



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**EFFECTO DE LA DEPLECIÓN DE LINFOCITOS
T CD4⁺ SOBRE LAS ALTERACIONES
CARDIOVASCULARES EN UN MODELO DE
ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:
JOHANNES HANANEEL GARCÍA BALLHAUS**

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

**ASESORAS PRINCIPALES:
DRA. JUANA ROSADO PÉREZ
MTRA. MARÍA TERESA HERNÁNDEZ GALINDO**

Ciudad de México, 2021





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 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”. México, Ciudad de México.

Periodo: diciembre 2019 - febrero 2021.

Este trabajo fue apoyado 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.

A los miembros del jurado:

Q.F.B. Carina Gutiérrez Iglesias	Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM
Dr. Jonatan Barrera Chimal	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dra. Juana Rosado Pérez	Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM
Mtra. María Teresa Hernández Galindo	Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM
Dra. Rosa Linares Culebro	Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM

Dedicatorias

A mis padres:

Pablo García Romero
y
Nieve Eloisa Ballhaus Santo.

A mi hermano:

Pablo García Ballhaus.

A mi alma máter, la Universidad
Nacional Autónoma de México.

Agradecimientos

Como tributo a aquel que me formó y me otorgó la dádiva de mi existencia, porque todo lo que soy y espero ser se lo debo a él...

Gracias A Dios por haberme permitido lograr una meta más y con ello culminar con esta etapa de mi vida, porque sé que sin su ayuda inefable no hubiese podido lograrlo.

A mis padres y mi hermano por todo el amor, cariño, paciencia, comprensión y apoyo que me han brindado desde siempre.

A mis amigos de toda la vida, quienes han estado siempre conmigo y me han apoyado y acompañado en mis éxitos y en mis fracasos.

Al Dr. Jonatan Barrera Chimal, director de tesis, por ser un gran guía académico. Gracias por sus consejos, la paciencia y por el tiempo dedicado a este trabajo y por la confianza al permitirme formar parte de este proyecto.

A mis asesoras de tesis: Dra. Juana Rosado Pérez y Mtra. María Teresa Hernández Galindo, por su apoyo y entusiasmo en la realización de este trabajo.

A mis sinodales: Dra. Rosa Linares Culebro y Q.F.B. Carina Gutiérrez Iglesias, por su apoyo, observaciones y comentarios acertados en la tesis.

A mis amigas y compañeras de laboratorio, por sus consejos, paciencia y apoyo brindado durante la realización de los experimentos y demás actividades.

A mi familia, en general, quienes siempre estuvieron pendientes de mi y me apoyaron durante la carrera.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por contribuir en mi formación profesional y sobre todo por hacer de mí una mejor persona.

Índice general

Contenido

1.	Marco teórico	5
1.1.	Fisiología renal	5
1.2.	Enfermedades renales	11
1.3.	La enfermedad cardiovascular en la enfermedad renal crónica	17
1.4.	Inflamación renal y cardíaca como consecuencia de la enfermedad renal crónica	21
1.5.	Linfocitos T CD4+ y el síndrome cardiorrenal	25
2.	Planteamiento del problema.....	30
3.	Justificación	31
4.	Hipótesis	32
5.	Objetivo general.....	33
5.1.	Objetivos específicos.....	33
6.	Metodología	34
6.1.	Estudios en la fase temprana de la enfermedad renal crónica	35
6.2.	Fase crónica de la enfermedad renal crónica.....	50
6.3.	Estudios histopatológicos	52
6.4.	Análisis estadístico	53
7.	Resultados	54
7.1.	Caracterización de la lesión renal en la fase aguda.	54
7.2.	Lesión tubular en el riñón como consecuencia de la isquemia / reperusión durante la fase temprana	60

7.3.	Factores proinflamatorios que se sobre expresan en la fase temprana de la progresión de la enfermedad renal crónica en el corazón.....	61
7.4.	Caracterización de la lesión renal en la fase crónica.....	67
7.5.	Caracterización de la lesión cardíaca en la fase crónica.....	69
7.6.	Factores pro-fibróticos que se sobre expresan en la fase crónica de la progresión de la enfermedad renal crónica en el corazón y el riñón y el efecto de la depleción de linfocitos T CD4 ⁺ sobre estos factores.....	70
8.	Discusión de resultados.....	81
8.1.	Caracterización del modelo de EnfermedadRC inducido por IR renal	81
8.2.	Factores proinflamatorios sobre expresados en la fase temprana de la progresión de la enfermedad renal crónica en el corazón.....	83
8.3.	Caracterización de la lesión renal y cardíaca en la fase crónica.....	85
8.4.	Efecto de la depleción de linfocitos T CD4 ⁺ sobre los factores pro-fibróticos sobre expresados en la fase crónica de la progresión de la enfermedad renal crónica en el riñón y el corazón.....	87
9.	Conclusiones.....	94
10.	Esquema de hallazgos.....	95
11.	Referencias.....	97

Índice de figuras

Figura 1. Microanatomía organizacional de la nefrona superficial y la yuxtamedular.....	6
Figura 2. Estructura del corpúsculo renal, vista al interior de la cápsula de Bowman en el penacho capilar glomerular.	8
Figura 3. Área de administración del anestésico.	36
Figura 4. Incisiones quirúrgicas.....	37
Figura 5. Colocación de los clips vasculares no traumáticos en los pedículos renales.	38
Figura 6. Placa de 96 pozos con la curva por duplicado y las muestras.....	43
Figura 7. A) Imagen del gel teñido con azul de Coomassie con las muestras de 24 horas, obtenida del fotodocumentador BIO RAD. B) Proteinuria en orina de los ratones del grupo sham e IR a las 24 h de la cirugía.	55
Figura 8. A) Imagen del gel teñido con azul de Coomassie con las muestras de 5 días, obtenida del fotodocumentador BIO RAD. B) Proteinuria en orina de los ratones del grupo sham e IR a los 5 días de la cirugía.	57
Figura 9. A) Inmunotransferencia de colágena como marcador de daño estructural y fibrosis en riñón y corazón. B) Imagen de la membrana de PVDF con muestras para detectar colágena teñida con rojo de Ponceau, obtenida del fotodocumentador BIO RAD. C) Representación gráfica de la expresión de colágena en riñón de los ratones del grupo sham y del grupo IR.....	59
Figura 10. Histología de tinciones en los riñones de los ratones de los grupos sham e IR de la fase temprana (5 días de evolución).	61

Figura 11. **A)** Representación gráfica de la expresión del gen CxCL-1 en el grupo sham y el grupo IR. **B)** Representación gráfica de la expresión del gen CxCL-2 en el grupo sham y el grupo IR..... 63

Figura 12. **A)** Representación gráfica de la expresión del gen ICAM-1 en el grupo sham y el grupo IR. **B)** Representación gráfica de la expresión del gen VCAM-1 en el grupo sham y el grupo IR..... 65

Figura 13. **A)** Representación gráfica de la expresión del gen IL-6 en el grupo sham y el grupo IR. **B)** Representación gráfica de la expresión del gen MCP-1 en el grupo sham y el grupo IR. **C)** Representación gráfica de la expresión del gen TNF- α en el grupo sham y el grupo IR. **D)** Representación gráfica de la expresión del gen IL-10 en el grupo sham y el grupo IR. 66

Figura 14. **A)** Representación gráfica de la media de los niveles de creatinina en plasma en los tres grupos de ratones de la fase crónica. **B)** Representación gráfica de la media de los niveles de urea en plasma en los tres grupos de ratones de la fase crónica. 68

Figura 15. Media del peso del corazón sobre el peso corporal de los ratones en los tres grupos..... 69

Figura 16. **A)** Representación gráfica de la expresión de colágena-1 en los tres grupos de ratones. **B)** Representación gráfica de la expresión de fibronectina en los tres grupos de ratones. **C, D, E, F, G y H)** Representaciones gráficas de la expresión de los genes TGF- β , PDGF, CTGF, PAI-1, MMP9 y α -SMA en los riñones de los ratones de los tres grupos..... 74

Figura 17. **A)** Representación gráfica de la expresión de colágena-1 en los tres grupos de ratones. **B)** Representación gráfica de la expresión de fibronectina en los tres

grupos de ratones. C, D, E, F, G y H) Representaciones gráficas de la expresión de los genes TGF- β , PDGF, CTGF, PAI-1, MMP9 y α -SMA en los corazones de los ratones de los tres grupos.	79
Figura 18. Esquema sobre los hallazgos más importantes encontrados en el presente trabajo.	95

Abreviaturas

- 18S**, RNA ribosómico 18S.
- AP**, Arteriopatía periférica.
- CD**, Células dendríticas.
- cDNA**, Ácido desoxirribonucleico complementario.
- CrS**, Creatinina sérica.
- CTGF**, Factor de crecimiento de tejido conectivo.
- CV**, Cardiovascular.
- CxCL-1**, Ligando 1 de quimiocina CxC.
- CxCL-2**, Ligando 2 de quimiocina CxC.
- DNA**, Ácido desoxirribonucleico.
- DNAsa**, Desoxirribonucleasa.
- dNTPs**, Desoxinucleósido trifosfato.
- ECV**, Enfermedad cardiovascular.
- ERC**, Enfermedad renal crónica.
- EVC**, Enfermedad vascular cerebral.
- FF**, Fracción de filtración.
- FPR**, Flujo plasmático renal.
- GAPDH**, Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa.
- HLA-D**, Molécula de histocompatibilidad de clase II.
- IC**, Insuficiencia cardíaca.
- ICAM-1**, Molécula de adhesión intercelular.
- IL-10**, Interlucina-10.
- IL-1 β** , Interlucina-1beta.
- IL-6**, Interlucina-6.
- IM**, Infarto agudo al miocardio.
- INF- γ** , Interferón gamma.
- IR**, Isquemia / Reperusión.
- IR + Anti-T CD4⁺**, Grupo de ratones con isquemia / reperusión más anticuerpo anti CD4⁺.
- IR + IgG**, Grupo de ratones con isquemia / reperusión más IgG.
- KDIGO**, Kidney disease improving global outcomes.
- KEEP**, Kidney early evaluation program.
- LC**, Laberinto cortical.
- LRA**, Lesión renal aguda.
- MAPK**, Proteína quinasa activada por mitógeno.
- MBG**, Membrana basal glomerular.
- MCP-1**, Proteína quimioatrayente de monocitos-1.
- MEC**, Matriz extracelular.
- MMP9**, Metalopepsidasa de matriz 9.
- NF- κ B**, Factor nuclear kB.
- NK**, Células natural killer.
- NTA**, Necrosis tubular aguda, 17
- PAI-1**, Proteína inhibidor de la serina proteasa.
- PDGF**, Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

RNA, Ácido ribonucleico.

RNA_m, Ácido ribonucleico mensajero.

RNAsa, Ribonucleasa.

RTasa, Retrotranscriptasa.

RT-qPCR, Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa, cuantitativa.

SCR, Síndrome cardiorenal.

Sham, Grupo de ratones control.

T_c, CD8⁺ T-citotóxico.

TC, Túbulo de conexión corto.

TCD, Túbulo contorneado distal.

TCP, Túbulo contorneado proximal.

TCR, Receptor de linfocito T.

TFG, Tasa de filtración glomerular.

TGF- β , Factor de crecimiento transformante beta.

Th, Células T CD4⁺ helper.

TNF- α , Factor de necrosis tumoral Alpha.

Tregs, Células T reguladoras.

TRR, Terapia de remplazo renal.

VCAM-1, Molécula 1 de adhesión celular vascular.

VIH, Virus de inmunodeficiencia humana.

WB, Western blot.

α -SMA, Alfa actina del músculo liso.

Resumen

La enfermedad renal crónica (ERC) es un problema de salud pública con una prevalencia mundial estimada del 13%. La principal causa de muerte prematura en los pacientes con ERC es debido a complicaciones cardiovasculares. En estudios previos se ha mostrado que durante fases tempranas de la ERC se incrementa la infiltración de linfocitos T CD4⁺ hacia el tejido cardíaco, sin embargo, se desconoce cuáles son los mediadores inflamatorios que facilitan la infiltración de linfocitos T CD4⁺ hacia el corazón y cuál es el papel de estas células en el daño cardíaco durante la ERC.

Por ello, el objetivo principal del presente trabajo fue evaluar el efecto de la depleción de células T CD4⁺ sobre las alteraciones cardiovasculares en un modelo murino de enfermedad renal crónica por lo que se evaluaron 1) los niveles de expresión de diferentes quimiocinas, moléculas de adhesión y citocinas pro-inflamatorias en el corazón durante las fases tempranas de la ERC y 2) el efecto de la depleción temprana y transitoria de linfocitos T CD4⁺ sobre las alteraciones cardíacas y renales en un modelo de ERC inducida por isquemia / reperfusión (IR).

Se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6 de 8 a 12 semanas de edad. Para identificar los mediadores tempranos del proceso inflamatorio, se incluyeron dos grupos de ratones: cirugía falsa (sham) y ratones sometidos a un proceso de isquemia renal bilateral (IR), colocando clips vasculares no traumáticos sobre los pedículos renales durante 25 min y retirándolos después para permitir la reperfusión; los ratones se estudiaron a los cinco días posteriores a la IR. Para el estudio de los efectos crónicos de la depleción de linfocitos T CD4⁺, los ratones se dividieron en tres grupos: sham, IR + IgG e IR más la administración

intraperitoneal de un anticuerpo anti CD4 al día 3 post IR (IR + anti-CD4); los ratones se estudiaron a las 8 semanas.

En los ratones que se estudiaron a los cinco días después de la IR se observó la presencia de proteinuria y de anomalías en la estructura renal, además, a nivel cardíaco se encontró un incremento en los niveles de RNA mensajero (mRNA) de las quimiocinas CXCL1 y CXCL2, las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 así como de la citocina pro-inflamatoria TNF- α .

