



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**CARACTERIZACIÓN DE ALTERACIONES  
CARDIACAS EN UN MODELO DE ENFERMEDAD  
RENAL CRÓNICA INDUCIDA POR LESIÓN RENAL  
AGUDA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**YADIRA ISABEL AMADOR MARTÍNEZ**



**DIRECTOR DE TESIS:  
Dr. JONATAN BARRERA CHIMAL**

**Ciudad Universitaria, CD. MX., 2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# Reconocimientos

El presente trabajo se realizó bajo la asesoría del Dr. Jonatan Barrera Chimal en la Unidad de Fisiología Molecular del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y el Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”. Periodo: Junio 2016 – junio 2017

A los miembros del Jurado:

Dra. Norma Araceli Bobadilla Sandoval	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dra. Rosario Ortíz Hernández	Facultad de Ciencias, UNAM
Dr. Jonatan Barrera Chimal	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dra. Blanca Bazán Perkins	Facultad de Ciencias, UNAM
Dra. María Genoveva González Morán	Facultad de Ciencias, UNAM

Este trabajo fue apoyado por el donativo **IA200117** otorgado por **PAPIIT/DGAPA/UNAM** al Dr. Jonatan Barrera Chimal y por los donativos **235964** y **235855** otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) a la Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval.

Durante la realización de mis estudios de licenciatura recibí el nombramiento como Ayudante de Investigador Nacional Nivel III (No. Expediente 13876), otorgado por el Sistema Nacional de Investigadores-CONACyT (Dra. Norma Bobadilla, No. Expediente 7497) de septiembre 2016- septiembre 2017.

A la Q.F.B Rosalba Pérez Villalva por su asesoría técnica durante la realización de este trabajo.

## Abreviaturas

**SCR:** Síndrome cardiorenal

**ERC:** Enfermedad renal crónica

**LRA:** Lesión renal aguda

**IR:** Isquemia reperfusión

**SRAA:** Sistema renina angiotensina aldosterona

**FSR:** Flujo sanguíneo renal

**NO:** Óxido nítrico

**eNOS:** Sintasa de óxido nítrico endotelial

**Hsp90 KDa:** Proteína de choque térmico de 90 KDa

**BNP:** Péptido natriurético cerebral

**FCAD:** Falla cardíaca aguda descompensada

**iECA:** Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina

**ECV:** Enfermedad cardiovascular

**MLV:** Músculo liso vascular

**TNF-alfa:** Factor de necrosis tumoral alfa

**SNS:** Sistema nervioso simpático

**IL-6:** Interleucina 6

**TFG-beta:** Factor de crecimiento tumoral-beta

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno

**Ang II:** Angiotensina II

**TFG:** Tasa de filtración glomerular

**PVC:** Presión venosa central

**PA:** Presión arterial sistémica

**MCP-1:** Proteína 1 quimioatrayente de monocitos

**ICAM-1:** Molécula 1 de adhesión intracelular

**VCAM-1:** Molécula 1 de adhesión vascular

**BUN:** Nitrógeno ureico en sangre

**Nx:** Nefrectomía

**Snx:** Subnefrectomía

**IM:** Infarto miocárdico

**RNS:** Especies reactivas de nitrógeno

**NADPH:** Nicotin adenin dinucleótido fosfato reducido

## Índice de figuras

**Figura 1.** Clasificación del síndrome cardiorenal.

**Figura 2.** Protocolo de la agrupación y periodo de estudio de los animales.

**Figura 3.** Proteinuria 24 horas.

**Figura 4.** Seguimiento mensual de proteinurias.

**Figura 5.** Parámetros de función renal.

**Figura 6.** Presión arterial e hipertrofia cardiaca.

**Figura 7.** Niveles de BNP en corazón.

**Figura 8.** Niveles de Colágena I en corazón.

**Figura 9.** Fosforilación de eNOS en la Tre-495.

**Figura 10.** Niveles de expresión de Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  en corazón.

**Figura 11.** Co-inmunoprecipitación que muestra la interacción entre eNOS y Hsp90 $\alpha$ .

**Figura 12.** Co-inmunoprecipitación de la interacción entre la proteína eNOS y Hsp90 $\beta$ .

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
<b>Síndrome cardiorenal</b> .....	<b>3</b>
Síndrome cardiorenal tipo I.....	4
Síndrome cardiorenal tipo II.....	5
Síndrome cardiorenal tipo III.....	5
Síndrome cardiorenal tipo IV.....	6
Síndrome cardiorenal tipo V.....	7
<b>Posibles mecanismos involucrados en el síndrome cardiorenal</b> .....	<b>7</b>
Anemia.....	7
Inflamación.....	8
Activación del Sistema Renina-Angiotensina- Aldosterona (SRAA).....	8
Cambios en la hemodinámica renal.....	9
Óxido nítrico.....	10
Estrés oxidante.....	11
<b>Modelos experimentales de síndrome cardiorenal tipo IV</b> .....	<b>12</b>
Nefrectomía unilateral más infarto miocárdico.....	12
Nefrectomía subtotal (SNx).....	13
Falla cardíaca crónica complicada con falla renal causada por tres-cuartos de nefrectomía e inyección de isoprenalina.....	14
Toxicidad por adriamicina.....	15
Toxicidad por 6-aminopurina.....	15
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>15</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>18</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>18</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>18</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	<b>18</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>19</b>
Protocolo experimental.....	19
Modelo de isquemia/reperfusión.....	20
Mediciones fisiológicas.....	20
Presión arterial media.....	20
Flujo Sanguíneo Renal (FSR).....	21

<b>Estudios Bioquímicos y Moleculares .....</b>	<b>21</b>
Análisis de Western Blot.....	21
Inmunoprecipitación .....	21
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>23</b>
<b>Modelo de transición de lesión renal aguda a enfermedad renal crónica. ....</b>	<b>23</b>
.....	25
.....	25
<b>Alteraciones cardiovasculares en la transición de LRA a ERC .....</b>	<b>25</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>31</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>36</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>36</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>37</b>

## RESUMEN

El síndrome cardiorenal (SCR) se define como un desorden fisiopatológico en el corazón y los riñones, en donde la disfunción aguda o crónica de uno de estos órganos puede inducir disfunción aguda o crónica en el otro órgano. En particular, el SCR tipo IV es un padecimiento que comienza con el establecimiento de la enfermedad renal crónica (ERC) y el posterior desarrollo de enfermedad cardiovascular crónica. La frecuencia de este síndrome es elevada y esto se refleja en que más del 50% de las muertes en pacientes con ERC se deben a enfermedad cardiovascular.

El endotelio juega un papel importante en mantener la función vascular y la homeostasis, por lo tanto, el daño en la función endotelial puede conducir a enfermedades cardiovasculares a largo plazo. La disfunción endotelial se caracteriza por la reducción en la biodisponibilidad de NO y esta reducción puede ser debida a alteraciones en la vía de señalización para la activación de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS); por ejemplo, pérdida de interacción de eNOS con la proteína de choque térmico 90 KDa (Hsp90) e incremento en la fosforilación de la treonina-495 (Tre-495) de eNOS, lo cual induce la inactivación de eNOS.

En este estudio, se hizo una caracterización de las alteraciones cardiovasculares que aparecen en un modelo de ERC inducida por un episodio isquémico de lesión renal aguda (LRA). Para esto, se utilizaron 50 ratas Wistar macho que se dividieron en: grupo control (sham) (n=25) y grupo con isquemia reperusión (IR) de 45 minutos (n=25). Las ratas se estudiaron en intervalos de tiempo de 1, 2, 3, 4 y 5 meses.

En este modelo, se confirmó la progresión de LRA a ERC a través del incremento progresivo de la proteinuria. La disfunción renal fue evidente hasta el quinto mes de seguimiento, donde se observó un aumento del 50% en la creatinina plasmática y la reducción del flujo sanguíneo renal en las ratas sometidas a IR renal. En el caso de las alteraciones cardiacas, encontramos hipertrofia cardiaca en el grupo de ratas sometidas a IR desde el cuarto mes de seguimiento. La disfunción cardiaca fue evidente al quinto mes, ya que observamos un incremento de la proteína péptido natriurético cerebral (BNP), el cual es un marcador de disfunción cardiaca. De forma interesante, observamos que los niveles de la proteína colágena I, un marcador de remodelamiento cardiaco, se incrementaron desde el



primer mes de seguimiento, indicando la aparición de alteraciones cardiovasculares incluso antes de que la disfunción renal y cardíaca sean evidentes.

Respecto a la vía de señalización de eNOS en el corazón, se observó un aumento en la fosforilación inactivante de esta enzima (Tre-495) en el grupo con IR y además la disminución de la interacción de eNOS con Hsp90 $\alpha$ .

El modelo de ERC inducido por LRA, es adecuado para el estudio de las alteraciones cardiovasculares que suceden en el establecimiento y progresión de la ERC y que se caracterizan por el desarrollo de hipertrofia cardíaca e incremento en la expresión de colágena I y BNP. Además mostramos que la disfunción endotelial mediada por la inactivación de eNOS, y la pérdida de interacción entre Hsp90 $\alpha$  y eNOS parecen tener un papel importante en el desarrollo de estas alteraciones y consecuentes repercusiones fisiológicas en el contexto del SCR tipo IV.

# INTRODUCCIÓN

## Síndrome cardiorenal

Un gran número de pacientes son hospitalizados con cierto grado de disfunción renal y cardíaca. Es importante destacar que el corazón y el riñón son dos órganos que se encuentran estrechamente relacionados y que repercuten entre sí mediante diferentes mecanismos <sup>1</sup>. La alteración de uno, puede conducir a un desorden en el otro <sup>9</sup>, es decir, la falla renal, puede surgir como consecuencia de la disfunción cardíaca o por el contrario, la falla cardíaca, puede surgir como consecuencia de la disfunción renal <sup>2,23</sup>. Esta importante asociación es conocida como una entidad clínica llamada: Síndrome cardiorenal (SCR) <sup>1,7,24</sup> o síndrome reno-cardíaco <sup>25</sup>. Como se muestra en la figura 1, la definición actual comprende cinco subtipos de SCR que reflejan: a) la patología primaria y secundaria, b) el periodo de tiempo (agudo, crónico o secundario) y c) la disfunción renal y cardíaca simultánea y como consecuencia de una enfermedad sistémica <sup>16,23,26</sup>

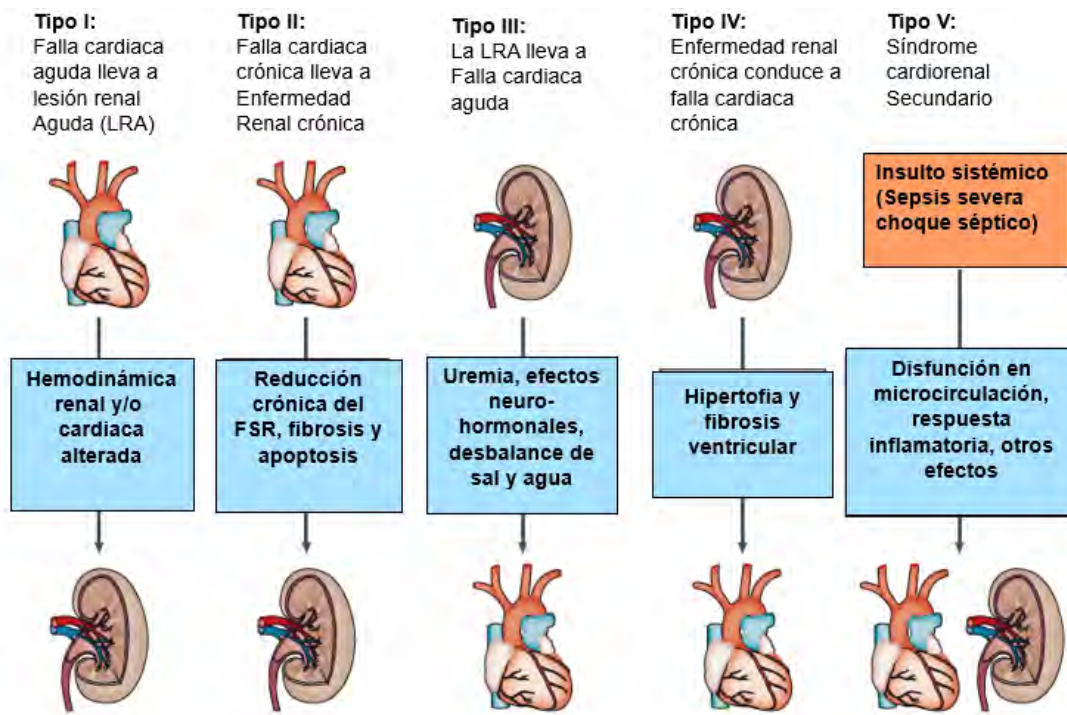


Figura 1. Clasificación del síndrome cardiorenal. Modificada de Schefold JC, et al. 2016

## Síndrome cardiorenal tipo I

El SCR tipo I ocurre cuando la falla cardíaca aguda conduce al desarrollo de lesión renal aguda (LRA) <sup>16</sup>. Las etiologías comunes de la enfermedad cardíaca aguda incluyen falla cardíaca aguda descompensada (FCAD), síndrome coronario agudo y cirugía cardíaca <sup>26</sup>. El SCR tipo I aparece en aproximadamente 25% a 33% de los pacientes con FCAD y síndrome coronario agudo <sup>7,9</sup>. Al empeorar la función renal, se complica la FCAD y el síndrome coronario agudo, generando un círculo vicioso que empeora el pronóstico del paciente. Esto se ejemplifica en un estudio clínico realizado con una cohorte de 476 pacientes admitidos con FCAD, en donde los pacientes con insuficiencia renal persistente (definida por un incremento de la creatinina en suero ( $\geq 0.5\text{mg/dL}$ ) <sup>15</sup> por más de 30 días tuvieron un incremento en la mortalidad, comparados con pacientes quienes tuvieron un incremento transitorio en la creatinina <sup>16</sup>. Por otro lado, en estudios observacionales se reporta que 27-40% de pacientes hospitalizados por FCAD desarrollan LRA, con un incremento en la creatinina en suero ( $\geq 0.3\text{mg/dl}$ ), función renal disminuida, y falla cardíaca <sup>15</sup>. Estos pacientes experimentan cursos hospitalarios más complicados, estancias hospitalarias más largas y mayor mortalidad <sup>26</sup>.

