lecturas recortadas se mapearon para la secuencia genómica UCSC *Mus musculus* (ratón) (versión GRCm38) utilizando un mapeador de metilación Bismark versión 0.203.0. Se generó un reporte resumido para cada muestra que incluyó la estadística de metilación de citocinas y el alineamiento. Se hizo un mapeo de la metilación y se utilizó la herramienta Samtools versión 0.1.0 para clasificar los archivos SAM producidos por la herramienta Bismark y se removieron las lecturas duplicadas debido a la amplificación por PCR. La información de metilación se extrajo del resultado final del mapeo con Bismark en una base. Se aplicó una cobertura mínima de 5 lecturas y la cantidad de calidad mínima de 20 (q20) en cada posición de las bases.

El análisis de las citocinas metiladas diferencialmente (DMC) se realizaron en el contenido total CpG. Las muestras se filtraron por cobertura (mínimo 5), normalizadas, empalmadas (solo se incluyeron las bases que se cubrieron en todas las muestras en comparación) y se sujetaron a identificación de DMC. Las DMCs identificadas se analizaron en contra de las secuencias de referencia de los genes de ratón (exones, intrones y promotores) y las islas CpG. El conteo de lecturas con citocinas metiladas (no convertidas) y las no-metiladas (citocinas convertidas) en cada región se resumieron. La cobertura para la región se calculó como (No. de citocinas metiladas+ No. de citocinas no-metiladas) y el porcentaje de metilación para la región

se calculó como (No. de citocinas metiladas) / (No. de citocinas metiladas + No. de citocinas no-metiladas) * 100.

7.5 Análisis estadístico

Los resultados se reportaron como la media \pm el error estándar de la media. Las diferencias significativas entre dos grupos se evaluaron por la prueba de t de Student. Se utilizó un software Graph Pad Prism para el análisis de datos y la representación de las gráficas (V.6.04, GraphPad Software, USA). Se utilizó un análisis de ANOVA de una vía con prueba de Bonferroni para la comparación de más de dos grupos. Los valores que se consideraron estadísticamente significativos tuvieron una $P < 0.05$.

8. RESULTADOS

8.1 Efecto de la administración de L-arginina sobre la aparición de alteraciones cardiovasculares durante la ERC.

En un estudio previo de nuestro laboratorio caracterizamos un modelo murino en el que indujimos ERC por isquemia/reperfusión y los animales se dejaron evolucionar durante 5 meses. En este estudio observamos que los animales con ERC desarrollaron alteraciones cardiovasculares como hipertrofia, fibrosis y disfunción cardiaca. También, observamos alteraciones en la vía de señalización de la eNOS (Amador-Martínez et al., 2019) y debido a esto, propusimos el modelo para estudiar el desarrollo de alteraciones cardiovasculares y así poder estudiar algunas vías por las cuales estas mismas se desarrollan (Amador-Martínez et al., 2019). En este modelo de ERC ya caracterizado (Barrera-Chimal et al., 2018) decidimos evaluar el efecto de la suplementación con L-arginina (al tercer mes de seguimiento), un sustrato para la síntesis de NO por la eNOS, en las alteraciones cardiacas observadas después de cinco meses de progresión de la ERC.

8.1.1 La L-arginina mejoró la depuración de creatinina y el flujo sanguíneo renal pero no previno la aparición de proteinuria y fibrosis renal.

En la presente tesis observamos que a los cinco meses de seguimiento los animales con ERC mostraron disfunción renal indicada por la disminución en la depuración de creatinina y en el flujo sanguíneo renal en comparación con los grupos con-

troles (Fig. 7A y 7B). Estos hallazgos están en relación con el daño renal que se desarrolla en los animales sometidos a ischemia-reperfusión. Por el contrario, los animales con ERC y que fueron tratados con L-arg mostraron una mejor depuración de creatinina y un flujo sanguíneo renal preservado (Fig. 7A y 7B), lo que indica que posiblemente la L-arginina actúa beneficiosamente a nivel hemodinámico ya que el flujo sanguíneo renal y el aporte de O₂ disminuyen durante el proceso de IR. Cabe mencionar que la suplementación a los animales con L-arg, no previno el incremento en los niveles de proteinuria observados durante la progresión de la ERC (Fig. 7C), lo que sugiere que la prevención de la disfunción renal fue principalmente mediada por un efecto vascular más que por la preservación de la estructura renal, un fenómeno que además pudo identificarse en las imágenes histológicas teñidas con rojo de sirio para identificar la deposición de fibras de colágena (Fig. 7E-H). Otro de los efectos que observamos en este modelo de ERC al quinto mes, fue el desarrollo de fibrosis renal (Fig. 7D) y la estructura renal permaneció severamente dañada en ambos grupos de ERC sin y con tratamiento de L-arginina (Fig. 7G y 7H).

8.1.2 La administración de L-arginina previno la hipertrofia cardiaca, la hipertrofia ventricular izquierda, la fibrosis y disfunción cardiaca.

A nivel cardiovascular no encontramos modificaciones en la presión arterial media (Fig. 8A). La relación del peso cardiaco/peso corporal, incrementó en el grupo IR-ERC (Fig. 8B) y es interesante mencionar que este efecto se previno en los ani-

males tratados con L-arginina (Fig. 8B) por lo que se puede sugerir que la hipertrofia cardiaca se redujo en los animales tratados.

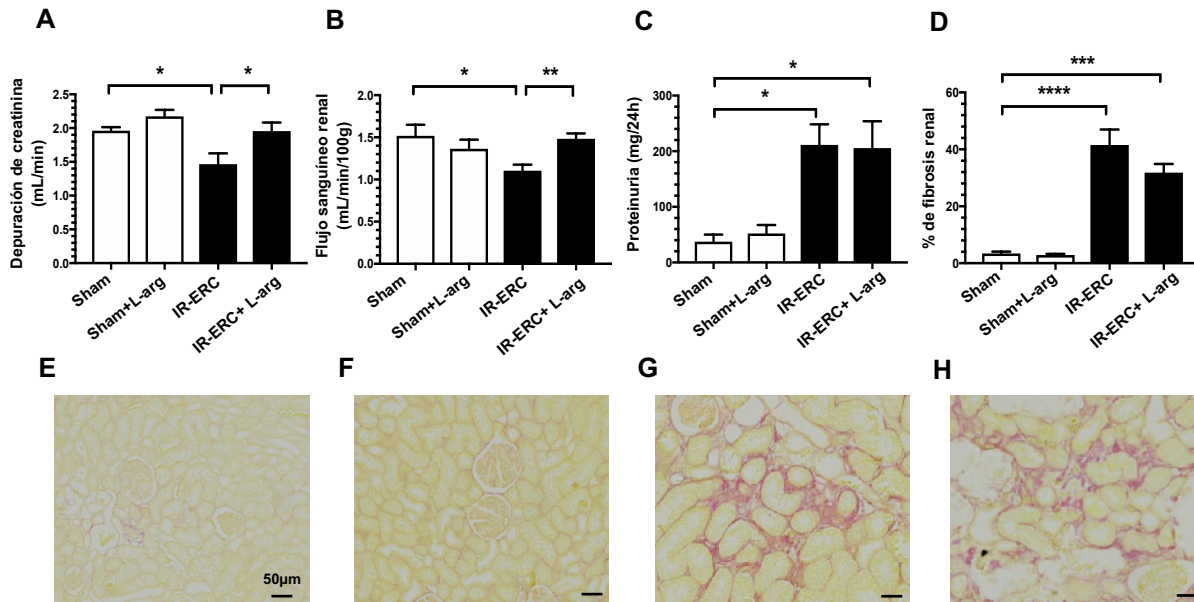


Figura 7. Efecto del tratamiento con L-arginina (L-arg) en la progresión de la enfermedad renal crónica (ERC). A) depuración de creatinina (mL/min), B) flujo sanguíneo renal (mL/min/100g), C) proteinuria (mg/24h), D) % de fibrosis tubulointerstitial. Imágenes representativas de secciones renales teñidas con Rojo de sirio para los siguientes grupos: E) sham, F), sham+L-arg, G), IR-ERC y H) IR-ERC+L-arg. Aumento original: 200X, n=8 por grupo. Datos reportados como la media \pm SE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

También observamos que el grosor de la pared ventricular izquierda disminuyó en los animales tratados con L-arg (Fig. 8C), lo que sugiere que hay un efecto benéfico de este compuesto en la aparición de hipertrofia ventricular izquierda. Aunado a estos hallazgos, encontramos que los corazones de los animales con ERC presentaron mayores niveles de fibrosis cardiaca (Fig. 8D) y deposición de colágena (8E-H) comparados con los animales del grupo sham, tal como se aprecia en la tinción con rojo de sirio. Por el contrario, en los animales que fueron tratados con L-arg se previno el incremento de fibrosis cardiaca (8D).

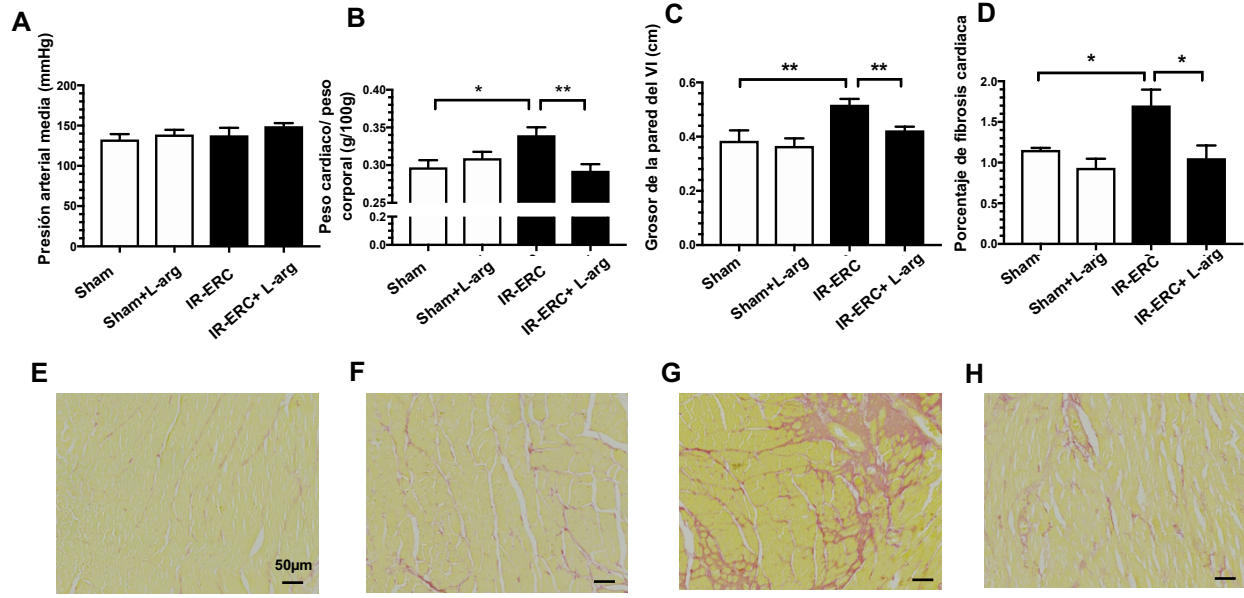


Figura 8. Efecto del tratamiento con L-arginina (L-arg) en el daño cardíaco durante la progresión de la enfermedad renal crónica (ERC) después de 5 meses de seguimiento. A) Presión arterial media, B) relación peso corporal/ peso cardíaco (HW/BW), C) grosor de la pared del ventrículo izquierdo, D) porcentaje de fibrosis cardíaca. Imágenes representativas de rojo de sirio para los siguientes grupos: E) sham, F), sham+L-arg, G), IR-ERC y H) IR-ERC+L-arg. Aumento original: 200X, n=8 por grupo. Datos reportados como la media \pm SE, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Con respecto a los niveles de BNP (Fig. 9A) (un marcador de disfunción cardíaca) y fibronectina (Fig. 9B) como marcador de fibrosis, observamos un incremento en los niveles de estas proteínas en el corazón de las ratas del grupo con ERC comparado con el grupo sham y estas alteraciones se evitaron al tratar a los animales con L-arg (Fig. 9A y 9B).

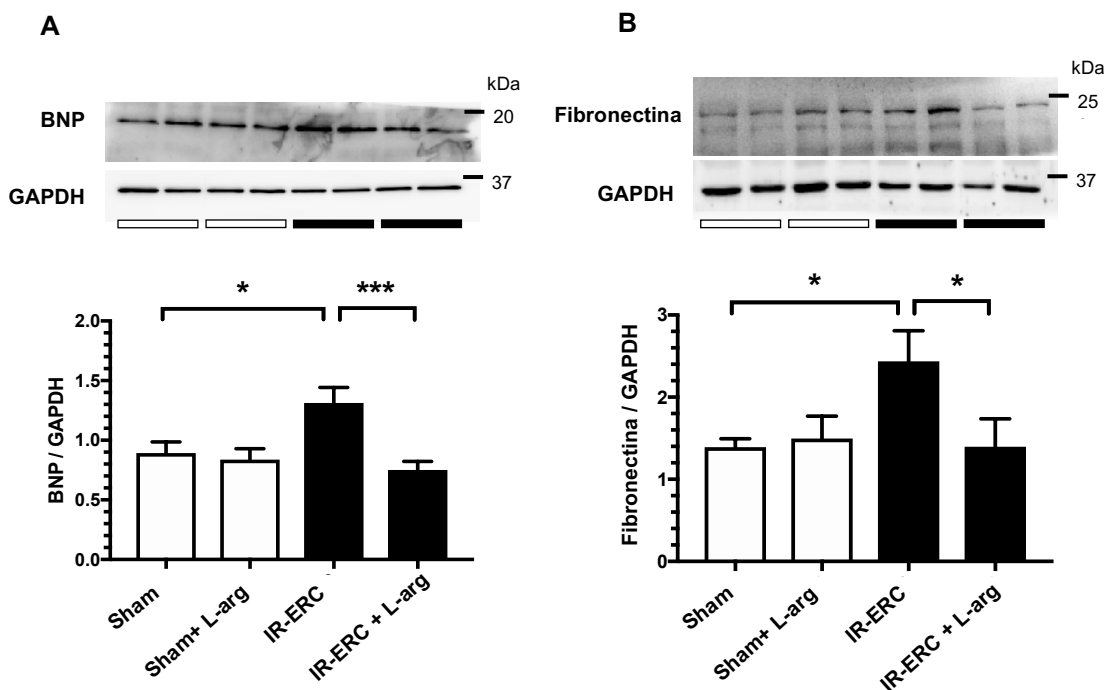


Figura 9. A) Incremento en los niveles del péptido natriurético cerebral (BNP) y B) fibronectina en los corazones de las ratas con ERC inducida por isquemia-reperfusion. En el panel de arriba se muestra el blot para las proteínas indicadas y en el panel de abajo se muestra el análisis densitométrico. GAPDH se utilizó como control de carga n=8 por grupo. Datos reportados como la media \pm SE, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

8.1.3 La administración de L-arginina disminuyó la fosforilación inactivante de eNOS (Tre-495), promovió una mejor interacción entre eNOS y Hsp 90 α y la formación del dímero de eNOS.

Como se mencionó anteriormente, la fosforilación en el residuo de Tre-495 de la eNOS inactiva a la enzima y, por lo tanto, disminuyen los niveles de NO. En este sentido, observamos que los animales con ERC tuvieron un aumento significativo en la fosforilación de la Tre-495 en el corazón (Fig. 10A), lo que se redujo cuando los animales fueron suplementados con L-arginina. Otro de los puntos de regulación de la eNOS es su actividad relacionada con proteínas Hsp 90 y en este modelo observamos que ni los niveles de la isoforma Hsp 90 α ni de la Hsp 90 β fueron modificados

durante la progresión de la ERC aún cuando los animales fueron tratados con L-arg (Fig. 10B y 10C).

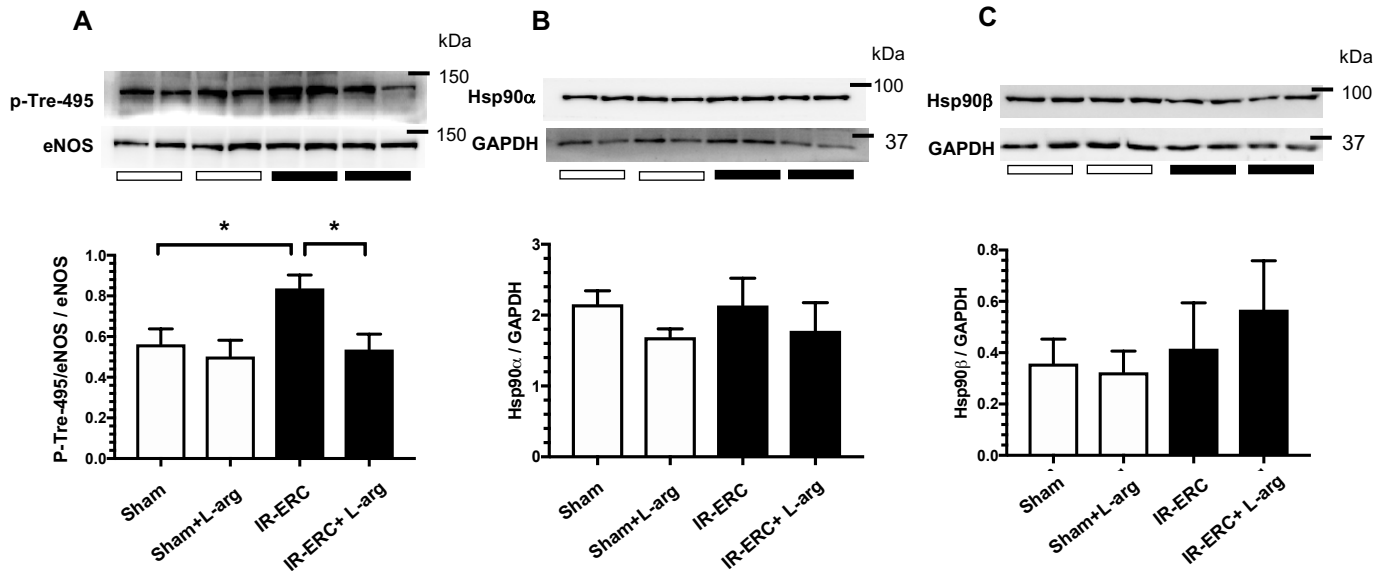


Figura 10. El tratamiento con L-arg redujo la fosforilación en la Tre-495 de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) en los corazones de las ratas con ERC inducida por isquemia-reperfusión. A) Western blot para observar la fosforilación en la Tre-495 (P-Tre-495-eNOS) normalizada con los niveles de la proteína eNOS, B) proteína de choque térmico (Hsp) 90 α , y C) (Hsp) 90 β . En el panel de arriba se muestra el blot de cada proteína y en el panel de abajo se muestra el análisis densitométrico. n=8 por grupo. Datos reportados como la media \pm SE, *p<0.05.

A diferencia del hallazgo anterior, al observar la interacción de eNOS y Hsp 90 α con estudios de co-inmunoprecipitación (Fig. 11A), encontramos que hubo una disminución de la interacción entre estas dos proteínas en el grupo con ERC y que de forma interesante la L-arg previno la disminución de la interacción. Además, al analizar la conformación dimérica (activa) de eNOS en el corazón, observamos que los animales con ERC presentaron una disminución en los niveles del dímero de eNOS, un efecto que fue revertido con la administración de L-arginina (Fig. 11B).