En los animales que se estudiaron en la fase crónica se demostró que el modelo de progresión a ERC inducida por IR fue efectivo ya que los animales del grupo IR + IgG desarrollaron disfunción renal evidenciada por un incremento en los niveles de creatinina y urea en plasma y un aumento en los niveles renales de mRNA de diferentes moléculas pro-fibróticas. Además, también se pudo caracterizar la lesión cardíaca ya que los animales del grupo de IR + IgG desarrollaron hipertrofia cardíaca e incremento en los niveles de mRNA de marcadores de fibrosis. De forma interesante, la depleción de los linfocitos T CD4⁺ se asoció con la reducción en los niveles de urea en plasma y de marcadores de fibrosis renal. Además, en los ratones IR + anti-CD4 se previno la hipertrofia cardíaca.

En este trabajo se mostró que durante las fases tempranas de la ERC se incrementa la expresión cardíaca de quimiocinas, moléculas de adhesión y citocinas inflamatorias las cuales pueden explicar el incremento en la infiltración de linfocitos T CD4⁺ al tejido cardíaco. Además, se evidenció que la depleción temprana y transitoria de linfocitos T CD4⁺ tiene un efecto benéfico sobre la severidad de la ERC y las alteraciones cardíacas que aparecen como consecuencia de la ERC.

Introducción

La enfermedad renal crónica (ERC) es un problema de salud que, de acuerdo con estudios recientes, afecta al 13% de la población mundial, es decir, que aproximadamente 850 millones de personas en el mundo cursan con algún grado de disfunción renal por lo que se ha convertido en un tema de salud de gran relevancia debido a su gran impacto a nivel global.

En México, durante los últimos años y hasta la actualidad, la ERC se ha convertido en la segunda causa de muerte prematura ya que cerca del 8% de la población padece ERC y aproximadamente 100,000 pacientes se encuentran en terapias de reemplazo renal (TRR) por lo que se estima que el índice de mortalidad por ERC en el país es de 12.3 por cada 100,000 habitantes. Además, al aumento en la frecuencia de la enfermedad debido a factores de riesgo como la diabetes mellitus, la hipertensión y la obesidad, aunado con el diagnóstico tardío, así como los altos costos que genera a nivel del sector salud lo han convertido en un importante problema de salud pública con grandes implicaciones sociales y económicas.

La principal causa de muerte en los pacientes con ERC es debido a complicaciones cardiovasculares, sin embargo, no se tiene claro cuáles son los mecanismos por los que, a partir de una lesión renal se desarrollen alteraciones cardiovasculares que culminan en complicaciones fatales. A esta relación entre la ERC y las complicaciones cardiovasculares se le conoce como una manifestación clínica llamada síndrome cardiorrenal. En estudios recientes se ha observado que, durante el desarrollo de las alteraciones cardiovasculares debidas a la ERC, los niveles cardíacos de diferentes células del sistema inmune se ven incrementadas, por lo que se ha planteado la posibilidad de que las complicaciones

cardiovasculares sean provocadas, al menos en parte, por la infiltración excesiva de estas células en el tejido cardíaco. También se desconoce cuáles son los mediadores inflamatorios que podrían estar facilitando la infiltración de estas células en el tejido cardíaco y sobre todo, cual es el rol que juegan en el daño cardíaco. En estudios previos de nuestro equipo de investigación realizados en un modelo murino de ERC inducida por IR, se ha observado que los linfocitos T CD4⁺, los macrófagos y las células dendríticas son las células que presentan un mayor incremento en el tejido cardíaco durante las etapas tempranas de la ERC y de acuerdo con la evidencia teórico-científica, estas podrían tener un rol importante sobre el desarrollo de las alteraciones cardiovasculares. Es por ello por lo que en el presente trabajo se ha hecho énfasis en estudiar a los linfocitos T CD4⁺, determinando que mediadores inflamatorios podrían ser responsables de su incremento en tejido cardíaco en etapas tempranas de ERC, así como, observando el efecto de su depleción sobre los cambios estructurales en corazón y riñón. El identificar los mediadores tempranos de la infiltración de células inflamatorias al corazón así como el evaluar el efecto de la depleción de linfocitos T CD4⁺ sobre las alteraciones renales y cardíacas nos ayudará a identificar blancos terapéuticos que pueden seguir estudiándose para mejorar el conocimiento sobre los posibles mecanismos de acción y así establecer el tratamiento más adecuado con el propósito de disminuir la tasa de mortalidad y mejorar el pronóstico de vida de los pacientes con ERC.

1. Marco teórico

1.1. Fisiología renal

El sistema urinario se conforma por el riñón, los uréteres, la vejiga urinaria y la uretra. Su función principal es la de filtrar a la sangre asegurando así la eliminación de los productos de desecho metabólico, toxinas y del exceso de iones, a través de la generación, almacenamiento y expulsión de la orina de forma periódica y de manera coordinada, según las necesidades del propio organismo.(1)

Específicamente, el riñón es el órgano que regula la osmolaridad plasmática debido a que mantiene un control equilibrado de la cantidad de agua, solutos y electrolitos en la sangre, gracias a los procesos de filtración, reabsorción y secreción, así mismo, es capaz de mantener el equilibrio ácido base y también produce eritropoyetina, la cual estimula la producción de eritrocitos; renina, para la regulación de la presión arterial y también puede realizar la conversión de la vitamina D a su forma activa.(2)

Macroscópicamente, el riñón se divide en dos partes: la corteza renal (parte externa) y la médula (parte interna). En ellas se encuentran las nefronas, que son la unidad funcional del riñón y que a su vez se componen de un glomérulo y un complejo sistema tubular. El riñón humano está compuesto por aproximadamente 1 millón de nefronas y la tasa de filtración glomerular (TFG) para todo el organismo, es la suma de las tasas de filtración individuales de aproximadamente 2 millones de glomérulos (en los dos riñones) sin embargo, puede haber diferencias significativas en el tamaño y las tasas de filtración de los glomérulos individuales en las diferentes regiones del riñón, por ello es importante entender la estructura de la nefrona para así comprender el funcionamiento del riñón.(3)

Existen dos tipos de nefronas (*Figura 1*):

- 1) Nefronas superficiales, sus glomérulos están ubicados cerca de la superficie cortical y tienen asas de Henle cortas.
- 2) Nefronas yuxtamedulares, con glomérulos ubicados cerca de la unión cortico-medular y tienen asas de Henle largas que descienden más profundamente hacia la médula renal.(4)

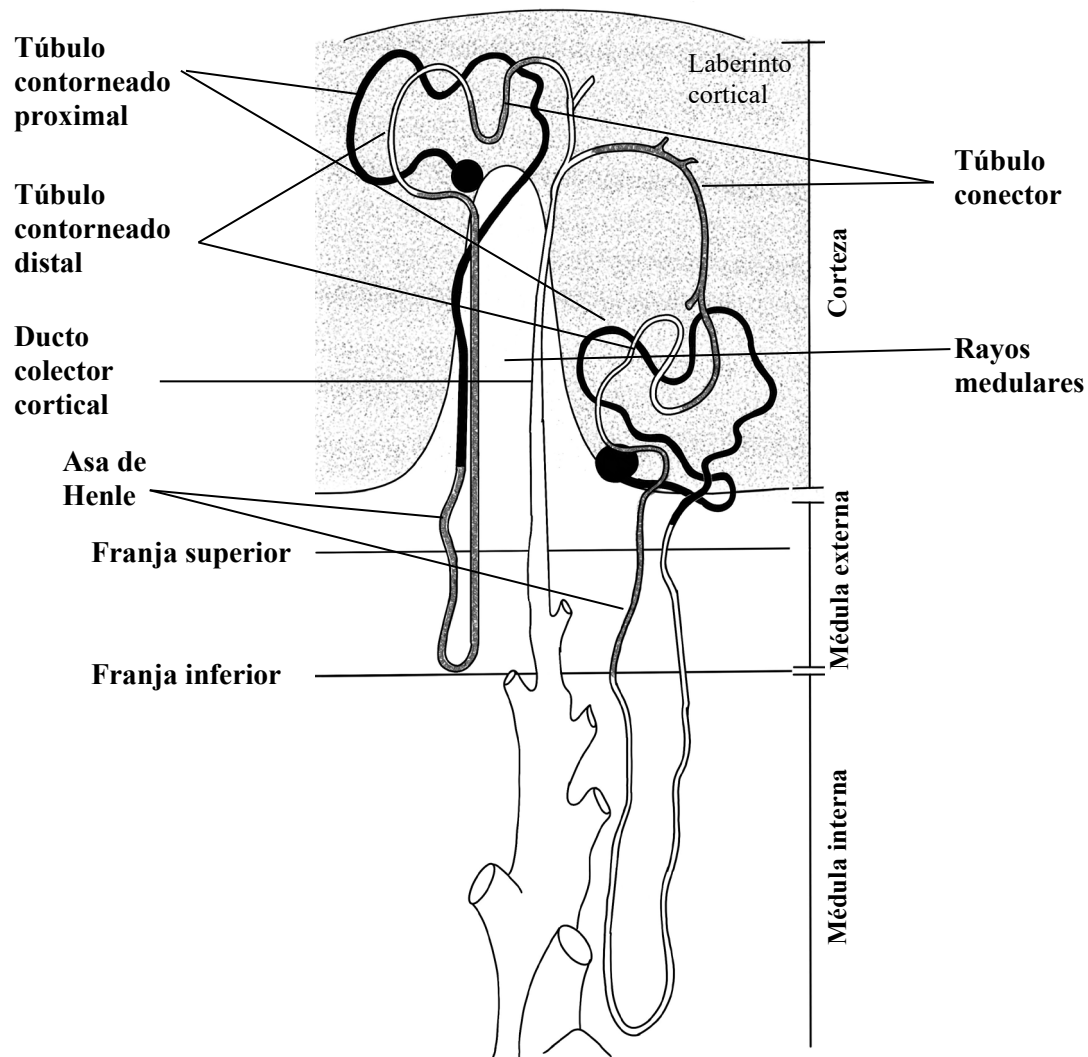


Figura 1. Microanatomía organizacional de la nefrona superficial y la yuxtamedular. Las nefronas superficiales (a la izquierda de la figura 1), se conforman de un túbulo contorneado distal (TCD, en color blanco), un túbulo de conexión corto (TC, que se muestra sombreado) y una porción del epitelio del ducto colector que comienza proximal para formar el ducto colector. Una nefrona

yuxtamedular (a la derecha de la figura) tiene largas asas de Henle que descienden hacia la médula renal. En las nefronas yuxtamedulares, el TC se une para formar ramificaciones que ascienden a través del laberinto cortical (LC) antes de vaciarse al ducto colector (DC).

Tomado y modificado de McCormick JA, Ellison DH. Distal convoluted tubule. Compr Physiol [Internet]. 2015 Jan;5(1):45–98.(4)

Glomérulo

El glomérulo está formado por capilares los cuales permiten filtrar grandes cantidades de sangre y, a su vez, se rodean de una membrana impermeable denominada cápsula de Bowman. La barrera de filtración glomerular se compone de tres estructuras que le proporcionan soporte y propiedades selectivas (**Figura 2**):

- 1) Endotelio fenestrado de los capilares glomerulares, que confiere selectividad con el tamaño de las fenestras que ronda de 70 a 100 nm de diámetro.
- 2) Membrana basal glomerular (MBG), es gruesa y está compuesta de proteínas extracelulares como fibronectina y colágeno, además confiere selectividad de carga a las partículas que son filtradas.
- 3) Podocitos, recubre a la MBG y sirven para dar integridad a las asas capilares.(3)

Una vez que se filtra la sangre, el ultrafiltrado pasa al túbulo contorneado proximal (TCP). Tanto el glomérulo como la primera porción del TCP se encuentran en la corteza.(5)