El SCR tipo I se desarrolla después de la hospitalización y no en la fase pre-hospitalaria, por lo que se ha atribuido principalmente al uso de diuréticos que probablemente activan de forma adicional el Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA) y que posteriormente afectan la hemodinámica intra-renal <sup>15</sup>. La presencia de una presión venosa central elevada, definida como la constante fisiológica que refleja el rendimiento del músculo cardíaco, es decir, la habilidad que tiene el miocardio para expulsar el volumen sanguíneo que recibe <sup>27</sup> y congestión venosa renal también son factores que influyen para el desarrollo del SCR tipo I <sup>15</sup>. La prevalencia del SCR I en pacientes con FCAD ha sido atribuida a causas como: 1) la disminución de la perfusión renal en pacientes con falla cardíaca debido a la falla del corazón, 2) los pacientes con FCAD pueden experimentar falla cardíaca crónica y un daño renal crónico posterior y 3) la terapia de la FCAD incluye fármacos que modifican la hemodinámica renal como inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (iECA) o bloqueadores de los receptores de angiotensina <sup>26</sup>. Por lo tanto, el balance relativo del tono arterial y venoso y la congestión del riñón parecen ser importantes para la caída de la función renal que ocurre durante el tratamiento hospitalario de FCAD <sup>23</sup>.

### Síndrome cardiorenal tipo II

En el SCR tipo II, la insuficiencia cardíaca crónica puede conducir al desarrollo de enfermedad renal crónica (ERC) <sup>1,7,9</sup>. En muchas ocasiones, al momento del diagnóstico, estos padecimientos coexisten y es difícil determinar cuál de las dos enfermedades es primaria <sup>1</sup>. Estudios clínicos han mostrado que 45-63.6% de los pacientes con falla cardíaca crónica tienen evidencia de ERC. En el SCR tipo II, las anomalías crónicas en la función miocárdica conducen al empeoramiento de la ERC, ya que inciden sobre el rendimiento miocárdico sistólico y diastólico y por lo tanto pueden conducir a alteraciones en la activación neurohormonal <sup>15</sup>, hemodinámica renal y una gran variedad de procesos celulares adversos que conducen a apoptosis y fibrosis renal <sup>1,2,25</sup>. En diferentes estudios, se ha demostrado que la enfermedad cardiovascular (ECV), contribuye al empeoramiento de la ERC (aproximadamente 30%-50%) <sup>1,2,15</sup>. La ERC a su vez puede acelerar el curso de la arterosclerosis y resultar en eventos prematuros de ECV lo que incluye, infarto miocárdico y derrame cerebral <sup>15</sup>.

La ERC, causa desórdenes metabólicos que pueden acelerar el curso de la arterosclerosis calcificada avanzada y el trastorno óseo y mineral, que se caracterizan por retención de fosfato<sup>28</sup>, vitamina D relativa, disponibilidad de calcio (Ca<sup>2+</sup>) e hiperparatiroidismo secundario <sup>7,29</sup>. De estos, la retención de fosfato es un componente fisiopatológico importante debido a que estimula la conversión de células del músculo liso vascular a células tipo osteoblásticas, que se estimulan para producir calcio extracelular y cristales de hidroxapatita en las capas del músculo liso vascular (MLV) de las arterias<sup>15</sup>. Esto coincide con alteraciones que presentan los pacientes con SCR tipo II, como calcificación vascular, menor elasticidad vascular, menor tensión y alto grado de lesión crónica en órganos relacionados con la elevación de la presión sanguínea<sup>1,15</sup>.

### Síndrome cardiorenal tipo III

El SCR tipo III, se define como el empeoramiento de la función renal de manera aguda que conduce a lesión o disfunción cardíaca aguda (infarto miocárdico, falla cardíaca congestiva o arritmia). La lesión cardíaca puede ser directamente inducida por mediadores inflamatorios, estrés oxidante <sup>16</sup> y la sobre-regulación temprana de sistemas neuroendocrinos después de

LRA <sup>15</sup>. En este síndrome, desafortunadamente, se desconoce la prevalencia ya que ha sido uno de los tipos menos estudiados debido a la heterogeneidad en las etiologías de la LRA <sup>16</sup>.

En el SCR tipo III, la LRA resulta en la sobrecarga del volumen ventricular, retención de sodio, activación neurohormonal y desarrollo de falla cardiaca. El SCR tipo III, presenta características como: congestión pulmonar y edema periférico <sup>23</sup>. La identificación de los casos donde LRA conduce a descompensación cardiaca es difícil <sup>16</sup>. El desbalance electrolítico, por ejemplo, niveles de potasio elevados en plasma, puede contribuir al desarrollo de arritmias y como consecuencia arresto cardiaco.

Se ha descrito, que posiblemente el SCR tipo III pueda precipitar o apresurar un síndrome coronario agudo o derrame cerebral, puesto que la uremia no tratada afecta la contractilidad miocárdica a través de la acumulación de factores depresivos miocárdicos, vasoconstricción pulmonar o pericarditis (inflamación del pericardio) <sup>30</sup>.

#### Síndrome cardiorenal tipo IV

El SCR tipo IV, se caracteriza por el deterioro primario y crónico de la función renal que eventualmente genera disfunción o falla cardiaca crónica. Las principales alteraciones cardiovasculares que se observan son: remodelación cardiaca, disfunción diastólica, hipertrofia ventricular y /o incremento en el riesgo de eventos cardiovasculares como infarto al miocardio, falla cardiaca o incremento en la frecuencia de arritmias <sup>1,9,23</sup>.

Independientemente de la edad y factores de riesgo convencionales, se ha mostrado que la ERC es un factor que predispone al desarrollo de enfermedad cardiovascular (ECV). La frecuencia del SCR tipo IV es elevada y esto se refleja en que más del 50% de las muertes en pacientes con ERC es debido a enfermedad cardiovascular siendo ésta la principal causa de muerte en pacientes con enfermedad renal. En términos absolutos, se ha mostrado que los pacientes con disfunción renal y que son sometidos a diálisis, tienen de 10 a 20 veces más riesgo de muerte cardiovascular respecto a los controles pareados por edad y género en la población en general. Además, en pacientes con ERC menores de 45 años, el riesgo de mortalidad cardiovascular es aún mayor, siendo un riesgo de más de 100 veces respecto a controles sanos <sup>22</sup>.

En la práctica clínica, la ERC se ha asociado con el desarrollo de alteraciones cardiacas como: fibrosis, aumento del riesgo de isquemia, hipertrofia ventricular izquierda, disfunción

diastólica, disfunción endotelial e inflamación crónica <sup>6,31</sup>. Sin embargo, los mecanismos moleculares que conducen a estas alteraciones no son del todo claros ni tampoco la temporalidad con la que estas alteraciones ocurren <sup>2,7,16,23</sup>.

### Síndrome cardiorenal tipo V

Este síndrome involucra una enfermedad sistémica que conduce a falla renal y cardíaca simultánea<sup>1</sup>. Se puede originar la disfunción simultánea de ambos órganos sin ninguna enfermedad renal o cardíaca pre-existente y se ha reconocido que se origina por un insulto sistémico <sup>15</sup>. Los escenarios clínicos que se relacionan son: sepsis, trauma múltiple, quemaduras, uso de drogas, quimioterapéuticos, infecciones y enfermedades tales como: hepatitis B, hepatitis C, VIH, lupus eritematoso, diabetes mellitus o amiloidosis <sup>1,25</sup>. Existen datos limitados acerca de la incidencia y determinantes de este síndrome, ya que existe la confusión en presencia de factores como: hipotensión, falla respiratoria, falla hepática y otros órganos lesionados más allá de los sistemas cardíaco y renal <sup>25</sup>.

Se conoce que la sepsis es un anticipador de SCR tipo V con una mortalidad estimada en 20-60%. Aproximadamente, 11-64% de pacientes con sepsis desarrollan LRA que se asocia con alta mortalidad y morbilidad ya que genera anomalías en la función cardíaca: alteraciones en el movimiento de paredes cardíacas y reducción transitoria de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo <sup>11,24</sup>. En estudios clínicos observacionales, se demostró que aproximadamente el 36% de pacientes con sepsis, tuvo incidencia de LRA y la sobrecarga del volumen ventricular fue un fuerte predictor de mortalidad <sup>15,16</sup>.

## **Posibles mecanismos involucrados en el síndrome cardiorenal**

### Anemia

La anemia es un proceso multifactorial que se caracteriza por la deficiencia relativa de eritropoyetina <sup>32</sup>, inhibidores de eritropoyesis inducidos por uremia, corta supervivencia de los eritrocitos y desórdenes en la homeostasis del hierro. Sin embargo, no es claro si es un mediador de SCR o más bien un marcador de progresión de la enfermedad <sup>1</sup>. Se ha visto que la eritropoyetina mejora la función cardíaca después de un infarto miocárdico un efecto parecido al aumento de neovascularización. Además, se ha determinado que el exceso de

hepcidina (hormona que se produce en el hígado y se involucra en la homeostasis del hierro), es un principal factor de los desórdenes de la homeostasis del hierro y consecuente anemia en el escenario de la ERC, ya que se hace incorrecta la absorción del mismo, en la dieta y la movilización desde reservas del cuerpo <sup>32</sup>.

### Inflamación

La inflamación es también un factor de riesgo para el infarto miocárdico en pacientes urémicos y un marcador de severidad y progresión de falla cardíaca. Se sabe que la infiltración renal de macrófagos y la expresión de citocinas inflamatorias incrementa tan pronto como 3 días post-infarto al miocardio. La inflamación crónica se asocia con el daño renal progresivo debido a la presencia elevada de citocinas pro-inflamatorias circulantes en el tejido tales como interleucina-6 y factor de necrosis tumoral (TNF-alfa) <sup>1,2,25</sup>.

En la disfunción renal temprana, el TNF-alfa y el estrés oxidante causan expansión del volumen intravascular al reducir la excreción renal de sodio. La retención del fluido y la presión elevada en los vasos renales incrementa las concentraciones intrarenales y sistémicas de Ang II y se estimula el SNS, posteriormente se genera una disminución de la tasa de filtrado glomerular y se promueve la expresión de las citocinas inflamatorias <sup>33</sup>. El TNF-alfa y la IL-6 promueven la acumulación de células inflamatorias en el intersticio renal al incrementar la expresión de la proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1), la molécula 1 de adhesión intercelular ICAM-1 y la molécula 1 de adhesión vascular VCAM-1 <sup>34,35</sup>. Además, se conoce que el TNF-alfa influye en el daño glomerular asociado con glomerulonefritis al regular la apoptosis celular de las células del mesangiales glomerulares <sup>24</sup>. La inflamación se origina por múltiples factores entre los que destacan la depuración inadecuada de citocinas inflamatorias, ROS, aumento de toxinas urémicas, factores neurohumorales y algunas comorbilidades (por ejemplo: diabetes) <sup>17</sup>.

### Activación del Sistema Renina-Angiotensina- Aldosterona (SRAA)

El papel de SRAA en el SCR es complejo. La angiotensina II (AngII) es el péptido bioactivo primario y actúa vía el receptor de AngII tipo I, lo que ejerce efectos intracelulares. Al activarse excesivamente en presencia de insuficiencia cardíaca, el SRAA contribuye con el incremento de hipertrofia cardíaca, inflamación, fibrosis, apoptosis y estrés oxidante <sup>2</sup> (a través de la activación de NADPH oxidasa), con la creciente formación de especies reactivas de oxígeno

(ROS) y disfunción endotelial <sup>1</sup>. Además esta activación prolongada conduce a la retención de sodio generando una sobrecarga del volumen adicional y remodelación cardiaca <sup>9</sup>.

Otro de los problemas asociados a la activación crónica del SRAA, es que la AngII estimula la producción de aldosterona <sup>1</sup>, la cual se ha mostrado que promueve el aumento de los niveles de galectina-3 en el corazón y el riñón<sup>1,36</sup>. Esta proteína se encuentra distribuida en diferentes tejidos y se produce de forma fisiológica por macrófagos, células endoteliales y células epiteliales como las del colon, mama y riñón <sup>37</sup>. La galectina-3 incrementa la expresión de colágeno tipo I y tipo III y juega un papel importante en las interacciones entre células, crecimiento celular, transformación neoplásica, metástasis, regulación del ciclo celular, apoptosis y reparación del daño celular. De tal forma que la sobre-regulación de galectina-3 contribuye al desarrollo de fibrosis e inflamación cardiovascular y renal <sup>2,36</sup>.