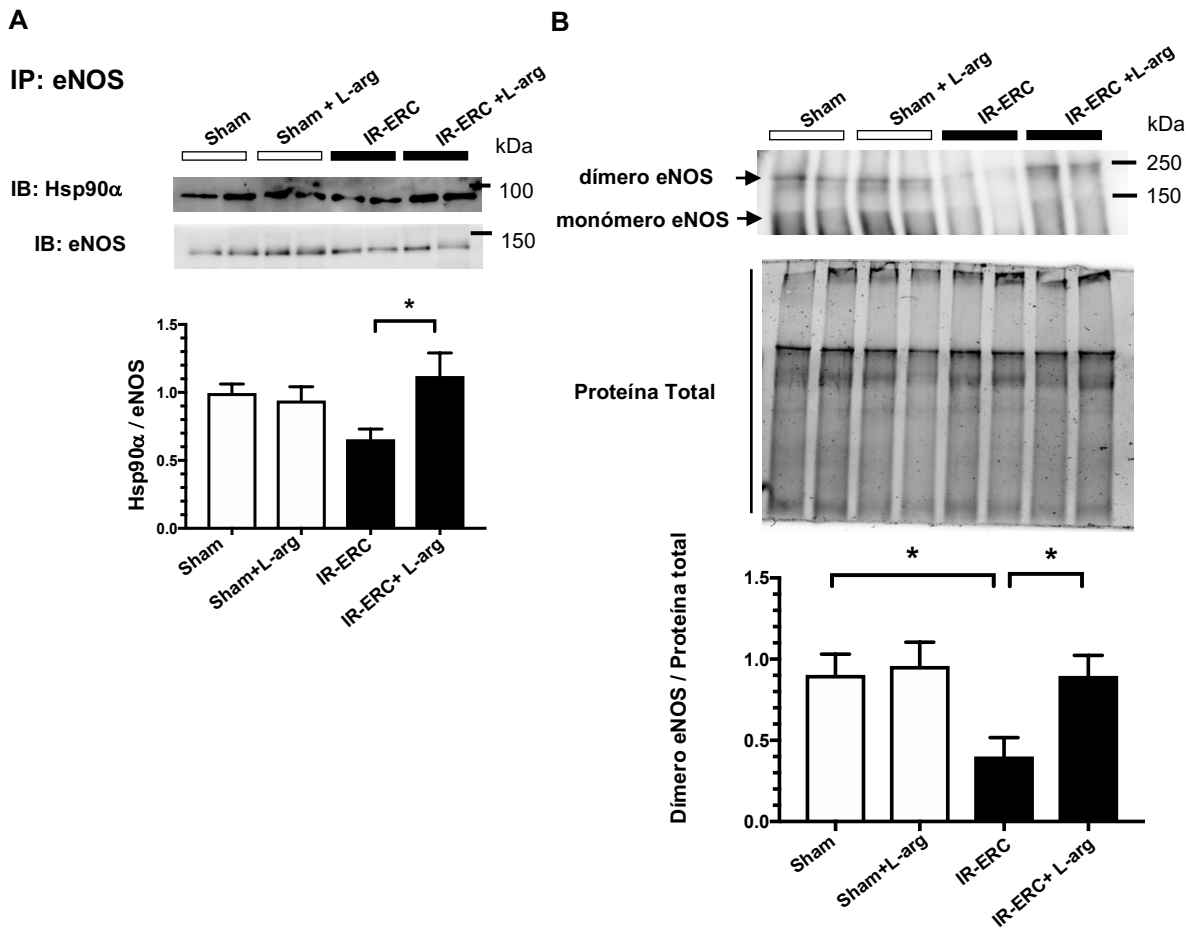


Figura 11. El tratamiento con L-arg promovió la interacción en la hsp90 α y la dimerización de la eNOS. Mediante la inmunoprecipitación de eNOS en extractos de corazón, observamos la interacción con hsp90 α mediante inmunoblot. A) Análisis de western blot en un gel con SDS, bajo voltaje y baja temperatura para analizar la conformación dímero/ monómero de la eNOS. B) la proteína total fue determinada por tecnología stain free (Bio-Rad). En el panel de arriba se muestran los blot representativos y en el panel de abajo, se muestran los análisis densitométricos. IP; inmunoprecipitación, IB; inmunoblot, n=8 por grupo. Datos reportados como la media \pm SE, *p<0.05.

Posteriormente, se midieron los niveles de dimetil-arginina asimétrica ADMA (Fig. 12A), un producto que se acumula durante el daño renal y actúa como un inhibidor competitivo de la eNOS. Se encontró que los animales con ERC con o sin tratamiento con L-arg mostraron un incremento en los niveles de ADMA lo que sugiere que este compuesto puede ser un inhibidor endógeno de la actividad de eNOS bajo

condiciones patológicas. Por otra parte, se midieron los niveles de L-arg en plasma y se observó que los animales con ERC tuvieron una reducción significativa a diferencia del grupo sham y los suplementados con L-arg recuperaron parcialmente esos niveles, pero no fueron significativos (Fig. 12B).

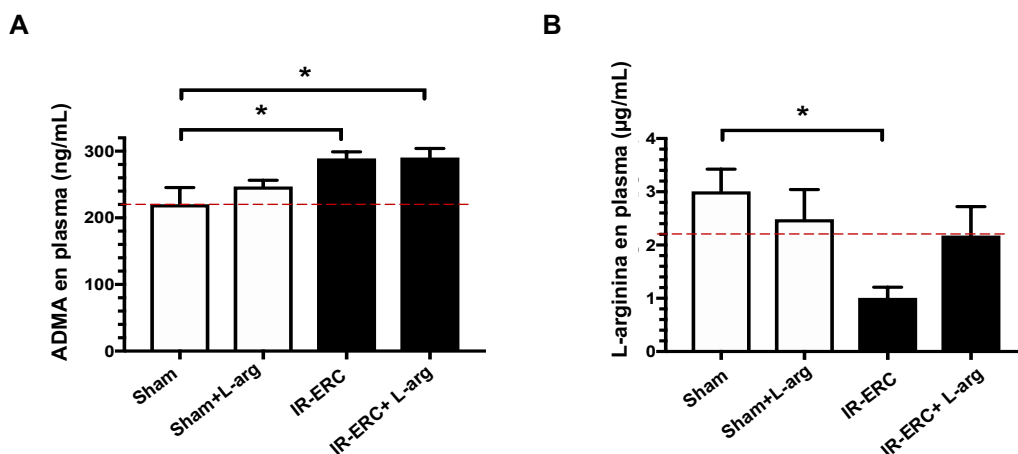


Figura 12. Incrementos en los niveles de dimetil arginina asimétrica y disminución en los niveles de L-arginina en plasma de ratas sujetas a isquemia-reperfusión (IR-ERC). A) niveles plasmáticos de ADMA y B) niveles plasmáticos de L-arginina determinados por ELISA. n=8 por grupo. Datos reportados como la media \pm SE, * $p < 0.05$. Las líneas rojas punteadas representan los valores normales reportados de ADMA (220ng/mL) y L-arginina (2.2µg/mL).

Para estudiar el papel del estrés oxidante en nuestro modelo de ERC, determinamos los niveles de proteínas modificadas por 4-hidroxinonenal (4-HNE) tanto en tejido cardiaco y renal. En ambos tejidos (renal y cardiaco), se mostró un incremento significativo en los niveles de 4-HNE en el grupo con ERC (Fig. 13A y 13B) y el tratamiento con L-arg no previno esta modificación en el riñón de los animales con ERC, sin embargo, en el corazón si hubo una disminución significativa de este marcador en el grupo con ERC tratado con L-arg. Este hallazgo sugiere que el estrés

oxidante puede jugar un papel importante en la progresión de la ERC, sin embargo, se necesitan más estudios detallados para el estudio de este mecanismo.

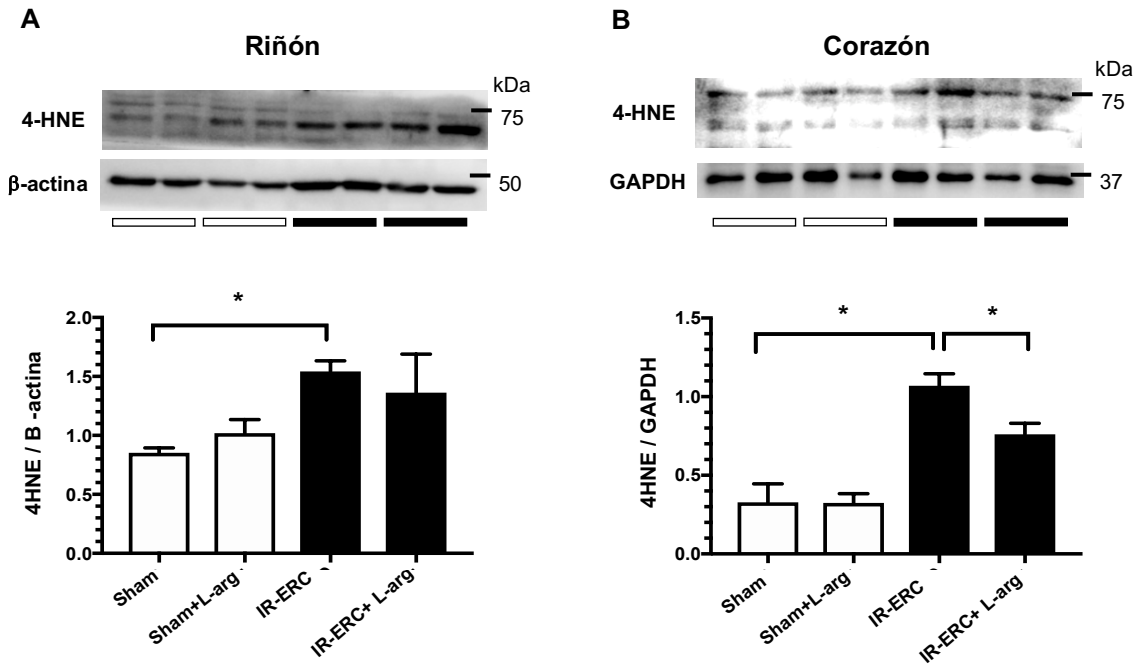


Figura 13. Incremento del estrés oxidante en corazón y riñón de ratas con ERC inducida por isquemia-reperfusión. Western-blot para observar los niveles de 4-hidroxinonanal (4-HNE) en; A) riñón y B) corazón. En el panel de arriba se muestran los blots representativos y en el panel de abajo se muestran los análisis densitométricos. β -Actina y GAPDH se utilizaron como control de carga en el riñón y corazón, respectivamente. n=8 por grupo. Datos reportados como la media \pm SE, *p<0.05.

En resumen, en esta primera parte del trabajo de investigación, se mostró que la suplementación con L-arginina es capaz de prevenir el desarrollo de fibrosis e hipertrofia del miocardio, a través de modular la activación de la sintasa de óxido nítrico endotelial.

8.2 La inflamación temprana como mecanismo que contribuye al daño cardiaco en la ERC.

Posteriormente, se inició con la caracterización del infiltrado inflamatorio temprano en el modelo de ERC. Primero, se extrajo el tejido renal y cardiaco a las 72 y 120 horas posteriores a la inducción de la IR. En el caso del riñón, se observó que hubo un incremento de macrófagos, células dendríticas y neutrófilos a las 72 h (Fig. 14A) y que todas las poblaciones inflamatorias medidas como macrófagos, células dendríticas, linfocitos TCD4+, TCD8+ y neutrófilos, incrementaron de forma significativa a las 120 h en los riñones de los animales que fueron sometidos a IR (Fig. 14B). A diferencia de los hallazgos inflamatorios en el riñón, en el corazón, se observó que se incrementó la infiltración de células dendríticas, linfocitos TCD4+ y neutrófilos a las 72 h después de la IR (Fig. 14C) y estos niveles permanecieron similares hasta las 120 h (Fig. 14D), lo que indica de forma interesante y novedosa que desde etapas tempranas hay una infiltración de células inflamatorias (neutrófilos y linfocitos TCD4+) hacia el corazón.

Debido a que se observó que los neutrófilos fueron los que más se infiltraron en el corazón durante las etapas tempranas de la ERC, se procedió a evaluar el efecto de la depleción de estas células, mediante un anticuerpo monoclonal anti-Ly6G específico, sobre la fibrosis y disfunción cardiacas crónicas en la ERC.

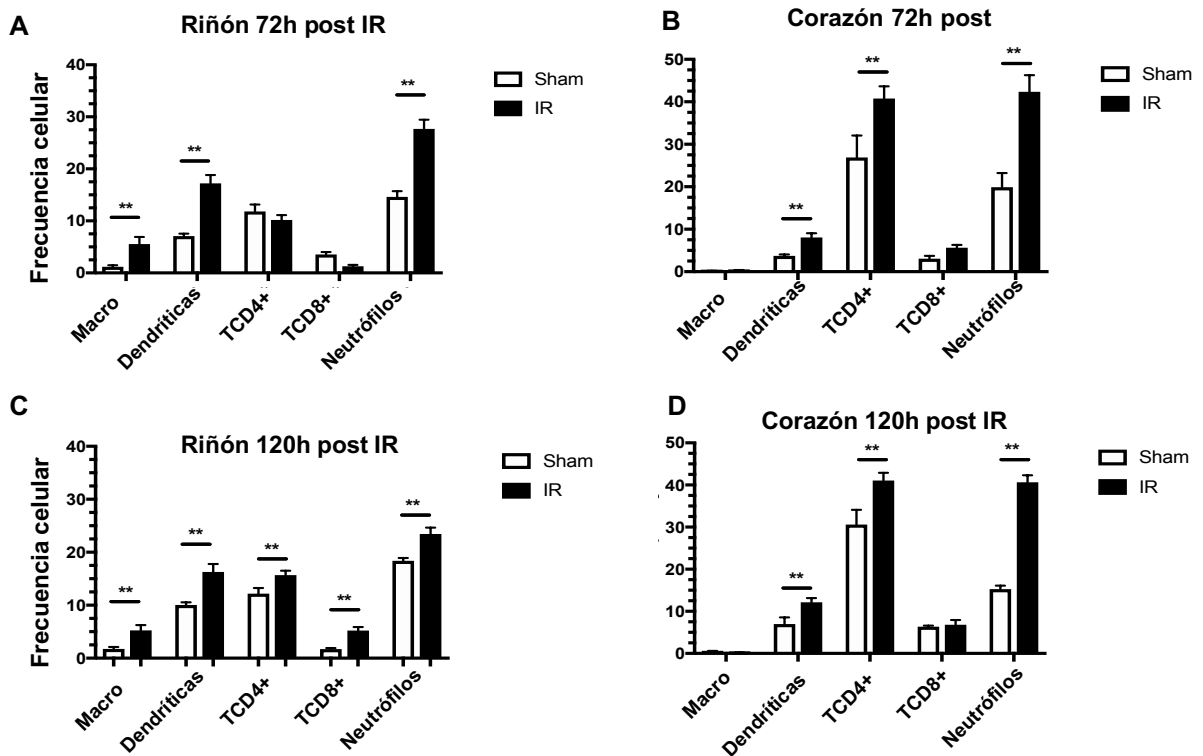


Figura 14. Infiltración de células inflamatorias al tejido renal y cardiaco. A), células dendríticas, linfocitos TCD4+ y neutrófilos a las 72 h y tal incremento persiste hasta 120 h de seguimiento de los animales (B). En el caso del riñón se observa que las células que incrementan en etapas agudas son, macrófagos, células dendríticas y neutrófilos a las 72h (C) y a las 120h se observa un incremento significativo de macrófagos, células dendríticas, linfocitos TCD4+, TCD8+ y neutrófilos (D). n=5 por grupo. Datos reportados como la media \pm desviación estándar, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

8.2.1 Resultados depleción de neutrófilos (crónico)

Los animales que progresaron a ERC después de 8 semanas de seguimiento desarrollaron disfunción renal evidenciada por un incremento en los niveles de urea y creatinina plasmática (Fig. 15A y 15B). Los animales con ERC a los cuales se les inyectó el anticuerpo anti-Ly6G en la etapa temprana de la ERC, mostraron una reducción del incremento en los niveles de urea en plasma (Fig. 15A) pero no de los

niveles de creatinina (Fig. 15B), lo que sugiere que la depleción de neutrófilos podría prevenir de forma parcial la disfunción renal en los animales que progresan hacia ERC, sin embargo, esta es una parte que se debería investigar más a detalle en el contexto renal. Después de analizar la función renal, se hizo la evaluación de diferentes parámetros cardíacos. Se observó que los animales con ERC mostraron hipertrofia cardíaca que se midió mediante la proporción del peso cardíaco / peso corporal (Fig. 15C) y de forma interesante se vio que los animales que fueron depletados de neutrófilos mostraron una reducción de la hipertrofia que tuvo valores similares a los del grupo sham.

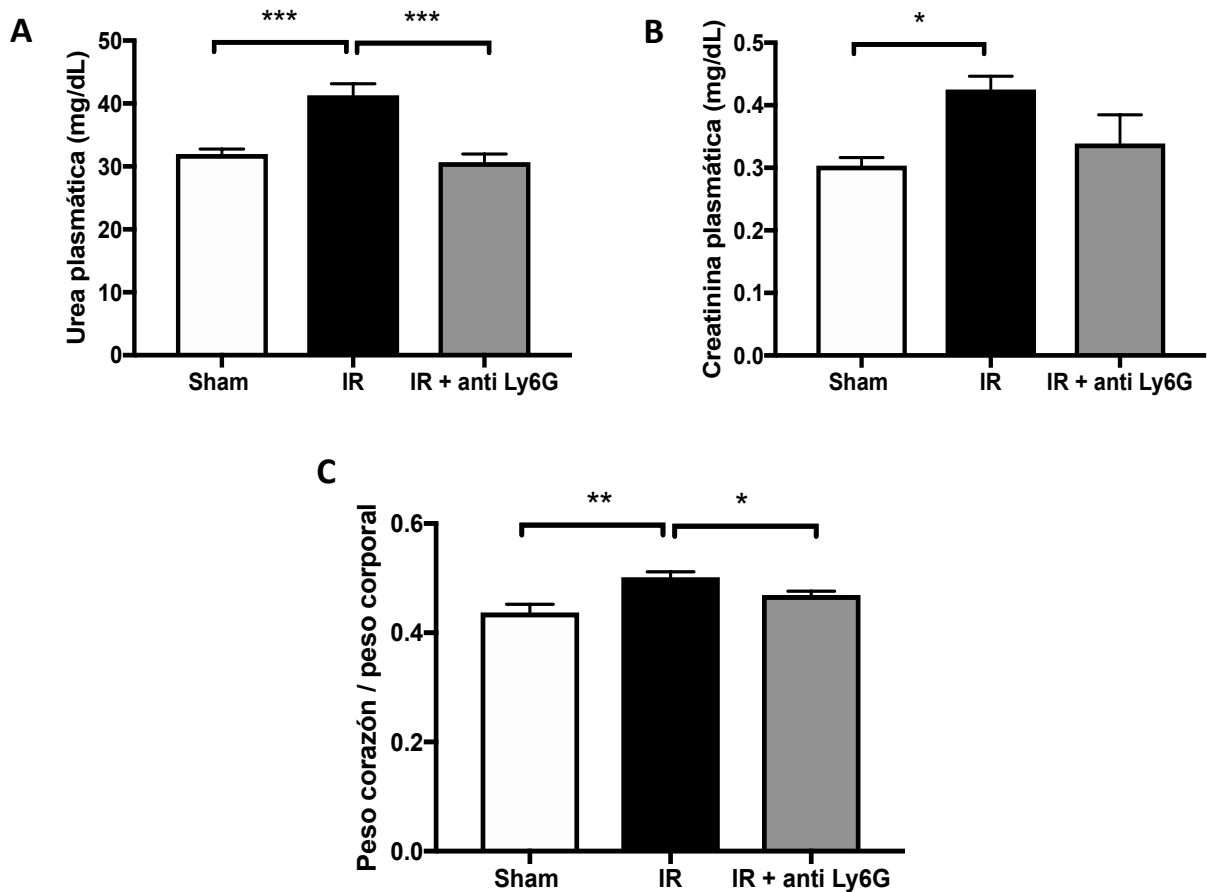


Figura 15. Medición de la función renal e hipertrofia cardiaca en animales con ERC y ERC+ depleción de neutrófilos. La depleción de neutrófilos previene el incremento de A) urea plasmática y de forma parcial el incremento de B) creatinina plasmática. El peso cardiaco/peso corporal (C), incrementó en los animales con IR y se previno en los animales con depleción de neutrófilos (color gris). Sham: n= 5, IR: n=6 e IR+ anti Ly6G: n=7. Datos reportados como el promedio \pm SE, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Después se evaluaron los niveles de renales de RNA mensajero de diferentes genes relacionados con el desarrollo de fibrosis como colágena I, fibronectina, TGF- β y α -SMA. Se observó que los niveles de RNA mensajero de colágena I (Fig. 16 A) y fibronectina (Fig. 16 B) incrementaron en los animales con ERC y que disminuyeron de forma significativa en el grupo de ERC con eliminación de neutrófilos. Al evaluar los niveles de α -SMA (Fig.16C) y de TGF- β (Fig. 16D) se observó que hubo un incremento en los animales con ERC y también se notó una tendencia a la disminución en los animales del grupo con eliminación de neutrófilos, sin embargo, esta no fue significativa. Posteriormente, se analizaron los niveles de RNA mensajero del factor de crecimiento derivado de plaquetas PDGF (Fig.16 E) un gen relacionado con la regulación de la angiogénesis y también se analizaron los niveles de RNA mensajero del inhibidor del activador de plasminógeno-1 PAI-1 (Fig.16 F) que se relaciona con la inhibición de la fibrinólisis y que contribuye a la activación de trombos. De forma interesante, observamos que estos dos genes incrementaron de forma significativa en los animales con ERC y que en los animales eliminados de neutrófilos este incremento no se previno, algo que podría indicar que en el tejido renal están ocurriendo cambios inflamatorios y fibróticos importantes que inciden en el desarrollo de daño

cardiovascular. Debido a estos hallazgos se decidió hacer la evaluación de genes relacionados con daño cardíaco en los corazones de estos animales.