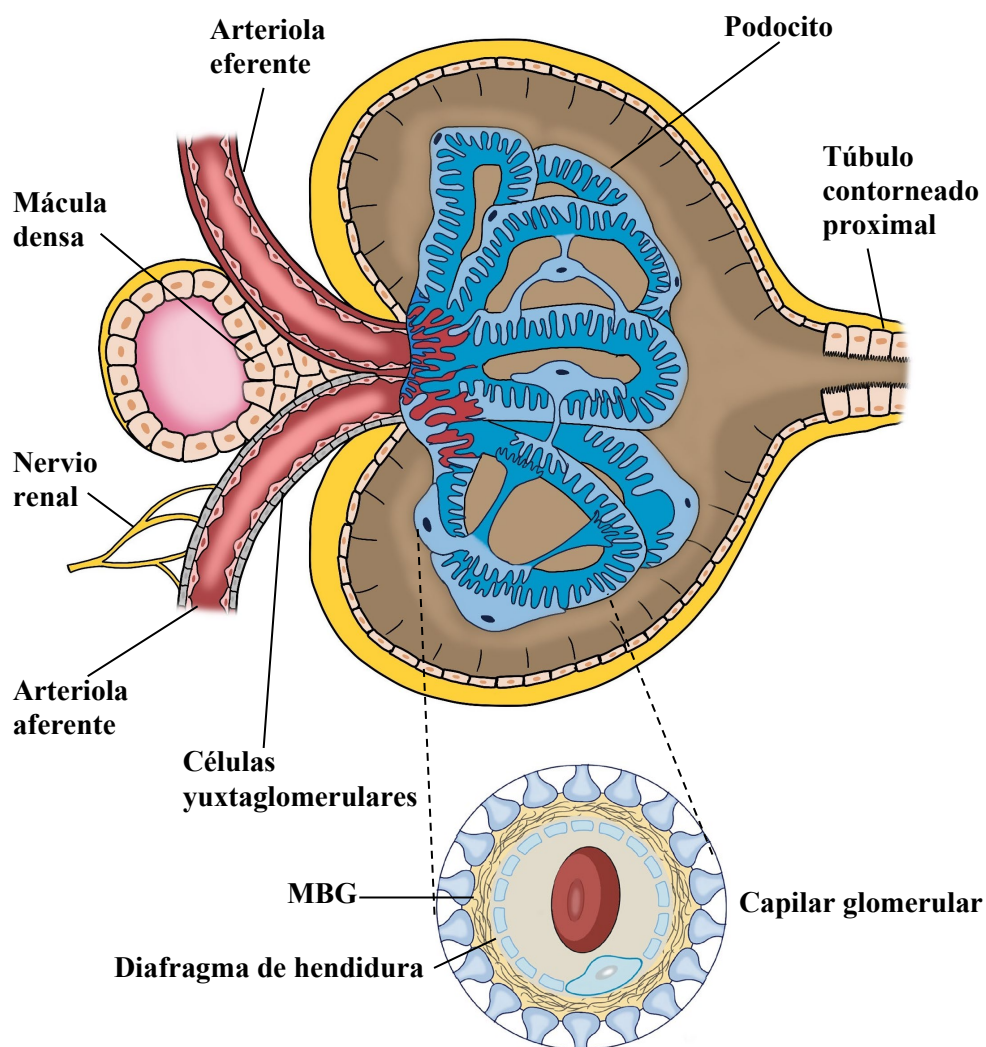


Figura 2. Estructura del corpúsculo renal, vista al interior de la cápsula de Bowman en el penacho capilar glomerular. La cápsula se encuentra cubierta con epitelio parietal y da paso a las células del túbulo proximal en el polo urinario a la derecha. A la izquierda, se ubican las arteriolas aferente y eferente en el polo vascular del glomérulo. Se aprecia la relación entre estas arteriolas y la porción especializada de la nefrona distal llamada mácula densa. Además, se muestran las capas que comprenden la barrera de filtración siendo la más externa compuesta por las células epiteliales viscerales, los podocitos, luego la membrana basal glomerular (MBG) y finalmente las células endoteliales fenestradas.

Tomado y modificado de Pollak MR, Quaggin SE, Hoenig MP, Dworkin LD. The glomerulus: The sphere of influence. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014;9(8):1461–9.(3)

Túbulo contorneado proximal

El TCP se encuentra adyacente al glomérulo y está dedicado a la absorción y transporte de agua, electrolitos y otras partículas gracias a microvellosidades que favorecen e incrementan la superficie de contacto con el ultrafiltrado y a mitocondrias largas y delgadas que recubren el polo basal celular. Los capilares peritubulares que rodean al TCP son responsables de suministrar sangre a los túbulos, así como llevar a cabo la recuperación de agua libre reabsorbida, iones y otros componentes como aminoácidos y glucosa.(5)

Asa de Henle

El TCP abandona la corteza y se convierte en una delgada extremidad descendente conocida como asa de Henle que se encuentra ya en la médula, se vuelve cada vez más estrecha y luego gira hacia arriba (extremidad ascendente delgada) convirtiéndose en una rama ascendente gruesa, en esta parte aumentan el número de microvellosidades y mitocondrias para participar en el transporte activo de sodio y así, diluir o concentrar la orina.(5)

Aparato yuxtaglomerular y túbulo contorneado distal

El aparato yuxtaglomerular es una región que se encarga de regular la filtración glomerular a través de la retroalimentación túbulo-glomerular y se encuentra cerca del polo vascular del glomérulo.

La rama ascendente gruesa se convierte en el túbulo contorneado distal (TCD) y ahí, las células destacan por contener el mayor número de mitocondrias.(5)

Conexión y recogida de túbulos.

La última parte de la nefrona está formada por los túbulos conectores en donde se da el último ajuste a la orina. En esta parte se encuentran las células intercaladas y las células del túbulo conector las cuales regulan la secreción de hidrógeno y bicarbonato.

La presencia de las células principales marca la transición hacia los túbulos colectores y la parte final de la nefrona. En las nefronas corticales, el túbulo conector conduce al túbulo colector y los túbulos conectores de las nefronas yuxtamedulares se unen y forman una arcada que drena en un conducto colector compartido.(5)

Se sabe que los riñones reciben aproximadamente un 25% del gasto cardíaco lo que equivale a 1,200 mL/min de flujo sanguíneo renal o 600 mL/min de flujo plasmático renal (FPR). La fracción de filtración (FF) representa la proporción del FPR que pasa a los túbulos renales, y normalmente es del 20% lo que quiere decir que la TFG es de 120 mL/min en una persona promedio de 60 kg.(3,5)

Fisiopatología

Las patologías relacionadas con las nefronas son complejas ya que cada sección de la nefrona es susceptible a diferentes tipos de daño y más de una estructura puede verse afectada por una sola enfermedad lo que resultaría en un daño propagado debido a la interdependencia de las estructuras en el riñón. Las enfermedades glomerulares a menudo están mediadas por daños inmunológicos, mientras que los trastornos en los túbulos son causados por agentes tóxicos o infecciosos.(5)

Por lo anterior, el presentar alguna alteración en alguno de los componentes del sistema urinario, y principalmente en el riñón, podría desencadenar problemas de salud que

pueden llegar a ser tan severos que pueden afectar de forma permanente al estilo de vida de las personas, empeorándolo y en casos muy extremos, ocasionar la muerte.

1.2. Enfermedades renales

Las patologías del sistema urinario tienen una amplia gama de presentaciones clínicas, por ejemplo, las infecciones enfisematosas del tracto urinario, las enfermedades renales como la lesión renal aguda y la enfermedad renal crónica, la nefrolitiasis, la incontinencia urinaria en hombres y mujeres entre otras. Además, las enfermedades renales son un problema de salud que afectan a un gran número de personas en todo el mundo y principalmente aquellos con enfermedad renal crónica (ERC), lesión renal aguda (LRA) así como los que se encuentran con terapias de reemplazo renal (TRR) exceden los 850 millones de personas afectadas en el mundo (6), una cifra que supera al doble el número estimado de los pacientes con diabetes mellitus y es veinte veces mayor que el número de individuos infectados por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). La LRA y la ERC son de las enfermedades más comunes en todo el mundo siendo la ERC la de mayor prioridad debido a las complicaciones que se pueden desarrollar durante su progresión.

La prevalencia de la enfermedad renal varía sustancialmente alrededor del mundo, así como su diagnóstico y tratamiento ya que la disponibilidad de la información es limitada e inconsistente.(7)

En la última década se han obtenido datos que relacionan diversos factores como los genéticos, ambientales, sociodemográficos y clínicos con la enfermedad renal. Por otra parte, en América central y el sureste de México, la conocida nefropatía mesoamericana (también referida como ERC de causas desconocidas) ha surgido como una causa importante de enfermedad renal (7). Esta nefropatía mesoamericana tiene una elevada

prevalencia en los países de bajo y medio desarrollo de las zonas antes mencionadas y es definida como de causas desconocidas porque no se presentan los factores de riesgo tradicionales que se conocen para la ERC los cuales son la diabetes y la hipertensión, por ello, se ha sugerido que un factor de riesgo para este tipo de ERC es la exposición ambiental a metales pesados y otros contaminantes como fertilizantes, así como la prolongada exposición a altas temperaturas y baja hidratación durante largas jornadas de trabajo (8).

Por consiguiente, antes de abordar el tema sobre la importancia de atender la ERC es necesario hablar sobre la LRA ya que ambas son enfermedades renales y comparten ciertas características que culminan en un daño irreversible en los riñones y además, el haber padecido un episodio de LRA es un factor de riesgo importante para el desarrollo de ERC, sin embargo, se diferencian en el tiempo (agudo o crónico) en el que se lleva a cabo un daño estructural y funcional en los riñones el cual puede ser medido, principalmente con los niveles de creatinina sérica y depuración de creatinina así como en los valores de volumen urinario y excreción urinaria de proteínas.

1.2.1. Lesión renal aguda

Se entiende por lesión renal aguda a la reducción repentina de la función de los riñones durante un periodo corto de tiempo (48 horas aproximadamente) lo que ocasiona un incremento en la concentración de la creatinina sérica (CrS; producto de deshecho que se acumula en la sangre al existir disfunción renal) por lo que se consideran los siguientes valores para establecer el diagnóstico: un incremento en los niveles de CrS ≥ 0.3 mg/dL o cuando se incrementen a ≥ 1.5 veces el valor inicial conocido de CrS en 48 horas; o que se presume que ha ocurrido dentro de los 7 días anteriores; o la obtención de un volumen urinario <0.5 mL/kg/h por 6 horas (9). El concepto de la LRA ha sido reexaminado en

varias ocasiones, sin embargo, hay evidencias que sugieren que la LRA se caracteriza por cambios en la producción de orina y en la química sanguínea que de igual manera sirven para predecir consecuencias clínicas severas (9). Dentro de las principales causas de LRA se encuentran la hipovolemia, choque séptico, cirugías abdominales mayores y/o tratamiento con fármacos nefrotóxicos. (9)

1.2.2. Enfermedad renal crónica

1.2.2.1. Etiología

Las causas de la ERC varían globalmente, sin embargo, existen enfermedades primarias comunes que pueden causar ERC y en última instancia ERC en fase terminal, las cuales se enlistan a continuación:

- Diabetes mellitus tipo 2 (30% a 50%)
- Hipertensión arterial (27.2%)
- Glomerulonefritis primaria (8.2%)
- Diabetes mellitus tipo 1 (3.9%)
- Nefritis tubulointersticial crónica (3.6%)
- Enfermedades quísticas o hereditarias (3.1%)
- Vasculitis o glomerulonefritis secundaria (2.1%)
- Neoplasias o discrasias de células plasmáticas (2.1%) (10)

La ERC puede resultar de los procesos de las enfermedades en cualquiera de las tres categorías:

- Cambios hemodinámicos: cuando hay una disminución en la presión de la perfusión renal. Esto ocurre, principalmente, en pacientes con insuficiencia cardíaca o cirrosis

los cuales tienen ya una disminución persistente en la perfusión renal, lo que incrementa la probabilidad de que sean propensos a múltiples episodios de una lesión intrínseca del riñón, así como una necrosis tubular aguda (NTA) y esto conduzca al desarrollo de ERC.(10)

- Lesión renal intrínseca de enfermedad vascular, glomerular y tubular e intersticial: cuando hay patologías relacionadas con los vasos, glomérulos o túbulos intersticios.
 - Para la vascular, la más común es la nefrosclerosis la cual causa un daño crónico en los vasos sanguíneos, glomérulos y túbulos intersticios.(10)
 - Para la glomerular, se identifica debido a la presencia de un patrón anormal en el recuento de células sanguíneas en la orina, así como un grado variable de albuminuria las cuales son ocasionadas comúnmente por *Streptococcus*, endocarditis infecciosa, nefritis en derivación, nefropatía de IgA, nefritis lúpica, síndrome de Goodpasture y vasculitis.(10)
 - Para la intersticial, la más común es la enfermedad renal poliquística, aunque también se puede incluir la nefrocalcinosis, sarcoidosis y síndrome de Sjögren. En esta categoría hay un incremento en el reconocimiento de la nefropatía mesoamericana.(10)

La ERC también se puede originar como consecuencia de un episodio de LRA. En esta, una reparación defectuosa después de la LRA que se caracteriza por inflamación crónica, rarefacción vascular, arresto de las células del epitelio tubular en la fase G2/M del ciclo celular y activación de fibroblastos, juegan un papel esencial en el desarrollo de fibrosis y disfunción renal.(10)

- Obstructiva: Cuando existe una obstrucción y esta puede ser por una enfermedad prostática o una nefrolitiasis o tumor abdominal/pélvico con más efecto en el uréter.(10)

1.2.2.2. Epidemiología de la ERC

La enfermedad renal crónica, por su parte, es un problema de salud que tiene gran impacto a nivel mundial, con una prevalencia estimada del 13% con lo que se calcula que cerca de 850 millones de personas en el mundo presentan cierto grado de disfunción renal (6,11). En México, se estima que el 8% de la población padece ERC y cerca de 100,000 pacientes se encuentran en TRR, además se estima que el rango de mortalidad anual es de 12.3 por cada 100,000 habitantes y se ha convertido en la segunda causa de muerte prematura en el país.(8)

Así mismo, en México, durante un estudio realizado para conocer la prevalencia de la enfermedad renal crónica en el KEEP (Kidney Early Evaluation Program), se ha detectado que los factores de riesgo más importantes para la ERC son la diabetes y la hipertensión.(12)

La ERC se caracteriza por un deterioro funcional persistente durante más de tres meses, con o sin evidencia de un déficit estructural (13). La reducción de la tasa de filtración glomerular (TFGe) a menos de 60 mL/min/1.73 m² indica un daño renal y así mismo, el desarrollo de anormalidades funcionales de los riñones como proteinuria, una elevada proporción de albúmina-creatinina en la orina y anormalidades en el sedimento urinario, como glóbulos rojos dismórficos son factores importantes bien establecidos que determinan el diagnóstico de ERC.(14,15)

1.2.2.3. Clasificación de la ERC

El consorcio KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) en 2012 clasificó a la ERC en 6 categorías basadas en la TFGe (de G1 a G5 con G3 dividido en 3a y 3b, *Tabla 1.*) además, incluye subcategorías basadas en los niveles de albuminuria (A1, A2 y A3, *Tabla 2.*), con ello cada etapa subcategorizada, de acuerdo a la proporción de albumina-creatinina en orina, se mide en (mg/mg) o (mg/mmol) en una muestra de orina obtenida en la mañana, es decir, la primera orina de la mañana.(10)