La activación crónica del SRAA favorece la disfunción simultánea del corazón y riñón, de tal manera que la disminución del rendimiento cardiaco en la insuficiencia cardiaca conduce a la hipoperfusión renal <sup>2</sup>, esto activa de nuevo al SRAA y el sistema nervioso simpático repitiendo un ciclo en forma de “círculo vicioso” y como consecuencia hay un aumento en el estrés oxidante que resulta en una concomitante disfunción endotelial <sup>25,34</sup>. La causa de estos cambios, se debe a que la AngII activa la NADPH oxidasa cardiaca y renal y por consiguiente, las especies reactivas de oxígeno (ROS) conducen a la reducción de la biodisponibilidad de óxido nítrico e inducen vasoconstricción<sup>2</sup>.

### Cambios en la hemodinámica renal

El mantenimiento de la homeostasis cardiaca, depende de diversos mecanismos de regulación, entre ellos se encuentra el SRAA y mecanismos neurohormonales <sup>25</sup>. En el caso de una activación prolongada del SRAA, se conduce a la progresión de la falla cardiaca, remodelación miocárdica, fibrosis y necrosis del miocardio <sup>37</sup>. Estos cambios se atribuyen como uno de los factores principales en el SCR, ya que la existencia de una falla en el corazón impide mantener el rendimiento cardiaco y esto resulta en la reducción de la perfusión de los órganos periféricos <sup>9,11</sup>, lo que, incide en la disminución del flujo sanguíneo renal (FSR). Además se ha visto que la disminución de la perfusión renal es un factor principal de la reducción de la tasa de filtración glomerular en pacientes con insuficiencia cardiaca <sup>17,24</sup>.



Por otra parte, la insuficiencia cardiaca procede hacia la activación compensatoria de barorreceptores e incrementa la actividad simpática, lo que preserva el rendimiento cardiaco pero a la vez, genera efectos adversos como la función exagerada del sistema simpático <sup>16</sup>, apoptosis, necrosis de cardiomiocitos y arritmias a largo plazo <sup>25</sup>.

También se ha mostrado que la disminución de la perfusión renal, es un determinante principal de la reducción en la tasa de filtración glomerular (TFG) en los pacientes con falla cardiaca lo que contribuye al incremento de la creatinina y de la albumina en la orina <sup>13</sup>. En consecuencia, la disminución de la TFG en pacientes con falla cardiaca se relaciona inversamente a la presión venosa central (PVC) <sup>1</sup>.

El incremento de la PVC, cuando la presión arterial sistémica (PA) no cambia, conduce a la disminución del gradiente de presión a través del glomérulo y la subsecuente disminución del flujo sanguíneo renal (FSR), también incrementa la presión hidrostática en el riñón y subsecuente hipoxia y activación de SRAA. Se propone que la PVC y la TFG, tienen una relación bidireccional puesto que el daño en la función renal puede conducir a la retención de agua y sal, lo que genera un incremento en la PVC.

### Óxido nítrico

El óxido nítrico (NO), es una molécula de señalización de vida corta que se sintetiza en células endoteliales por la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS). El NO juega un papel importante en mantener la homeostasis cardiovascular al influir en el tono vascular, la proliferación de células del músculo liso, adhesión y migración de leucocitos y la agregación plaquetaria.

La actividad de eNOS se modula por interacciones proteína-proteína; en condiciones inactivas, eNOS es anclada a la caveola de la membrana plasmática a través de la N-miristoilación y plamitolación del N-terminal de cisteína y se mantiene en un estado inhibido a través de su interacción con caveolina-1 <sup>18</sup>. Tras la estimulación con varios agonistas movilizados de calcio e inóforos (p. ej. ionomicina), la unión a caveolina-1, se desplaza por calmodulina activada por calcio (CaM), esto resulta en un cambio conformacional que promueve el flujo de electrones dependiente de la NADPH a la porción hemo y esto incrementa la síntesis de NO. Otro regulador crucial de la eNOS es la actividad de la chaperona molecular Hsp90 (proteína de choque térmico 90). La unión basal de Hsp90 a la eNOS aumenta en las

células endoteliales <sup>19</sup> por distintos estímulos como: el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), histamina, estrógenos y estrés celular. La unión de Hsp90 induce un cambio conformacional que promueve la actividad de eNOS y esto incrementa la producción de NO. Aunado a esto, Hsp90 es un andamio para el reclutamiento de otras proteínas que regulan la actividad de eNOS, como las proteínas quinasas Akt. Akt fosforila la eNOS en Ser-1177 en el C-terminal del dominio reductasa, lo cual incrementa el flujo de electrones y aumenta la sensibilidad de CaM <sup>12,18,19</sup>.

La eNOS es importante para mantener la homeostasis cardiovascular y se le ha atribuido un efecto protector ya que se involucra en la relajación vascular y en contra de la remodelación vascular patológica, hipertensión y arterosclerosis. En estudios clínicos, se ha observado que los pacientes con ERC y falla cardíaca tienen niveles reducidos de óxido nítrico y niveles aumentados de citocinas pro-inflamatorias. Se ha sugerido que la reducción en la vasodilatación y la presencia de inflamación vascular crónica podrían ser responsables de las alteraciones cardíacas, sin embargo, esto último aún no se ha estudiado con detalle <sup>21</sup>.

Un hecho que resalta la importancia del NO para mantener una función cardíaca adecuada, es el fenotipo de los animales genéticamente deficientes de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS). Los ratones deficientes para eNOS desarrollan hipertrofia y disfunción cardíaca <sup>20</sup>. Además, en ratas con nefrectomía subtotal, se ha visto que la inhibición de eNOS con N-nitro-L-arginina disminuye el NO y agrava la disfunción renal, lo que induce posteriormente disfunción endotelial <sup>17</sup>.

### Estrés oxidante

El estrés oxidante se produce cuando existe un desbalance entre la generación de ROS y la defensa antioxidante. Las ROS, se producen como resultado de reacciones REDOX en las células y se han reconocido como los mediadores principales del envejecimiento celular, incremento en la producción de citocinas inflamatorias como TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-1 e IL-6 y la disfunción del órgano asociado <sup>9</sup>. Adicionalmente, el incremento de ROS genera disfunción endotelial, ya que estas pueden reaccionar con el NO, generando peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) y disminuyendo la biodisponibilidad de NO. Esto genera que se afecte la perfusión renal y se permita la agregación plaquetaria. En pacientes con falla renal o cardíaca, se ha visto un incremento de estrés oxidante y reducción en la disponibilidad de NO que posteriormente

repercute en una menor vasodilatación y reducción de la perfusión renal <sup>1,25</sup>. Además, el daño endotelial causado por estrés oxidante genera la acumulación de lipoproteínas de baja densidad oxidadas, lo cual, es un potenciador del desarrollo de arterosclerosis <sup>8,9</sup>. Se ha visto que la incubación de miocitos ventriculares de rata con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) genera disfunción de la contractilidad y remodelación cardiaca <sup>2</sup>. Los niveles incrementados de ROS pueden estimular la producción de mediadores pro-inflamatorios como interleucina-6 (IL-6) y TGF-β; principales mediadores de fibrosis renal y cardiaca <sup>2,5,25</sup>.

## **Modelos experimentales de síndrome cardiorenal tipo IV**

El presente proyecto se enfocará en estudiar el SCR tipo IV en el cual, la enfermedad renal crónica (ERC) contribuye al desarrollo de disfunción cardiaca crónica <sup>1,2,9</sup>. Se han realizado diferentes modelos de estudio con animales para estudiar la fisiopatología del SCR y los posibles conectores responsables de la comunicación entre el riñón y el corazón, sin embargo, estos modelos presentan limitaciones como la incapacidad de abordar la función del órgano de interés o que el modelo utilizado no simula las características que aparecen en el SCR en humanos. Específicamente, la principal limitante que hemos detectado es que en estos modelos se combinan estrategias para inducir disfunción renal y cardiaca, lo cual genera confusión dado que muchos de los efectos producidos no se pueden atribuir a los conectores cardiorenales, si no al daño directo que se induce en ambos órganos <sup>1</sup>.

Las estrategias experimentales más utilizadas para inducir daño o falla renal, se basan en la reducción de tejido renal viable en diferentes formas, (nefrectomía (NX) y nefrectomía subtotal (SNX) <sup>1,5,25</sup>. Para el caso de la inducción de disfunción cardiaca, se puede provocar la sobrecarga del volumen o presión, infarto/isquemia miocárdico, administración de agentes tóxicos y estimulación ventricular rápida <sup>1,38-40</sup>

### Nefrectomía unilateral más infarto miocárdico

En el modelo de nefrectomía unilateral (UNx), se remueve uno de los riñones sin un incremento substancial en la proteinuria o cambios histológicos en el riñón remanente <sup>1,3</sup>. En el modelo de UNx, adicionalmente se puede inducir infarto miocárdico (IM) una semana después, por ligamiento de la arteria coronaria izquierda. En este modelo conjunto, se ha observado

disfunción renal acelerada evidenciada por el incremento en los niveles de proteinuria, creatinina y glomeruloesclerosis focal, fibrosis y expansión de la matriz mesangial <sup>1</sup>. Se ha mostrado, que un daño cardíaco más prolongado, incrementa de forma progresiva el daño renal y estas alteraciones se atribuyen a los cambios hemodinámicos <sup>41</sup>. En ratas con IM, la severidad de la disfunción ventricular y los subsecuentes cambios hemodinámicos dependen de la severidad del infarto. Es importante destacar que dentro de las alteraciones cardiovasculares en este modelo se encuentra, un incremento de la presión arterial sistémica y del peso total del corazón, pero no se observa incremento significativo de la presión diastólica final (principal determinante de disfunción cardíaca), ni del péptido natriurético cerebral (BNP / marcador de disfunción cardíaca).

### Nefrectomía subtotal (SNx)

La nefrectomía subtotal o nefrectomía 5/6 es un modelo establecido de falla renal progresiva <sup>24</sup> en el que se realiza la escisión de una quinta parte de la masa renal total y debido a esto, se logra inducir un modelo de falla renal progresiva donde al disminuir el número de nefronas funcionales se presentan anormalidades permanentes en el riñón como glomeruloesclerosis y fibrosis intersticial (complicaciones similares a humanos) <sup>1</sup>, sin embargo es un modelo altamente variable con respecto al grado de progresión de la falla renal <sup>24</sup>. Respecto al daño cardiovascular en este modelo se ha observado que la remodelación cardíaca patológica incluye cambios en la arquitectura del tejido, proporción miocitos/capilares, incremento de fibrosis y apoptosis. No se observa hipertensión pero sí disfunción diastólica temprana vista además con el incremento en el peso del corazón (corregido por peso corporal) <sup>25</sup> sin embargo los cambios observados no son tan marcados.

Otra modalidad para empeorar la severidad del daño cardiovascular en este modelo de SNx consiste en inhibir a las sintasas de óxido nítrico (NOS) mediante la administración de N-nitro-L-arginina <sup>25</sup> para promover una reducción en la producción de NO e incremento del estrés oxidante. En este modelo, posterior a la inhibición de las NOS se exagera la hipertrofia, disfunción cardíaca y el daño glomerular. Además se ha visto, que la combinación de SNx con la inhibición de las NOS conduce a la disfunción cardíaca severa con el incremento de la presión sanguínea, mayor volumen diastólico final, disminución de la fracción de eyección, congestión, incremento de fibrosis cardíaca e hipertrofia de miocitos <sup>1</sup>. Con respecto a la

función renal, este modelo resulta en el aumento de urea y creatinina en sangre, así como, proteinuria. A nivel histológico se ha determinado el incremento de glomeruloesclerosis focal y lesión tubulointersticial.

Es interesante mencionar una variante de este modelo, <sup>17</sup> en la cual se indujo IM agudo (por ligamiento de la arteria la arteria coronaria anterior descendiente izquierda) generando disfunción ventricular izquierda. Dos semanas después del IM, se realizó nefrectomía subtotal. En este experimento, se tuvo una supervivencia del 70% en los animales que fueron sometidos a SNx, la disfunción renal se validó por el aumento de creatinina y medición del nitrógeno ureico en sangre (BUN). En el grupo de SNx, el peso renal disminuyó respecto a los controles. En el caso del grupo donde además se indujo IM, el peso renal fue ligeramente más alto, comparado con el grupo control. El peso cardiaco respecto al peso renal fue significativamente más alto, por lo que se pone de manifiesto que la ERC a corto plazo es suficiente para inducir cambios patológicos en el corazón.