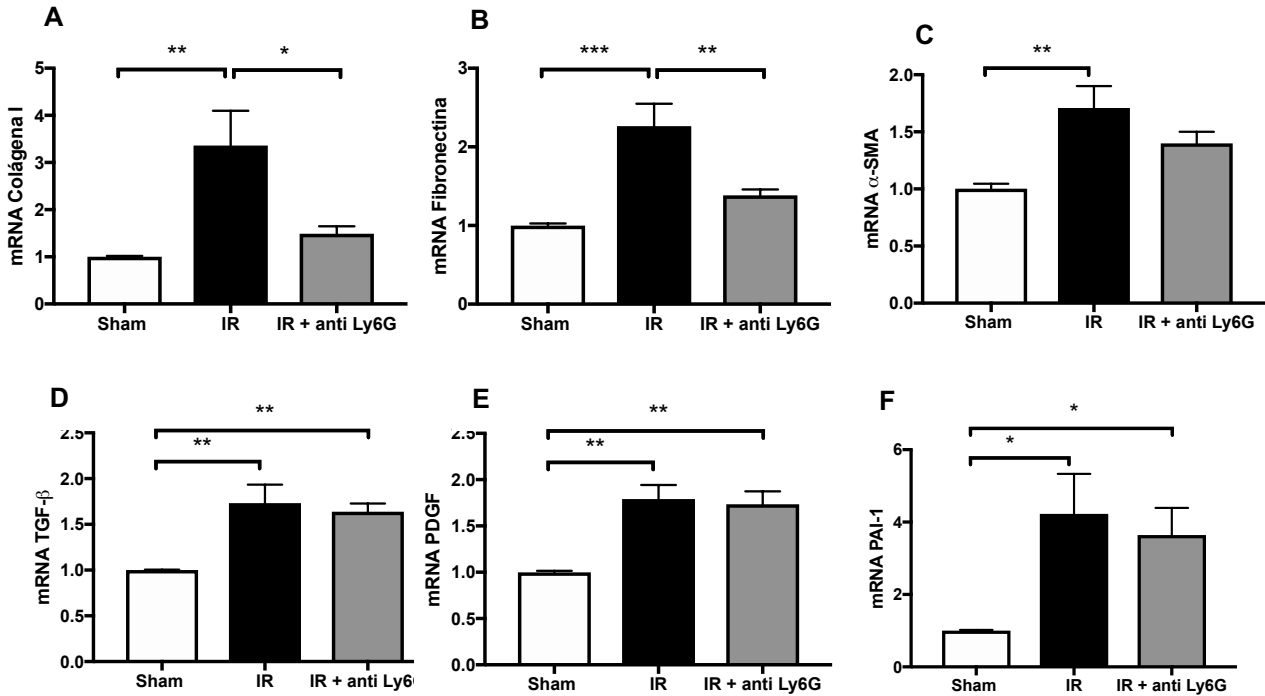


Figura 16. Niveles de RNA mensajero de genes profibróticos, de regulación, de angiogénesis y fibrinólisis. Grupo sham (barra blanca), grupo con avance a ERC (barra negra) y con ERC tratados un inhibidor de neutrófilos (anti-Ly6G). Sham: n= 5, IR: n=6 e IR+ anti Ly6G: n=7. Datos reportados como el promedio \pm SE, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

En el corazón de los animales con ERC, se observó un incremento de α -SMA (Fig.17 A) y de PDGF (Fig. 17 B) que se previno al eliminar de neutrófilos a los animales con IR. Adicionalmente, se observó que TGF- β (Fig.17 C) aumentó en ambos grupos de ischemia y no se previno con la eliminación de neutrófilos. Finalmente, se observó que BNP (Fig. 17 D), un marcador de disfunción cardíaca aumentó en los animales con ERC y disminuyó parcialmente en el grupo con eliminación de neutrófi-

los y ERC, algo que sugiere que el tratamiento de eliminación temprana de neutrófilos incide de forma especial en la prevención de la fibrosis mediada por la remodelación de la matriz extracelular, en la disminución de daño cardíaco y de la disfunción cardíaca.

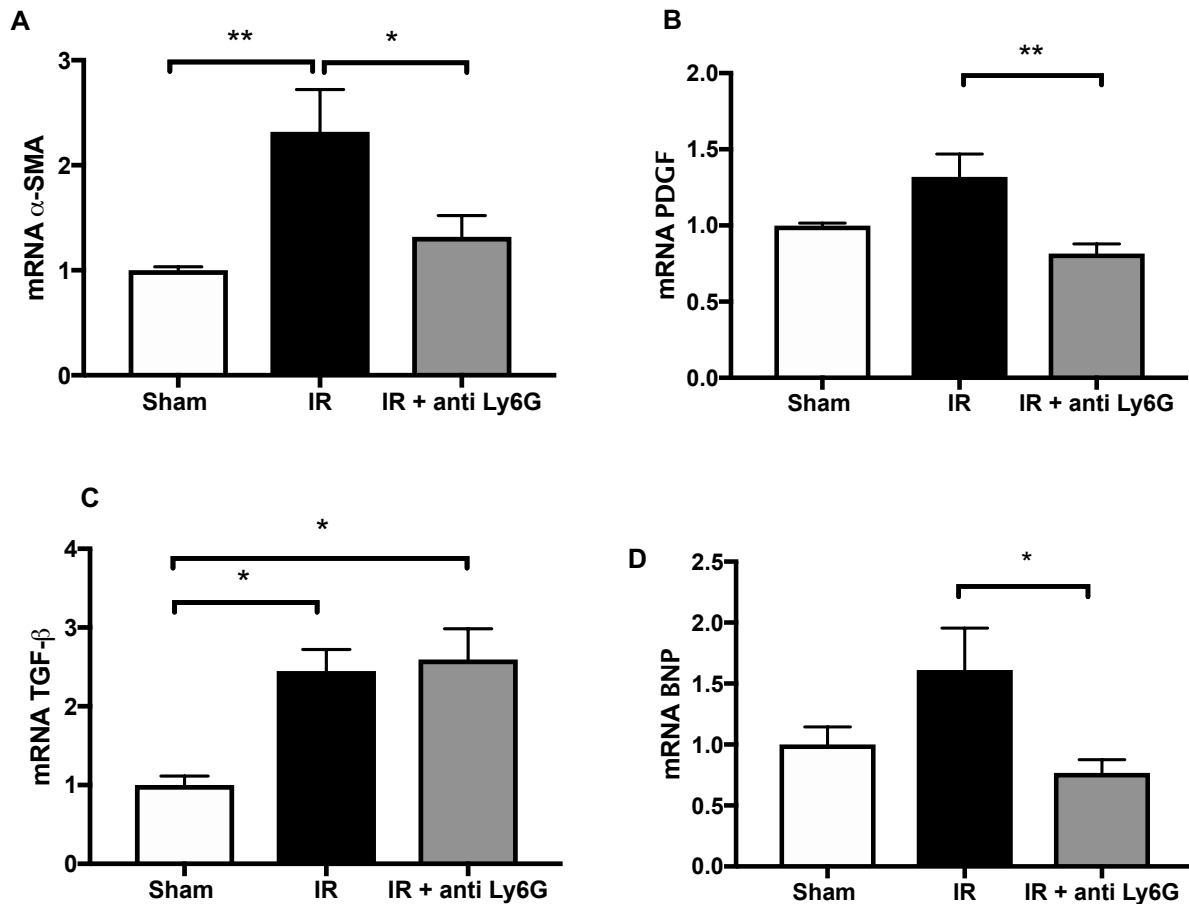


Figura 17. Niveles de RNA mensajero en corazón de animales con ERC y con depleción de neutrófilos. A) α -SMA, B) PDGF, C) TGF- β , D) BNP. Grupo sham se muestra en la barra blanca, el grupo con ERC inducida por IR en la barra negra y el grupo con ERC inducida por IR y tratado con el anticuerpo anti-Ly6G para la eliminación de neutrófilos. Sham: n= 5, IR: n=6 e IR+ anti Ly6G: n=7. Datos reportados como el promedio \pm SE *p<0.05, **p<0.01.

8.2.2 Análisis de las modificaciones transcriptómicas cardíacas de los animales con daño renal en la etapa temprana de la ERC

Debido a que se observó que la inflamación es un proceso importante que participa en el desarrollo de fibrosis y disfunción endotelial, se decidió hacer la caracterización de los cambios transcripcionales inducidos en la etapa temprana de la ERC en el corazón. El análisis de RNA-Seq mostró que en los corazones durante la etapa temprana de la ERC hubo 54 genes regulados al alza (“upregulated”) en comparación con el grupo sham (figura suplementaria 1, Fig. 18A). La mayoría de los genes regulados al alza se apreciaron principalmente en proteínas que codifican para la respuesta inflamatoria, quimiotaxis, respuesta a interferón y moléculas de adhesión. Posteriormente, se realizó la confirmación de la regulación al alza por qRT-PCR de ciertos genes involucrados como el gen de la respuesta a interferón (*Irf7*), la quimiocina (*cc18*), la molécula de señalización inflamatoria (*Stat2*) y una molécula de adhesión (*Itgb7*), todos los cuales mostraron un incremento significativo en el tejido cardíaco de los ratones con ERC en etapa temprana (Fig. 18B).

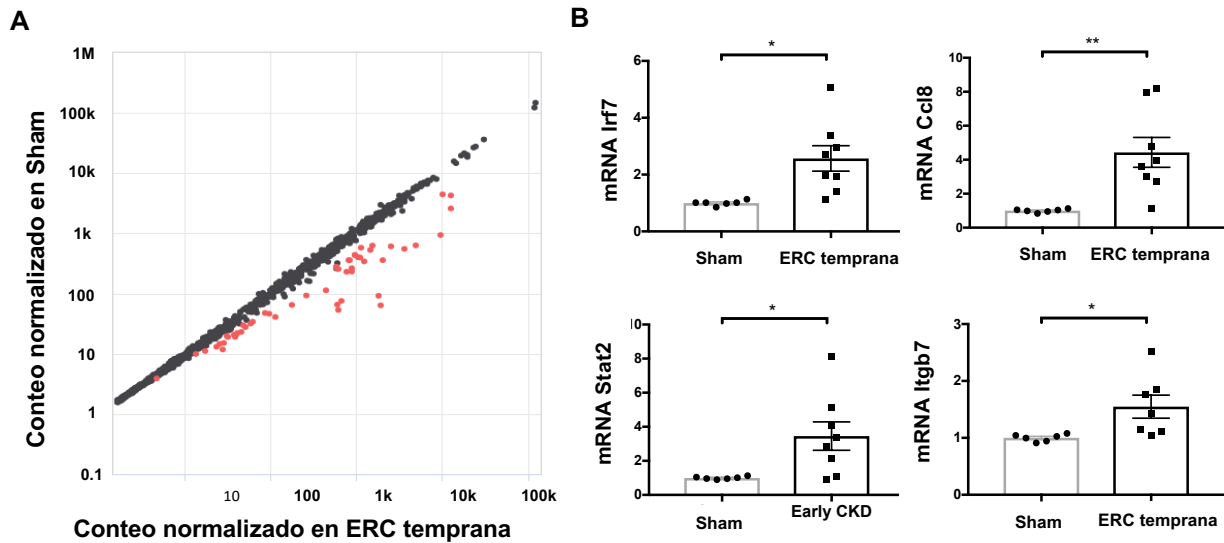


Figura 18. Análisis transcripcional durante la etapa temprana de la ERC en el corazón. A) Se muestra la expresión diferencial de genes; en color negro, los que no cambian y en rojo los que muestran un cambio significativo (54 genes). B) Se muestra el análisis por qRT-PCR para los genes *Irf7*, *Ccl8*, *Stat2* e *Itgb7*. n=4 por grupo. Datos reportados como el promedio \pm SE, *p<0.05, **p<0.01.

El análisis de enriquecimiento funcional, gene ontology (GO), mostró que los procesos biológicos más enriquecidos que se activaron en el tejido cardiaco durante la ERC temprana se relacionan con la respuesta inflamatoria y la lista de los 20 procesos biológicos más enriquecidos se muestra en la figura 19A. Los cinco procesos biológicos mayormente enriquecidos fueron: respuesta inmune (33 genes, $p=8.71 \times 10^{-23}$), procesos del sistema inmune (38 genes, $p=9.25 \times 10^{-23}$), respuesta de defensa (32 genes, $p=2.00 \times 10^{-21}$), respuesta a citocinas (27 genes, $p=2.92 \times 10^{-21}$) y finalmente respuesta celular a interferón beta (13 genes, $p=4.95 \times 10^{-21}$).

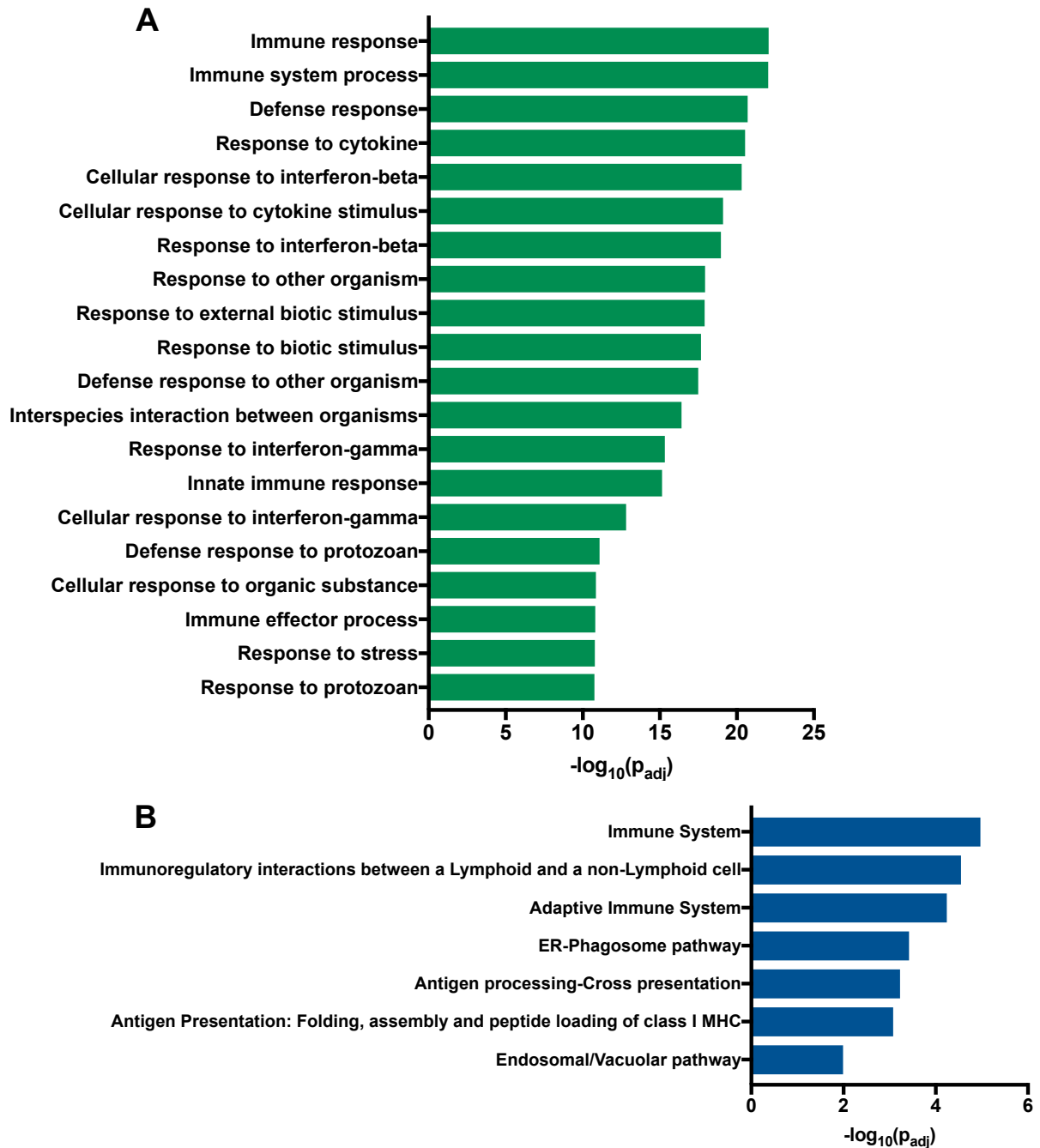


Figura 19. Análisis de ontología a partir de los datos de RNA-Seq. En A, se muestran los 20 procesos biológicos con mayor enriquecimiento y se observa que varios de estos se relacionan con la respuesta inmune, procesos del sistema inmune, respuesta de defensa y respuesta a citocinas. En B, se observan las 5 vías biológicas de la base de datos “reactoma” con mayor enriquecimiento y que también se encuentran relacionados con el sistema inmune.

Además, se realizó el análisis de enriquecimiento del reactoma con el programa ShinyGO v0.61 y este reveló que el sistema inmune y las interacciones inmunoregulatoras entre una célula linfoide y una no linfoide son las vías más enriquecidas (Fig.19B). El análisis de redes de los procesos biológicos más enriquecidos mostró que hay una relación funcional de los procesos biológicos enriquecidos (Fig. 20), en la cual una conexión más fuerte se representa por una línea gris más oscura y un punto más grande cuando el número de genes que participan en cada proceso biológico está más relacionado. También, se realizó el análisis de anotación de redes de asociación proteína-proteína con la herramienta de búsqueda STRING y se generó una red de interacción con una alta confianza (0.700) que incluyó 48 de las proteínas que se observaron en los 54 genes regulados al alza, algo que muestra interacciones incrementadas significativas versus las esperadas ($p < 1.0 \times 10^{-16}$), con proteínas relevantes para los procesos inflamatorios tales como ligando 10 de quimiocina con motivo C-X-C (Cxcl10), el transductor y activador de la transcripción (Stat1 y Stat2), miembro 1 y 2 de la familia GTPasa relacionado con inmunidad (Irgm1 e Irgm2) y el factor regulador de interferón 7 (Irf7) en el centro de la red de interacción (Fig.21).

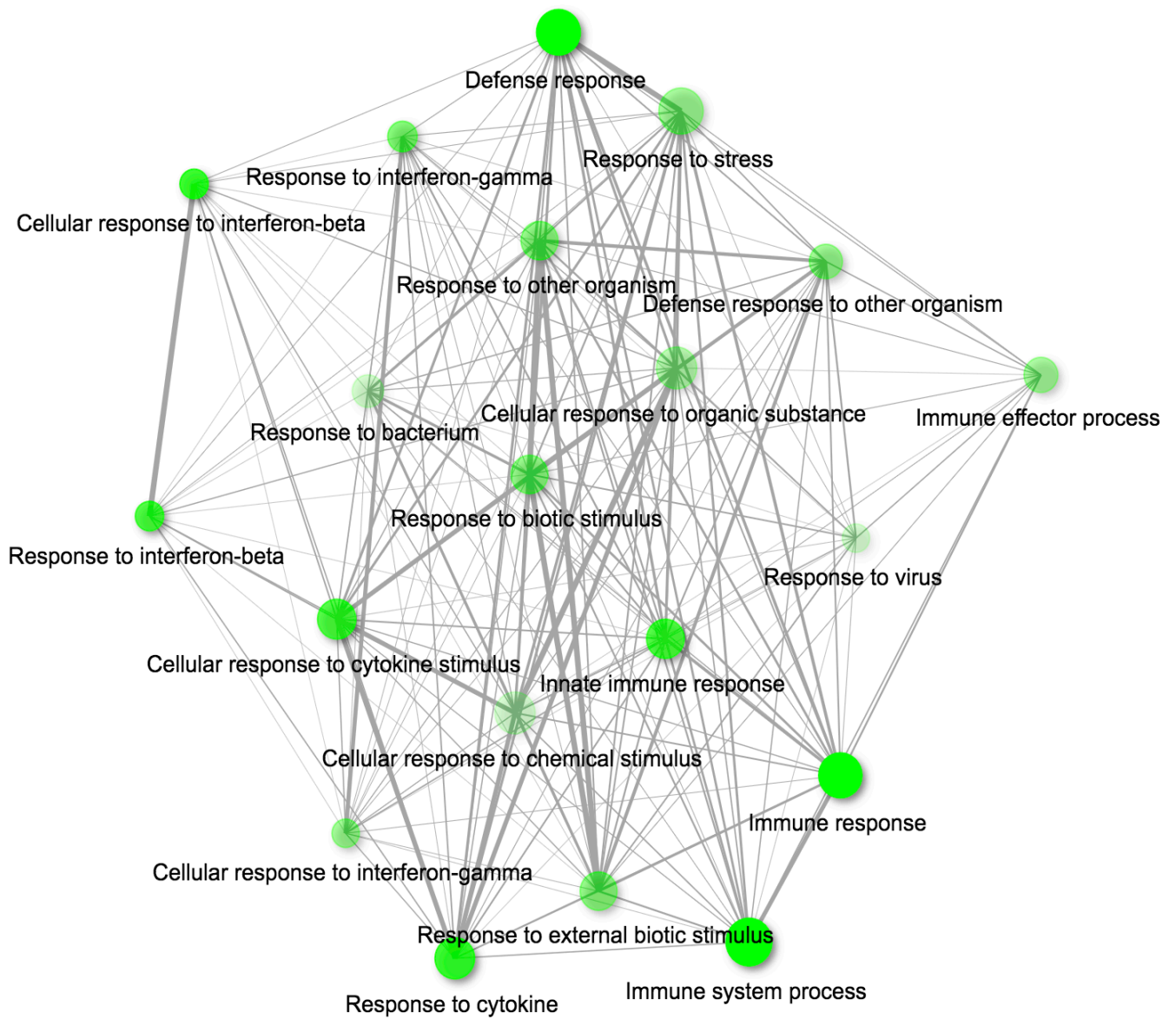


Figura 20. Análisis de redes de los procesos biológicos más enriquecidos obtenido con el programa ShinyGO v0.61. El análisis de redes mostró que hay una relación funcional de los genes regulados al alza en cada proceso biológico enriquecido. Las líneas grises y más anchas representan las vías con una mayor relación.