Tabla 1. *Categorías de la ERC basada en la TFGe.* Modificado de: Official Journal of the International Society of Nephrology KDIGO 2012, Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. (16)

Categoría de TFGe	TFGe (mL/min/m²)	Interpretación
G1	90 o mayor	Normal o alta
G2	60 a 89	Levemente disminuido
G3a	45 a 59	Leve o moderadamente disminuido
G3b	30 a 44	Moderada o severamente disminuido
G4	15 a 29	Severamente disminuido
G5	Menos de 15	Fallo renal

Tabla 2. *Categorías por niveles de albuminuria.* Modificado de: Official Journal of the International Society of Nephrology KDIGO 2012, Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease.(16)

Categoría	Tasa de excreción de albúmina (mg/24 horas)	Relación albúmina-creatinina		
		(mg/mmol)	(mg/g)	Interpretación
A1	Menor a 30	Menor a 3	Menor a 30	Normal o levemente incrementado
A2	30 a 300	3 a 30	30 a 300	Moderadamente incrementado
A3	Mayor a 300	Mayor a 30	Mayor a 300	Severamente incrementado

En la etapa G5 de la ERC, la más avanzada según la clasificación dada por la KDIGO (16), las opciones terapéuticas son las de TRR como la diálisis peritoneal o la hemodiálisis y en algunos casos, cuando se llega a la insuficiencia renal, se opta por el trasplante de riñón sin embargo, a pesar de que el trasplante es la opción terapéutica que incrementa en mayor proporción la calidad de vida de los pacientes renales, no siempre representa un buen pronóstico para la salud del paciente ya que no se asegura que el nuevo órgano cumpla con todas las funciones adecuadamente y así mismo se puede llegar a otras complicaciones como el rechazo del órgano trasplantado, infecciones microbianas (tanto en la hemodiálisis como en la diálisis peritoneal), inflamación renal, nefrotoxicidad inducida por la administración de medicamentos, disfunción crónica del injerto, entre otras.(17,18)

1.3. La enfermedad cardiovascular en la ERC

1.3.1. Fisiología cardíaca

Una de las principales alteraciones secundarias a la ERC son las relacionadas a la enfermedad cardiovascular (ECV). Antes de abordar los temas relacionados a la ECV que

surge como consecuencia/efecto secundario de la enfermedad renal, es necesario conocer acerca del funcionamiento del corazón, así como comprender la estrecha relación entre la fisiología cardíaca y otros sistemas de órganos y como la fisiopatología se relaciona con la fisiología macroscópica simple.

El corazón es un órgano vital que tiene la función principal de bombear la sangre que suministra oxígeno y nutrientes a todo el cuerpo. Este órgano cuenta con cuatro cavidades, una aurícula y un ventrículo en cada lado (derecho e izquierdo). Las cavidades de la parte derecha reciben la sangre desoxigenada del cuerpo y la envía a los pulmones para ser oxigenada, así la sangre regresa a las cavidades de la parte izquierda y es enviada a todo el cuerpo. Esto sucede gracias a los cardiomiocitos; la matriz extracelular (MEC), la cual proporciona un soporte bioquímico y estructural; fibroblastos, que produce el MEC; células endoteliales, que recubren las cavidades, arterias, venas y válvulas; y un sistema de conducción eléctrica que le permite al corazón coordinar secuencialmente las contracciones.(19)

A pesar de que el corazón es un órgano notablemente resistente y que puede adaptarse a través de múltiples variables como la frecuencia cardíaca, volumen sistólico, precarga, poscarga, diástole y sístole existe un gran número de etiologías que pueden afectar el correcto funcionamiento y provocar una insuficiencia cardíaca y en casos más severos, la muerte.(20)

1.3.2. Incidencia de la ECV en la ERC

Un aumento de la tasa de morbilidad y mortalidad de los pacientes con ERC está muy relacionado con las complicaciones cardiovasculares en las que se incluyen el infarto agudo al miocardio (IM), la insuficiencia cardíaca (IC), la enfermedad valvular, la

enfermedad vascular cerebral (EVC), la arteriopatía periférica (AP), la enfermedad tromboembólica y la muerte cardíaca súbita las cuales son todas las formas de la enfermedad cardiovascular (ECV) y que se desencadenan a partir de los daños provocados por la ERC, lo que la convierte en la principal causa de muerte en estos pacientes y por ello se dice que los pacientes con ERC tienen más probabilidad de morir por una ECV que progresar a la etapa G5 de la ERC (21). De hecho, más del 50% de los pacientes con ERC fallecen por complicaciones CV.

1.3.3. *Síndrome cardiorrenal*

Esta relación ERC-ECV representa una manifestación clínica denominada como síndrome cardiorrenal (SCR). Ronco et al. (22) propusieron una clasificación de cinco tipos de SCR, dependiendo de las interacciones etiológicas y cronológicas como se muestra en la **Tabla 3**. El SCR incluye un amplio espectro de enfermedades en las que se involucra el corazón y el riñón por ello, el SCR reconoce dos grupos principales, el síndrome cardiorrenal y renocárdico que, a su vez, se dividen en crónicos y en agudos según la temporalidad de la enfermedad (23). En particular el SCR tipo IV es en el que la ERC conduce al desarrollo de alteraciones cardiovasculares crónicas como remodelación y disfunción cardíaca crónica (23,24). En el SCR tipo IV, el sistema cardiovascular se ve afectado por una amplia gama de alteraciones clínicas de la ERC incluyendo uremia y anemia debido a la insuficiencia renal y metabolismo anormal de fosfato inorgánico y de calcio que conducen a calcificación vascular. Además, se presenta disfunción endotelial e inflamación crónica que pueden contribuir al desarrollo de fibrosis, hipertrofia y disfunción cardíaca.(23)

Tabla 3. *Clasificación del Síndrome Cardiorenal.* Modificado de: Di Lullo L, House A, Gorini A, Santoboni A, Russo D, Ronco C. Chronic kidney disease and cardiovascular complications. Heart Fail Rev. 2015;20(3):259–72.(24)

<p>Síndrome Cardiorenal (SCR) definición: Trastorno fisiopatológico del corazón y los riñones por el cual la disfunción aguda o crónica en un órgano puede indicar una disfunción aguda o crónica en el otro órgano.</p>
<p>SCR I (Síndrome Cardiorenal agudo) Empeoramiento abrupto de la función cardíaca que conduce a una lesión renal aguda (p. ej. Shock cardíaco agudo o insuficiencia cardíaca congestiva agudamente descompensada).</p>
<p>SCR II (Síndrome Cardiorenal crónico) Anomalías crónicas en la función cardíaca (p. ej. Insuficiencia cardíaca congestiva) que causan ERC progresiva y potencialmente permanente.</p>
<p>SCR III (Síndrome Renocárdico agudo) Empeoramiento abrupto de la función renal (p. ej. Isquemia aguda por enfermedad renal o glomerulonefritis) que causa trastorno cardíaco agudo (insuficiencia cardíaca, arritmia, isquemia).</p>
<p>SCR IV (Síndrome Renocárdico agudo) Enfermedad renal crónica (p. ej. enfermedad glomerular o intersticial crónica) que contribuye a la disminución de la función cardíaca y/o mayor riesgo o eventos cardiovasculares adversos.</p>
<p>SCR V (Síndrome Cardiorenal secundario) Afección sistémica (p. ej. diabetes mellitus, sepsis) que causa disfunción cardíaca y renal.</p>

La evidencia clínica muestra que los niveles de función renal, determinados por la tasa de filtrado glomerular, tienen una correlación inversamente proporcional con el incremento del riesgo cardiovascular, es decir, a menor tasa de filtrado glomerular, mayor es el riesgo de sufrir un evento cardiovascular. Así mismo, se ha demostrado que los pacientes con ERC, tienen una mayor incidencia complicaciones cardiovasculares independientemente de la edad (25,26). La diálisis es otro factor que influye en la incidencia de complicaciones cardiovasculares, inicialmente se creía que esto era debido a los factores de riesgo tradicionales existentes en este tipo de pacientes, como la aterosclerosis, la hipertensión arterial sistémica, trastornos lipídicos, diabetes mellitus y

enfermedades inflamatorias crónicas incluidas las inmunomediadas. Sin embargo, la incidencia de estos factores no explica completamente la alta tasa de complicaciones cardiovasculares en esta población de pacientes, por lo que se cree que otros factores deben estar involucrados.(26)

Por tanto, es razonable decir que el entender cuáles son las vías de señalización y los tipos celulares específicos que participan en la interacción riñón-corazón durante las primeras etapas de la ERC puede ayudar a detectar blancos terapéuticos y a tener un manejo efectivo con el que se conseguirá tener efectos cardio protectores y, por lo tanto, puede ralentizar la evolución de la ERC, reducir la mortalidad por una complicación CV y mejorar el pronóstico en este grupo de pacientes.

1.4. Inflamación renal y cardíaca como consecuencia de la ERC

1.4.1. *Inflamación como respuesta inmune.*

Como se ha mencionado anteriormente, en el SCR tipo IV, el sistema cardiovascular es afectado por el desarrollo de alteraciones clínicas de la ERC lo que puede llegar a causar una inflamación y fibrosis cardíaca, lo cual explica el alto índice de pacientes con complicaciones cardíacas durante la ERC.

La inflamación es una parte del mecanismo de defensa innata del cuerpo contra etiologías infecciosas o no infecciosas y esta puede ser aguda o crónica dependiendo de la temporalidad, es decir, aguda cuando se presenta en los primeros días y crónica cuando se presenta durante meses, sin embargo, también es posible evolucionar de una aguda a crónica.

La inflamación aguda comienza cuando se produce una lesión específica la cual produce mediadores solubles como las citoquinas, proteínas de fase aguda y quimiocinas

que promueven la migración de neutrófilos y macrófagos al área de la inflamación. Estas células son parte de la inmunidad natural innata del organismo y activan el rol en la inflamación aguda. Cuando la inflamación no se detiene durante las primeras semanas se puede desarrollar la forma crónica en donde se da la migración de linfocitos y células plasmáticas al sitio de la inflamación y si ésta persiste y no hay una recuperación entonces se favorecerá el desarrollo de fibrosis.(27)

1.4.2. *Mediadores en la inflamación*

Existen muchos grupos de mediadores que participan en el proceso en cascada de la inflamación, en uno de ellos se encuentran los mediadores y biomarcadores de inflamación aguda como el oxígeno reactivo y especies reactivas de óxido de nitrógeno, citocinas como la IL-6, TNF- α y quimiocinas, proteínas de fase aguda como la proteína C reactiva, factores de crecimiento relacionados con la inflamación así como factores de transcripción como la NF- κ B y los principales tipos de células inmunes aunque el tipo de mediadores y células que se verán involucradas durante la inflamación, va a depender de varios factores como el tipo de inductor, la duración de la lesión y múltiples variables genéticas.(27)

El riñón alberga una variedad de células inmunes residentes como las células dendríticas (CD), macrófagos, Células T reguladoras (Tregs), Linfocitos CD8 y NK, entre otras, las cuales tienen un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos.

1.4.3. *Inflamación renal*

Las causas más comunes de la inflamación renal son debidas a una infección, isquemia/reperfusión y a la formación de complejos inmunes o desregulación

complementaria. Los promotores más importantes de la inflamación renal son las células epiteliales de los túbulos renales las cuales secretan citocinas en respuesta a los inductores. Estos mediadores activan las vías NF- κ B o MAPK.

NF- κ B es una familia de factores de transcripción pleiotrópica que tienen la función de regular la transcripción de cientos de genes relacionados con inflamación, inmunidad, apoptosis, proliferación y diferenciación celular por lo que su activación ocasiona una translocación nuclear que puede proceder a través de vías clásicas/canónicas, alternativas/no canónicas o híbridas.(28)

Del mismo modo, la vía de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK por sus siglas en inglés) juega un papel importante ya que es un elemento central en la señalización de procesos básicos como la proliferación celular, la diferenciación, la apoptosis, la angiogénesis y la metástasis tumoral.(29)

En este proceso, tanto las células inmunes residentes como las circulantes pueden llevar a cabo una interacción con las células renales parenquimatosas y desencadenar una respuesta inflamatoria cuando son sometidas a estrés lo que causa daños irreversibles en los tejidos y también una insuficiencia orgánica.(30)

En varios estudios se ha demostrado que la activación de células dendríticas (CD) incrementa la actividad de las células T CD4⁺ lo que promueve un daño glomerular y fibrosis renal y a su vez la severidad de la fibrosis intersticial es un predictor preciso de la supervivencia renal.(31)

La infiltración de células inflamatorias juega un papel crucial en la fibrogénesis renal y se considera que de todas ellas los macrófagos y los linfocitos T podrían ser los más importantes en este proceso. El rol de los linfocitos T CD4⁺ en la fibrosis renal aún no es

clara sin embargo, se ha demostrado que son las más predominantes durante la fibrosis renal.(31,32)

1.4.4. *Respuesta inmune en el corazón*

En varios estudios se ha identificado y caracterizado las interacciones complejas que hay entre varios tipos de células inmunes que habitan o se infiltran en el tejido cardíaco y las células cardíacas residentes, incluidos los cardiomiocitos, fibroblastos y células endoteliales como resultado de la respuesta inmune a afecciones y enfermedades, sin embargo, aún hay mucho que aprender sobre la implicación de la inflamación en las afecciones del corazón ya que, en algunos casos, la respuesta inflamatoria es aguda y fuerte, en otros es crónica y moderada y en otras más el papel del sistema inmune sigue siendo difícil de comprender.(19)

El corazón no es un órgano aislado ya que sus cavidades, vasos y válvulas se encuentran rodeados del pericardio. Éste contiene un líquido seroso protector que contiene leucocitos en los que se incluyen a los macrófagos y células B, y puede convertirse en una fuente de leucocitos infiltrantes de tejido durante una afección.