#### Falla cardiaca crónica complicada con falla renal causada por tres-cuartos de nefrectomía e inyección de isoprenalina

En este modelo se sometió a las ratas a remoción del polo inferior del riñón izquierdo y una semana posterior a la cirugía inicial, se les removió totalmente el riñón derecho. Posteriormente se les aplicó una inyección subcutánea de isoprenalina (100mg/kg/peso corporal) y se realizó un seguimiento por cuatro semanas. En este modelo de disfunción cardio-renal, se observaron características generales como: oscurecimiento del pelo, reducción del apetito, disminución del peso corporal, movimientos deficientes, asma, edema, entre otros. Además, se observó insuficiencia cardiaca, que se caracterizó por una disminución de la presión sistólica del ventrículo izquierdo, incremento de la presión diastólica del ventrículo izquierdo aunado a un incremento significativo de los niveles de BNP y Ang II en suero y disminución del peso renal. También se mostró el desarrollo de hipertrofia de cardiomiocitos con células miocárdicas con mayor grosor, distribución desigual y fibrosis miocárdica. Respecto a la función renal hubo un incremento en los niveles de creatinina, proteinuria y albuminuria <sup>3</sup>.

### Toxicidad por adriamicina

Un modelo en el que no se realiza intervención quirúrgica, es la utilización de adriamicina (doxorubicina), un quimioterapéutico que genera toxicidad renal y daño cardíaco <sup>25</sup>. Este modelo simula las características del SCR visto en humanos respecto a la falla cardiorenal funcional con el aumento de daño endotelial, fibrosis e inflamación, así como, fibrosis, glomeruloesclerosis y lesión tubulointersticial. Sin embargo, la dosis requerida para inducir cardiomiopatía es mucho más alta en comparación a la disfunción renal severa resultante. Aunado a esto, se pone en duda este modelo debido a que muchos de los efectos producidos en la interacción se pueden atribuir a la toxicidad de la adriamicina y no precisamente a los conectores cardiorenales <sup>39</sup>.

### Toxicidad por 6-aminopurina

*Nakano et al.*<sup>24</sup>, describen otro modelo de estudio en ratas a las que se les dio una dosis oral de adenina (6-aminopurina) la cual posteriormente se metaboliza a 2,8- dihidroxiadenina, ésta se precipita y forma cristales tubulares lo cual conduce a falla renal crónica. En este modelo se observó un incremento en la creatinina de las ratas con falla renal crónica, respecto al grupo control. Además, las ratas con ERC mostraron una función sistólica preservada, pero disfunción diastólica y una disminución en la velocidad de llenado ventricular. Adicionalmente no se encontró fibrosis miocárdica, pero si presencia de apoptosis (técnica: TUNEL-positiva).

## **ANTECEDENTES**

En este proyecto se estudiará el SCR tipo IV utilizando un modelo de ERC inducida por un episodio de isquemia/reperfusión (IR) renal. Este modelo nos permitirá estudiar el curso temporal de las alteraciones que conllevan al daño del órgano distante en cuestión. En particular nos interesa estudiar las consecuencias crónicas de un episodio de IR renal ya que la lesión renal aguda (LRA) inducida por IR renal es una complicación frecuente en los pacientes hospitalizados (5-10%) y en aquellos pacientes que se encuentran en unidades de terapia intensiva (40-80%) <sup>5,14</sup>.

Diferentes causas como: la pérdida abrupta de sangre (trauma), disminución de la presión arterial, sepsis y deshidratación inducen la restricción o impedimento de la irrigación sanguínea

y la correcta perfusión del riñón<sup>1-4</sup>. Posterior a esto, el riñón comienza a presentar alteraciones como: daño en las células tubulares (principalmente del segmento S3 del túbulo proximal), alteración del fenotipo celular tubular (desprendimiento de la membrana basal tubular, pérdida del borde en cepillo de las células del epitelio tubular proximal<sup>5</sup> muerte celular por apoptosis o necrosis), rarefacción vascular (en relación con la pérdida de interacciones endotelio-pericitos)<sup>6</sup>, activación de procesos inflamatorios<sup>7-9</sup> y mal adaptaciones de las células epiteliales tubulares como arresto en la fase G2/M del ciclo celular<sup>10 5</sup>.

La ERC, es una condición clínica que resulta en la pérdida progresiva de la función renal, se asocia con múltiples etiologías y presenta alteraciones histológicas similares como fibrosis tubulo-intersticial y esclerosis glomerular<sup>7</sup>. El desarrollo de ERC, posterior a LRA inducida por IR, se caracteriza por el incremento progresivo en los niveles de proteinuria (presencia de proteínas en orina), disfunción renal, disminución de la TFG, lesión de los podocitos (se asocian en la formación de la barrera de filtración y función del glomérulo), hipertrofia y esclerosis glomerular<sup>10-13</sup>. Estas condiciones, 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<sup>5,14,15</sup>.

En estudios de nuestro laboratorio, se ha demostrado que un episodio de LRA inducido por IR renal es suficiente para que los animales desarrollen ERC. La transición de LRA a ERC después de cinco meses se caracterizó por el desarrollo de hipertrofia renal, disfunción renal, hipertrofia glomerular, glomeruloesclerosis, atrofia tubular y fibrosis túbulo-intersticial<sup>10</sup>. Estas alteraciones funcionales y estructurales, se asocian con un aumento en el estrés oxidante, inflamación y activación de la vía del factor de crecimiento tumoral- beta (TGF- $\beta$ ). También se ha encontrado que las ratas que desarrollan ERC inducida por LRA, al quinto mes, presentan hipertrofia cardíaca, aumento en la expresión de colágena e interleucina-6 de manera independiente a los niveles de presión arterial, los cuales no se ven modificados (datos no publicados).

Sin embargo, desconocemos el momento preciso, en el que, los animales comienzan con el desarrollo de alteraciones cardiovasculares a lo largo de la progresión de la ERC y los mecanismos moleculares involucrados. Debido a que en los modelos animales de ERC así como en los pacientes con ERC se ha mostrado el desarrollo de disfunción endotelial y

reducción en la producción de óxido nítrico (NO) <sup>16-18</sup>, resulta interesante estudiar el efecto de la disfunción endotelial sobre la inducción de alteraciones cardiovasculares en el curso de la ERC.

Como se mencionó, en estudios clínicos se ha observado que los pacientes con ERC y falla cardíaca tienen niveles reducidos de óxido nítrico y niveles aumentados de citocinas pro-inflamatorias. Se ha sugerido que una reducción en la vasodilatación aunado a la presencia de inflamación vascular crónica podría ser responsables de las alteraciones cardíacas <sup>1,9,19</sup>, sin embargo, esto último aún no se ha estudiado con detalle. Un hecho que resalta la importancia del NO para mantener una función cardíaca adecuada, es el fenotipo de los animales genéticamente deficientes en sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS). Los ratones deficientes para eNOS desarrollan hipertrofia y disfunción cardíaca <sup>20</sup>.

La pérdida de la función del endotelio precede a la enfermedad vascular y se piensa que es un evento detonante. El óxido nítrico es una molécula clave en la función endotelial. El NO derivado de la eNOS juega un papel importante en mantener la homeostasis cardiovascular a través de modular el tono vascular <sup>12</sup>, la proliferación de las células de músculo liso, la migración y adhesión de leucocitos así como la agregación plaquetaria <sup>18</sup>.

La regulación de la actividad de la eNOS es crítica para mantener la función de los vasos sanguíneos. La actividad de eNOS y su capacidad de generar NO es finamente regulada. A pesar de que la actividad de eNOS está acoplada a cambios en los niveles de calcio intracelular, un aumento en la concentración de calcio no es suficiente para afectar la actividad de la enzima ya que la unión de calmodulina y el flujo de electrones del dominio reductasa a dominio oxigenasa de la enzima es dependiente de la fosforilación y de fosforilación de la proteína. En particular el residuo de Ser-1177 en el dominio reductasa y un residuo de Tre-495 localizado en el dominio de unión a calmodulina, parecen ser 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 son también de suma importancia para su regulación. Alteraciones en la señalización de eNOS/NO pueden contribuir al desarrollo de diversas patologías cardiovasculares <sup>20-22</sup>

Investigar y explorar modelos experimentales adecuados al escenario clínico para examinar mecanismos y estrategias terapéuticas potenciales en el contexto del SCR tipo IV, podrán



ayudar a desarrollar estrategias terapéuticas importantes ya que este representa serios problemas de salud en todo el mundo.

## **JUSTIFICACIÓN**

Como se mencionó anteriormente, el presente proyecto se enfocará en estudiar el SCR tipo IV. Este síndrome, representa un problema de salud pública con una frecuencia cada vez mayor, lo cual, es preocupante debido al alto costo que implica para los sistemas de salud y la calidad de vida reducida en el paciente. El conocer a fondo cuales son las vías de señalización involucradas en la comunicación entre el corazón y el riñón nos permitirá desarrollar estrategias farmacológicas específicas para el tratamiento de las alteraciones en ambos órganos.

## **HIPÓTESIS**

La progresión de la enfermedad renal crónica inducida por isquemia/reperfusión renal, se asociará con hipertrofia cardiaca, desarrollo de fibrosis y alteraciones en la vía de señalización de NO/eNOS.

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar las alteraciones cardiovasculares en un modelo de enfermedad renal crónica inducida por isquemia/reperfusión.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Estudiar el curso temporal de la aparición de hipertrofia cardiaca y fibrosis en ratas con progresión a enfermedad renal crónica.
2. Investigar las alteraciones cardiacas en la vía de señalización de NO/eNOS encontradas en ratas en el modelo de progresión de lesión renal aguda a enfermedad renal crónica.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Protocolo experimental

Todos los procedimientos en animales fueron aprobados por la Comisión de Investigación en Animales del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán con el número de protocolo NMM-1845-16/18-1. Se utilizaron 50 ratas Wistar macho con un peso aproximado de 300 g y se dividieron en los siguientes grupos: 1) ratas con cirugía falsa (control) y 2) grupo sometido a isquemia/reperfusión (IR) de 45 minutos. Se estudiaron 10 animales (5 del grupo sham y 5 del grupo IR), por periodos de 30, 60, 90, 120 y 150 días como se muestra en la Figura 2. Al finalizar el periodo de tiempo de seguimiento, los animales fueron sacrificados y se obtuvieron diferentes parámetros como se describe posteriormente.

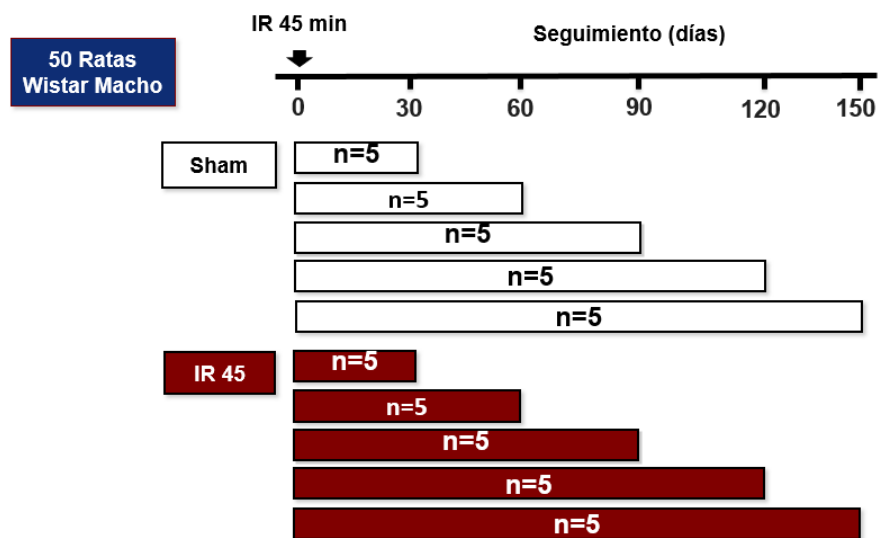


Figura 2. Protocolo de la agrupación y periodo de estudio de los animales, grupo con cirugía falsa (sham) (blanco) y grupo con Isquemia reperfusión renal bilateral (IR) (rojo).

## **Modelo de isquemia/reperfusión**

Las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico a una dosis de 30 mg/Kg (este anestésico fue utilizado porque no altera la presión arterial ni la hemodinámica renal). Una vez que los animales fueron anestesiados, se colocaron en una cama termorregulada para mantener la temperatura adecuada (en la rata es cercana a 37 °C). Posteriormente, se realizó laparotomía para acceder al retroperitoneo y se disecó el paquete vascular renal de forma bilateral. Se interrumpió el flujo sanguíneo a los riñones mediante la colocación de un clip en cada paquete vascular durante 45 minutos. Después del periodo de IR, los clips vasculares fueron retirados y se verificó la reperfusión de los riñones visualmente. Los animales fueron suturados de la pared abdominal con vicryl 3-0 y de la piel con seda 3-0. Las ratas se dejaron evolucionar según el periodo de tiempo al que correspondían. Los animales sometidos a cirugía falsa (control), se manipularon de la misma forma que los que fueron sometidos a IR, pero sin la colocación de los clips.

## **Mediciones fisiológicas**

Los animales se colocaron en jaulas metabólicas para la recolección de orina de 18 h, después de la cirugía y cada 30 días. En la recolección se cuantificó el volumen urinario y en la orina colectada se determinó la excreción urinaria de proteínas mediante el método de turbidimetría con Ácido tricloroacético (TCA) <sup>42</sup>. Al finalizar el periodo experimental se obtuvieron los siguientes parámetros; flujo sanguíneo renal, presión arterial media y se realizaron las eutanasias correspondientes. Posteriormente se obtuvo el peso del corazón y riñón.