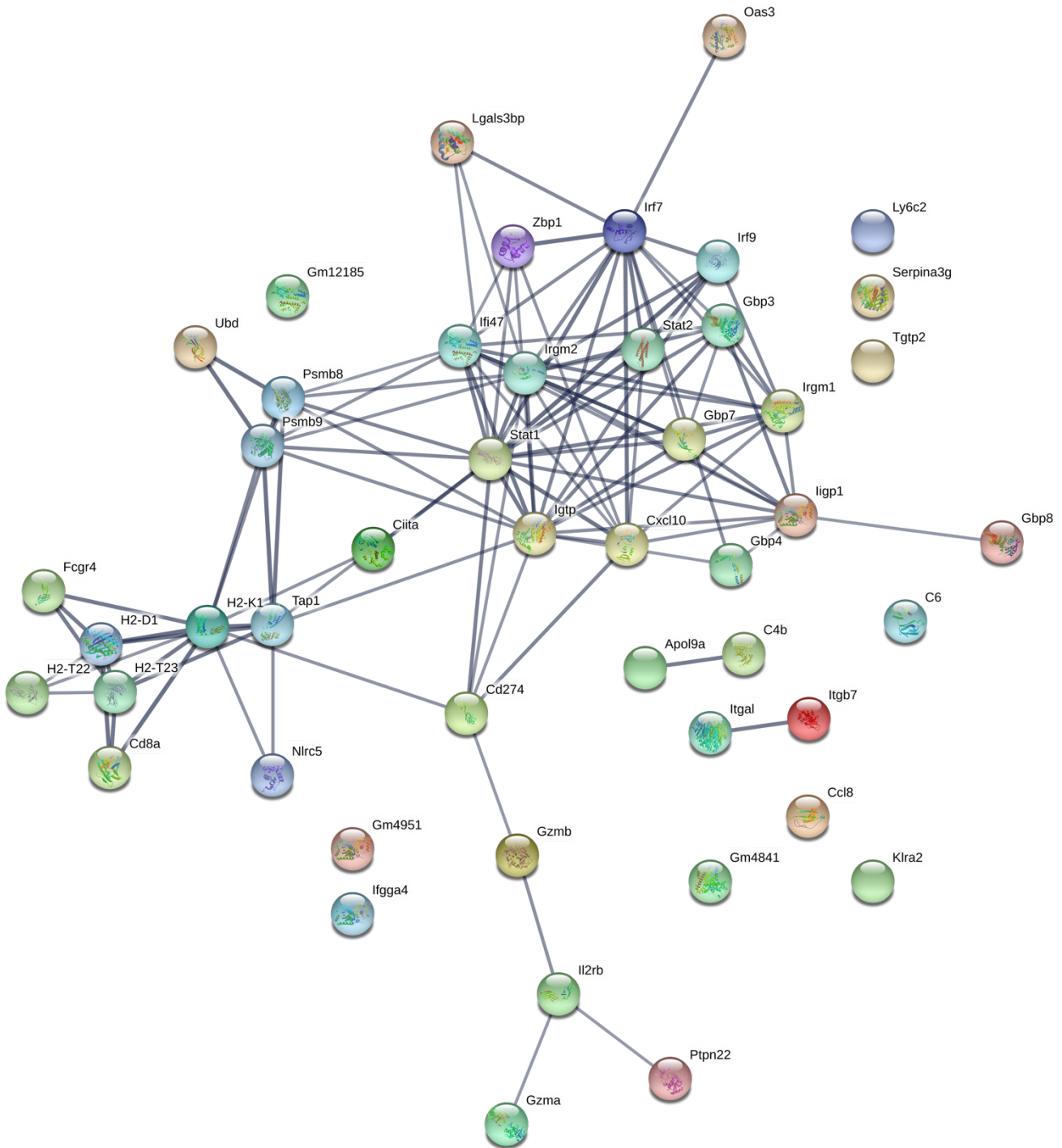


Figura 21. **Análisis de anotación de redes de asociación proteína-proteína obtenido con la herramienta de búsqueda STRING.** Se muestran 48 de las proteínas que se observaron en los 54 genes regulados al alza. Se muestran mayoritariamente interacciones con proteínas relacionadas con procesos inflamatorios, $p < 1.0 \times 10^{-16}$.

8.2.3 Estado de la metilación del DNA en el corazón en la etapa temprana de la ERC.

Para la evaluación de los cambios epigenéticos que podrían contribuir al desarrollo de remodelación cardiaca durante la ERC se utilizó secuenciación por bisulfito de representación reducida, una herramienta que permite evaluar las modificaciones de metilación en las citocinas del DNA. Las regiones metiladas diferencialmente (DMRs por sus siglas en inglés) se definieron por una diferencia de metilación $>20\%$, cobertura $>5\%$ y $p < 0.05$. Se encontraron 104 DMRs significativamente diferentes en los corazones de los ratones con ERC temprana en comparación con los animales controles. De éstas DMRs, el 15% se encontró en promotores, 20% en exones, 28% en intrones y 37% en regiones intergénicas (Fig.22A). Las DMRs se distribuyeron a lo largo del genoma en todos los cromosomas excepto el cromosoma 10, 15 y Y (Fig. 22B). Las regiones significativamente hipermetiladas se destacan en color rojo y las regiones hipometiladas en color verde.

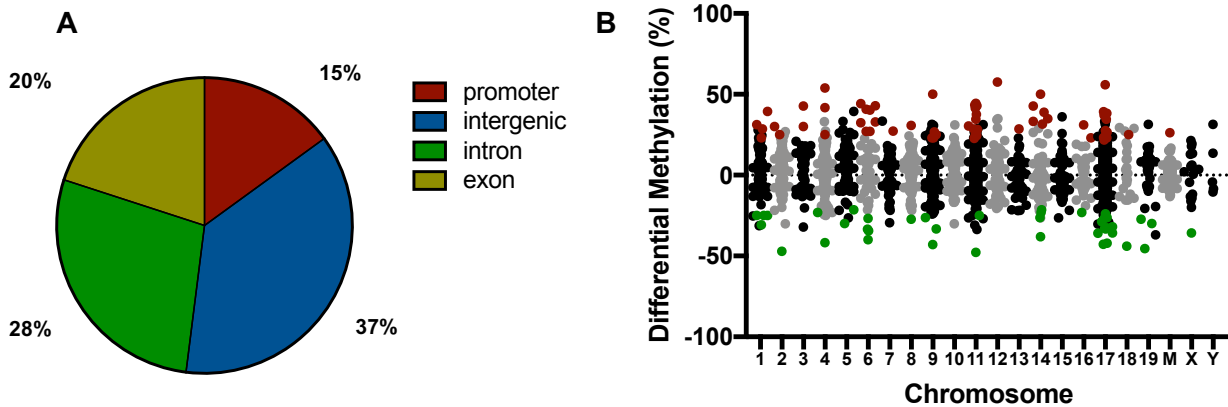


Figura 22. Análisis de la secuenciación por bisulfito para observar cambios epigenéticos cardiacos presentes en la etapa temprana de la ERC. Se encontraron 104 DMRs significativamente diferentes en los corazones de los ratones con ERC temprana en comparación con los animales controles. A) 15% de las DMRs, se encontró en promotores, 20% en exones, 28% en intrones y 37% en regiones intergénicas. B) Las DMRs se distribuyeron a lo largo del genoma en todos los cromosomas excepto el cromosoma 10, 15 y Y. DMRs (regiones metiladas diferencialmente).

Las DMRs se asociaron a genes que producen mRNA o miRNA y regiones no codificantes. Los 10 mRNAs de genes codificantes asociados a regiones hipometiladas o regiones hipermetiladas se muestran acomodados por diferencia en metilación (Fig. 23 A y B). Los genes asociados a DMRs hipermetiladas incluyeron genes relevantes para la función cardiaca tales como *Hcn4* (activated cyclic nucleotide gate potassium channel 4), *SerpinaF2* (alpha 2-antiplasmin), *Adra1a* (alpha-1B adrenergic receptor), *Chl1* (cell adhesion molecule), *Wwtr1* (WW domain-containing transcription regulator protein 1), *Gal1R* (galanin receptor 1), *Ezh1* (enhancer of zeste 1 polycomb repressive complex 2 subunit) y *Zbtb17* (zinc finger and BTB domain containing 17).

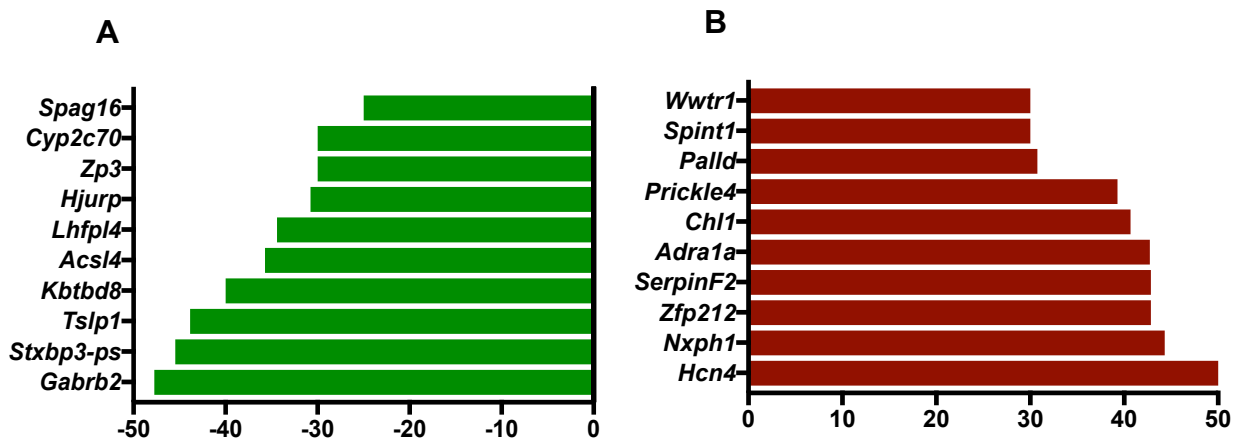


Figura 23. Gráficas de diferencias de metilación. A) Se muestran las regiones hipometiladas (verde), B) se muestran las regiones hipermetiladas en genes que son relevantes para la función cardiaca como *Hcn4*, *SerpinaF2*, *Adra1a*, *Chl1*, *Wwtr1*, *Gal1R*, *Ezh1* y *Zbtb17*.

En el presente proyecto, se estudió particularmente la relación entre el estado de la hipermetilación del DNA y los niveles de mRNA de *Hcn4*, *Wwtr1* y *SerpinF2* debido a su relevancia en funciones como las corrientes de marcapasos cardiacas, trabeculación cardiaca y metabolismo así como susceptibilidad a riesgo de falla cardiaca, respectivamente. En acuerdo con el estado del DNA hipermetilado, se encontró que los niveles de mRNA de *Hcn4*, *Wwtr1* y *SerpinF2* se redujeron durante la etapa temprana de la progresión de la ERC en los corazones de los animales (Fig. 24).

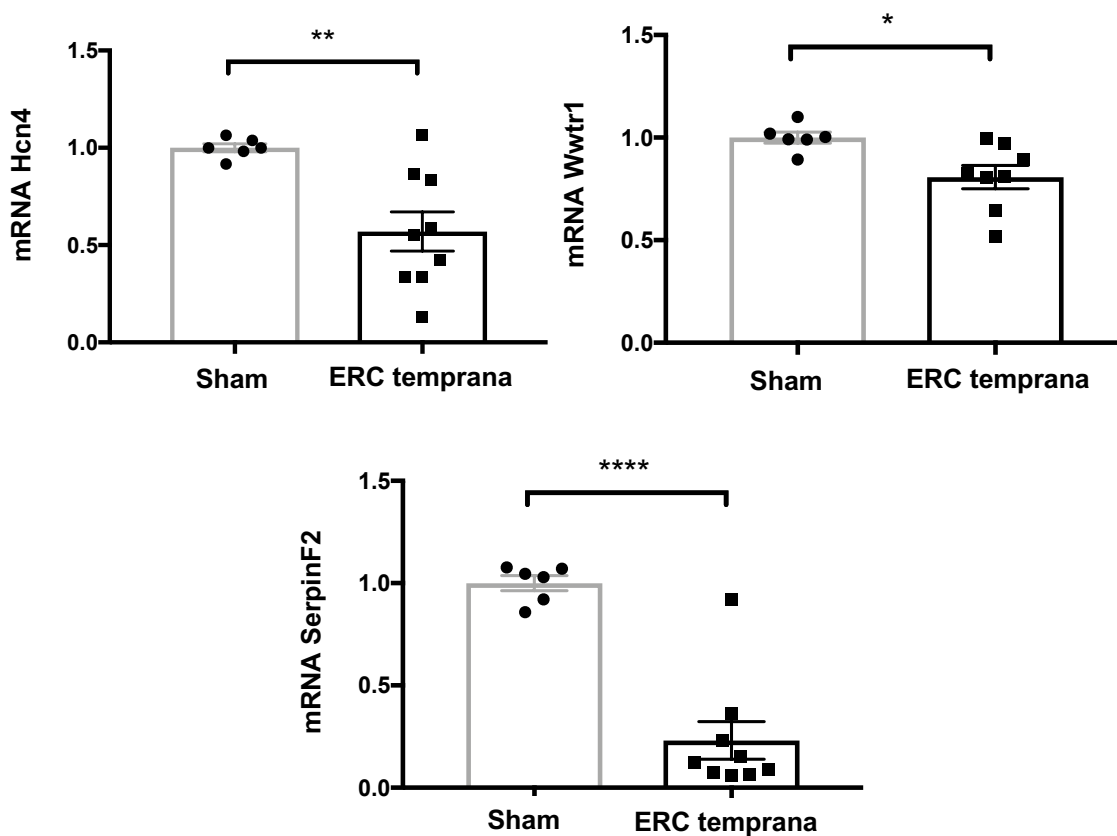


Figura 24. Niveles de mRNA de los genes *Hcn4*, *Wwtr1* y *SerpinF2*. Se observa que estos genes importantes para el funcionamiento, trabeculación-metabolismo y susceptibilidad a riesgo de falla cardiaca, disminuyeron significativamente en el corazón de los animales con progresión a ERC. n=8 por grupo. Datos reportados como el promedio \pm SE, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

9. DISCUSIÓN

La ERC es una condición clínica que se asocia con el desarrollo de falla cardiaca y el incremento de la mortalidad cardiaca por factores como la sobrecarga en la presión, sobrecarga del volumen y cardiomiopatía. La ERC contribuye al daño cardiaco a través de diferentes alteraciones hemodinámicas y no hemodinámicas que pueden resultar en remodelación cardiaca adversa, disfunción sistólica y diastólica y fibrosis miocárdica (Larsen et al., 2012). La sobrecarga de la presión y factores no hemodinámicos como el incremento en la activación del RAAS, estrés oxidante, disfunción endotelial, inflamación crónica y alteraciones del metabolismo del fosfato son vías importantes que se han propuesto para desarrollar estrategias de terapéuticas que incidan de forma apropiada en la prevención y progresión del daño en el corazón durante ERC pero a pesar de las estrategias terapéuticas que tratan de inhibir este daño concomitante como la disminución de lípidos, el incremento en el número de procesos de diálisis o la normalización de hemoglobina, se ha determinado que las personas con ERC manifiestan perfiles de riesgo diferentes en comparación con la población en general (Stenvinkel et al., 2008) y que desarrollan alteraciones cardiovasculares (Larsen et al, 2012). Lo anterior incide en la búsqueda de estrategias terapéuticas que puedan detener esta progresión o en un aspecto esencial, corregirla. En las siguientes secciones se destaca con más detalle que durante la etapa temprana de la ERC se presentan alteraciones cardiacas tempranas como la infiltración de células inflamatorias, cambios transcripcionales y epigenéticos que pueden contribuir al desarrollo de alteraciones cardiovasculares crónicas en la

ERC (Figura 25) y que además un tratamiento con L-arginina en la etapa crónica de la ERC, previene el desarrollo de fibrosis e hipertrofia cardíacas a través de promover la activación de la eNOS.

9.1 El papel de la disfunción endotelial en el desarrollo de alteraciones cardiovasculares durante la ERC

Una de las principales causas de muerte en pacientes con ERC es el desarrollo de consecuencias cardiovasculares como falla cardíaca y muerte cardíaca (Narala et al., 2012; Kumar et al., 2014; Pinheiro da Silva, AL & Vaz da Silva, 2016). Los mecanismos que conducen a estas alteraciones no han sido caracterizados a detalle y permanecen siendo explorados. En un estudio previo, caracterizamos un modelo murino en el cual se indujo ERC por IR bilateral y observamos que en la progresión de la enfermedad aparecieron alteraciones como hipertrofia cardíaca, incluso antes de la elevación de creatinina en suero y proteinuria en orina. Estas alteraciones sugieren que existen ciertos mecanismos como inflamación, estrés oxidante y disfunción endotelial que pueden afectar el corazón e inducir daño secundario. Diferentes estudios han encontrado que la producción de NO disminuye en pacientes con ERC y esto se relaciona con mecanismos que alteran la producción de este agente vasodilatador, NO, tales como la reducción de L-arg, alteraciones en los cofactores de la eNOS, o bien, el incremento en la producción de inhibidores endógenos de la L-arg (por ejemplo, ADMA) (Dobrian, 2012; Reddy et al., 2014; Siragusa et al., 2016). La disfunción

endotelial se caracteriza por una reducción en la biodisponibilidad de NO y esto es una causa del desarrollo de patologías renales y cardíacas debido a que se origina la reducción de la vasodilatación, la rigidez arterial funcional y cambios en el fenotipo de VSMC (Zanoli et al., 2019). Los resultados descritos en la presente tesis demuestran por primera vez en un modelo en roedores a los cuales se les indujo ERC por IR, que los animales con progresión a ERC tuvieron alteraciones en la vía de señalización de la eNOS, hacia los 5 meses de seguimiento, que se caracterizó por un aumento en la fosforilación inactivante de la eNOS (Tre-495) (Fig. 10A), reducción de las interacciones con Hsp 90 (Fig. 11A) y el desacople del estado dimérico de la enzima (estado activo) (Fig. 11B). A diferencia de estos hallazgos, los animales que se suplementaron con L-arg, aun cuando el tratamiento se inició al tercer mes después del daño por IR, no mostraron estas alteraciones. El desacople de la eNOS puede contribuir al desarrollo de lesión cardiovascular a través de dos mecanismos, 1) la disminución de la síntesis de NO y 2) el incremento en la producción del anión superóxido debido a la alteración de la conformación de eNOS o a la pérdida de su interacción con otras proteínas como Hsp 90 (Siragusa et al., 2016). ADMA es un inhibidor endógeno de la eNOS y en diferentes estudios se ha reportado que puede ser un nuevo marcador de enfermedad cardiovascular, puesto que los altos niveles de este compuesto son un fuerte predictor de eventos cardiovasculares y de diferentes causas de mortalidad en personas con enfermedad arterial coronaria (Ueda et al, 2007). En este estudio observamos que los animales con ERC y tratados con L-arg, tuvieron aumento en los niveles plasmáticos de ADMA (Fig. 12A), lo que señala que el incremento de este compuesto no se pudo contrarrestar con L-arginina aún cuando

do los propios valores de L-arg disminuyeron de forma significativa en los animales con ERC tratados (Fig. 12B) sugiriendo que la L-arginina no supera los niveles plasmáticos al ser administrada, sino que posiblemente se agota de forma más precipitada al estar sistémicamente más disponible como sustrato de la eNOS. Estos hallazgos sugieren que posiblemente hay un efecto aditivo entre la pérdida de NO y la alteración estructural y bioquímica de la eNOS, sin embargo, se necesitaría de otros estudios tridimensionales más detallados para determinar la estructura de eNOS en el corazón durante la ERC o bien, medir de forma más directa los niveles de NO al incrementar el sustrato de la eNOS.

La conexión cardiorrenal es compleja puesto que aún al modificar diferentes parámetros que se alteran durante la ERC, se ha visto que se desarrollan alteraciones cardiacas (Stenvinkel et al., 2008). En este estudio, se observó que el riñón manifiesta características similares a las observadas en pacientes con ERC (Amdur et al., 2016; Draws & Rahman, 2010; Pinheiro da Silva & Vaz da Silva, 2016) y que en el corazón se altera la vía de producción de NO, seguramente por un efecto que relaciona otros mecanismos como la alteración de hormonas, la acumulación de toxinas urémicas, el desarrollo de inflamación (Stenvinkel et al., 2008), entre otros mecanismos, puesto que se trata de dos órganos que requieren de un gran aporte de nutrientes y una regulación homeostática de equilibrio iónico e hídrico muy fina. En este sentido, medimos los niveles de BNP, un marcador que evalúa el estrés miocárdico y que refleja la sobreactivación de reacciones neurológicas y humorales que pueden afectar el funcionamiento y estructura del corazón (Yasuda et al., 2012), se

observó que los animales con ERC mostraron mayores niveles de BNP en corazón y los animales que se trataron con L-arg mostraron una inhibición en el incremento de BNP en el corazón (Fig. 9A), algo que refleja que la mayor activación de la eNOS previno la respuesta al estrés de la pared miocárdica ventricular inducida por la expansión del volumen y la sobrecarga de la presión durante la ERC. Esto es importante, ya que se ha visto que los niveles de BNP son una herramienta de diagnóstico de mucha ayuda para determinar el estrés miocárdico y correlacionan con la mortalidad cardiovascular a largo plazo en pacientes con infarto miocardio agudo y que predicen la mortalidad cardíaca y otros eventos cardíacos adversos (Dasgupta & Wahed, 2014). También observamos que los animales del grupo de ERC tratados con L-arg mostraron niveles proteicos reducidos de fibronectina (Fig. 9B), lo que sugiere un posible efecto benéfico del NO en la prevención de la fibrosis cardíaca.