La respuesta inmune innata en el corazón da comienzo cuando se presenta alguna afección y esta va a depender tanto de células inmunes residentes, así como de poblaciones adicionales reclutadas. Inmediatamente después de que se ocasiona una lesión, las células inmunes residentes que ya han sido activadas como los macrófagos, las células linfoides innatas y los mastocitos, coordinan la eliminación de las células dañadas o en proceso de muerte a través de la fagocitosis, de igual manera coordinan la remodelación del estroma del tejido y el reclutamiento de células inmunes de la sangre (16,30). En el corazón, la liberación de TNF- α , IL-1 β por macrófagos e histamina por mastocitos, desencadena la

permeabilidad vascular y la trans migración de las células innatas circulantes (33). Posteriormente, los monocitos infiltrantes se diferencian localmente para dar lugar a la eliminación de células dendríticas productoras de macrófagos o $\text{TNF-}\alpha$ que son capaces de coordinar una respuesta inmune adaptativa. A pesar de que estos eventos son importantes para la recuperación de los tejidos, la activación en exceso y la expansión local de macrófagos también puede ser perjudicial para el proceso de regeneración de tejidos.(34)

Hasta la fecha, se ha demostrado que las células inmunes como los macrófagos pueden terminar afectado la recuperación de los tejidos, sin embargo, se ha estudiado que de las células inmunes, los linfocitos T podrían tener un papel muy importante en el daño hacia el tejido cardíaco aunque la información actual aún es inconsistente y se debe estudiar más acerca sobre este tipo de células para esclarecer el posible mecanismo de acción sobre su infiltración en tejidos cardíacos y su contribución a la inflamación y fibrosis cardíaca.

1.5. Linfocitos T CD4+ y el SCR

En diversos modelos experimentales de ERC se ha observado que hay un incremento en la infiltración de algunas células inflamatorias en el tejido cardíaco, que contribuyen a las complicaciones cardiovasculares por ejemplo; en la ERC desencadenada por la nefrectomía subtotal, hay un aumento en las células CD68^+ cardíacas (macrófagos) y una elevación del factor de necrosis tumoral ($\text{TNF-}\alpha$), interleucina-6 (IL-6) y proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), siendo el $\text{TNF-}\alpha$ y la IL-6 predictores independientes significativos de la mortalidad cardíaca (35) ya que contribuyen al remodelamiento cardíaco debido a su papel en el proceso inflamatorio (35). Así mismo, se ha observado que al depletar la infiltración de cierto tipo de células se pueden evitar efectos y complicaciones no deseadas, por ejemplo, en un experimento realizado con un modelo

clásico de fibrosis cardíaca producido por la administración de angiotensina II, se evitó la remodelación cardíaca cuando se vio afectada la infiltración de macrófagos proinflamatorios, lo que demuestra el importante papel de la inflamación en el proceso fibrótico.(35)

Del mismo modo, en modelos murinos se ha observado que de estas células inmunes los linfocitos T y en especial el grupo de linfocitos T CD4⁺ ya activados, se infiltran en el corazón y juegan un papel crucial en el desarrollo de complicaciones cardiovasculares como la promoción de fibrosis cardíaca, la hipertrofia y la remodelación (36) sin embargo, la información actual aún es insuficiente por lo que se requiere hacer más estudios para observar el efecto de estas células en los tejidos cardíacos y con ello saber establecer pautas que puedan apoyar en la comprensión de su mecanismo de acción sobre las complicaciones cardíacas. Por ello, a continuación, se explicará brevemente sobre los principios básicos de estas células y su estrecha relación con el SCR para así explicar la razón del presente proyecto.

1.5.1. Principios básicos de los linfocitos T CD4⁺

Los linfocitos T son células producidas por la médula ósea las cuales maduran y se diferencian en el timo, se encuentran en los tejidos linfoides asociados a la piel o mucosa intestinal. Con diversos estudios se ha demostrado que su función principal es la de controlar la respuesta inmune mediante mecanismos de reconocimiento antigénico, pero también se ha comprobado que participan en el control de la respuesta inflamatoria aguda y crónica, así como en enfermedades alérgicas e infecciosas.(37,38)

Los linfocitos T maduros se dividen en 3 tipos principales: CD4⁺ T-helper (Th), CD8⁺ T-citotóxico (Tc) y CD4⁺ T-regulador (Treg) sin embargo, nos enfocaremos en los

T CD4⁺ ya que en diversos estudios se ha demostrado que son el tipo de células que, dentro del linaje de linfocitos T, tienen una relación importante con la patogenia de la lesión cardíaca.(36,39)

Este tipo de células carecen de inmunoglobulinas de superficie, pero contienen marcadores en ella como el CD4. La molécula CD4 es una proteína que se encuentra expresada en la población CD4⁺ o Linfocitos T CD4⁺ y estas únicamente reconocen a los antígenos que son transportados por la molécula de histocompatibilidad de clase II (HLA-D) mediante el receptor de linfocito T (TCR), este proceso tiene lugar en los órganos linfáticos secundarios, principalmente en los ganglios linfáticos drenantes y el bazo (40), y una vez que se activan empiezan a ejercer su función (38).

1.5.2. Evidencia experimental sobre el rol de los linfocitos T en lesiones cardíacas

Cada vez existen más pruebas que indican que la presencia de células T pueden contribuir en la patogénesis de la lesión cardíaca, un ejemplo de ello es su papel en el daño por isquemia/reperfusión en el corazón.

Una evidencia experimental que muestra como los linfocitos T CD4⁺ contribuyen a la lesión por isquemia-reperfusión miocárdica provino de un estudio realizado en ratones RAG1 KO, que son ratones deficientes en linfocitos maduros y se compararon con ratones de tipo salvaje. En ellos se demostró que los ratones con reducción de linfocitos T, en comparación con los ratones control, mostraron un tamaño de infarto significativamente menor. A su vez, se hizo una reconstitución de los ratones RAG1 KO mediante la transferencia adoptiva con células T CD4⁺ y se observó que se revirtió la protección antes observada lo que indica que las células T CD4⁺ promueven la lesión por isquemia-reperfusión cardíaca.(39)

Se sabe que las citocinas relacionadas con los linfocitos se encuentran sobre reguladas en el corazón postisquémico y las moléculas de quimiocinas y la de adhesión de leucocitos, tales como la glicoproteína P-selectina ligando-1, CD11/CD18, la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1 por sus siglas en inglés), y la proteína quimioatrayente de monocitos proteína-1 (MCP-1), son los que median la lesión por isquemia-reperfusión en el miocardio así como la adhesión, migración y señalización de los linfocitos.(41,42)

1.5.3. *Perspectiva clínica y antecedentes directos*

Aunque la inflamación es un proceso muy característico de una lesión cardíaca, la inmunomodulación terapéutica sigue siendo un tema que aún no está completamente estudiado.(36)

En nuestro grupo de investigación se ha sugerido que los linfocitos T CD4⁺ juegan un rol crucial en la progresión de la remodelación cardíaca después de un daño renal; en estudios preliminares realizados en un modelo murino de ERC inducida por IR, se ha observado que el número de linfocitos T CD4⁺ infiltrados se ve aumentado en el corazón en los primeros días después de haber iniciado la ERC y se presume que este aumento puede contribuir al desarrollo de las complicaciones cardiovasculares (datos no publicados).

Por lo tanto, una propuesta de la presente investigación, es que el desarrollo de complicaciones cardiovasculares durante la ERC podría considerarse como complicaciones inmunomediadas por la infiltración temprana de linfocitos T CD4⁺ posiblemente activos y que son indispensables para la remodelación adversa a largo plazo por lo que la depleción de estas células T CD4⁺ en las etapas tempranas de la ERC podría

representar una estrategia terapéutica efectiva para prevenir las alteraciones cardiovasculares crónicas durante la ERC.

2. Planteamiento del problema

Se ha demostrado que en etapas tempranas de la ERC hay un incremento de linfocitos T CD4⁺ en el tejido cardíaco, sin embargo, los estudios al respecto son incipientes y se desconoce cuáles son los mediadores pro-inflamatorios que facilitan la infiltración de los linfocitos T CD4⁺ en el corazón y cuál es el papel de éstas células en el daño cardíaco crónico durante la ERC por lo cual, se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es el efecto de la depleción de linfocitos T CD4⁺ sobre las alteraciones cardiovasculares en un modelo de ERC?.

3. Justificación

En nuestro grupo de investigación, en un estudio previo realizado en un modelo murino de ERC, se observó que la infiltración de diferentes tipos de células inflamatorias en el corazón presenta un patrón anormal. En particular, el número de linfocitos T CD4⁺ se ve incrementado en los corazones de los ratones después de 3 a 5 días de iniciación de la ERC. Sin embargo, se desconoce si la infiltración de estas células está asociada con el desarrollo de complicaciones cardiovasculares durante la ERC. Además, los mediadores inflamatorios que promueven la infiltración temprana de linfocitos T CD4⁺ y otras células inflamatorias en el corazón se desconocen. Por lo tanto, en este proyecto se buscó conocer cuál es la relación del incremento de estas células con el progreso de las complicaciones cardiovasculares en la ERC y si la depleción de estas células contribuye a la disminución del daño en el corazón. Además, se estudió a los mediadores inflamatorios tempranos en el tejido cardíaco de los ratones en etapas iniciales de la ERC.

4. Hipótesis

De acuerdo con la evidencia teórico-científica que muestra que la infiltración cardíaca de linfocitos T CD4⁺ en las primeras fases de la ERC causa efectos perjudiciales crónicos en la fisiología cardiovascular, suponemos que al efectuar una depleción de estas células mediante la inyección de anticuerpos anti-CD4, en un modelo murino de ERC, se prevendrán o disminuirán significativamente las alteraciones cardiovasculares.

5. Objetivo general

Evaluar el efecto de la depleción de células T CD4⁺ sobre las alteraciones cardiovasculares en un modelo murino de enfermedad renal crónica.

5.1. Objetivos específicos

-Determinar cuáles son los mediadores inflamatorios que participan en la infiltración temprana de linfocitos T CD4⁺ y en la lesión cardiovascular en un modelo de ratón con ERC.

-Evaluar el efecto de la depleción transitoria y temprana de linfocitos T CD4⁺ sobre la aparición de fibrosis y disfunción del miocardio en etapas más avanzadas de la ERC.

6. Metodología

Diseño de estudio

Se llevó a cabo un estudio experimental.

Modelos experimentales

Se utilizó un modelo murino de ERC en el que se evaluaron las alteraciones renales y cardíacas agudas y crónicas. Este modelo en ratón de ERC consistió en inducir un daño renal por isquemia / reperfusión y se dio seguimiento por 8 semanas para permitir la progresión de la ERC. En el caso del protocolo agudo el seguimiento fue durante 5 días.

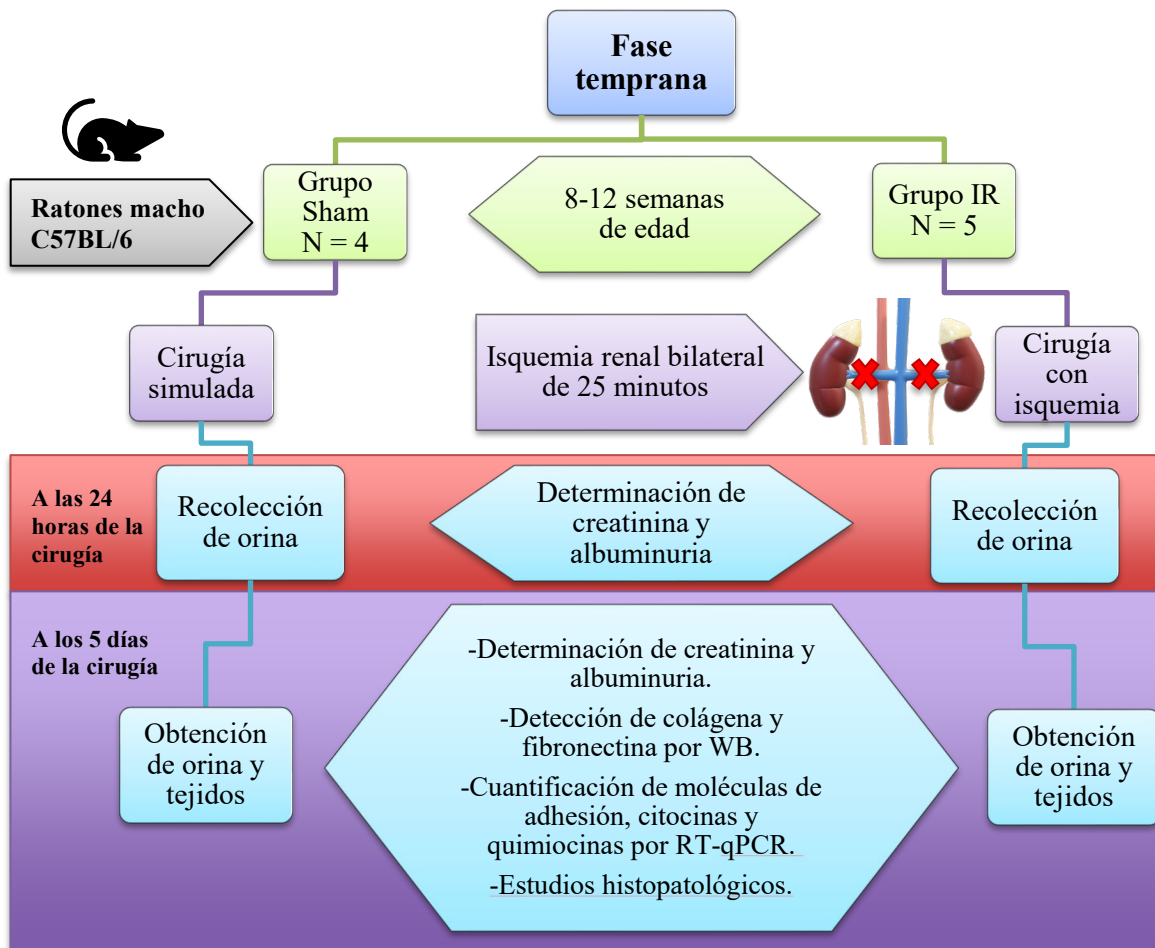
Los animales utilizados fueron ratones de la cepa C57BL/6, machos sanos de entre 8 y 12 semanas de edad y con un peso prometido de 20 g, los cuales fueron proporcionados por el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y a su vez fueron transferidos al bioterio del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” lugar en donde se mantuvieron durante el estudio. Los animales tuvieron acceso a comida y agua *Ad libitum* y permanecieron con ciclos de luz-oscuridad 12-12 horas. Los procedimientos experimentales con los animales fueron aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del Instituto de investigaciones Biomédicas con los números ID: 1293 e ID: 6317 y por el CICUAL del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez con el número INC/CICUAL/013/2018.