### Presión arterial media

La presión arterial se midió a través de la colocación de un catéter de polietileno (PE-50), conectado a un transductor de presión (modelo p23 db, Gould). La presión arterial, se registró en un polígrafo (Grass Instruments, Quincy, MA), cada dos minutos, en un intervalo de 10 minutos tanto para el grupo Sham como el de IR.

## Flujo Sanguíneo Renal (FSR)

Para la determinación del FSR se realizó una incisión media en el abdomen, se disecó la arteria renal izquierda y se colocó una sonda ultrasónica conectada a un flujómetro (Transonic System) en el que se registró en forma continua durante 10 minutos el FSR.

## **Estudios Bioquímicos y Moleculares**

Se extrajo el corazón, se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

### Análisis de Western Blot

Las proteínas de corazón fueron extraídas por homogenización del tejido en 4 volúmenes de buffer de lisis (5 ml de HEPES  $\text{pH}=7.4$ , 5ml de NaCl 5 M, 1ml de EDTA 0.5 M y 100  $\mu\text{l}$  de IGEPAL CA-630), los homogenados fueron centrifugados a 13,000 rpm por 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , se retiraron los restos celulares y se recuperó el sobrenadante. La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry. Se cargaron 50  $\mu\text{g}$  de proteínas en un gel SDS-PAGE al 8.5%. Posteriormente, se transfirieron a una membrana PVDF, y se incubaron con anticuerpos específicos para Colágena I (Santa Cruz, sc-8784), BNP (ab19645), eNOS-total (Abcam, ab-138430) y su fosforilación en la Tre-495 (Cell signaling, 9574S). También se estudió la expresión de la proteína de choque térmico de 90 kDa alfa y beta (Hsp-90 $\alpha$  (Abcam, ab-2928-100) y de Hsp-90 $\beta$  (Abcam, ab-2927). La proteína GAPDH se utilizó como control de carga. La cantidad de proteína se detectó mediante un ensayo de quimioluminiscencia por radiografía de las bandas y se cuantificaron por análisis densitométrico.

### Inmunoprecipitación

Para inmunoprecipitar a la proteína eNOS, se utilizaron perlas de agarosa acopladas a proteína A (Sigma). Se incubaron 200  $\mu\text{g}$  de proteína de cada rata con 4  $\mu\text{g}$  de anticuerpo anti-eNOS (BD Transduction Laboratory) durante una noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se añadieron 60  $\mu\text{L}$  de las perlas acopladas a proteína A y se incubaron durante dos horas más. Se

realizaron 3 lavados con PBS. Para eluir las proteínas inmunoprecipitadas se añadieron 80  $\mu$ L de buffer Laemmli y las proteínas se incubaron a 95 °C durante 10 minutos. Posterior a la elución, las proteínas se separaron por electroforesis en gel SDS-PAGE al 8.5% y se transfirieron a membranas de PVDF para someterlas a western blot con anticuerpos específicos para Hsp90 $\alpha$ , Hsp90 $\beta$ .

### **Análisis estadístico**

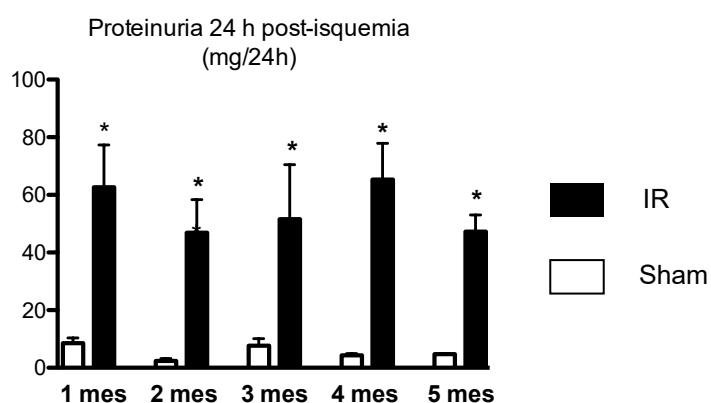
Los resultados obtenidos se analizaron por una prueba t de Student, comparando cada grupo de IR con su grupo control de cada mes. En el caso del seguimiento de la proteinuria los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías. Las diferencias estadísticamente significativas se tomaron cuando la p alcanzó un valor menor a 0.05. Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  el error estándar. Se utilizó el programa Graphpad Prism 6.0 para la representación de los datos y los análisis estadísticos.

## RESULTADOS

### Modelo de transición de lesión renal aguda a enfermedad renal crónica.

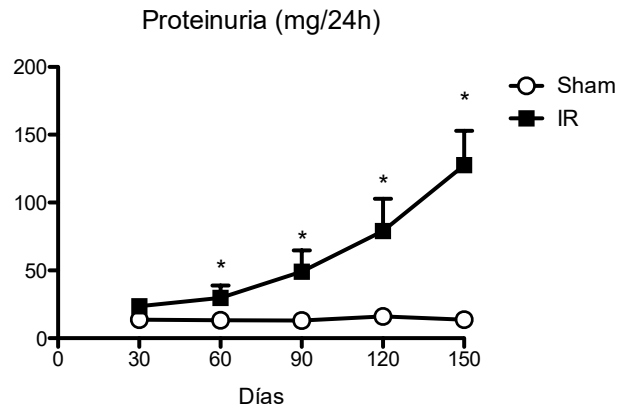
Nuestro modelo para estudiar las alteraciones cardiovasculares en el curso de la ERC consistió en la inducción de IR renal bilateral y seguimiento de los animales por 5 meses. Para poder estudiar el curso temporal de la aparición de hipertrofia cardíaca y fibrosis en ratas con progresión a enfermedad renal crónica se incluyeron 25 ratas con cirugía falsa (Sham) y 25 ratas con IR. La sobrevivencia en los grupos con isquemia renal fue del 70%. Las ratas que no sobrevivieron fueron sustituidas hasta completar la cantidad de 25 ratas con IR. De las 25 ratas de cada grupo, cada mes se tomaron cinco ratas Sham y cinco con IR para realizar los estudios funcionales y obtener los tejidos para estudios moleculares.

Para corroborar que el grado de daño renal inicial era similar en las ratas que se siguieron por 1, 2, 3, 4 y 5 meses, se determinó la excreción urinaria de proteínas a las 24-h posteriores a la IR. Como se muestra en la Figura 3, la proteinuria después de 24 horas de inducir la IR mostró un incremento significativo en las ratas sometidas a IR con respecto a sus respectivos controles (Sham). El incremento de la proteinuria fue similar en los cinco grupos incluidos.



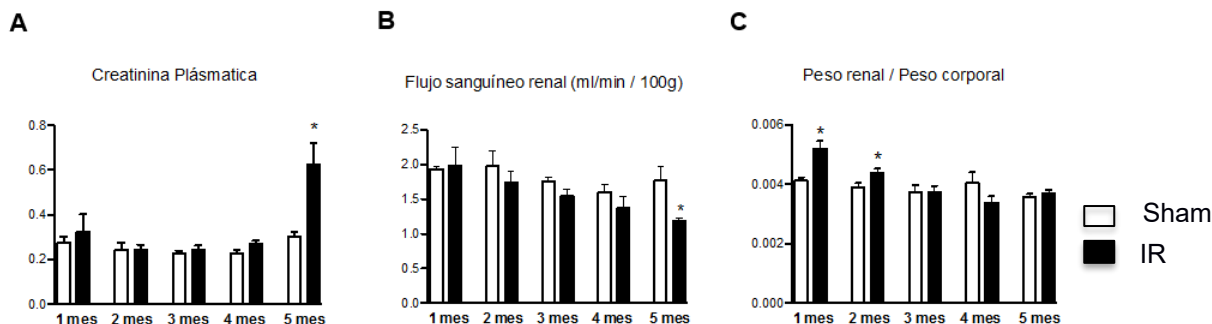
**Figura 3. Proteinuria (mg/24h) a las 24 horas después de la isquemia reperfusion (IR) y cirugía falsa (Sham) en los diferentes grupos. Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  el error estándar. Significancia estadística: \* $p < 0.05$  IR vs. Sham.**

Para asegurarnos que los animales progresaron a ERC, cada mes se colocaron en jaulas metabólicas y se determinó la proteinuria en las orinas recolectadas. Como se aprecia en la Figura 4, la proteinuria se incrementó de forma significativa desde el segundo mes post-isquemia y ascendió progresivamente hasta el quinto mes de seguimiento, lo que nos habla de la progresión de LRA a ERC en estos animales.



**Figura 4. Seguimiento mensual de proteinurias (mg/24h) a partir del primer mes hasta el quinto mes de seguimiento en el grupo Control (Sham) y el grupo con IR renal. Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  el error estándar. Significancia estadística: \* $p < 0.05$  vs. Sham de cada mes**

Para monitorear la disfunción renal, determinamos los niveles plasmáticos de creatinina sérica; producto de desecho que se acumula al existir disfunción renal. Como se aprecia en la Figura 5<sup>a</sup>, la disfunción renal se observó únicamente al quinto mes posterior a la inducción de la IR renal, con un incremento de creatinina plasmática del 50%. Estos resultados coincidieron con la disminución significativa en los niveles de perfusión renal de las ratas al quinto mes post-isquemia, como se aprecia en la Figura 5B donde se observan los niveles del flujo sanguíneo renal. Al determinar el peso renal, encontramos que los animales cursan con hipertrofia renal al primero y segundo mes post-isquemia, lo cual se relaciona con inflamación persistente y que es corregida en los meses posteriores (Figura 5C).



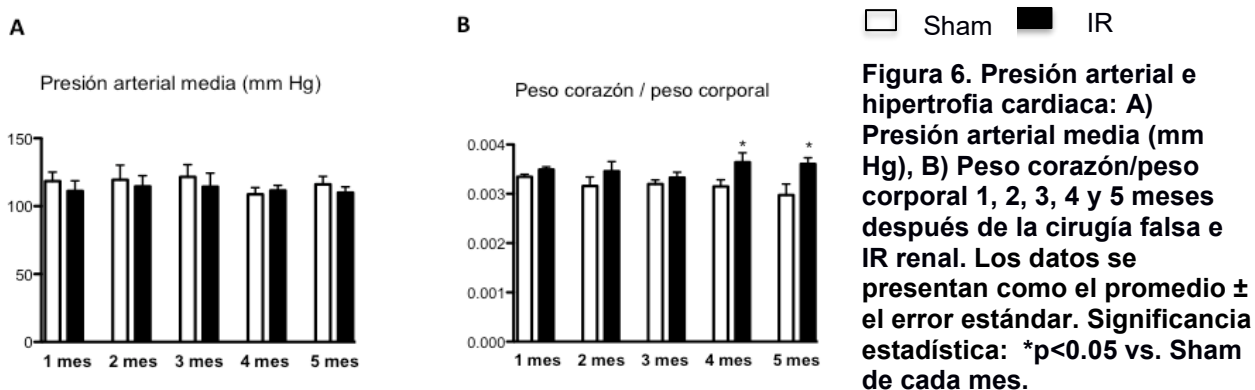
**Figura 5. Parámetros de función renal: A) Creatinina plasmática, B) Flujo sanguíneo renal, C) Peso renal / peso corporal 1, 2,3,4 y 5 meses después de cirugía falsa e IR renal. Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  el error estándar. Significancia estadística: \* $p < 0.05$  vs. Sham de cada mes.**

### Alteraciones cardiovasculares en la transición de LRA a ERC

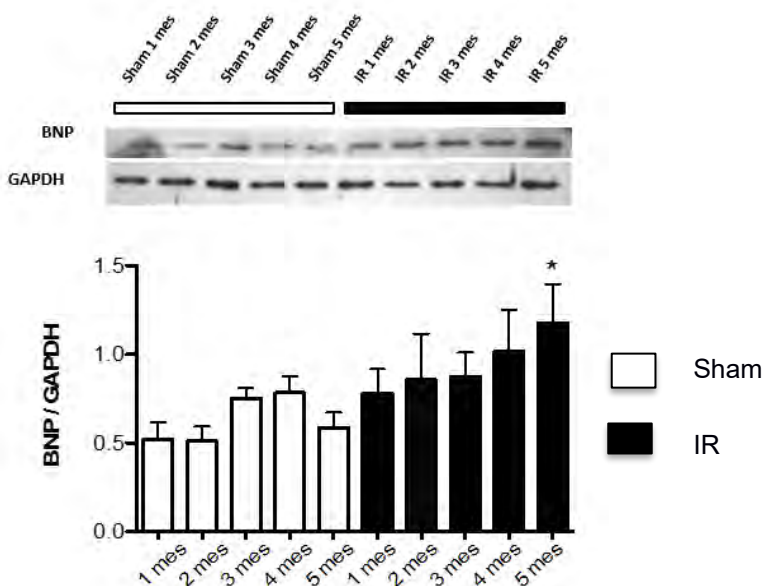
El primer análisis relacionado con la función cardiovascular, fue la determinación de los niveles de presión arterial media. Como se muestra en la Figura 6<sup>a</sup>, el análisis de la medición de la presión arterial media no mostró diferencias significativas entre el grupo sham y el grupo con isquemia, en ninguno de los meses posteriores a la LRA. Este hallazgo es importante, ya que nos indica que todas las alteraciones que observamos tanto a nivel renal, como a nivel cardiovascular son consecuencia exclusiva del insulto isquémico al riñón y no de un fenómeno de hipertensión crónica.