La excesiva activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona, la secreción de endotelina y la actividad nerviosa simpática son características frecuentes de pacientes con ERC que se asocian con un aumento de las ROS e inducen estrés cardíaco y la secreción de BNP (Daiber et al., 2019; Larsen et al., 2012; Stenvinkel et al., 2008). Por otra parte, la inflamación crónica puede originar rigidez arterial y el aumento de moléculas inflamatorias que interfieren con la actividad de eNOS e inducen estrés oxidante, cambio fenotípico de las células del músculo liso celular vascular (Stenvinkel et al., 2008), producción de metaloproteinasas de matriz y disminución de inhibidores de estas últimas. Además se sabe que el efecto de TNF en paredes arteriales, es mediado de forma parcial por la liberación de IL-6 desde VSMC y célu-

las endoteliales (Zanoli et al., 2019) . En relación con estos hallazgos, observamos que hubo un incremento de 4-HNE, un marcador de estrés oxidante, en los animales con ERC tanto en corazón como en riñón (Fig. 13A y 13B), sin embargo, a pesar de que estos niveles disminuyeron en el corazón de los animales tratados con L-arg, los riñones de estos animales no se vieron mejorados. Estos hallazgos sugieren que posiblemente el tratamiento con L-arginina produjo una mayor síntesis de NO promoviendo una mejor perfusión en el corazón y previniendo los efectos del estrés oxidante, sin embargo, se necesitaría de otros estudios funcionales y de imagen cardíaca para la validación de estos resultados. En el riñón, el estrés oxidante se mantuvo por el daño renal inducido *per se* y por la deficiencia de NO mediado por alteraciones de la señalización de eNOS, la reducción de L-arg o el incremento de ADMA y otras toxinas urémicas (Zanoli, et al., 2019).

En la actualidad existe controversia con el uso de aminoácidos como la L-arginina o L-citrulina, sustratos de la eNOS, en el tratamiento clínico de pacientes hipertensos y con enfermedades crónicas renales y cardíacas. Aunque en este estudio destacamos el papel benéfico de la L-arginina en un modelo que simula las alteraciones cardiovasculares observadas en humanos durante la ERC, hay otros estudios clínicos que demuestran una paradoja entre la cantidad de L-arginina y la saturación de la Km de la eNOS por lo que se piensa que las elevadas concentraciones de L-arginina en plasma no incrementen la producción endógena de NO (Khalaf et al., 2019), sin embargo, la producción de L-citrulina si se ha visto benéfica pero se necesitan más estudios que engloben otras patologías más allá de modelos de hiper-

tensión (Adejare et al., 2020). Es importante destacar que los pacientes con ERC cursan con niveles reducidos de NO, L-arginina y en estados más avanzados de ERC, se reduce la L-citrulina por lo que se ha determinado que la reducción en la biodisponibilidad de NO es un desencadenante del empeoramiento en la función renal (Reddy et al., 2014). También, en diferentes estudios se ha destacado que los inhibidores endógenos de la eNOS son un elemento importante en el desarrollo de disfunción endotelial debido a la interacción competitiva que muestran con la L-arginina y a que su producción se incrementa durante la ERC (Baylis, 2008; Sibal et al., 2010; Ueda et al., 2007). En cierto sentido la controversia que existe en el uso de la L-arginina como una terapia para restablecer los niveles de NO puede deberse a la estandarización de los métodos de medición, la temporalidad y la etiología de la enfermedad en la que se hace la evaluación de distintos componentes de la función endotelial, aunado a que en algunos estudios se ha señalado que la dosis baja o a corto periodo de tiempo en que se administra no es suficiente para obtener un efecto claro (Miller et al., 2003). Por otra parte, el endotelio por sí mismo es un tejido que se regula de una forma muy fina a través de mecanismos autonómicos y humorales por lo que se involucran otras moléculas de señalización y regulación que son importantes en la función endotelial y el balance hemodinámico que podrían ser objetivos de estudio posteriores.

En resumen, los hallazgos de esta primera parte de la tesis muestran que durante la progresión de la ERC fuimos capaces de prevenir las alteraciones cardiacas a través de la administración de L-arginina, algo que favoreció la activación de la

eNOS. Sin embargo, estas observaciones e intervenciones terapéuticas se hicieron en etapas avanzadas de la ERC (3er mes), cuando el daño renal estructural y funcional es ya evidente. Es por esto por lo que nos propusimos evaluar qué cambios tempranos en la progresión de ERC pudieran ocurrir en el corazón, en particular con un enfoque sobre la inflamación, cambios transcripcionales y epigenéticos.

9.2 El papel de la inflamación en el desarrollo de alteraciones cardiovasculares durante la ERC.

En el presente trabajo además de evaluar el papel de la disfunción endotelial, se decidió evaluar el papel que juega la inflamación en etapas tempranas de la ERC sobre el desarrollo de alteraciones cardiovasculares durante la ERC inducida por IR renal bilateral (25 minutos) en un modelo de ratón. En este modelo se observó que hubo una infiltración renal de macrófagos, células dendríticas y neutrófilos a las 72h después de la IR y que a las 120 h se mantuvo la infiltración de las células antes mencionadas, más la infiltración adicional de linfocitos TCD4+ y TCD8+.

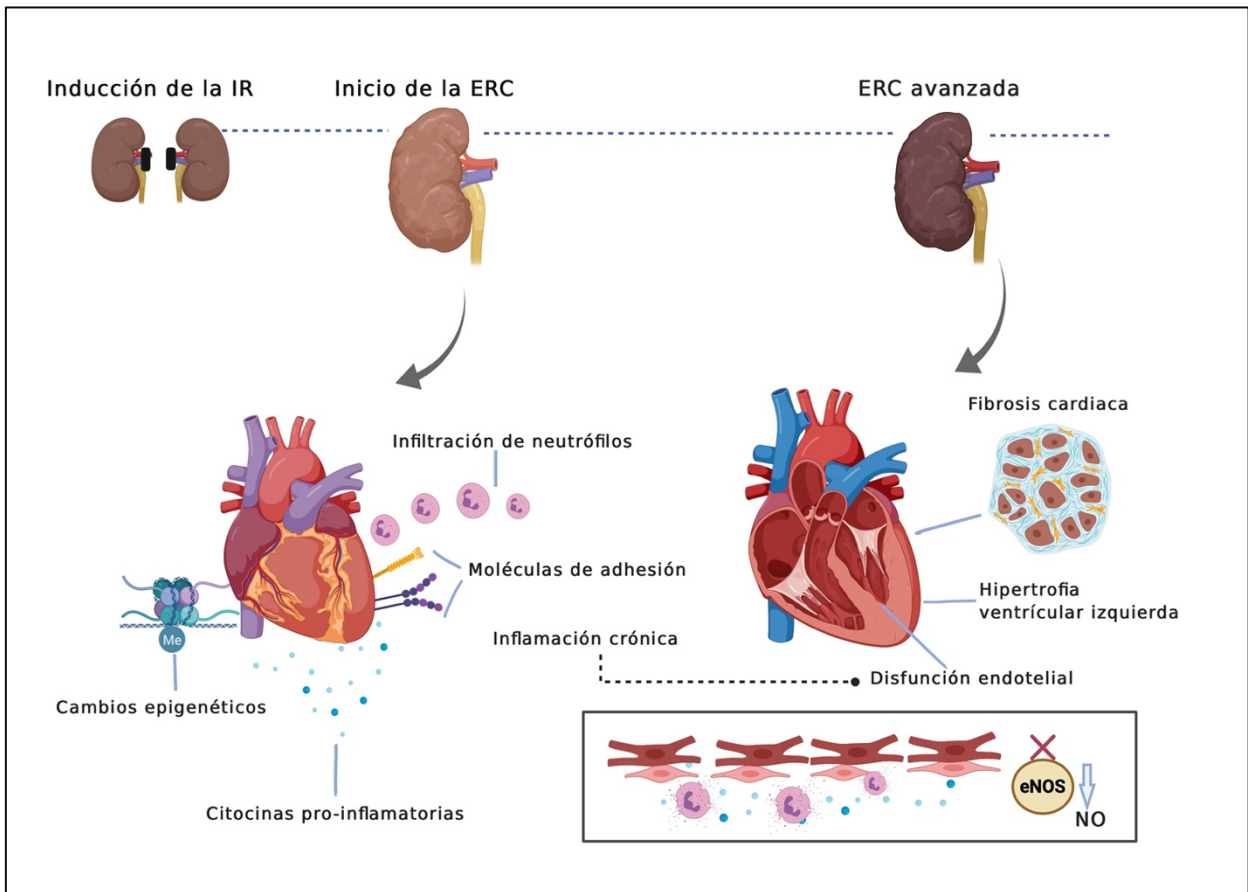


Figura 25. Mecanismos que influyen en el desarrollo de alteraciones cardiacas que aparecen durante la ERC.

Durante los estados iniciales de la ERC hay una regulación al alza de genes estrechamente relacionados con la respuesta inflamatoria, entre ellos quimiocinas, moléculas de adhesión y genes de respuesta a interferón y que esta marca transcriptómica se asocia con la infiltración de células inflamatorias hacia el corazón como neutrófilos, linfocitos T y células dendríticas. La metilación diferencial de citocinas aparece en regiones cercanas a genes que influyen en la función cardiaca, por ejemplo, se observa la hipermetilación de genes como *Hcn4*, *Wwtr1* y *SerpinF2*. Todos estos datos muestran que el tejido cardiaco sufre de cambios transcriptómicos, epigenéticos e inflamatorios durante etapas tempranas de la ERC que podrían ser desencadenantes del daño cardiaco inducido por la ERC y promover disfunción endotelial, hipertrofia y fibrosis cardiaca. Imagen realizada con el programa Bio-Render.com (Autor: Y. Isabel Amador-Martínez).

El incremento de estas células inflamatorias hacia el riñón coincide con la fisiopatología de la progresión de la ERC tras una etiología como lo es la LRA inducida por isquemia-reperusión (Li & Okusa, 2010) utilizada en otros modelos animales y que se presenta en humanos como una caída rápida de la función renal (Kramann et al., 2015; Bonventre & Yang et al., 2011). Este modelo induce un daño directo sobre el tejido renal debido al fenómeno de hipoxia que se mantiene y después la reperusión, lo que origina una plétora de cambios tanto de reparación como de mal adaptación en el tejido renal (Bonventre & Yang, 2011; Colombo et al., 2012; Pinheiro da Silva, AL & Vaz da Silva, 2016; Sharfuddin & Molitoris, 2011). El papel del sistema inmune durante la ERC se distingue por las células inflamatorias que favorecen la lesión renal al generar mediadores como citocinas, quimiocinas, eicosanoides, proteínas de señalización y aumento de ROS (Grabulosa et al., 2018; Wang et al., 2014; Yang et al., 2011). Estos mecanismos promueven la extravasación y adhesión de leucocitos en el endotelio activado en el que hay un incremento de E-selectina, integrinas $\beta 2$ (LFA1 y MAC1) y receptores del endotelio como ICAM 1 (Németh et al, 2020; Yang et al., 2011). La recuperación de la lesión por IR es un proceso complejo y diferentes tipos de subpoblaciones de linfocitos T pueden involucrarse en los procesos de reparación o de daño. Dentro de estos procesos, se incluye el papel que juegan las diversas poblaciones inflamatorias en eventos moleculares que dependen de la temporalidad y del grado de daño a cada órgano. Las células dendríticas son las principales células efectoras que inician la respuesta inmune en el riñón. Estas células junto con los macrófagos liberan mediadores solubles y activan directamente otras células in-

munes (Li & Okusa, 2010). Las células dendríticas pueden activar células T *naïve* y este es un mecanismo que conecta la respuesta inmune a la adaptativa con lo que se convierte en amplia y eficaz, sin embargo, un exceso de la respuesta o la resolución ineficiente de la inflamación pueden conducir a la disfunción de los órganos involucrados (Bonventre & Yang, 2011).

Por otro lado, en el presente modelo de ERC en ratones, observamos que durante la etapa temprana de la ERC se presentó una infiltración importante de células inflamatorias hacia el corazón, por ejemplo, a las 72 h post-IR hubo una infiltración de células dendríticas, linfocitos TCD4+ y neutrófilos (Fig. 14C) y a las 120 h se mantuvo el incremento de estas mismas células (Fig. 14D), lo que indica que hay una inflamación sostenida en el corazón y que es importante descubrir cuál es el origen, función y señalización de las células asociadas y las zonas o células cardíacas principalmente afectadas. Se sabe que durante la falla cardíaca no isquémica hay altos números de células T circulantes y subconjuntos de células T efectoras que promueven inflamación sistémica y remodelación cardíaca. Las células T humanas producidas durante la falla cardíaca no isquémica se activan e interactúan con células endoteliales vasculares *in vitro* y se infiltran en el ventrículo izquierdo *in vivo*. Se conoce que este mecanismo se produce por la secreción de citocinas como TNF α e IFN- γ que podrían contribuir a la disfunción cardíaca (Nevers et al., 2015).

Como se mencionó anteriormente, la liberación de moléculas inflamatorias renales desencadena mecanismos de recuperación y daño durante la fisiopatología de la ERC y cabe destacar que esto incide en el sistema cardiovascular (Ma et al.,

2013). Un ejemplo de esto es la citocina TNF que activa diferentes vías como; la transcripción de genes relacionados con receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDL), el incremento en la expresión proteica de fosfatasa alcalina y la reducción de la expresión de la actina de músculo liso α (α -SMA) (Swirski & Nahrendorf, 2018). Estos procesos se acompañan de la infiltración de leucocitos dentro de vasos sanguíneos, la acción directa de toxinas urémicas (un fenómeno que conduce a la proliferación de VSMC), liberación de metaloproteinasas de la ME, fragmentación de elastina, degradación de colágena, calcificación vascular y rigidez arterial que inciden de forma directa en el desarrollo de daño cardiovascular (Kumar et al., 2014; Ma et al., 2013; Zanolli et al., 2019). A diferencia de estos antecedentes, en el presente modelo no hicimos un daño directo al corazón que pudiera explicar los cambios inflamatorios en el tejido cardiaco por lo que proponemos que existe una comunicación sistémica bidireccional de moléculas inflamatorias hacia el tejido renal y cardiaco que podría influenciar cambios en las diferentes poblaciones celulares cardiacas. En relación con esto, en algunos estudios se ha determinado el papel de autoantígenos cardiacos (Swirski & Nahrendorf, 2018) que inducen la respuesta de las células T y que se pueden dirigir contra proteínas mitocondriales (Cordero-Reyes et al., 2016), sin embargo, una parte importante de evaluar sería cuál es el origen de estos autoantígenos, si tienen función de reparación, de destrucción o la posterior muerte de las células dañadas. También se han propuesto mecanismos biomecánicos tradicionales, por ejemplo, que el corazón y los riñones producen citocinas proinflamatorias en respuesta a neurohormonas (noradrenalina, angiotensina II, endotelina-1, BNP, IL-

1 β , receptor soluble de IL-2 y TNF- α) (Coma-Canella et al., 2005) y activación simpática, sin embargo, no todos estos cambios han logrado explicar la conexión inflamatoria cardiorrenal. Finalmente, se han propuesto factores no biomecánicos como la congestión venosa y de tejidos debido a la sobrecarga en el volumen y que son importantes debido a que estimulan la absorción de endotoxinas, como LPS derivadas de bacterias intestinales, que pasan hacia células endoteliales dañadas y esto conduce a la síntesis periférica y liberación de mediadores proinflamatorios (Colombo et al., 2012), sin embargo, en nuestro modelo de ERC aunado a la respuesta inflamatoria temprana que observamos no se ha dilucidado de forma clara la conexión inflamatoria renal debido a que se necesita de otros estudios moleculares o inmunohistopatológicos más específicos que nos permitan evaluar si las células llegan desde una misma fuente, o bien si los mediadores inflamatorios del riñón actúan directamente sobre el corazón u otros órganos estrechamente relacionados.

Posterior a los hallazgos anteriores de infiltración temprana de células inflamatorias al corazón, decidimos evaluar si al eliminar a los neutrófilos (una de las poblaciones que más se infiltraron en el corazón en etapas tempranas de la ERC), se prevenían algunas de las alteraciones cardiacas observadas. Primero se determinó que la urea en plasma disminuyó (Fig. 15A) y que la creatinina tuvo una tendencia a reducirse (Fig. 15B), pero este efecto no fue significativo, lo que sugiere que hubo una respuesta benéfica parcial en la función renal, sin embargo, se necesitaría un análisis más profundo para observar el daño o beneficio claros hacia la función renal. Segundo, al hacer la eliminación temprana de neutrófilos hubo una disminución de la ex-

presión renal de proteínas como colágena I, fibronectina y α -SMA, efectos que indican la prevención de fibrosis renal y de forma adicional, los niveles de TGF- β , PDGF y PAI-1 incrementaron en ambos grupos de ERC sin observarse el beneficio de la depleción de neutrófilos que se vio en los genes profibróticos anteriormente mencionados. Tercero, se observó que en el contexto cardiaco hubo un incremento en la expresión de α -SMA y PDGF en los animales con ERC y que de forma similar al riñón, los niveles de TGF- β incrementaron en ambos grupos de ERC tanto con eliminación de neutrófilos como sin eliminación de estos y los niveles de BNP disminuyeron parcialmente pero no fueron significativos, todo en conjunto indica que la inflamación mediada por neutrófilos participa de forma importante en la aparición de fibrosis y disfunción cardiaca.

El corazón es un órgano que en condiciones normales se encuentra desprovisto de células inflamatorias a excepción de unos cuantos monocitos por lo que la infiltración de otras células inflamatorias es un indicador de procesos de daño importantes (Usher et al., 2010). Las células inmunes producen enzimas proteolíticas que ayudan a digerir tejido muerto y liberan citocinas inflamatorias como IL-1, TNF e IL-6, lo cual amplifica aun más la inflamación a través de sus efectos en leucocitos, células endoteliales y cardiomiocitos (Cordero-Reyes et al., 2016). En este contexto, se observó que al depletar a los neutrófilos en etapas tempranas de la ERC, se previnieron varios de sus efectos patológicos en el corazón como fibrosis y disfunción, sin embargo, esto es una observación que debe estudiarse con más detalle en el corazón debido a que se sabe que al inicio de la inflamación el papel de los neutrófilos y mo-

nocitos es limpiar los productos necróticos y apoptóticos de los cardiomiocitos pero al desregularse el proceso, se convierte en una fuente de producción constante de citocinas, quimiocinas y activación de señales de apoptosis y necrosis de cardiomiocitos. Este proceso inflamatorio activo también involucra varios receptores “scavenger”, entre ellos la tirosin- proteína quinasa MER (MERKT) y las células inmunes también limpian DNA liberado por cardiomiocitos muertos algo que se logra a través del factor- interferón regulador-3 (IRF3), (Swirski & Nahrendorf, 2018). Además, en el modelo de daño cardíaco por isquemia, se sabe que los mastocitos liberan gránulos y los macrófagos residentes y los cardiomiocitos comienzan a producir citocinas inflamatorias como IL-1 e IL-6 y quimiocinas como CCL-2/MCP-1. Los fibroblastos cardíacos liberan factores de crecimiento hematopoyéticos como GM-CSF y las células endoteliales se activan (Swirski & Nahrendorf, 2018). Los eventos mencionados, inducen la producción a larga escala y reclutamiento de neutrófilos y monocitos principalmente provenientes de células progenitoras hematopoyéticas en la médula ósea. Las células madre mesenquimales en la médula ósea y las células B periféricas liberan quimiocinas atrayentes de neutrófilos y de monocitos, tales como: CCL2/MCP-1 y CCL7, las cuales movilizan neutrófilos y monocitos a la sangre en grandes cantidades. Este proceso funciona como un factor de riesgo independiente para eventos cardiovasculares en humanos (Swirski & Nahrendorf, 2018). Después de que la señalización proinflamatoria se suprime; las subpoblaciones de macrófagos, mastocitos y linfocitos activan respuestas fibrogénicas y angiogénicas que contribuyen al proceso de reparación. La activación crónica y desmedida de las células inmunes puede promover fibrosis e hipertrofia (Okyere & Tilley, 2020), dos de las alteraciones cardíacas

que se pudieron observar en el modelo de ERC inducida por IR y que se previnieron en los animales a los que se les eliminaron los neutrófilos en etapas tempranas de la ERC (Figura 15).