Criterios de inclusión y eliminación

- Inclusión: ratones cepa C57BL/6, machos sanos de entre 8 y 12 semanas de edad con un peso promedio de 20 g.
- Eliminación: reperfusión inadecuada en el riñón, daño al riñón y/u otros órganos durante la cirugía, muerte durante la anestesia y/o cirugía,

anormalidades en la salud del ratón y/o muerte durante el tiempo de progresión de la enfermedad renal crónica.

6.1. Estudios en la fase temprana de la ERC



Esquema 1. Protocolo general de la fase temprana de la ERC.

6.1.1. Modelo de ERC inducida por isquemia / reperfusión renal bilateral

En esta fase se utilizaron nueve ratones de los cuales se formaron dos grupos: Sham (control) e Isquemia/Reperfusión (IR), teniendo cuatro y cinco ratones en cada grupo, respectivamente. El tamaño de la muestra se calculó con base en experimentos previos, realizados por nuestro equipo de investigación, en donde se conocen los niveles de

creatinina sérica como parámetro principal para determinar la existencia de disfunción renal en ratones con ERC inducida por isquemia renal bilateral.

Se usó como anestésico pentobarbital de sodio (PISABENTAL®) a una dosis de 60 mg/kg vía intraperitoneal.

Para la anestesia, los ratones se sujetaron teniendo cuidado de no lastimarlos y se administró el anestésico en la parte baja del abdomen, como se muestra en la **Figura 3**.

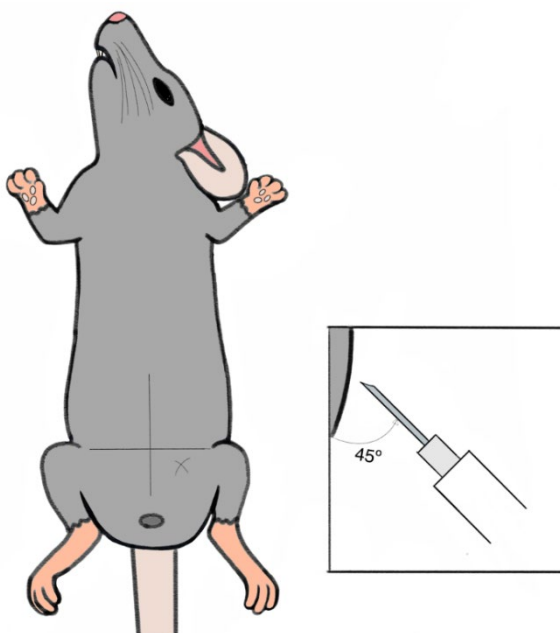


Figura 3. Área de administración del anestésico.

Transcurridos 3-5 minutos, o hasta que el ratón estuviera anestesiado mostrado por la ausencia de reflejos, se procedió a rasurar las dos zonas en dónde se realizaron las incisiones (**Figura 4**). Posteriormente se colocó al ratón en una cama termorregulada a 37°C para mantener su temperatura corporal durante la cirugía.

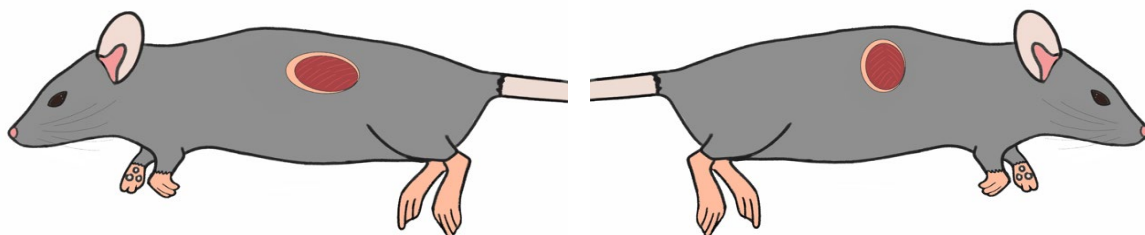


Figura 4. Incisiones quirúrgicas. La incisión en la parte lateral izquierda del ratón se realizó de manera horizontal y en la parte derecha se realizó de manera vertical debido a la cercanía y posición del riñón con el hígado.

Se procedió a realizar las incisiones en las zonas rasuradas, cortando primero la piel y luego el músculo, teniendo cuidado de no cortar o rasgar órganos.

Con ayuda de hisopos, se buscó y se expuso al riñón, teniendo cuidado de no lastimar otros órganos, en seguida se disecó rápida y cuidadosamente el pedículo renal con la ayuda de pinzas quirúrgicas. Se realizó el mismo proceso con el otro riñón.

Luego de que se disecaron los pedículos renales de ambos riñones se procedió a realizar la isquemia.

Para realizar la isquemia se colocaron clips vasculares no traumáticos en los pedículos renales de ambos riñones y a partir de su colocación se midió un tiempo de 25 minutos. Como se muestra en la **Figura 5**.

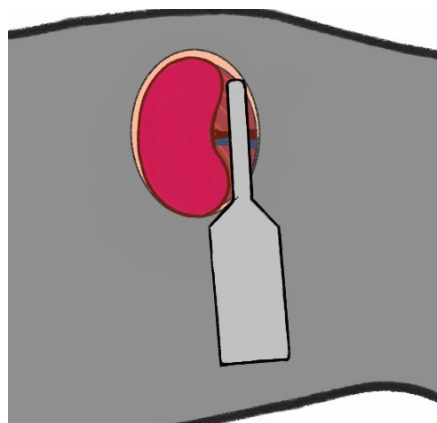


Figura 5. Colocación de los clips vasculares no traumáticos en los pedículos renales.

Al terminar la isquemia se procedió a retirar los clips con cuidado y a observar que hubiera una reperfusión adecuada, esto se identificó por el cambio de coloración en el riñón que iba de un color café oscuro a un color rojo “vivo”.

Posteriormente, se devolvieron los riñones a su sitio, se suturó el músculo y seguido la piel, teniendo cuidado de no dañar o perforar órganos y demás tejidos con la aguja.

Por último, se esperó un tiempo (en la cama térmica a 37°C) hasta que el ratón se recuperara de la anestesia para luego devolverlo a su caja.

Se repite el mismo procedimiento para todos los ratones del grupo IR.

Para los ratones del grupo control únicamente se realizaron las incisiones, cortando piel y músculo y exponiendo al riñón, pero sin impedir el flujo sanguíneo, durante 25 minutos en la cama termorregulada (37°C).

Por último, se suturaron las incisiones y se esperó a que los ratones se recuperaran de la anestesia para devolverlos a su caja.

6.1.2. *Recolección de orina de 24 horas*

A las 24 horas de haber realizado la cirugía se recolectó la orina de ambos grupos de ratones. Para ello se sujetó rápida y cuidadosamente al ratón y se estimuló para que produjera orina, la cual fue recolectada y almacenada a -20°C para su posterior análisis.

6.1.3. *Función renal: Determinación de creatinina y albuminuria en orina de 24 horas*

Para la cuantificación de creatinina en orina se utilizó el kit de QuantiChrom™ Creatinine Assay Kit. Se usó un blanco, el estándar de creatinina y las muestras de orina correspondientes a los nueve ratones.

En una placa de 96 pozos se adicionaron las muestras en el siguiente orden: Blanco, estándar, muestras de orina 1-9. Una vez colocadas las muestras, se les adicionó el reactivo de trabajo (mezcla de reactivo A y B del kit) e inmediatamente se leyeron en un lector de placas a una absorbancia de 510 nm. Se hicieron dos lecturas la primera al minuto 0 y la otra al minuto 5 como se indica en el instructivo del kit.

Con los valores obtenidos se realizó una curva para conocer la concentración de creatinina en las muestras. Posteriormente se determinó la cantidad necesaria de cada muestra para realizar la electroforesis y detectar la presencia de albuminuria, normalizando las variaciones en el volumen urinario al cargar en los geles la cantidad de orina correspondiente a 75 mg de creatinina, una cantidad previamente establecida en el laboratorio para obtener una imagen de calidad para detectar la presencia de albumina.

Para la determinación de albuminuria en la muestra de orina se realizó la técnica de electroforesis en geles SDS-PAGE y detección de las proteínas con una tinción de Coomassie. Para ello, se preparó un gel de poliacrilamida al 8.5%, las muestras se

prepararon tomando la cantidad requerida de cada una más buffer de carga y calentándolas a 95° C durante 5 minutos.

Posteriormente se preparó la cámara de electroforesis y se cargó el marcador de peso molecular y todas las muestras en el gel de poliacrilamida (una en cada pozo). Se dejó correr a 80V por 15 min - 120V por 01:20 horas.

Posteriormente se sumergió el gel en una solución de azul de coomassie y se dejó a 60 r.p.m. durante 2 horas.

Después se procedió a desteñir el gel, para ello se realizaron tres lavados, con una solución de desteñido (que contiene metanol y ácido acético), de 30 minutos a 60 r.p.m. y se hizo un último lavado el cual se dejó durante toda la noche.

Por último, se observó el gel en un fotodocumentador (Chemidoc-BioRad) para obtener las imágenes adecuadas y poder comprobar la presencia de proteínas en las muestras.

6.1.4. *Obtención de orina, plasma y órganos a los 5 días de evolución de la ERC*

Transcurridos 5 días después de la cirugía se obtuvo nuevamente muestras de orina de ambos grupos de ratones. Para ello se sujetó rápida y cuidadosamente al ratón y se estimuló para que produjera orina, esta fue recolectada y almacenada a -20°C para su posterior análisis.

Para la obtención de suero se procedió a anestésiar a los ratones y una vez que estuvieron completamente bajo el efecto anestésico se obtuvo una muestra de sangre de 1 mL aproximadamente, por punción cardíaca, la cual fue colocada en un tubo con heparina para evitar la coagulación. Seguido se sacrificó al animal mediante dislocación y se obtuvo el corazón y ambos riñones.

Los riñones se diseccionaron en dos partes iguales teniendo en total 4 fragmentos, 3 de ellos se colocaron en un tubo adecuado y se almacenaron a -80°C para estudios moleculares y el último se almacenó en un tubo con solución de paraformaldehído para fijar el tejido y utilizarlo en los estudios histológicos y se almacenó a 4°C .

El corazón se diseccionó en 3 partes y únicamente se almacenó la parte media para estudios histológicos y el ápex a -80°C para los estudios moleculares. Se obtuvieron estas porciones debido a que nos interesa analizar el ventrículo izquierdo ya que es la principal cavidad afectada en nuestras condiciones experimentales.

La muestra de sangre obtenida previamente fue centrifugada para obtener así el plasma el cual fue almacenado a -80°C .

Finalmente, el material quirúrgico, tejidos y cadáveres fueron desechados de acuerdo con la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 Residuos peligrosos biológico-infecciosos, clasificación y especificaciones de manejo.

6.1.5. Función renal: Determinación de creatinina en muestras de plasma y orina de 5 días de evolución

Para la cuantificación de creatinina en orina y suero se utilizó el kit de QuantiChrom™ Creatinine Assay Kit. Se usó un blanco, el estándar de creatinina y las muestras de orina y de suero correspondientes a los nueve ratones. Se realizó el mismo procedimiento descrito en la sección Función renal: Determinación de creatinina y albuminuria en orina de 24 horas.

6.1.6. Determinación de albuminuria en orina de 5 días

Para la determinación de este parámetro se realizó el mismo procedimiento que se usó en las muestras de 24 horas descrito en la sección 6.1.3.

Con los valores obtenidos de la densitometría se hizo el análisis estadístico y se hizo una comparación con los valores obtenidos de las muestras de orina de 24 horas para observar los cambios provocados por los daños de la ERC en fase temprana.

6.1.7. Extracción de proteínas del riñón

Se tomó un fragmento de riñón de los 9 ratones y cada uno fue transferido a un tubo correctamente etiquetado. Los tubos fueron colocados en nitrógeno líquido durante su manipulación para evitar la degradación del tejido y la activación de ciertas enzimas que pudieran interferir con el análisis.

A cada tubo se añadió 400 μ L de buffer de homogeneizado (50 mM HEPES, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1 % Nonidet P-40 y un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa) y se homogeneizó completamente.

Una vez preparadas las muestras se procedió a centrifugar durante 15 minutos. Al finalizar, se obtuvo el sobrenadante y se dividió en tres tubos teniendo así tres alícuotas de cada muestra. Estas fueron almacenadas a -80° C.

Cuantificación de proteínas por ensayo colorimétrico con BCA

Se preparó una curva con las siguientes concentraciones de estándar (albúmina): blanco, 200, 400, 600, 800 y 1000. Posteriormente se preparó el reactivo de trabajo como se indica en el instructivo del kit.