Para observar el desarrollo de hipertrofia cardíaca en el modelo de ERC inducida por IR, se registró el peso del corazón en cada uno de los grupos de estudio. El desarrollo de hipertrofia en el corazón (Figura 6B) se observó a partir del cuarto y quinto mes post-isquemia, lo que sugiere que las alteraciones cardiovasculares ocurren incluso antes de que la disfunción renal sea evidente.



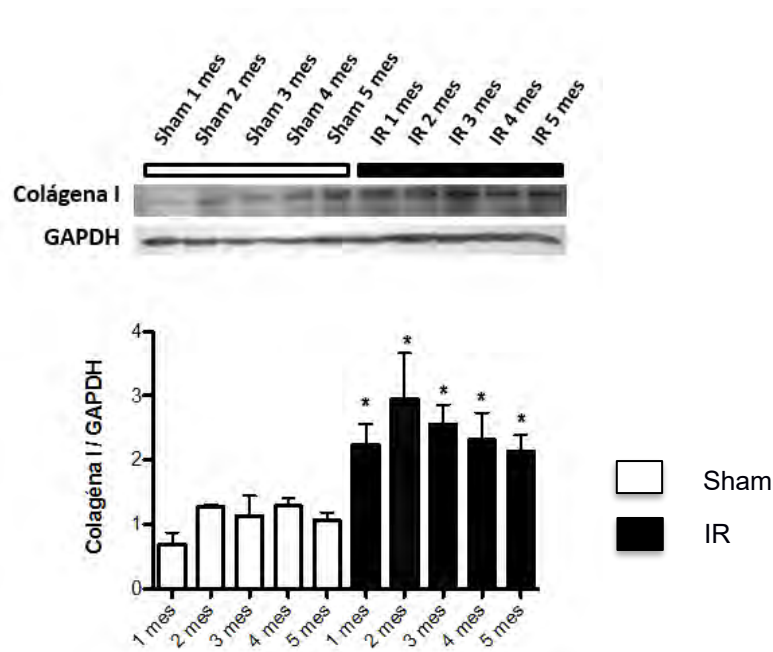


Para evaluar el grado de disfunción cardiaca, determinamos los niveles de la proteína BNP en los corazones de las ratas de nuestros grupos de estudio. Como se muestra en la Figura 7, las ratas con progresión a ERC mostraron un incremento significativo en los niveles de esta proteína hasta el quinto mes de seguimiento.



**Figura 7. Niveles de BNP en corazón. Arriba; Western blot de la proteína BNP y gen control GAPDH. Abajo; Análisis densitométrico. Los grupos de 1, 2, 3, 4 y 5 meses posteriores a la cirugía falsa e IR renal. Los datos se presentan como el promedio ± el error estándar. Significancia estadística: \*p<0.05 vs. Sham de cada mes.**

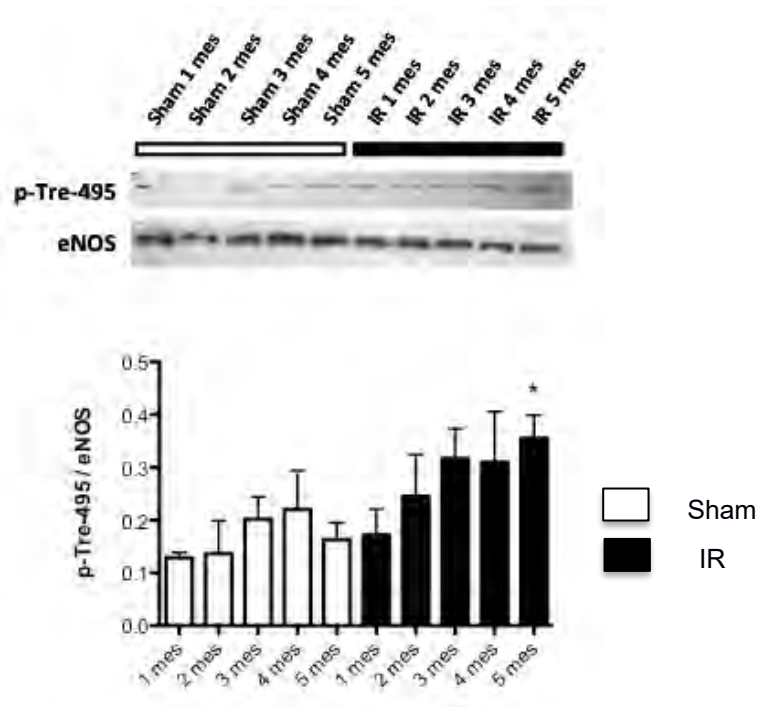
Otra de las principales alteraciones en el corazón que se han reportado en los pacientes con ERC es el desarrollo de fibrosis. En este modelo, se evaluó la presencia de fibrosis a través de la determinación de la cantidad de Colágena I que se encuentra en los corazones de las ratas en progresión a ERC. En la figura 8, se muestra el análisis de western blot donde observamos que desde el primer mes post-isquemia las ratas incrementaron el contenido cardiaco de Colágena I, indicando el desarrollo de fibrosis cardiaca.



**Figura 8. Niveles de Colágena I en corazón. Arriba; Western-blot de Colágena I y gen control GAPDH, en los grupos Sham (1-5 mes) e IR (1-5 mes). Abajo; Análisis densitométrico. Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  el error estándar. Significancia estadística: \* $p < 0.05$  vs. Sham de cada mes.**

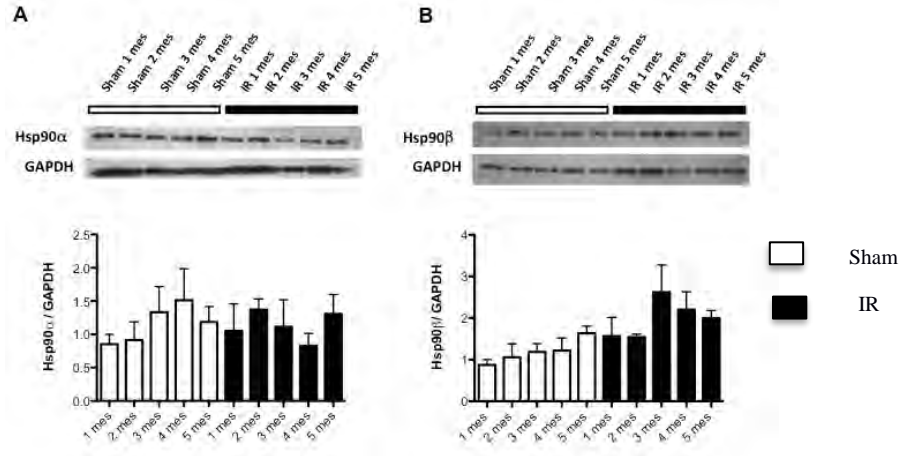
Debido a que la reducción en la biodisponibilidad de óxido nítrico/disfunción endotelial se ha sugerido como uno de los posibles mecanismos responsables del desarrollo de las alteraciones cardiovasculares en el curso de la ERC, nosotros decidimos evaluar el estado de activación de la sintasa de óxido nítrico endotelial a través de determinar los niveles de fosforilación de eNOS en la Tre-495, un residuo que se conoce que al estar fosforilado promueve el desacople de eNOS y por ende la reducción en la síntesis de óxido nítrico. Como se observa en la Figura 9, en los corazones de las ratas con ERC observamos un incremento en la fosforilación de la Tre-495 de eNOS, que fue significativo al quinto mes post-isquemia,

sugiriendo la inactivación de esta enzima y por ende una reducción en la activación de la sintasa de óxido nítrico endotelial.



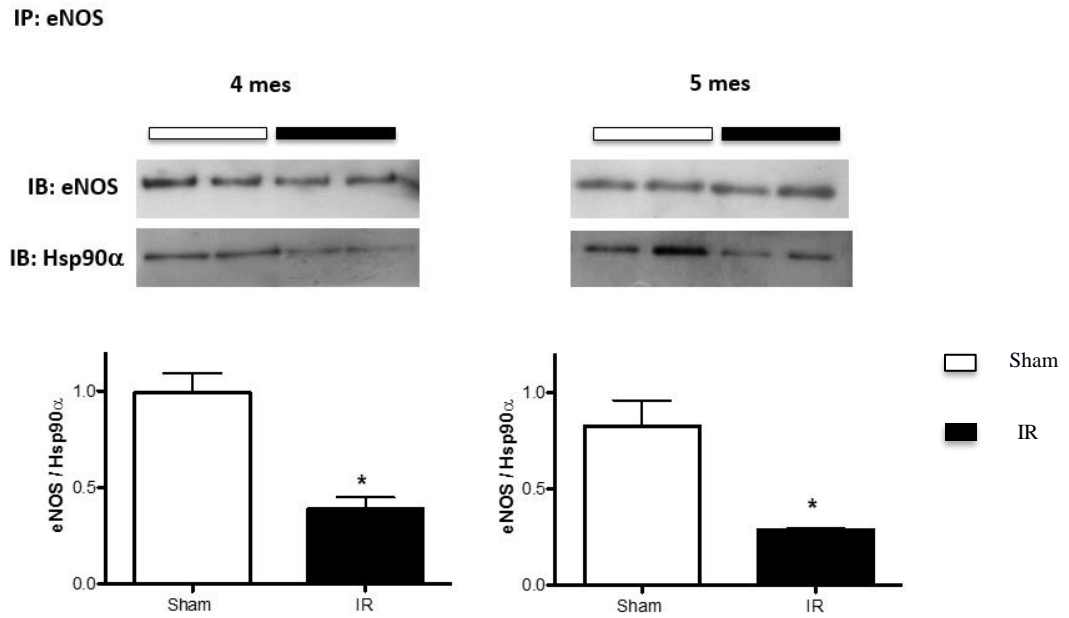
**Figura 9. Fosforilación de eNOS en la Tre-495. Arriba; Western-blot para observar la fosforilación en la Tre-495 con respecto a eNOS, en los grupos Sham (-5 mes) e IR (1-5 mes). Abajo; Análisis densitométrico. Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  el error estándar. Significancia estadística: \* $p < 0.05$  vs. Sham de cada mes.**

Para investigar si el incremento en la fosforilación de la Tre-495 de eNOS se debía a cambios en la expresión de la proteína Hsp90, la cual regula de manera muy fina la actividad de eNOS, determinamos los niveles de expresión de las isoformas alfa y beta de Hsp90. Como se aprecia en la Figura 10A, no observamos cambios en los niveles de Hsp90 $\alpha$ , ni de Hsp90 $\beta$  (Figura 10B) a lo largo del seguimiento de los animales.



**Figura 10.** Niveles de expresión de Hsp90α y Hsp90β en corazón **A) Western-blot para observar la expresión de Hsp90α y el gen control GAPDH. Abajo se muestra el análisis por densitometría de Hsp90α en el grupo Sham e IR. B) Western-blot para observar la expresión de Hsp90β y el gen control GAPDH. Abajo se muestra el análisis por densitometría de Hsp90β en el grupo Sham e IR. Los datos se presentan como el promedio ± el error estándar. Significancia estadística: \* $p < 0.05$  vs. Sham de cada mes.**

Finalmente, debido a que la interacción entre Hsp90 y eNOS es esencial para la activación de eNOS, evaluamos el estado de interacción de eNOS con ambas isoformas de Hsp90 mediante estudios de co-inmunoprecipitación en el tejido cardiaco. Como se observa en la Figura 11, encontramos que eNOS tiene una menor interacción con Hsp90α en las ratas sometidas a IR desde el 4° mes post-isquemia, sugiriendo que la pérdida de esta interacción es responsable de la fosforilación de eNOS en la Tre-495 y por ende de su inactivación.



**Figura 11. Co-inmunoprecipitación que muestra la interacción entre eNOS y Hsp90 $\alpha$ , en el 4° y 5° mes, posterior a la cirugía Sham e IR. Abajo se muestra el análisis cuantitativo de la densitometría para estas proteínas. Sham e IR. Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  el error estándar. Significancia estadística: \* $p < 0.05$  vs. Sham.**

En el caso de la interacción con Hsp90 $\beta$ , no encontramos cambios detectables en los niveles de interacción con eNOS como se aprecia en la Figura 12.