En otros estudios se ha determinado que la fase inflamatoria de recuperación está dominada por la desaparición de neutrófilos y la aparición de macrófagos Ly6C, la disminución de citocinas inflamatorias, factores de crecimiento y quimiocinas. Estos cambios ocurren gracias a señales intrínsecas como NR4A1 (nuclear receptor sub-family 4 group A member 1) que se produce por células T reguladoras, lo cual ayuda a los macrófagos a la transición hacia un fenotipo de reparación al amortiguar la expresión de IL-6, TNF y la metaloproteínasa MMP9 (Swirski & Nahrendorf, 2018). La consecuencia de este cambio es que la transición en el fenotipo hacia los macrófagos cardíacos reparadores es que producen TGF- β y VEGF que promueven fibrosis y angiogénesis que se indican como algunos de los mecanismos asociados con remodelación y fibrosis cardíaca. Este tipo de información conduce a pensar que el desarrollo de estrategias de eliminación de células inflamatorias o de las moléculas que estas liberan son efectivas para prevenir la alteración crónica de los órganos en diferentes enfermedades, por ejemplo, en un estudio de Cordero-Reyes et al, 2016; se eliminaron las células B en un modelo de falla cardíaca inducida por angiotensina II y se observó que hubo menos hipertrofia, deposición de colágena, preservación de la función ventricular izquierda y, que en relación con estos cambios, hubo una reducción en la expresión de citocinas proinflamatorias, deposición de inmunoglobulina G y apoptosis del miocardio (Cordero-Reyes et al., 2016). En otro estudio de Wang et al.,

2014, en el que se utilizó un modelo de fibrosis cardiaca inducida por angiotensina II, se observó que la inhibición del receptor tipo toll- 2 (TLR2) con una estrategia *knock out*, atenuó el reclutamiento de macrófagos y la respuesta inflamatoria en el corazón con lo que se previno el desarrollo de fibrosis mediada por una respuesta inflamatoria exacerbada (Wang et al., 2014). En otro estudio de Grabie, et al., 2003, se mostró que las células Ly6G+, contribuyen al desarrollo de miocarditis y que causan daño cardiaco al promover la contribución adicional de células T CD8+ que persisten hacia etapas crónicas y que empeoran el resultado cardiovascular, sin embargo, cuando hicieron la depleción de las células T CD8+ se previno la falla cardiaca al mejorar el resultado de mecanismos estructurales, funcionales y moleculares (Grabie et al., 2003). Todo esto destaca que la inflamación es actualmente un mecanismo que resulta importante estudiar para conocer mejor los mecanismos patológicos de desarrollo de daño cardiovascular en la ERC y además en el desarrollo de maniobras terapéuticas que puedan ser utilizadas efectivamente en el campo de la medicina.

9.3 Análisis de las modificaciones transcriptómicas cardiacas de los animales con ERC en etapa temprana

Posterior a la observación de células inflamatorias en la fase temprana de la ERC, en este estudio se realizó un análisis del estado transcripcional en el corazón durante la ERC en etapa temprana con un análisis de RNA-Seq y este mostró que

los genes relacionados con procesos inflamatorios se encuentran entre las principales vías activadas. El análisis de enriquecimiento funcional (gene ontology), mostró que los procesos biológicos más enriquecidos probablemente activados en el tejido cardiaco durante la ERC en etapa temprana son relacionados a la respuesta inflamatoria y de los 20 procesos más enriquecidos que se encontraron, los primeros cinco procesos biológicos que cambiaron se vinculan con la “respuesta inmune”, se conocen como vías modificadas relacionadas principalmente con procesos del sistema inmune, respuesta de defensa, respuesta a citocinas, respuesta inmune, entre otras, algo que destaca que en etapas tempranas de la ERC ya se presentan cambios importantes a nivel transcriptómico en el sistema inmune (Fig. 19 A y 19 B).

La contribución de la inflamación al daño cardiaco se ha visto en distintos modelos de daño cardiaco como infarto miocárdico, lesiones hipertensivas, sobrecarga de la presión, miocarditis, en las cuales el desarrollo de fibrosis ha sido al menos parcialmente atribuida al incremento en la infiltración de células inflamatorias (Bacmeister et al., 2019; Bradshaw & DeLeon-Pennell, 2020; Lindsey et al., 2020; Patel et al., 2018; Unudurthi et al., 2020) El papel de la inflamación en la remodelación cardiaca se ha observado en algunos estudios experimentales, por ejemplo, en la ERC que surge como consecuencia de la nefrectomía subtotal hay un incremento en las células CD68⁺ cardiacas y en la elevación de TNF- α , IL-6 y MCP-1 en el corazón (Chang et al., 2015).

Además, en un modelo clásico de fibrosis cardiaca por administración de angiotensina II, la remodelación cardiaca se previno al inhibir la infiltración de células

proinflamatorias, algo que muestra el importante papel de las células inflamatorias en el proceso fibrótico (Wang et al., 2014). Adicionalmente, en este trabajo se reporta que la regulación al alza de la transcripción de genes relacionados con la respuesta a interferón (*Irf7*), de la quimiocina (*Ccl8*), de la molécula de señalización inflamatoria (*Stat2*) y la molécula de adhesión (*Itgb7*) (Fig. 21), son importantes en el proceso inflamatorio cardiaco durante la ERC por lo que para conocer el papel benéfico o deletéreo de las células mieloides y la infiltración de macrófagos al tejido cardiaco merece investigación adicional.

Existe además evidencia clínica que apoya un papel de los mediadores inflamatorios en la cardiomiopatía urémica. Los estudios demuestran que la ERC se asocia con la elevación de niveles de citocinas proinflamatorias en plasma (Amdur et al., 2016; Amdur et al., 2016; Santoro & Mancini, 2002). En pacientes con hemodiálisis que se dividieron de acuerdo con la historia de eventos cardiovasculares, los pacientes urémicos mostraron una disminución en células Tregs y citocinas como IL-10 y TFG- β , así como un incremento en las células Th17 periféricas y citocinas Th17 como IL-17, IL-6 e IL-23, comparado con voluntarios sanos normales (J. Zhang et al., 2010). El surgimiento de herramientas genómicas ha permitido descifrar los cambios a nivel molecular y esto se ha tratado de explotar en herramientas como la terapia génica y el desarrollo de estrategias a nivel molecular como los micro-RNAs o RNAs de interferencia, sin embargo, esto es un avance importante que se debe desarrollar con más profundidad para la utilización en la parte clínica.

Las quimiocinas CXC contienen el motivo ácido glutámico-leucina-arginina (ELR) que atrae neutrófilos, mientras que las quimiocinas CC median el reclutamiento de subpoblaciones de células mononucleares que participan en el “clearance” de células muertas y restos de matriz extracelular (B. Chen & Frangogiannis, 2017). El incremento de diferentes quimiocinas es responsable del aumento en las células inflamatorias infiltradas al corazón, un evento que coincide con el hallazgo del RNA-Seq en las quimiocinas Ccl8 y Cxcl10 en etapas tempranas de la ERC, algo que sugiere que el incremento de estas citocinas y su movilización hemodinámica podría favorecer el reclutamiento de células inflamatorias hacia el corazón como se observó en la infiltración de células inmunes desde etapas muy tempranas de la enfermedad.

Modificaciones epigenéticas cardíacas durante la ERC en etapa temprana.

Por otra parte, existe evidencia reciente que sugiere que estímulos como el estrés podrían inducir modificaciones epigenéticas que inducen cambios en la expresión génica que conducen a alteraciones y disfunción (Liu & Tang, 2019). La metilación del DNA ha llegado a constituirse como una de las marcas epigenéticas más estudiadas y se involucra con la activación o silenciamiento transcripcional de genes por lo que juega un papel importante en el desarrollo de los mamíferos y durante situaciones patológicas (Lan & Evans, 2019). En la actualidad el estudio de las modificaciones epigenéticas en la enfermedad cardiovascular ha tenido relevancia para la búsqueda de blancos terapéuticos en la enfermedad cardiovascular, sin embargo, esto aún representa desafíos importantes en el conocimiento preciso de los mecanismos involucrados ya que la inhibición o activación de los reguladores puede tener efectos pleiotrópicos debidos a la acción general de los mecanismos de regulación y por otro lado, a la cantidad de células presentes en el corazón y sus funciones específicas (Liu & Tang, 2019). En el presente estudio, se evaluaron los patrones de metilación que surgen como consecuencia del ambiente urémico o el medio inflamatorio observado en la ERC temprana. Se encontró la metilación diferencial de 104 regiones y en particular en algunos genes de la función cardíaca. De forma interesante, se encontró la expresión reducida de la expresión de mRNA de *Hcn4*, *Wwtr1* y *SerpinF2* (Fig. 24), lo cual fue consistente con el estado de hipermetilación del DNA en regiones cercanas a estos genes (Fig.23). *Hcn4* es importante en el tejido cardíaco, específicamente en el nodo sinoauricular donde es altamente expresado y contribuye a

las corrientes de la actividad como marcapasos y a la regulación de la tasa y ritmicidad del seno (Brown et al, 1979; Milanesi et al., 2006). En algunos estudios se ha visto que las mutaciones en el gen *Hcn4* se asocian con arritmias cardiacas por medio de la alteración eléctrica cardiaca (Milanesi et al., 2006; Schulze-bahr et al., 2003). *Wwtr1*, un efector nuclear de la vía *hippo* se ha reportado que participa en la trabeculación cardiaca y en la maduración de la pared cardiaca (Lai et al., 2018), aunado a que este gen es un regulador del metabolismo de los cardiomiocitos durante las condiciones de estrés y falla cardiaca (Kashihara & Sadoshima, 2019). Los niveles de *SerpinF2* se han asociado con la ocurrencia de la falla cardiaca (Zhang et al., 2016) por lo que la expresión reducida de estos genes observada desde etapas tempranas de la ERC en el corazón podría contribuir a la lesión cardiovascular a través de alteraciones en la conductividad, estructura y anomalías del miocardio.

La metilación diferencial de citocinas en genes que participan en inflamación, fibrosis de tejidos, muerte celular, remodelación cardiaca, estructura de sarcómeros, crecimiento de cardiomiocitos y diferenciación, ha sido detectada en un modelo de cardiomiopatía dilatada ratones (Tabish et al., 2019). En otro estudio, al utilizar una plataforma de secuenciación por bisulfito se demostró que pacientes masculinos con falla cardiaca de diferentes causas incluyendo cardiomiopatía obstructiva hipertrófica, cardiomiopatía isquémica y cardiomiopatía dilatada, los autores identificaron dos genes hipermetilados relacionados a desarrollo (*HEY2*) y la respuesta inflamatoria (*MSR1*) y dos genes hipometilados relacionados con la estabilidad de la matriz extracelular (*CTGF* y *MMP2*) (Glezeva et al., 2019). Además, en pacientes con infarto in-

cidente del miocardio, se encontró una huella epigenética que se compuso de nueve genes metilados diferencialmente. De estos genes dos se relacionaron con enfermedad cardiovascular *KCNN1* y *LRP8* (Ward-Caviness et al., 2018).

Otra relación importante entre las modificaciones epigenéticas y la inflamación es el papel que juegan en contextos como la regulación puesto que en lesiones de células del músculo liso (VSMC) que reclutan neutrófilos durante la formación de placas arterioscleróticas, los neutrófilos se someten a NETosis y la Histona H4 derivada de NET causa la lisis de VSMC y se desestabiliza la placa arteriosclerótica por lo que se sugiere que estas pueden tratarse utilizando un inhibidor de esta histona H4 y esto destaca que la información obtenida de estudios epigenéticos es una clave importante en el desarrollo de estrategias enfocadas en diversas patologías (Németh et al., 2020).

10. CONCLUSIÓN

En el presente trabajo, se mostró que la progresión de la ERC en ratas se asocia con alteraciones cardiacas tales como, hipertrofia, fibrosis, estrés oxidante e incremento en los niveles de BNP, los cuales fueron acompañados por un incremento en la fosforilación de eNOS en el sitio inactivante de la eNOS (Tre-495) y la reducción en la interacción de eNOS-Hsp 90 α y la forma dimérica de la enzima; efectos que se previnieron con la administración de L-arginina. El desarrollo de disfunción endotelial (mediada por la alteración de la eNOS), la infiltración temprana de células

inflamatorias, la activación del endotelio y las modificaciones en los patrones de metilación desde etapas tempranas de la ERC son desencadenantes potenciales de hipertrofia, fibrosis y remodelación cardíaca.

Durante los estados iniciales de la ERC hay una regulación al alza de genes estrechamente relacionados con la respuesta inflamatoria, entre ellos quimiocinas, moléculas de adhesión y genes de respuesta a interferón. Esta marca transcriptómica se asocia con la infiltración de células inflamatorias hacia el corazón como neutrófilos, linfocitos T y células dendríticas. Además, se descubrió que la metilación diferencial de citocinas en regiones cercanas a genes que influyen en la función cardíaca y que el estado de hipermetilación correlaciona con la expresión reducida del mRNA de genes como *Hcn4*, *Wwtr1* y *SerpinF2*. Todos estos datos muestran que el tejido cardíaco sufre de cambios transcriptómicos, epigenéticos e inflamatorios tempranos durante etapas tempranas de la ERC que podrían ser desencadenantes del daño cardíaco inducido por la ERC y que representan blancos terapéuticos que ameritan investigación adicional.

BIBLIOGRAFÍA

- Adejare, A., Oloyo, A., Anigbogu, C., & Jaja, S. (2020). L-arginine Supplementation Increased Only Endothelium-Dependent Relaxation in Sprague-Dawley Rats Fed a High-Salt Diet by Enhancing Abdominal Aorta Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Expression. *Clinical Medicine Insights: Cardiology*, 14. <https://doi.org/10.1177/1179546820902843>
- Amador-Martínez, I., Pérez-Villalva, R., Uribe, N., Cortés-González, C., Bobadilla, N. A., & Barrera-Chimal, J. (2019). Reduced endothelial nitric oxide synthase activation contributes to cardiovascular injury during chronic kidney disease progression. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, ajprenal.00020.2019. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00020.2019>
- Amdur, R. L., Feldman, H. I., Gupta, J., Yang, W., Kanetsky, P., Shlipak, M., ... Raj, D. S. (2016). Inflammation and progression of CKD: The CRIC study. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 11(9), 1546–1556. <https://doi.org/10.2215/CJN.13121215>
- Amdur, R. L., Mukherjee, M., Go, A., Barrows, I. R., Ramezani, A., Shoji, J., ... Townsend, R. R. (2016). Interleukin-6 is a risk factor for atrial fibrillation in chronic kidney disease: Findings from the CRIC study. *PLoS ONE*, 11(2), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148189>
- Bacmeister, L., Schwarzl, M., Warnke, S., Stoffers, B., Blankenberg, S., Westermann, D., & Lindner, D. (2019). *Inflammation and fibrosis in murine models of heart failure*. *Basic Research in Cardiology* (Vol. 114). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/s00395-019-0722-5>
- Bansal, S. S., Ismahil, M. A., Goel, M., Hamid, T., Rokosh, G., & Prabhu, S. D. (2018). Activated T-Lymphocytes are Essential Drivers of Pathological Remodelling in Ischemic Heart Failure. *Circulation: Heart Failure*, 10(3), 1–23. <https://doi.org/doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.116.003688>

- Barrera-Chimal, J., Estrela, G. R., Lechner, S. M., Giraud, S., El Moghrabi, S., Kaaki, S., ... Jaisser, F. (2018). The myeloid mineralocorticoid receptor controls inflammatory and fibrotic responses after renal injury via macrophage interleukin-4 receptor signaling. *Kidney International*, 93(6), 1344–1355. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.12.016>
- Barrera-Chimal, J., Pérez-Villalva, R., Cortés-González, C., Ojeda-Cervantes, M., Gamba, G., Morales-Buenrostro, L. E., & Bobadilla, N. A. (2011). Hsp72 is an early and sensitive biomarker to detect acute kidney injury. *EMBO Molecular Medicine*, 3(1), 5–20. <https://doi.org/10.1002/emmm.201000105>
- Barrera-Chimal, J., Perez-Villalva, R., Ortega, J. A., Uribe, N., Gamba, G., Cortes-Gonzalez, C., & Bobadilla, N. A. (2014). Intra-renal transfection of heat shock protein 90 alpha or beta (Hsp90 or Hsp90) protects against ischemia/reperfusion injury. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 29(2), 301–312. <https://doi.org/10.1093/ndt/gft415>
- Barrera-Chimal, J., Pérez-Villalva, R., Rodríguez-Romo, R., Reyna, J., Uribe, N., Gamba, G., & Bobadilla, N. a. (2013). Spironolactone prevents chronic kidney disease caused by ischemic acute kidney injury. *Kidney International*, 83(1), 93–103. <https://doi.org/10.1038/ki.2012.352>
- Barrera-Chimal, J., Rocha, L., Amador-Martínez, I., Pérez-Villalva, R., González, R., Cortés-González, C., ... Bobadilla, N. A. (2018). Delayed spironolactone administration prevents the transition from acute kidney injury to chronic kidney disease through improving renal inflammation. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 1–8. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfy246>
- Baylis, C. (2008). Nitric oxide deficiency in chronic kidney disease. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 294(1). <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00424.2007>
- Bogdanova, E. A., Barsova, E. V., Shagina, I. A., Scheglov, A., Anisimova, V., Vagner, L. L., ... Shagin, D. A. (2011). Normalization of Full-Length-Enriched cDNA. In C.

- Lu, J. Browse, & J. G. Wallis (Eds.), *cDNA Libraries: Methods and Applications* (pp. 85–98). Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-065-2_6
- Bonventre, J. V., & Yang, L. (2011). Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Journal of Clinical Investigation*, *121*(11), 4210–4221. <https://doi.org/10.1172/JCI45161>
- Bradshaw, A. D., & DeLeon-Pennell, K. Y. (2020). T-cell regulation of fibroblasts and cardiac fibrosis. *Matrix Biology*, *91–92*, 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2020.04.001>
- Brown, H. F., DiFrancesco, D., & Noble, S. J. (1979). How does adrenaline accelerate the heart? *Nature*, *280*(5719), 235–236. <https://doi.org/10.1038/280235a0>
- Bucaloiu, I. D., Kirchner, H. L., Norfolk, E. R., Hartle, J. E., & Perkins, R. M. (2012). Increased risk of death and de novo chronic kidney disease following reversible acute kidney injury. *Kidney International*, *81*(5), 477–485. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.405>
- Butler, M. J., Ramnath, R., Kadoya, H., Desposito, D., Riquier-Brison, A., Ferguson, J. K., ... Satchell, S. C. (2018). Aldosterone induces albuminuria via matrix metalloproteinase–dependent damage of the endothelial glycocalyx. *Kidney International*. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2018.08.024>
- Cachofeiro, V., Goicochea, M., De Vinuesa, S. G., Oubã, P., Lahera, V., & Lũo, J. (2008). Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. *Kidney International*, *74*(SUPPL. 111). <https://doi.org/10.1038/ki.2008.516>
- Chang, D., Wang, Y.-C. C., Zhang, S.-J. J., Bai, Y.-Y. Y., Liu, D.-F. F., Zang, F.-C. C., ... Ju, S. (2015). Visualizing myocardial inflammation in a rat model of type 4 cardiorenal syndrome by dual-modality molecular imaging. *Biomaterials*, *68*, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.07.050>

- Chatterjee, S. (2018). Endothelial mechanotransduction, redox signaling and the regulation of vascular inflammatory pathways. *Frontiers in Physiology*, 9(JUN), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00524>
- Chen, B., & Frangogiannis, N. G. (2017). Immune cells in repair of the infarcted myocardium. *Microcirculation*, 24(1). <https://doi.org/10.1111/micc.12305>
- Chen, Y., Jiang, B., Zhuang, Y., Peng, H., & Chen, W. (2017). Differential effects of heat shock protein 90 and serine 1179 phosphorylation on endothelial nitric oxide synthase activity and on its cofactors. *PLOS ONE*, 12(6), e0179978. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179978>
- Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. (2013). Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. *Kidney International Supplements*, 3(1), 1–150. Retrieved from https://kdigo.org/wp-content/uploads/2017/02/KDIGO_2012_CKD_GL.pdf
- Colombo, P. C., Ganda, A., Lin, J., Onat, D., Harxhi, A., Iyasere, J. E., ... Cotter, G. (2012a). Inflammatory activation: cardiac, renal, and cardio-renal interactions in patients with the cardiorenal syndrome. *Heart Failure Reviews*, 17(2), 177–190. <https://doi.org/10.1007/s10741-011-9261-3>
- Colombo, P. C., Ganda, A., Lin, J., Onat, D., Harxhi, A., Iyasere, J. E., ... Cotter, G. (2012b). Inflammatory activation: cardiac, renal, and cardio-renal interactions in patients with the cardiorenal syndrome. *Heart Failure Reviews*, 17(2), 177–190. <https://doi.org/10.1007/s10741-011-9261-3>
- Coma-Canella, I., Macías, A., Varo, N., & Sánchez Ibarrola, A. (2005). Neurohormonas y citocinas en la insuficiencia cardíaca. Correlación con la reserva de flujo coronario. *Revista Espanola de Cardiología*, 58(11), 1273–1277. [https://doi.org/10.1016/S1885-5857\(06\)60414-3](https://doi.org/10.1016/S1885-5857(06)60414-3)
- Cordero-Reyes, A. M., Youker, K. A., Trevino, A. R., Celis, R., Hamilton, D. J., Flores-Arredondo, J. H., ... Torre-Amione, G. (2016). Full expression of cardiomyopathy

is partly dependent on B-cells: A pathway that involves cytokine activation, immunoglobulin deposition, and activation of apoptosis. *Journal of the American Heart Association*, 5(1), 1–12. <https://doi.org/10.1161/JAHA.115.002484>