En una placa de 96 pozos se colocaron, por duplicado (primera y segunda columna) 15 μ L de blanco y seguido 15 μ L de cada concentración del estándar para la curva. En las columnas siguientes se colocaron 15 μ L de muestra y a cada una se les agregó 200 μ L del reactivo de trabajo, como se muestra en la **Figura 6**.

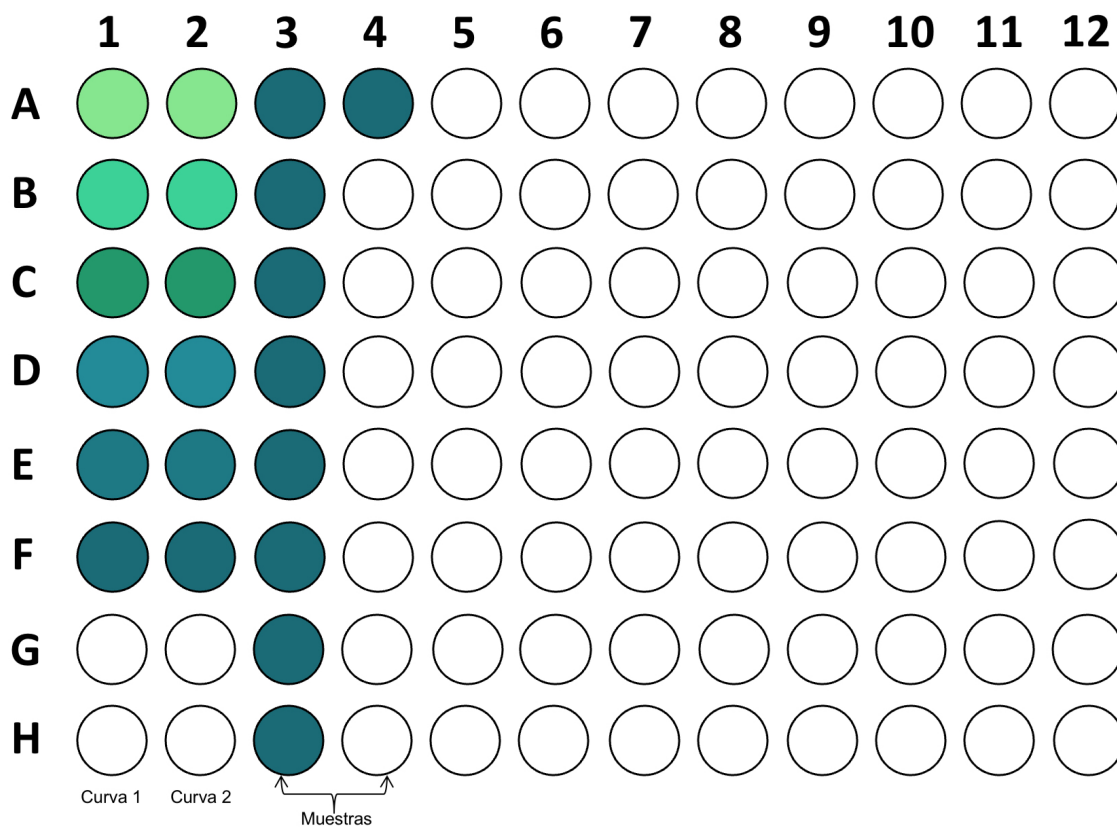


Figura 6. Placa de 96 pozos con la curva por duplicado y las muestras.

Una vez lista la placa con todas las muestras, se colocó un parafilm sobre toda la placa, cubriendo perfectamente los pozos, y se calentó en baño María a 37°C durante 30 minutos. Por último, se leyó la placa en un equipo lector de placas a 562 nm y se obtuvieron los valores de las curvas y de las muestras. Estos valores fueron utilizados para realizar una regresión lineal y así obtener la concentración de proteínas en cada muestra mediante una interpolación en la curva de absorbancias.

6.1.8. Detección de los niveles de colágena y fibronectina con técnica de Western blot

Así mismo se realizó la técnica de Western blot, y realizando la densitometría y los cálculos pertinentes para conocer los niveles de proteínas específicas (fibronectina y

colágena) normalizados respecto a proteínas control en las muestras de tejido renal y cardíaco, como marcadores de daño estructural por fibrosis.

Con los valores obtenidos de la lectura de proteínas se tomó la cantidad de muestra necesaria para cargar en los geles 60 μg para la detección de fibronectina y 40 μg para la detección de colágena. Las muestras de fibronectina fueron preparadas en condiciones desnaturalizantes (con calentamiento más β -mercaptoetanol como agente reductor) y las muestras de colágena en condiciones no desnaturalizantes (con calentamiento, pero sin el agente reductor).

Se prepararon dos geles de poliacrilamida al 8.5% y se cargaron las muestras a las cantidades requeridas para fibronectina y para colágena. Se dejó correr a 80V por 15 min - 120V por 1:20 horas.

Al término se obtuvieron los geles y se transfirieron a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) y al término de la transferencia, se bloquearon las membranas en una solución de bloqueo (proteína de leche) al 5% durante una hora. Para el caso de fibronectina, las membranas se cortaron por encima del marcador de peso molecular de 50 Kda. En la parte inferior, se agregó el anticuerpo contra β -Actina y el anticuerpo de fibronectina en la parte superior de la membrana. En el caso de Colágena al ser en condiciones no desnaturalizantes, se procedió a teñir la membrana con rojo de Ponceau para detectar las proteínas totales. Posteriormente la membrana se incubó con el anticuerpo contra Colágena I.

Se dejó incubar las membranas durante una noche. Al día siguiente, se hicieron 6 lavados de 10 minutos cada uno a la membrana con anticuerpo de actina y se leyeron en el

equipo Chemidoc-BioRad. Se obtuvieron las imágenes y se realizó la densitometría y el análisis estadístico.

Para el caso de las membranas con anticuerpo de fibronectina y de colágena se requirió añadir un anticuerpo secundario. Para ello, se hicieron 3 lavados de 10 minutos cada uno y se agregó anticuerpo secundario a cada membrana, se dejó incubar por 2 horas y al finalizar se hicieron 6 lavados de 10 minutos cada uno y se leyeron en el equipo Chemidoc-BioRad para obtener las imágenes y realizar densitometría. La densitometría se realizó con un programa especializado, vinculado al equipo revelador, Image Lab, y con los valores obtenidos se hizo el análisis estadístico.

6.1.9. Cuantificación de moléculas de adhesión, citocinas, quimiocinas y marcadores de fibrosis por RT-qPCR

Obtención de RNA

Para la realización de la RT-qPCR primero se procedió a obtener el RNA total libre de DNA mediante el Quick-RNATM Miniprep Kit por lo que se siguió el procedimiento que se indica en el instructivo.

El aislamiento de RNA consistió en tres pasos: 1) lisis/homogeneización de la muestra, 2) limpieza de muestra y eliminación de DNA genómico, y 3) Purificación de RNA.

Se inició con el proceso de homogeneización, para ello se tomaron las muestras del apex del corazón y se colocaron en nitrógeno líquido para evitar la descongelación del tejido.

Se preparó el buffer de lisis de RNA y se agregó 300 μ L de este a cada muestra, homogeneizando hasta tener la menor cantidad de partículas de tejido en la mezcla.

Una vez homogeneizadas las muestras se centrifugaron durante 1 minuto y se obtuvo el sobrenadante el cual fue transferido a un filtro Spin-Away™ (amarillo) sobre un tubo de recolección y se centrifugó nuevamente durante 1 minuto esto con el fin de limpiar las muestras y remover el DNA.

Se conservó el flow-trough para proceder con la purificación del RNA. Para ello se agregaron 300 µL de etanol grado biología molecular y se mezcló bien. La mezcla fue transferida a una columna IICG Zymo-Spin (verde) sobre un tubo de recolección y se centrifugó durante 30 segundos. En este caso se desechó el flow-trough y se conservó el filtro.

Se realizó un tratamiento para asegurar la eliminación de DNA. Para esto se agregaron 400 µL de buffer de lavado de RNA a cada muestra, se centrifugaron durante 30 segundos y se desechó el flow-trough.

Se preparó una mezcla de reacción de DNA en un tubo libre de RNAsa. Para ello se mezcló una cantidad suficiente de DNAsa 1² con DNA buffer digestión.

A cada muestra se agregó 80 µL de la mezcla y se dejó reaccionar por 15 minutos a temperatura ambiente. Al término se centrifugaron durante 30 segundos.

Se agregaron 400 µL de buffer prep de RNA a las columnas y se centrifugaron nuevamente durante 30 segundos. Se desechó el flow-trough y se conservaron las columnas.

Se agregaron 700 µL de buffer de lavado de RNA a las columnas y se centrifugaron durante 30 segundos. Se desechó el flow-trough.

Se agregaron 400 μL de buffer de lavado de RNA a las columnas y se centrifugaron por 2 minutos para asegurar la eliminación del buffer.

Las columnas se transfirieron a tubos libres de RNAsa, se agregó 120 mL de agua libre de DNAsa/RNAsa y se centrifugaron durante 30 segundos.

Se tomaron 55 μL del tubo y se transfirieron a otros tubos libres de RNAsa correctamente etiquetado para su secuenciación. Con esto, en los tubos originales quedaron 65 μL .

Por último, se calentaron todos los tubos a 60-70° C durante 5 minutos y finalmente se almacenaron a -80° C.

Retrotranscripción

Se tomaron los tubos con 65 μL de muestras de RNA purificadas. EL RNA se cuantificó en un NanoDrop para obtener la concentración de RNA en cada muestra. Por cada muestra se tomaron 1000 ng de RNA y se llevaron a un volumen de 14 μL utilizando agua grado biología molecular.

Se preparó una mezcla con Buffer de enzima Fast script (contiene los random primers, hexameros, dNTPs y sales) y la enzima RTasa, y a cada muestra de RNA se le agregaron 5 μL de esta.

Una vez preparadas las muestras se colocaron en un termociclador y se calentaron a 42° C durante 40 minutos y 85° C durante 10 minutos.

Al término del calentamiento de las muestras se procedió con una dilución 1:10. Para ello, en un nuevo tubo, se colocaron 90 μL de agua grado biología molecular y se adicionó 10 μL de la muestra homogeneizando muy bien.

Finalmente se almacenaron las muestras a -20°C para poder usarlas en la técnica de PCR posteriormente.

PCR en tiempo real

Los niveles de RNAm de diversas citocinas, moléculas de adhesión y factores profibróticos se analizaron por PCR en tiempo real mediante la detección de fluorescencia de SYBR green en un termociclador CTFX96 (Bio-Rad). Los pares de *primers* que se utilizaron, se enlistan en la **Tabla 3**. Todos los valores fueron normalizados a la media geométrica de 18S y GAPDH como controles endógenos. La cuantificación relativa de toda la expresión génica se realizó con el método comparativo 2^{-DDCT} .

Tabla 4. *Pares de Primers.* Primers utilizados en la RT-qPCR de la fase temprana.

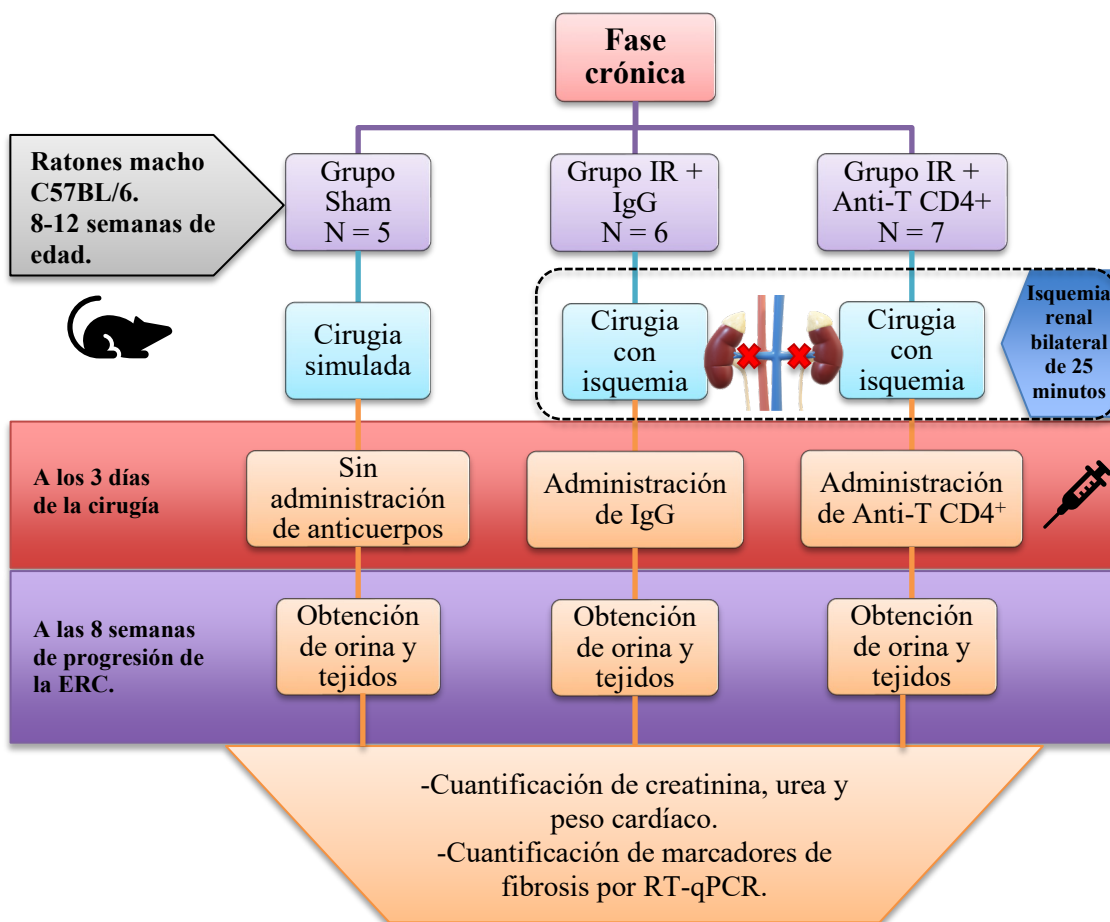
<i>Oligo</i>	<i>Forward 5'</i>	<i>Reverse 3'</i>
CxCL-1	ATCCAGAGCTTGAAGGTGTTG	GTCTGTCTTCTTTCTCCGTTACTT
CxCL-2	CGCCCAGACAGAAGTCATAG	TCCCTCCTTTCCAGGTCAGTTA
IL-6	CTCTGGGAAATCGTGAATG	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA
P-Selectina	GTCCACGGAGAGTTTGGTGT	AAGTGGTGTTCGGACCAAAG
E-Selectina	AGCTACCCATGGAACACGAC	ACGCAAGTTCTCCAGCTGTT
MCP-1	ATCCCAATGAGTAGGCTGGAGAGC	CAGAAGTCCTTGAGGTGGTTGTG
TNF-α	GGGACAGTGACCTGGACTGT	AGTGAATTCGGAAAGCCCATT
IL-10	AGTGAAGTGCCTGTCAATG	TTCAGGGTCAAAGGCAAACCTT
ICAM1	CAATTTCTCATGCCGCACAG	AGCTGGAAGATCGAAAGTCCG
VCAM	TGAACCCAAACAGAGGCAGAGT	GGTATCCCATCACTTGAGCAGG
GAPDH	TGAGGCCGGTGCTGAGTATGTCG	CCACAGTCTTCTGGGTGGCAGTG
18S	CGCCGCTAGAGGTGAAATTC	TCTAACTTTAACTGGAAAGAATGTC