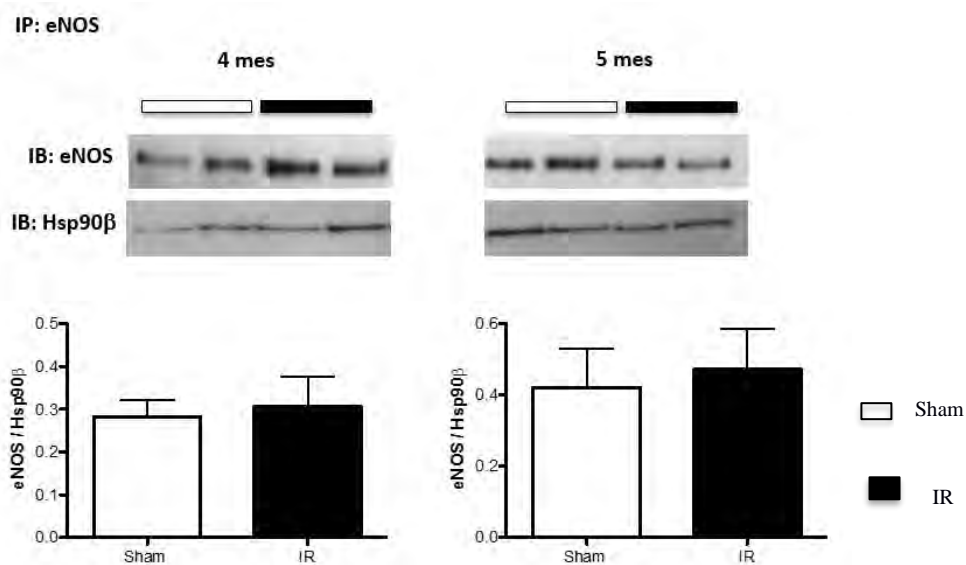


Figura 12. Co-inmunoprecipitación que muestra la interacción entre eNOS y Hsp90β, en el 4° y 5° mes, posterior a la cirugía Sham e IR renal. Abajo se muestra el análisis cuantitativo de la densitometría para estas proteínas. Los datos se presentan como el promedio ± el error estándar. Significancia estadística: NS (no significativo).

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo estudiamos algunas de las alteraciones cardiovasculares que ocurren en un modelo de ERC inducida por LRA. La LRA inducida por IR bilateral, es un modelo bien establecido que se caracteriza porque después de 24 horas de inducir isquemia de 45 minutos, las ratas desarrollan disfunción renal y lesión tubular severa <sup>10</sup>. Durante la LRA ocurren anomalías tubulares y vasculares que toman lugar después de la isquemia y durante el proceso de reperfusión. La vasoconstricción intra-renal conduce a una reducción en la tasa de filtración glomerular y congestión vascular, esto genera un fenómeno de hipoxia crónica que contribuye a que se desencadene daño en las estructuras renales.

Respecto a las alteraciones renales crónicas que ocurren en el modelo de IR renal bilateral en la rata, desde los 3 meses posteriores a la inducción de la isquemia, hay dilatación tubular, formación de cilindros, hipertrofia glomerular y fibrosis tubulointerstitial extensa. En un seguimiento más prolongado (9 meses), se presenta un mayor deterioro de las estructuras

renales y disfunción renal que se caracteriza por una disminución en el FSR y menor depuración de creatinina plasmática; características de la ERC <sup>10</sup>. En nuestro modelo de estudio, a los 5 meses post-isquemia, observamos un aumento de la creatinina plasmática, lo que indica la presencia de disfunción renal. Además, observamos una disminución del FSR en el grupo con IR, lo que coincide con alteraciones vasculares. Adicionalmente, mostramos que en los animales que progresan de LRA a ERC, existe un aumento significativo en los niveles de proteinuria a través de los meses de seguimiento.

Cabe destacar, que el modelo de transición de LRA a ERC no se había estudiado en el contexto de las alteraciones cardiovasculares que se pueden desarrollar durante la progresión de la ERC, sin embargo, existen estudios en otros modelos de ERC en los que se hace una asociación entre la alteración renal y cardiovascular. Por ejemplo, se conoce que en la nefrectomía subtotal se acelera la remodelación patológica en el riñón después de cuatro semanas de que se realiza infarto al miocardio y existe un empeoramiento en la fracción de eyección que se destaca en aquellos animales con daño renal. Por el contrario, cuando la nefrectomía subtotal se realiza antes de inducir el infarto al miocardio, el daño del ventrículo izquierdo es mayor y se asocia con una menor depuración de creatinina, menor flujo sanguíneo renal y aumento de proteinuria y glomeruloesclerosis <sup>25</sup>. En el modelo de nefrectomía unilateral se conoce que ocurre reducción de la función renal sin un incremento en los niveles de proteinuria o cambios histológicos importantes. Se ha descrito que, en este modelo de nefrectomía unilateral, al inducir infarto al miocardio, la función renal disminuye abruptamente dependiendo de la duración del infarto. Este daño en la función cardíaca resulta en la disminución del flujo renal sanguíneo y el mantenimiento de la tasa de filtración glomerular por un incremento compensatorio de la resistencia vascular renal, un efecto similar en humanos <sup>1</sup>.

En nuestro modelo de SCR tipo IV, se observó que las ratas no tuvieron modificación de la presión arterial, sugiriendo que las alteraciones observadas fueron causa del daño isquémico y que no surgen como consecuencia de problemas de hipertensión. Por el contrario, la presencia de hipertrofia cardíaca medida por el incremento del peso del corazón, estuvo presente en los grupos con IR, siendo significativa desde el cuarto mes de seguimiento.

La aparición de las alteraciones cardiovasculares se observó desde el primer mes de seguimiento de los animales que fueron sometidos a IR de 45 minutos, lo que se infiere por un aumento en la expresión de la proteína colágena I desde el primer mes post-isquemia, que

refleja la presencia de fibrosis. En cambio, la disfunción cardíaca, medida por los niveles de elevación del marcador molecular de daño ventricular BNP (péptido natriurético cerebral) fue evidente hasta el quinto mes de seguimiento. El incremento temprano en los niveles de colágena I, sugiere que la inflamación podría jugar un papel importante en etapas tempranas, puesto que en diversos estudios se ha resaltado la relevancia de una respuesta inflamatoria exacerbada en el desarrollo de fibrosis cardíaca. El curso normal de la inflamación incluye la producción de citocinas pro-inflamatorias en respuesta a la activación simpática y neurohormonal <sup>43</sup>. Además, los recursos biológicos que conducen a la inflamación crónica en la transición de la ERC a falla cardíaca crónica, no han sido completamente establecidos <sup>1,9,31</sup>. Sin embargo, se ha sugerido que la congestión venosa y de los tejidos por la sobrecarga del volumen, son importantes ya que estimulan la producción de endotoxinas desde el intestino y la síntesis periférica y liberación de mediadores proinflamatorios <sup>31</sup>.

Por otro lado, se conoce que la sintasa de óxido nítrico endotelial juega un papel importante en la disfunción endotelial y cardíaca ya que cuando pierde su interacción con Hsp90 y/o se fosforila en la Tre-495, pierde su capacidad para producir NO y se convierte en una enzima productora del anión superóxido ( $O^{2-}$ ) <sup>44,45</sup>. La reducción en la síntesis de NO y el incremento en el estrés oxidativo afecta directa e indirectamente al riñón y al sistema cardiovascular mediante la alteración de mecanismos como: reactividad vascular, inducción de vasoconstricción, agregación plaquetaria, afectaciones en la hemodinámica renal, filtración glomerular, reabsorción tubular y secreción en diferentes segmentos de la nefrona <sup>46</sup>. Esto coincide con un desequilibrio en la homeostasis del organismo, ya que, el corazón depende de la regulación de sodio y homeostasis de agua y a su vez el riñón depende del flujo sanguíneo y la presión generada por el corazón <sup>9</sup>.

El radical NO libre puede formar especies reactivas de nitrógeno, incluyendo peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) que se produce por la reacción de NO con el anión superóxido  $O^{2-}$ , por lo que el incremento en los niveles de especies reactivas de nitrógeno (RNS) en conjunto con el incremento de ROS puede contribuir a procesos patológicos en el sistema renal y cardiovascular <sup>47</sup>. Además, se conoce que las especies reactivas de oxígeno ROS generadas por recursos como la mitocondria y NADPH-oxidasas, se involucran en la transición epitelio mesénquima inducida por TGF- $\beta$  (citocina pro-fibrótica) <sup>46,48</sup> en el contexto de fibrosis, ya que se asocian vías de señalización como Smad, MAPK y P13K <sup>48</sup>. La lesión o daño alteran vías



de señalización que conducen a apoptosis celular, necrosis, alteración de la expresión génica, fibrosis, daño tisular y función renal anormal<sup>19,46,49</sup>. Cabe mencionar, que existe una falta de información destinada al estudio del estrés oxidante, debido a la ausencia de modelos humanos y animales que puedan abarcar el entendimiento de estos mecanismos debido a la localización celular específica de las ROS y RNS y de su metabolismo e inestabilidad<sup>1,46</sup>.

En nuestro estudio, las ratas que fueron sujetas a IR bilateral, presentaron una mayor fosforilación en la Tre-495, la cual se conoce como la fosforilación inactivante de eNOS, por lo que se infiere la falta de producción de NO y por lo tanto mayor vasoconstricción y remodelación vascular. Existen estudios con los que coinciden estos patrones, ya que, se conoce que los eventos fisiopatológicos que ocurren durante la LRA, son la afectación del tono vascular en parte por la reducción de NO derivado de eNOS y el daño endotelial. En este sentido, Barrera-Chimal *et al*<sup>19</sup>, demostraron que, bajo condiciones isquémicas, las ratas exhiben disminución en los metabolitos de NO urinarios, confirmando que la reducción de NO contribuye a la fisiopatología de la IR renal. Además, al incrementar la actividad de eNOS con la transfección intrarenal de Hsp90, la producción de NO es mayor y se confiere una protección en contra de la lesión renal por IR<sup>19</sup>.

La producción de NO a través de la eNOS, es un factor relevante para la vasodilatación, funcionamiento y angiogénesis del endotelio vascular. La interacción de Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  con eNOS, son imprescindibles para que se permita la correcta asociación de este complejo y se promueva la fosforilación en la Ser-1177 mediada por la cinasa Akt y por lo tanto la formación de NO<sup>19</sup> manteniendo así, la homeostasis celular. En condiciones basales, eNOS se encuentra secuestrada en la caveola, interactuando con Cav1, esta interacción mantiene eNOS en estado inactivo. Después de una estimulación endotelial, ya sea por tensión, cizallamiento o calcio citoplasmático, la calmodulina se activa, lo cual, a su vez debilita la interacción de eNOS-Cav1 y se promueve la activación a través de la interacción con Hsp90<sup>12</sup>.

En el presente trabajo, observamos que desde el cuarto mes post-isquemia, existe una reducción en la interacción entre la isoforma alfa de Hsp90 y eNOS en el corazón de las ratas con ERC. Este dato concuerda con el aumento en la fosforilación de eNOS en la Tre-495 y en consecuencia su inactivación y reducción de la biodisponibilidad de NO. El desacople entre eNOS y Hsp90 reduce la síntesis de NO y además eNOS en ausencia de Hsp90 es capaz de sintetizar el anión superóxido<sup>45</sup>. La relevancia de un funcionamiento adecuado de eNOS para

mantener la función cardiaca, se puso en evidencia en un estudio de *Kupatt, et al.*<sup>50</sup> en donde se demostró que la sobreexpresión de Hsp90 mediante transfección in vivo en un modelo de isquemia en miocardio, redujo el daño cardiovascular, ya que la expresión de Hsp90 en los cardiomiocitos promovió una mayor asociación de eNOS a Hsp90 y se aumentó la fosforilación activante de eNOS (Ser-1177) por Akt y redujo la fosforilación inactivante de eNOS (Tre-495), por lo que hubo protección mediada por la formación de NO. Esto preservó la función de los cardiomiocitos al prevenir apoptosis y necrosis. En el caso contrario, utilizando L-NAME (N-nitro-L-arginina metil éster) un inhibidor de la NOS, los efectos conferidos por la transfección de Hsp90 fueron suprimidos y se incrementó el daño a los cardiomiocitos.

Otro estudio que apoya la relevancia de la eNOS en el desarrollo de alteraciones cardiovasculares es el de *Flaherty et al.*<sup>20</sup> donde se reportó que un modelo *knockout* para el gen eNOS en ratón, desarrolla un aumento en la presión cardiaca, hipertrofia cardiaca y aún mayor hipertrofia en los cardiomiocitos del ventrículo izquierdo. Este fenotipo, además se asocia con modificaciones moleculares en la proteína SERCA2a (bomba calcio-ATPasa) del retículo sarcoplásmico a nivel subcelular y el aumento de TNF-alfa que se relaciona con inflamación, por lo tanto, estos animales presentan alteraciones cardiacas importantes, debidas a la ausencia en la producción de NO por la eNOS. En relación con estos hallazgos, recientemente un estudio de *Campedelli, et al.*<sup>51</sup>, demostró que la presencia de una variación polimórfica del gen de eNOS determina la producción, mal función y predisposición de arterosclerosis en pacientes con esta enfermedad sintomática, en comparación con pacientes controles sanos en los que no se observó la variación del gen de eNOS.

Estos datos en conjunto, demuestran que la vía de producción de NO, mediada por la fosforilación activante e inactivante de eNOS y adicionalmente su interacción con las Hsp90, son necesarias para su correcto funcionamiento y mantenimiento de la homeostasis cardiovascular. Es interesante mencionar que, en nuestro modelo de ERC, aparecieron de forma concomitante, alteraciones cardiacas que están relacionadas con la deficiencia en la producción de NO, observadas por el desacople de eNOS-Hsp90.

## CONCLUSIONES

- Durante la transición de LRA a ERC se presentó hipertrofia, fibrosis y disfunción cardíaca aun antes de que se manifieste la disfunción renal.
- Las alteraciones cardíacas se asociaron con menor activación de eNOS, determinada por un incremento en la fosforilación de la Tre-495 y por la pérdida de interacción entre Hsp90 y eNOS.
- El modelo de ERC es adecuado para el estudio de los mecanismos involucrados en el desarrollo de las alteraciones cardíacas producidas por una alteración renal inicial.