Daiber, A., Xia, N., Steven, S., Oelze, M., Hanf, A., Kröller-Schön, S., ... Li, H. (2019). *New Therapeutic Implications of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) Function/Dysfunction in Cardiovascular Disease. International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20). <https://doi.org/10.3390/ijms20010187>

Dasgupta, A., & Wahed, A. (2014). Cardiac Markers. *Clinical Chemistry, Immunology and Laboratory Quality Control*, 127–144. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-407821-5.00008-5>

Dobrian, A. D. (2012). ADMA and NOS regulation in chronic renal disease: Beyond the old rivalry for L-arginine. *Kidney International*, 81(8), 722–724. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.496>

Draws, P., & Mahboob, R. (2015). Chronic Kidney Disease. *Annals of Internal Medicine*. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-146-1-200701020-00014>

Draws, P., & Rahman, M. (2010). Chronic Kidney Disease. *Current Clinical Medicine*, 1–14. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-6643-9.00132-6>

Elhafeez, S. A., Bolignano, D., Arrigo, G. D., Dounousi, E., Tripepi, G., & Zoccali, C. (2018). Prevalence and burden of chronic kidney disease among the general population and high-risk groups in Africa: a systematic review. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2016-015069>

Ferenbach, D. A., & Bonventre, J. V. (2015). Mechanisms of maladaptive repair after AKI leading to accelerated kidney ageing and CKD. *Nature Reviews Nephrology*, 11(5), 264–276. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2015.3>

Flaherty, M. P., Brown, M., Grupp, I. L., Schultz, J. El, Murphree, S. S., & Jones, W. K. (2007). eNOS deficient mice develop progressive cardiac hypertrophy with altered cytokine and calcium handling protein expression. *Cardiovascular*

Toxicology, 7(3), 165–177. <https://doi.org/10.1007/s12012-007-0028-y>

Fox, B. M., Gil, H. W., Kirkbride-Romeo, L., Bagchi, R. A., Wennersten, S. A., Haefner, K. R., ... Faubel, S. (2019). Metabolomics assessment reveals oxidative stress and altered energy production in the heart after ischemic acute kidney injury in mice. *Kidney International*. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2018.10.020>

Glezeva, N., Moran, B., Collier, P., Moravec, C. S., Phelan, D., Donnellan, E., ... Watson, C. J. (2019). Targeted DNA Methylation Profiling of Human Cardiac Tissue Reveals Novel Epigenetic Traits and Gene Deregulation Across Different Heart Failure Patient Subtypes. *Circulation: Heart Failure*, 12(3), 1–6. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.118.005765>

Grabie, N., Hsieh, D. T., Buono, C., Westrich, J. R., Allen, J. A., Pang, H., ... Lichtman, A. H. (2003). Neutrophils Sustain Pathogenic CD8+ T Cell Responses in the Heart. *American Journal of Pathology*, 163(6), 2413–2420. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63596-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63596-1)

Grabulosa, C. C., Manfredi, S. R., Canziani, M. E., Quinto, B. M. R., Barbosa, R. B., Rebello, J. F., ... Dalboni, M. A. (2018). Chronic kidney disease induces inflammation by increasing Toll-like receptor-4, cytokine and cathelicidin expression in neutrophils and monocytes. *Experimental Cell Research*, 365(2), 157–162. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.02.022>

Hambrecht, R., Hilbrich, L., Erbs, S., Gielen, S., Fiehn, E., Schoene, N., & Schuler, G. (2000). Correction of endothelial dysfunction in chronic heart failure: Additional effects of exercise training and oral L-arginine supplementation. *Journal of the American College of Cardiology*, 35(3), 706–713. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(99\)00602-6](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(99)00602-6)

Henry, R. J., Sobel, C., & Segalove, M. (1956). Turbidimetric Determination of Proteins with Sulfosalicylic and Trichloroacetic Acids. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 92(4), 748–751. <https://doi.org/10.3181/00379727-92-22601>

- Hu Peng, Yugang Zhuang, Mark C. Harbeck, Donghong He, Lishi Xie, W. C. (2015). Serine 1179 Phosphorylation of Endothelial Nitric Oxide Synthase Increases Superoxide Generation and Alters Cofactor Regulation. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087495>
- Jager, K. J., Kovesdy, C., Langham, R., Rosenberg, M., Jha, V., & Zoccali, C. (2019). A single number for advocacy and communication—worldwide more than 850 million individuals have kidney diseases. *Kidney International*, *96*(5), 1048–1050. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2019.07.012>
- Jonatan, B.-C., Rocha, L., Amador-Martínez, I., Pérez-Villalva, R., González, R., Cortés-González, C., ... Bobadilla, N. A. (2018). Delayed spironolactone administration prevents the transition from acute kidney injury to chronic kidney disease through improving renal inflammation. *Nephrology Dialysis Transplantation*. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfy246>
- Jourde-Chiche, N., Fakhouri, F., Dou, L., Bellien, J., Burtey, S., Frimat, M., ... Roumenina, L. T. (2019). Endothelium structure and function in kidney health and disease. *Nature Reviews Nephrology*, *15*(2), 87–108. <https://doi.org/10.1038/s41581-018-0098-z>
- Jourde-Chiche, N., Fakhouri, F., Dou, L., Bellien, J., Stéphane, B., Frimat, M., ... Roumenina, L. T. (2019). Endothelium structure and function in kidney health and disease. *NATURE REVIEWS NEPHROLOGY*, *15*, 87–108. <https://doi.org/10.1038/s41581-018-0098-z>
- Karthiek Narala, T. L. (2012). Type 4 Cardiorenal Syndrome: Myocardial Dysfunction, Fibrosis, and Heart Failure in Patients with Chronic Kidney Disease. *Journal of Clinical & Experimental Cardiology*, *03*(04). <https://doi.org/10.4172/2155-9880.1000186>
- Karthiek Narala, T. L., Larsen, T., Narala, K., & McCullough, P. A. (2012). Type 4 Cardiorenal Syndrome: Myocardial Dysfunction, Fibrosis, and Heart Failure in Patients with Chronic Kidney Disease. *Journal of Clinical & Experimental*

Cardiology, 03(04). <https://doi.org/10.4172/2155-9880.1000186>

Kashihara, T., & Sadoshima, J. (2019). Role of YAP/TAZ in Energy Metabolism in the Heart. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 74(6), 483–490. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000736>

Khalaf, D., Krüger, M., Wehland, M., Infanger, M., & Grimm, D. (2019). The Effects of Oral L-Arginine and L-Citrulline Supplementation on Blood Pressure. *Nutrients*, 11(7), 1679. <https://doi.org/10.3390/nu11071679>

Kramann, R., Kusaba, T., & Humphreys, B. D. (2015). Who regenerates the kidney tubule? *Nephrology Dialysis Transplantation*, 30(6), 903–910. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfu281>

Kumar, S., Bogle, R., & Banerjee, D. (2014). Why do young people with chronic kidney disease die early? *World Journal of Nephrology*, 3(4), 143. <https://doi.org/10.5527/wjn.v3.i4.143>

Kupatt, C., Dessy, C., Hinkel, R., Raake, P., Daneau, G., Bouzin, C., Boekstegers, P., Feron, O. (2004). Heat shock protein 90 transfection reduces ischemia-reperfusion - Induced myocardial dysfunction via reciprocal endothelial NO synthase serine 1177 phosphorylation and threonine 495 dephosphorylation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(8), 1435–1441. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000134300.87476.d1>

Lai, J. K. H., Collins, M. M., Uribe, V., Jiménez-Amilburu, V., Nther, S. G., Maischein, H. M., & Stainier, D. Y. R. (2018). The hippo pathway effector Wwtr1 regulates cardiac wall maturation in zebrafish. *Development (Cambridge)*, 145(10). <https://doi.org/10.1242/dev.159210>

Lan, Y., & Evans, T. (2019). Epigenetic Regulation of Cardiac Development and Disease through DNA Methylation. *Journal of Life Sciences (Westlake Village, Calif.)*, 1(2), 1–10. Retrieved from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031938416312148>

- Lei, C., Berra, L., Rezoagli, E., Yu, B., Dong, H., Yu, S., ... Zapol, W. M. (2018). Nitric Oxide Decreases Acute Kidney Injury and Stage 3 Chronic Kidney Disease after Cardiac Surgery. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 198(10), 1279–1287. <https://doi.org/10.1164/rccm.201710-2150OC>
- Li, L., & Okusa, M. D. (2010). Macrophages, Dendritic Cells, and Kidney Ischemia-Reperfusion Injury. *Seminars in Nephrology*, 30(3), 268–277. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2010.03.005>
- Lindsey, M. L., Deleom-Pennel, K. Y., Bradshaw, A. D., Larue, R. A., Anderson, D. R., Thiele, G. M., ... Spinale, F. G. (2020). Focusing Heart Failure Research on Myocardial Fibrosis to Prioritize Translation. *Journal of Cardiac Failure*. <https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2020.05.009>
- Linthout, S. Van, & Tschöpe, C. (2017). Inflammation – Cause or Consequence of Heart Failure or Both ?, 251–265. <https://doi.org/10.1007/s11897-017-0337-9>
- Liu, C. F., & Tang, W. H. W. (2019). Epigenetics in Cardiac Hypertrophy and Heart Failure. *JACC: Basic to Translational Science*, 4(8), 976–993. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2019.05.011>
- Lu, T. M., Chung, M. Y., Lin, C. C., Hsu, C. P., & Lin, S. J. (2011). Asymmetric dimethylarginine and clinical outcomes in chronic kidney disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 6(7), 1566–1572. <https://doi.org/10.2215/CJN.08490910>
- Ma, Y., Yabluchanskiy, A., & Lindsey, M. L. (2013). Neutrophil roles in left ventricular remodeling following myocardial infarction. *Fibrogenesis and Tissue Repair*, 6(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1755-1536-6-11>
- Milanesi, R., Baruscotti, M., Gnecci-Ruscione, T., & DiFrancesco, D. (2006). Familial sinus bradycardia associated with a mutation in the cardiac pacemaker channel. *New England Journal of Medicine*, 354(2), 151–157. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa052475>

- Miller, H. I., Dascalu, A., Rassin, T. A., Wollman, Y., Chernichowsky, T., & Iaina, A. (2003). Effects of an acute dose of L-Arginine during coronary angiography in patients with chronic renal failure: A randomized, parallel, double-blind clinical trial. *American Journal of Nephrology*, 23(2), 91–95. <https://doi.org/10.1159/000068036>
- Moody, W. E., Edwards, N. C., Madhani, M., Chue, C. D., Steeds, R. P., Ferro, C. J., & Townend, J. N. (2012). Endothelial dysfunction and cardiovascular disease in early-stage chronic kidney disease: Cause or association? *Atherosclerosis*, 223(1), 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.01.043>
- Moore, P. K., Hsu, R. K., & Liu, K. D. (2018). Management of Acute Kidney Injury: Core Curriculum 2018. *American Journal of Kidney Diseases*, 72(1), 136–148. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2017.11.021>
- Moreno-Altamirano, L., García-García, J. J., Soto-Estrada, G., Capraro, S., & Limón-Cruz, D. (2014). Epidemiología y determinantes sociales asociados a la obesidad y la diabetes tipo 2 en México. *Revista Médica Del Hospital General De México*, 77(3), 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.hgmx.2014.07.002>
- Mühlstedt, S., Ghadge, S. K., Duchene, J., Qadri, F., Järve, A., Vilianovich, L., ... Bader, M. (2016). Cardiomyocyte-derived CXCL12 is not involved in cardiogenesis but plays a crucial role in myocardial infarction. *Journal of Molecular Medicine*, 94(9), 1005–1014. <https://doi.org/10.1007/s00109-016-1432-1>
- Németh, T., Sperandio, M., & Mócsai, A. (2020). Neutrophils as emerging therapeutic targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, 19(4), 253–275. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0054-z>
- Nevers, T., Salvador, A. M., Grodecki-Pena, A., Knapp, A., Velázquez, F., Aronovitz, M., ... Alcaide, P. (2015). Left Ventricular T-Cell Recruitment Contributes to the Pathogenesis of Heart Failure. *Circulation: Heart Failure*, 8(4), 776–787. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.115.002225>

- Niemczyk, S. (2015). Renal Perfusion Index Reflects Cardiac Systolic Function in Chronic Cardio-Renal Syndrome. *Medical Science Monitor*, 21, 1089–1096. <https://doi.org/10.12659/MSM.892630>
- Obi, Y., Kim, T., Kovesdy, C. P., Amin, A. N., Kalantar-Zadeh, K., & Simmons, H. (2016). Current and Potential Therapeutic Strategies for Hemodynamic Cardiorenal Syndrome Obi et al.: Current and Potential Therapeutic Strategies for Hemodynamic Cardiorenal Syndrome. *Cardiorenal Med*, 6, 83–98. <https://doi.org/10.1159/000441283>
- Ochodnický, P., De Zeeuw, D., Henning, R. H., Kluppel, C. A., & Van Dokkum, R. P. E. (2006). Endothelial function predicts the development of renal damage after combined nephrectomy and myocardial infarction. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17(SUPPL. 2), 50–53. <https://doi.org/10.1681/ASN.2005121322>
- Okyere, A. D., & Tilley, D. G. (2020). Leukocyte-Dependent Regulation of Cardiac Fibrosis. *Frontiers in Physiology*, 11(April), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00301>
- Patel, B., Bansal, S. S., Ismahil, M. A., Hamid, T., Rokosh, G., Mack, M., & Prabhu, S. D. (2018). CCR2+ Monocyte-Derived Infiltrating Macrophages Are Required for Adverse Cardiac Remodeling During Pressure Overload. *JACC: Basic to Translational Science*, 3(2), 230–244. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2017.12.006>
- Picken, M., Long, J., Williamson, G. A., & Polichnowski, A. J. (2016). Progression of Chronic Kidney Disease after Acute Kidney Injury: Role of Self-Perpetuating Versus Hemodynamic-Induced Fibrosis. *Hypertension*, 68(4), 921–928. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07749>
- Pinheiro da Silva, AL., Vaz da Silva, M. (2016). Type 4 cardorenal syndrome. *Portuguese Society of Cardiology*, 35(11), 200–209. <https://doi.org/10.1159/000356369>

- Prud'homme, M., Coutrot, M., Michel, T., Boutin, L., Genest, M., Poirier, F., ... Legrand, M. (2019). Acute Kidney Injury Induces Remote Cardiac Damage and Dysfunction Through the Galectin-3 Pathway. *JACC: Basic to Translational Science*, 4(6), 717–732. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2019.06.005>
- Puhl, S., & Steffens, S. (2019). Neutrophils in Post-myocardial Infarction Inflammation: Damage vs. Resolution? *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 6(March), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00025>
- Ramírez, R., Carracedo, J., Merino, A., Soriano, S., Ojeda, R., Alvarez-Lara, M. A., ... Aljama, P. (2011). CD14+CD16+ monocytes from chronic kidney disease patients exhibit increased adhesion ability to endothelial cells. *Contributions to Nephrology*, 171, 57–61. <https://doi.org/10.1159/000327134>
- Ratliff, B. B., Abdulmahdi, W., Pawar, R., & Wolin, M. S. (2016). Oxidant Mechanisms in Renal Injury and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 25(3), 119–146. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6665>
- Reddy, Y., Rao, P. V. L. Ns., Sivakumar, V., Bitla, A., Kiranmayi, V., & Krishna, G. (2014). Nitric oxide status in patients with chronic kidney disease. *Indian Journal of Nephrology*, 25(5), 287. <https://doi.org/10.4103/0971-4065.147376>
- Rubattu, S., Mennuni, S., Testa, M., Mennuni, M., Pierelli, G., Pagliaro, B., ... Volpe, M. (2013). Pathogenesis of Chronic Cardiorenal Syndrome: Is There a Role for Oxidative Stress? *International Journal of Molecular Sciences*, 14(11), 23011–23032. <https://doi.org/10.3390/ijms141123011>
- Santoro, A., & Mancini, E. (2002). Cardiac effects of chronic inflammation in dialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 17(SUPPL. 8), 10–15. https://doi.org/10.1093/ndt/17.suppl_8.10
- Saurabh, L., Dhimant, D., Rajeev, M., Madhu, B., Krishna, R., Guohua, D. y Pravin, C. (2002). Angiotensin II-Induced Mesangial Cell Apoptosis: Role of Oxidative Stress. *Molecular Medicine*, 8(12), 830–840.

- Schneider, R., Raff, U., Vornberger, N., Schmidt, M., Freund, R., Reber, M., ... Galle, J. (2003). L-arginine counteracts nitric oxide deficiency and improves the recovery phase of ischemic acute renal failure in rats. *Kidney International*, 64(1), 216–225. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00063.x>
- Schulze-bahr, E., Pongs, O., Isbrandt, D., Schulze-bahr, E., Neu, A., Friederich, P., ... Isbrandt, D. (2003). Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease Find the latest version : with sinus node disease, 111(10), 1537–1545. <https://doi.org/10.1172/JCI200316387>.Introduction
- Sharfuddin, A. A., & Molitoris, B. A. (2011). Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nature Reviews Nephrology*, 7(4), 189–200. <https://doi.org/10.1038/hrneph.2011.16>
- Sibal, L., C Agarwal, S., D Home, P., & H Boger, R. (2010). The Role of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Disease. *Current Cardiology Reviews*, 6(2), 82–90. <https://doi.org/10.2174/157340310791162659>
- Siragusa, M., Fröhlich, F., Park, E. J., Schleicher, M., Walther, T. C., & Sessa, W. C. (2016). Stromal cell–derived factor 2 is critical for Hsp90-dependent eNOS activation. *Sci Signal*, 24. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaa2819>
- Stenvinkel, P., Carrero, J. J., Axelsson, J., Lindholm, B., Heimbürger, O., & Massy, Z. (2008). Emerging biomarkers for evaluating cardiovascular risk in the chronic kidney disease patient: How do new pieces fit into the uremic puzzle? *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 3(2), 505–521. <https://doi.org/10.2215/CJN.03670807>
- Sud, M., Tangri, N., Pintilie, M., Levey, A. S., & Naimark, D. (2014). Risk of end-stage renal disease and death after cardiovascular events in chronic kidney disease. *Circulation*, 130(6), 458–465. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007106>

- Swirski, F. K., & Nahrendorf, M. (2018). Cardioimmunology: the immune system in cardiac homeostasis and disease. *Nature Reviews Immunology*, *18*(12), 733–744. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0065-8>
- Tabish, A. M., Arif, M., Song, T., Elbeck, Z., Becker, R. C., Knöll, R., & Sadayappan, S. (2019). Association of intronic DNA methylation and hydroxymethylation alterations in the epigenetic etiology of dilated cardiomyopathy. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* (Vol. 317). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00758.2018>
- Tan, H. L., Yap, J. Q., & Qian, Q. (2016). Acute Kidney Injury: Tubular Markers and Risk for Chronic Kidney Disease and End-Stage Kidney Failure. In *Blood Purification*. <https://doi.org/10.1159/000441269>
- Tsuruya, K., & Eriguchi, M. (2015). Cardiorenal syndrome in chronic kidney disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, *24*(2), 154–162. <https://doi.org/10.1097/MNH.0000000000000099>
- Ueda, S., Yamagishi, S. I., Matsumoto, Y., Fukami, K., & Okuda, S. (2007). Asymmetric dimethylarginine (ADMA) is a novel emerging risk factor for cardiovascular disease and the development of renal injury in chronic kidney disease. *Clinical and Experimental Nephrology*, *11*(2), 115–121. <https://doi.org/10.1007/s10157-007-0471-x>
- Unudurthi, S. D., Nassal, D. M., Patel, N. J., Thomas, E., Yu, J., Pierson, C. G., ... Hund, T. J. (2020). Fibroblast growth factor-inducible 14 mediates macrophage infiltration in heart to promote pressure overload-induced cardiac dysfunction. *Life Sciences*, *247*(February), 117440. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117440>
- Usher, M. G., Duan, S. Z., Ivaschenko, C. Y., Frieler, R. A., Berger, S., Schütz, G., ... Mortensen, R. M. (2010). Myeloid mineralocorticoid receptor controls macrophage polarization and cardiovascular hypertrophy and remodeling in mice. *Journal of Clinical Investigation*, *120*(9), 3350–3364. <https://doi.org/10.1172/JCI41080>

- Vila Cuenca, M., Hordijk, P. L., & Vervloet, M. G. (2019). Most exposed: the endothelium in chronic kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 1–10. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfz055>
- Wang, L., Li, Y. L., Zhang, C. C., Cui, W., Wang, X., Xia, Y., ... Li, H. H. (2014). Inhibition of toll-like receptor 2 reduces cardiac fibrosis by attenuating macrophage-mediated inflammation. *Cardiovascular Research*, 101(3), 383–392. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt258>
- Ward-Caviness, C. K., Agha, G., Chen, B. H., Pfeiffer, L., Wilson, R., Wolf, P., ... Peters, A. (2018). Analysis of repeated leukocyte DNA methylation assessments reveals persistent epigenetic alterations after an incident myocardial infarction. *Clinical Epigenetics*, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0588-7>
- Winterberg, P. D., Robertson, J. M., Kelleman, M. S., George, R. P., & Ford, M. L. (2019). T cells play a causal role in diastolic dysfunction during uremic cardiomyopathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 30(3), 1–14. <https://doi.org/10.1681/ASN.2017101138>
- Wu, T. T., Ma, Y. W., Zhang, X., Dong, W., Gao, S., Wang, J. Z., ... Lu, D. (2020). Myocardial tissue-specific Dnmt1 knockout in rats protects against pathological injury induced by Adriamycin. *Laboratory Investigation*. <https://doi.org/10.1038/s41374-020-0402-y>
- Yang, L., Humphreys, B. D., & Bonventre, J. V. (2011). Pathophysiology of acute kidney injury to chronic kidney disease: Maladaptive repair. *Contributions to Nephrology*, 174, 149–155. <https://doi.org/10.1159/000329385>
- Yasuda, K., Kimura, T., Sasaki, K., Obi, Y., Iio, K., Yamato, M., ... Hayashi, T. (2012). Plasma B-type natriuretic peptide level predicts kidney prognosis in patients with predialysis chronic kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 27(10), 3885–3891. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfs365>
- Yndestad, A. (2003). Enhanced expression of inflammatory cytokines and activation

markers in T-cells from patients with chronic heart failure. *Cardiovascular Research*, 60(1), 141–146. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(03\)00362-6](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(03)00362-6)

Zanoli, L., Lentini, P., Briet, M., Castellino, P., House, A. A., London, G. M., ... Boutouyrie, P. (2019). Arterial stiffness in the heart disease of CKD. *Journal of the American Society of Nephrology*, 30(6), 918–928. <https://doi.org/10.1681/ASN.2019010017>

Zhang, J., Hua, G., Zhang, X., Tong, R., Du, X., & Li, Z. (2010). Regulatory T cells/T-helper cell 17 functional imbalance in uraemic patients on maintenance haemodialysis: A pivotal link between microinflammation and adverse cardiovascular events: Original Article. *Nephrology*, 15(1), 33–41. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1797.2009.01172.x>

Zhang, Y. N., Vernooij, F., Ibrahim, I., Ooi, S., Gijssberts, C. M., Schoneveld, A. H., ... De Kleijn, D. P. V. (2016). Extracellular vesicle proteins associated with systemic vascular events correlate with heart failure: An observational study in a dyspnoea cohort. *PLoS ONE*, 11(1), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148073>

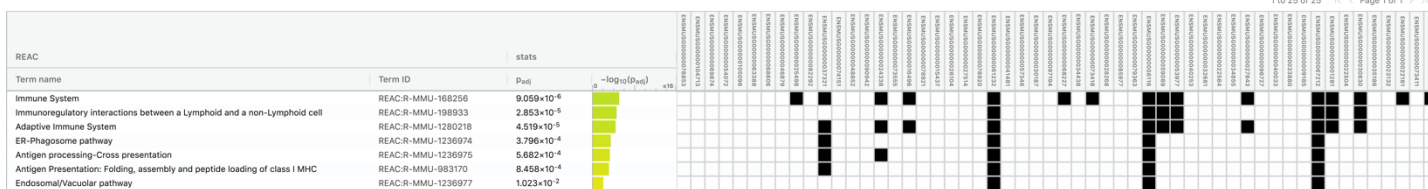
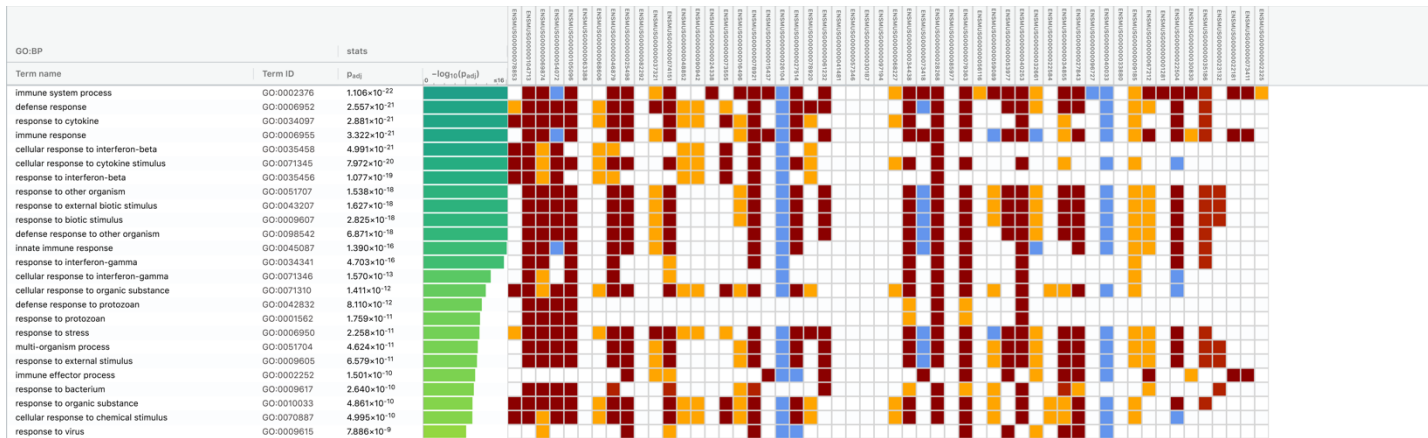
Zuk Anna, & Bonventre, J. V. (2016). Acute Kidney Injury. *Annu Rev Med*. <https://doi.org/10.1016/j.cnur.2018.07.001>

FIGURAS SUPLEMENTARIAS

Figura suplementaria 1. Lista de los 54 genes que cambiaron de forma significativa en el análisis de RNA-Seq. Datos obtenidos por RNA-Seq mediante secuenciación con Illumina.

Gene ID	Gene Name	baseMean	log2FoldCh	lfcSE	stat	pvalue	padj	Nx	Sham	lfcShrink
ENSMUSGO	Igtp	3455.056	4.388275	0.378704	10.04288	9.88E-24	2.63E-19	4840.012	631.1668	3.200081
ENSMUSGO	Gbp6	1289.855	3.671448	0.314925	9.80059	1.12E-22	1.49E-18	2032.618	359.1348	2.883451
ENSMUSGO	Irgm2	2430.77	4.004342	0.354061	9.657498	4.57E-22	4.05E-18	3563.37	551.9638	3.008995
ENSMUSGO	Iigp1	7750.93	3.215849	0.293434	8.965737	3.08E-19	2.05E-15	12420.97	2590.067	2.614461
ENSMUSGO	Gbp10	425.8426	5.469915	0.55979	8.726329	2.63E-18	1.4E-14	597.4578	65.60732	2.851518
ENSMUSGO	BC023105	1563.904	6.784371	0.728362	8.511384	1.72E-17	7.62E-14	1825.933	91.80311	2.488201
ENSMUSGO	Gm4841	2027.516	8.344563	0.975631	7.953382	1.81E-15	6.9E-12	1911.732	63.73614	1.578437
ENSMUSGO	Irgm1	1692.631	3.095849	0.322345	7.78932	6.74E-15	2.24E-11	2529.808	608.4688	2.42362
ENSMUSGO	Irf7	799.9795	2.76235	0.293887	7.408791	1.27E-13	3.77E-10	1217.383	342.7807	2.227488
ENSMUSGO	Gm12250	533.8866	5.288393	0.636657	7.38764	1.49E-13	3.98E-10	668.0496	75.44854	2.477271
ENSMUSGO	Tap1	584.9081	2.946252	0.326081	7.241299	4.44E-13	1.08E-09	870.5932	231.919	2.294407
ENSMUSGO	Nlrc5	299.2028	3.138812	0.356599	7.161575	7.98E-13	1.77E-09	444.0813	113.3219	2.343905
ENSMUSGO	Gm12185	619.7961	6.215358	0.816663	6.894344	5.41E-12	1.11E-08	611.0109	53.43422	1.99829
ENSMUSGO	F83001680	7637.876	4.962027	0.674581	6.488514	8.67E-11	1.65E-07	9466.558	936.9306	2.214575
ENSMUSGO	Psmb8	418.2318	1.963454	0.217129	6.348559	2.17E-10	3.86E-07	616.7971	255.6364	1.738764
ENSMUSGO	Gm4951	132.4901	2.826051	0.366157	6.120469	9.33E-10	1.55E-06	178.4589	64.78845	2.08308
ENSMUSGO	Cd274	555.2968	2.84455	0.370482	6.098954	1.07E-09	1.67E-06	775.2524	230.318	2.082718
ENSMUSGO	Tgtp2	624.8437	2.80104	0.370281	5.98476	2.17E-09	3.2E-06	874.643	263.6422	2.05779
ENSMUSGO	Gzmb	28.27968	7.918654	1.237443	5.926457	3.1E-09	4.34E-06	27.60263	11.7808	2.10831
ENSMUSGO	Stat1	712.1046	2.124721	0.261287	5.89284	3.8E-09	5.05E-06	1050.246	400.4929	1.789499
ENSMUSGO	Zbp1	94.08833	3.346932	0.506786	5.449899	5.04E-08	6.39E-05	113.7759	40.89738	1.983457
ENSMUSGO	Ifi47	204.5664	2.82632	0.416419	5.382363	7.35E-08	8.89E-05	263.5439	92.84128	1.920139
ENSMUSGO	H2-K1	8917.975	2.410835	0.358135	5.098183	3.43E-07	0.000371	12551.27	4261.678	1.791324
ENSMUSGO	Serpina3g	42.70978	2.942715	0.462657	5.096026	3.47E-07	0.000371	51.14875	27.76757	1.883398
ENSMUSGO	Apo19a	27.56356	4.244184	0.71821	5.094867	3.49E-07	0.000371	28.90598	15.11813	1.812276
ENSMUSGO	Klra2	32.61271	3.011149	0.490789	4.943368	7.68E-07	0.000786	38.41483	20.9097	1.863878
ENSMUSGO	9330175E1	34.85076	3.035019	0.506871	4.833618	1.34E-06	0.001321	40.62907	22.10883	1.794328
ENSMUSGO	Ii2rb	35.90129	3.265628	0.556045	4.820884	1.43E-06	0.001358	39.7649	20.81686	1.813595
ENSMUSGO	Gbp8	27.21518	2.803078	0.461041	4.811021	1.5E-06	0.001378	31.67232	19.03426	1.813684
ENSMUSGO	C4b	502.1421	1.675039	0.227548	4.790376	1.66E-06	0.001477	574.8456	279.4401	1.452167
ENSMUSGO	Gbp3	1043.805	2.31842	0.364768	4.752115	2.01E-06	0.001728	1448.522	529.2707	1.710931
ENSMUSGO	Gm5970	15.88902	3.705551	0.65917	4.734064	2.2E-06	0.00183	17.37757	11.10112	1.865114
ENSMUSGO	Gbp4	808.3061	2.381745	0.38047	4.722431	2.33E-06	0.001879	1099	396.8144	1.722929
ENSMUSGO	H2-T22	671.9893	1.743532	0.246292	4.703903	2.55E-06	0.001998	968.3594	435.8346	1.49441
ENSMUSGO	Fcgr4	50.38926	2.353916	0.37689	4.693456	2.69E-06	0.002042	61.46068	34.08636	1.683622
ENSMUSGO	Cd8a	21.78096	4.258091	0.785322	4.677178	2.91E-06	0.002135	23.41041	13.09701	1.677305
ENSMUSGO	Gbp7	1094.147	2.032513	0.30976	4.67301	2.97E-06	0.002135	1545.02	626.5943	1.610304
ENSMUSGO	Oas3	40.33682	3.358571	0.610673	4.541828	5.58E-06	0.003905	45.27766	23.09297	1.621919
ENSMUSGO	Ly6c2	32.26516	2.713618	0.470373	4.52538	6.03E-06	0.004113	37.6078	20.69802	1.776101
ENSMUSGO	Cxcl10	23.78487	3.772672	0.707363	4.506417	6.59E-06	0.004386	25.60785	14.57556	1.643126
ENSMUSGO	Ptpn22	39.88098	2.069641	0.335648	4.423203	9.72E-06	0.006311	48.22686	29.66848	1.593258
ENSMUSGO	Psmb9	405.0027	1.681877	0.2507	4.375265	1.21E-05	0.007684	575.5754	273.4605	1.436402
ENSMUSGO	Stat2	588.1904	1.853555	0.292556	4.336114	1.45E-05	0.008974	809.4102	358.6369	1.497022
ENSMUSGO	Lgals3bp	594.2618	1.876238	0.301653	4.280533	1.86E-05	0.011275	828.2143	358.4365	1.49744
ENSMUSGO	Ccl8	30.64838	3.216653	0.618269	4.256487	2.08E-05	0.012279	30.93923	19.73659	1.420983
ENSMUSGO	H2-T23	820.1752	1.458595	0.20768	4.206437	2.59E-05	0.015007	1136.356	576.7815	1.300931
ENSMUSGO	Itgb7	49.54922	2.491926	0.456122	4.180749	2.91E-05	0.016449	59.33207	31.73276	1.604243
ENSMUSGO	Ciita	69.59696	2.023159	0.347242	4.141667	3.45E-05	0.019114	85.93521	47.63882	1.521635
ENSMUSGO	Itgal	78.64755	2.445942	0.454759	4.092147	4.27E-05	0.022967	96.21786	46.26393	1.572739
ENSMUSGO	Ubd	4.594326	5.977263	1.318436	4.089894	4.32E-05	0.022967	4.711766	3.895308	1.211895
ENSMUSGO	Gzma	35.51646	3.25507	0.659493	4.048669	5.15E-05	0.026875	38.31383	19.03428	1.605949
ENSMUSGO	C6	12.55864	3.431317	0.71448	3.983758	6.78E-05	0.034711	13.48247	9.936264	1.496601
ENSMUSGO	H2-D1	7226.81	1.779089	0.300278	3.976614	6.99E-05	0.035095	9945.214	4439.75	1.422749
ENSMUSGO	Irf9	681.0592	1.739851	0.296885	3.889897	0.0001	0.049417	943.3728	438.9971	1.400483

Figura suplementaria 2. Análisis gene ontology realizado con el programa g: profiler. Se muestran los procesos que más cambian durante la ERC en etapa temprana. En la parte de abajo se muestra el reactoma y se observan que las vías que más interactúan son relacionadas con el sistema inmune y procesos inmunoregulatorios de células linfoides. Datos obtenidos por RNA-Seq mediante secuenciación con Illumina.



RESEARCH ARTICLE

Reduced endothelial nitric oxide synthase activation contributes to cardiovascular injury during chronic kidney disease progression

Isabel Amador-Martínez,^{1,2} Rosalba Pérez-Villalva,^{2,3} Norma Uribe,³ César Cortés-González,⁴
Norma A. Bobadilla,^{2,3} and Jonatan Barrera-Chimal^{1,2}¹Laboratorio de Fisiología Cardiovascular y Trasplante Renal, Unidad de Medicina Translacional, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México and Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Mexico City, Mexico; ²Molecular Physiology Unit, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico; ³Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico; and ⁴Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología, Mexico City, Mexico

Submitted 15 January 2019; accepted in final form 10 May 2019

Amador-Martínez I, Pérez-Villalva R, Uribe N, Cortés-González C, Bobadilla NA, Barrera-Chimal J. Reduced endothelial nitric oxide synthase activation contributes to cardiovascular injury during chronic kidney disease progression. *Am J Physiol Renal Physiol* 317: F275–F285, 2019. First published May 22, 2019; doi:10.1152/ajprenal.00020.2019.—Major cardiovascular events are a common complication in patients with chronic kidney disease (CKD). Endothelial dysfunction can contribute to the cardiovascular injury observed in CKD. Here, we used a rat model of acute kidney injury to CKD transition to investigate heart alterations in the pathway activating endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and its impact on the cardiac injury observed during CKD progression. Fifty male Wistar rats were subjected to sham surgery ($n = 25$) or bilateral renal ischemia-reperfusion (IR-CKD) for 45 min ($n = 25$). Rats were studied on a monthly basis up to 5 mo ($n = 5$). In another set of sham and IR-CKD rats, L-arginine was administered starting on the third month after renal ischemia. CKD development and cardiac alterations were monitored in all groups. CKD was characterized by a progressive increase in proteinuria and renal dysfunction that was evident after the fifth month of followup. Heart hypertrophy was observed starting on the fourth month after ischemia-reperfusion. There was a significant increase in brain natriuretic peptide levels. In the heart, IR-CKD rats had increased eNOS phosphorylation at threonine 495 and reduced eNOS-heat shock protein-90 α interactions. L-Arginine administration prevented the heart alterations observed during CKD and increased eNOS coupling/dimerization and activation. In summary, CKD progression is accompanied by cardiac hypertrophy, fibrosis, oxidative stress, and increased brain natriuretic peptide levels. These alterations were associated with limited eNOS activation in the heart, which may result in reduced nitric oxide bioavailability and contribute to cardiac injury during CKD.

asymmetric dimethyl-arginine; cardiorenal; endothelial nitric oxide synthase; heat shock protein 90; L-arginine; nitric oxide

INTRODUCTION

Acute kidney injury (AKI) may lead to the development of chronic kidney disease (CKD) even if it is followed by renal recovery (11). In addition, CKD is an independent risk factor for cardiovascular disease (CVD) (13, 34). The occurrence of major cardiovascular events in CKD is a very common complication, and the leading cause of death in this group of patients (41, 43). The mortality associated with CVD is 20-fold higher in patients with CKD versus the general population (33). The risk of cardiovascular events increases when the glomerular filtration rate drops below $60 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 1.73 \text{ m}^{-2}$, and this risk is inversely proportional to the glomerular filtration rate reduction (14, 17). In patients with CKD, the major heart alterations observed are fibrosis, increased risk of ischemia, left ventricular hypertrophy, diastolic dysfunction, endothelial dysfunction, and chronic inflammation (12, 41). The mechanisms leading to cardiac damage during CKD are not completely understood. The increased cardiovascular risk in CKD is partly explained by comorbidities like hypertension, diabetes, or hypercholesterolemia. However, specific targeting of these comorbidities does not reduce cardiovascular outcomes in patients with stage 4 or 5 CKD (18). Therefore, other risk factors like chronic inflammation and endothelial dysfunction have been proposed as possible mediators of cardiovascular injury in CKD (33).

One of the main functions of the endothelium is the production and release of the vasodilator nitric oxide (NO) via endothelial NO synthase (eNOS). Activation of eNOS requires the presence of L-arginine as a substrate, cofactors like tetrahydrobiopterin, Ca^{2+} /calmodulin, binding of eNOS to heat shock protein (Hsp)90, and eNOS dimerization (38). NO generated in the endothelium plays a critical role in blood pressure maintenance, vascular permeability, avoiding leukocyte adhesion, and smooth muscle proliferation (15, 22). A hallmark of endothelial dysfunction is the reduced synthesis or bioavailability of NO (15). Endothelial dysfunction is present in the peripheral vasculature of patients with moderate and severe CKD (27). Moreover, several studies have shown that patients with CKD display reduced levels of NO (7, 31, 36, 37). Factors that might contribute to a reduction in NO generation include eNOS uncoupling, eNOS inactivation by phosphorylation at Thr⁴⁹⁵, oxidative stress, and increased levels of endogenous

Address for reprint requests and other correspondence: J. Barrera-Chimal, Laboratorio de Fisiología Cardiovascular y Trasplante Renal, Unidad de Medicina Translacional, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM and Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Juan Badiano 1, Sección XVI Belisario Domínguez, Tlalpan, Mexico City 14080, Mexico (e-mail: jbarrera@biomedicas.unam.mx).

Los resultados de inflamación se encuentran en proceso de publicación.



La disfunción endotelial y la inflamación crónica como mecanismos en el desarrollo de fibrosis del miocardio durante la enfermedad renal crónica.



YADIRA ISABEL AMADOR MARTINEZ
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 10:00 horas del día 18 del mes de diciembre del año 2020 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión

DRA. MARIA CONCEPCION GUTIERREZ RUIZ
DR. FAUSTO SANCHEZ MUÑOZ
DR. CARLO CESAR CORTES GONZALEZ
DR. MARIO GARCIA LORENZANA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: YADIRA ISABEL AMADOR MARTINEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. MARIA CONCEPCION GUTIERREZ RUIZ

VOCAL

DR. FAUSTO SANCHEZ MUÑOZ

VOCAL

DR. CARLO CESAR CORTES GONZALEZ

SECRETARIO

DR. MARIO GARCIA LORENZANA

El presente documento cuenta con la firma -autógrafa, escaneada o digital, según corresponda- del funcionario universitario competente, que certifica que las firmas que aparecen en esta acta - Temporal, digital o dictamen- son auténticas y las mismas que usan los c.c. profesores mencionados en ella