## PERSPECTIVAS

Una vez establecido que en el modelo de transición de LRA a ERC se reproducen las principales alteraciones cardíacas que se observan en los pacientes con ERC y que estas pudieran estar mediadas por una deficiente activación de la eNOS, proponemos realizar un estudio para evaluar el efecto de la inhibición de eNOS a través del uso de L-NAME y la activación de eNOS con L-arginina en este modelo, para así poder estudiar más a fondo el papel de la eNOS en las alteraciones cardíacas y renales durante la ERC. Además, pretendemos realizar evaluaciones con diferentes técnicas histológicas que nos permitan visualizar más a fondo las alteraciones que se presentan a nivel celular y estructural en los tejidos renal y cardíaco. Esto nos permitirá sugerir estrategias que interfieran en la regulación de las vías para una adecuada síntesis de NO y correcta vasodilatación, mejorando los pronósticos en esta condición clínica. Además, utilizando este modelo se propone estudiar el papel de la inflamación en el daño cardiovascular asociado con el desarrollo de ERC.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Szymanski, M. K., De Boer, R. A., Navis, G. J., Van Gilst, W. H. & Hillege, H. L. Animal models of cardiorenal syndrome: A review. *Heart Fail. Rev.* **17**, 411–420 (2012).
2. Giam, B., Kaye, D.M. & Rajapakse, N. W. Role of Renal Oxidative Stress in the Pathogenesis of the Cardiorenal Syndrome. *Hear. Lung Circ.* (2016). doi:10.1016/j.hlc.2016.02.022
3. Peng, D. F., Tang, S. Y., Hu, Y. J., Chen, J. & Yang, L. Pathophysiological model of chronic heart failure complicated with renal failure caused by three-quarter nephrectomy and subcutaneous injection of isoprenaline. *Exp. Ther. Med.* **5**, 835–839 (2013).
4. Lubas BCD, A., Ryczek BCE, R., Kade ABEG, G., Niemczyk, S. & Lubas, A. Renal Perfusion Index Reflects Cardiac Systolic Function in Chronic Cardio-Renal Syndrome. **21**, 1089–1096 (2015).
5. Tan, H. L., Yap, J. Q. & Qian, Q. Acute Kidney Injury: Tubular Markers and Risk for Chronic Kidney Disease and End-Stage Kidney Failure. in *Blood Purification* (2016). doi:10.1159/000441269
6. Saurabh, L., Dhimant, D., Rajeev, M., Madhu, B., Krishna, R., Guohua, D. y Pravin, C. Angiotensin II-Induced Mesangial Cell Apoptosis: Role of Oxidative Stress. *Mol. Med.* **8**, 830–840 (2002).
7. Clementi, A., Virzì, GM., Goh, Y., Cruz, D., Granata, A., Vescovo, G. y Ronco, C. Cardiorenal syndrome type 4: A review. *CardioRenal Medicine* (2013). doi:10.1159/000350397
8. Granata, A., Virzì, MG., Brocca, A., De Cal, M., Scarfia, VR., Zanolli, L., Corrao, S. & Malatino, L. Cardiorenal syndrome type 4: From chronic kidney disease to cardiovascular impairment. *European Journal of Internal Medicine* (2016). doi:10.1016/j.ejim.2016.02.019
9. Pinheiro da Silva, A. & Vaz da Silva, M. Type 4 cardiorenal syndrome. *Rev Port Cardiol.* **35**, (2016).
10. Barrera-Chimal, J., Pérez-Villalva, R., Rodríguez-Romo, R., Reyna, J., Uribe, N., Gamba, G., Bobadilla, NA. Spironolactone prevents chronic kidney disease caused by ischemic acute kidney injury. *Kidney Int.* 93–103 (2012). doi:10.1038/ki.2012.352

11. Obi, Y., Kim, T., Kovesdy, CP., Amin, AN. & Kalantar-Zadeh, K.. 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 (2016).
12. Hu Peng, Yugang Zhuang, Mark C. Harbeck, Donghong He, Lishi Xie, W. C. Serine 1179 Phosphorylation of Endothelial Nitric Oxide Synthase Increases Superoxide Generation and Alters Cofactor Regulation. *PLoS One* (2015). doi:10.1371/journal.pone.0087495
13. Sandilands, E. A., Dhaun, N., Dear, J. W. & Webb, D. J. Measurement of renal function in patients with chronic kidney disease. *Br. J. Clin. Pharmacol.* (2013). doi:10.1111/bcp.12198
14. Barrera-Chimal, J. *et al.* Hsp72 is an early and sensitive biomarker to detect acute kidney injury. *EMBO Mol. Med.* **3**, 5–20 (2011).
15. Mccullough, P. A. & Ahmad, A. World Journal of Cardiology. *Apoptosis* (2011). doi:10.4330/wjc.v3.i1.116. *Gnanaraj, J. & J. Radhakrishnan.* Open Peer Review Cardio-renal syndrome [version 1; referees: 3 approved]. (2016). doi:10.12688/f1000research.8004.1
17. Tsuruya, K. & Eriguchi, M. Cardiorenal syndrome in chronic kidney disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **24**, 154–162 (2015).
18. Siragusa, M., Fröhlich, F., Park, E J., Schleicher, M., Walther, T C., Sessa, W C., Stromal cell–derived factor 2 is critical for Hsp90-dependent eNOS activation. *Sci Signal* **24** (2016). doi:10.1126/scisignal.aaa2819
19. Barrera-Chimal, J., Pérez- Villalva, R., Ortega, J., Uribe, N., Gamba, G., Cortés-González, C. & Bobadilla, NA. Intra-renal transfection of heat shock protein 90 alpha or beta (Hsp90 $\alpha$  or Hsp90 $\beta$ ) protects against ischemia/reperfusion injury. *Nephrol. Dial. Transplant.* **29**, 301–312 (2014).
20. Flaherty, M. P., Brown, M., Grupp, I. L., Schultz, J. E., Murphree, S.S. & Jones, W. K. eNOS deficient mice develop progressive cardiac hypertrophy with altered cytokine and calcium handling protein expression. *Cardiovasc. Toxicol.* **7**, 165–177 (2007).

21. Gross, P., Six, I., Kamel, S. & Massy, Z. a. Vascular toxicity of phosphate in chronic kidney disease. *Circ. J.* **78**, 2339–46 (2014).
22. Kumar, S. Why do young people with chronic kidney disease die early? *World J. Nephrol.* **3**, 143 (2014).
23. Lai, S., Ciccariello, M., Dimko, M., Galani, A., Lucci, S., Cianci, R., & Mariotti, A. Cardio-Renal Syndrome Type 4: The Correlation Between Cardiorenal Ultrasound Parameters. *Kidney Blood Press Res* **41**, 654–662 (2016).
24. Nakano, S., Masuda, K., Asanuma, T. & Nakatani, S. The effect of chronic renal failure on cardiac function: an experimental study with a rat model. *J. Echocardiogr.* **14**, (2016).
25. Hewitson, T. D., Holt, S. G. & Smith, E. R. Animal models to study links between cardiovascular disease and renal failure and their relevance to human pathology. *Front. Immunol.* **6**, 1–9 (2015).
26. Vandenberghe, W., Gevaert, S., Kellum, J.A., Bagshaw, S.M., Peperstraete, H., Herck, I., & Decruyenaere, J. Hoste, Eric A J. Acute kidney injury in cardiorenal syndrome type 1 patients: A systematic review and meta-analysis. *CardioRenal Med.* **6**, 116–128 (2015).
27. Arls, A. Presión venosa central. Su determinación e importancia clínica. *Angiología XXI*, 303 (1969).
28. Gross, P., Six, I., Kamel, S. & Massy, Z. A. Vascular Toxicity of Phosphate in Chronic Kidney Disease. *Circ. J.* **78**, 2339–2346 (2014).
29. Gargiulo, R., Suhail, F. & Lerma, E. V. Cardiovascular disease and chronic kidney disease. *ELSEVIER* (2015). doi:10.1016/j.disamonth.2015.07.005
30. Goh, C. Y., Vizzi, G., De Cal, M. & Ronco, C. in *Controversies in Acute Kidney Injury* (2011). doi:10.1159/000329233
31. Colombo, P., Ganda, A. & Lin, J. et al. Inflammatory activation: cardiac, renal, and cardio-renal interactions in patients with the cardiorenal syndrome. *Computer (Long. Beach. Calif.)* **144**, 724–732 (2008).

32. Babitt, J. L. & Lin, H. Y. SCIENCE IN RENAL MEDICINE Mechanisms of Anemia in CKD. *J Am Soc Nephrol* **23**, 1631–1634 (2012).
33. Pinheiro da Silva, AL., Vaz da Silva, M. Type 4 cardorenal syndrome. *Port. Soc. Cardiol.* **35**, 200–209 (2016).
34. Chalovich, J. M. & Eisenberg, E. NIH Public Access. *Biophys. Chem.* **257**, 2432–2437 (2005).
35. Doi, K. Kidney-Heart Interactions in Acute Kidney Injury. *Nephron* **134**, 141–144 (2016).
36. Saccon, F., Gatto, M., Ghirardello, A., Iaccarino, L., Punzi, L., & Doria, A. Role of galectin-3 in autoimmune and non-autoimmune nephropathies. *Autoimmun. Rev.* **16**, 34–47 (2017).
37. Mondéjar, P. L., Picó, A., Seguí, J. & Maciá, A. L. Usefulness of galectin-3 expression in the clinical behavior of differentiated thyroid carcinoma | Utilidad de la expresión de galectina-3 en el comportamiento clínico del cáncer diferenciado de tiroides. *Med. Clin. (Barc).* **130**, 161–164 (2008).
38. Francis, J., Weiss, R. M., Wei, S. G., Johnson, a K. & Felder, R. B. Progression of heart failure after myocardial infarction in the rat. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **281**, R1734–R1745 (2001).
39. Ochodnický, P. Endothelial Function Predicts the Development of Renal Damage after Combined Nephrectomy and Myocardial Infarction. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, S49–S52 (2006).
40. Lubas, A., Ryzec, R., Kade, G. y Niemczyc, S. Renal Perfusion Index Reflects Cardiac Systolic Function in Chronic Cardio-Renal Syndrome. *Med. Sci. Monit.* **21**, 1089–1096 (2015).
41. Kluppel, A. C. A. *et al.* Myocardial Infarction Enhances Progressive Renal Damage in an Experimental Model for Cardio-Renal Interaction. **2**, 3103–3110 (2004).
42. Pennock, C. A., Passant, L. P. & Bolton, F. G. Estimation of cerebrospinal fluid protein. *J. clin. Path* **21**, 518–520 (1968).
43. Bonventre, J. & Yang, L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest.* **121**, 4210–4221 (2011).

44. Mejía-Vilet, J. M., Ramírez, V., Cruz, C., Uribe, N., Gamba, G. & Bobadilla NA. Renal ischemia-reperfusion injury is prevented by the mineralocorticoid receptor blocker spironolactone. 78–86 (2007). doi:10.1152/ajprenal.00077.2007.
45. Cortés-González, C. C., Ramírez-González, V., Ariza, A. C. & Bobadilla, N. A. Significado funcional de las proteínas de choque térmico de 90 kDa. *Rev. Investig. Clin.* **60**, 311–320 (2008).
46. Ratliff, B. B., Abdulmahdi, W., Pawar, R. & Wolin, M. S. Oxidant Mechanisms in Renal Injury and Disease. *Antioxid. Redox Signal.* **25**, 119–146 (2016).
47. Poulianiti, K. P., Kaltsatou, A., Mitrou, Gl., Jamurtas, AZ., Koutedakis, Y., Maridaki, M., Stefanidis, I., Sakkas, G K., & Karatzaferi, C. Systemic Redox Imbalance in Chronic Kidney Disease: A Systematic Review. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, (2016).
48. Liu, R. & Desai, L. P. Reciprocal regulation of TGF-  $\beta$  and reactive oxygen species : A perverse cycle for fibrosis. *Redox Biol.* **6**, 565–577 (2015).
49. Villanueva, S., Contreras, F. Tapia, A., Carreño, JE., Vergara, C., Ewertz, E. Cespedes, C., Irrarrazabal, C. Sandoval, M., Velarde, V. y & Vio, C. Basic fibroblast growth factor reduces functional and structural damage in chronic kidney disease. *Am J Physiol Ren. Physiol* **306** F430–F441 (2012).
50. Kupatt, C., Dessy, C., Hinkel, R., Raake, P., Daneau, G., Bouzin, C., Boekstegers, P., Feron, O. Heat shock protein 90 transfection reduces ischemia-reperfusion - Induced myocardial dysfunction via reciprocal endothelial NO synthase serine 1177 phosphorylation and threonine 495 dephosphorylation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 1435–1441 (2004).
51. Campedelli, FL., Silva, KSF. Rodrigues, Da., Martins, JVM., Costa, Ir., Lagares, MH., Barbosa, Am., de Morais, MP. Moura, K. Polymorphism of the gene eNOS G894T (Glu298Asp) in symptomatic patients with atherosclerosis. *Genet. Mol. Res.* **16**, 1–13 (2017).