Para ello, se colocaron 3 μL de cDNA en la placa, posteriormente se preparó una mezcla con agua grado biología molecular más el primer correspondiente, previamente preparado en relación 1:1 (forward y reverse), más Master Mix y se homogeneizó muy bien.

A cada muestra se colocaron 12 μL de esta mezcla, se homogeneizó muy bien y finalmente se selló la placa.

Una vez selladas las placas, se leyeron en un termociclador y los datos obtenidos se analizaron en un programa especial (CFX Maestro, Bio-Rad) y se realizó el análisis estadístico correspondiente.

6.2. Fase crónica de la ERC



Esquema 2. Protocolo general de la fase crónica de la ERC.

6.2.1. ERC inducida por isquemia / reperfusión bilateral

En esta fase se utilizaron dieciocho ratones de los cuales se formaron tres grupos: Sham (control), isquemia / reperfusión + IgG (IR + IgG) e isquemia / reperfusión + anti-T CD4⁺ (IR + Anti-T CD4⁺) teniendo cinco, seis y siete ratones en cada grupo, respectivamente.

El procedimiento quirúrgico realizado tanto al grupo de los ratones control como a los dos grupos de ratones con IR, fue el mismo que se siguió en los ratones de la fase temprana de la ERC (sección 6.1.1).

6.2.2. Depleción de linfocitos T CD4⁺

A los ratones del grupo IR + Anti-T CD4⁺ se les administró una dosis de 200 µL del anticuerpo Ultra-LEAF™ Purified anti-mouse CD4 a los tres días después de la cirugía.

Al mismo tiempo, a los ratones del grupo IR + IgG se les administró una dosis de 200 µL de anticuerpo IgG como control de isotipo.

6.2.3. Obtención de orina, plasma y órganos a las 8 semanas de evolución de la ERC

Se siguió el mismo procedimiento quirúrgico de la fase temprana de la ERC para la obtención de orina, plasma y órganos en los tres grupos de ratones (control, IR + IgG e IR + Anti-T CD4⁺) de la fase crónica y siguiendo la normatividad vigente para el desecho de material quirúrgico, tejidos y cadáveres (sección 6.1.4).

En las muestras obtenidas del protocolo crónico, se determinaron los niveles de creatinina en plasma y orina (sección 6.1.3), la excreción urinaria de proteínas (sección 6.1.3). Así mismo se extrajo RNA de corazón y riñón para la cuantificación de los niveles de marcadores de fibrosis como se describe en las secciones 6.1.9. Se realizó extracción de proteína de corazón y riñón para determinar los niveles de colágena I y fibronectina I como se describe en las secciones 6.1.7 y 6.1.8

6.2.4. Cuantificación de moléculas de adhesión, citocinas, quimiocinas y marcadores de fibrosis por RT-qPCR

Para la realización de la RT-qPCR en la fase crónica, se siguió el mismo procedimiento que se indica en el punto 6.1.9 para la obtención de RNA, retrotranscripción y la lectura de la PCR en tiempo real.

Los pares de *primers* que se utilizaron, se enlistan en la. Todos los valores fueron normalizados a la media geométrica de 18S y GAPDH como controles endógenos. La

cuantificación relativa de toda la expresión génica se realizó con el método comparativo 2^{-DDCT}.

Tabla 5. *Pares de Primers.* Primers utilizados en la RT-qPCR de la fase crónica.

<i>Oligo</i>	<i>Forward 5'</i>	<i>Reverse 3'</i>
Colagena-1	AAACCCGAGGTATGCTTGATCTGTA	GTCCCTCGACTCCTACATCTTCTGA
Fibronectina	CCT ACG GCC ACT GTG TCA CC	AGT CTG GGT CAC GGC TGT CT
TGF-β	CAACAATTCCTGGCGTTACCTTGG	GAAAGCCCTGTATTCCGTCTCCTT
PDGF-A	GTCCAGGTGAGGTTAGAGG	CACGGAGGAGAACAAAGAC
CTGF	CTCCACCCGAGTTACCAATGACAA	CCAGAAAGCTCAAACCTGACAGGC
PAI-1	ACGTTGTGGAAGTGCCTAC	GCCAGGGTTGCACTAAACAT
MMP-9	CAGGAGTCTGGATAAGTTGG	CTGGAAGATGTCGTGTGAGT
α-SMA	GTACCACCATGTACCCAGGC	GCTGGAAGGTAGACAGCGAA
GAPDH	TGAGGCCGGTGCTGAGTATGTCG	CCACAGTCTTCTGGGTGGCAGTG
18S	CGC CGC TAG AGG TGA AAT TC	TCT TGG CAA ATG CTT TCG C

6.3. Estudios histopatológicos

Los riñones que se colocaron en formaldehído fueron posteriormente deshidratados y se embebieron en parafina. Después, se prepararon secciones de 4µm y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Las fotomicrografías se tomaron en un microscopio AxioScan.Z1 (Zeiss) equipado con una cámara AxioCam MRc5 (Zeiss, amplificación original: 200X). Las imágenes se procesaron utilizando un software ZEN2.3 (blue edition, 2001, Carl Zeiss Microscopy).

6.4. Análisis estadístico

Los resultados se reportaron como la media \pm el error estándar de la media. El análisis de datos y la representación gráfica se realizaron con el programa IBM SPSS Statistics (Versión 25).

Fase aguda

Para los resultados obtenidos en la fase aguda, se realizaron pruebas *t*-student de muestras independientes para la comparación de dos grupos (grupo sham y el grupo IR). Primeramente, los datos fueron sometidos a una prueba de normalidad, de acuerdo con los criterios de Saphiro-Wilk, por lo que se consideró una $p > 0.05$ para demostrar que los datos provenían de una distribución normal. Posteriormente, se utilizó la prueba de Levene para analizar la igualdad de varianzas, considerando una $p < 0.05$ para asumir que existía una diferencia significativa entre las varianzas y con ello poder continuar con la prueba estadística. Finalmente, se consideró $p < 0.05$ para rechazar la hipótesis nula y con ellos demostrar que existía una diferencia significativa entre las medias de los datos de ambos grupos de ratones.

Fase crónica

En el caso de los resultados de la fase crónica, se utilizaron análisis de ANOVA de una vía con prueba post hoc de Bonferroni para la comparación de más de dos grupos (grupos sham, IR + IgG e IR + anti-T CD4⁺). Los valores que se consideraron estadísticamente significativos tuvieron una $p < 0.05$.

7. Resultados

7.1. Caracterización de la lesión renal en la fase aguda.

Para saber si el daño renal inducido por IR fue efectivo, se determinaron los niveles de excreción urinaria de proteínas a las 24 horas posteriores a la reperusión. Para ello, se obtuvo una imagen, en el fotodocumentador, del gel donde se corrieron las muestras de orina y se tiñeron con azul de coomassie, la cual se muestra en la *Figura 7A*. En ella se observa a ambos grupos de ratones, sham e IR y se puede apreciar que la presencia de albuminuria en los ratones del grupo IR es mucho más predominante en comparación con los ratones del grupo sham, para ello se ha tomado como referencia la banda indicada por la flecha, la cual por el peso molecular corresponde a la albúmina (66.5 kDa). Esto quiere decir que a las 24 horas de haber realizado la cirugía se ha presentado un daño considerable en el riñón, más específicamente en las nefronas, en aquellos ratones sometidos a isquemia / reperusión, ya que esto conlleva a un daño estructural en los túbulos provocando así la excreción de proteínas a través de la orina.

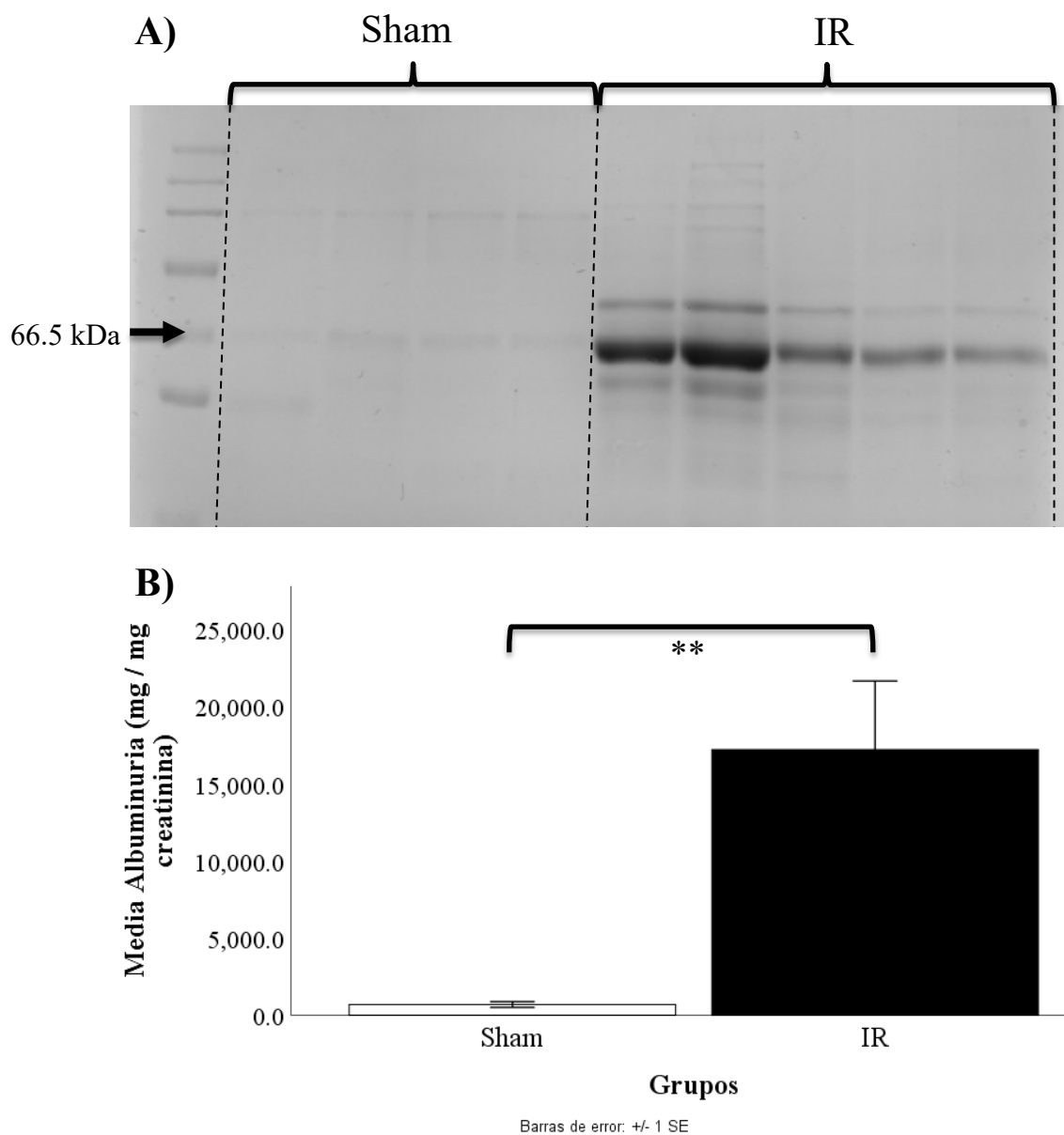


Figura 7. A) Imagen del gel teñido con azul de Coomassie con las muestras de 24 horas, obtenida del fotodocumentador BIO RAD. Se utilizó el colorante de azul de coomassie para teñir las proteínas después de haber realizado el SDS-PAGE y así comprobar y comparar la presencia de proteinuria en ambos grupos de ratones (sham e IR), la banda que indica la flecha fue el frente de referencia para dicha comparación. **B)** Proteinuria en orina de los ratones del grupo sham e IR a las 24 h de la cirugía. Gráfico obtenido a partir del análisis estadístico con prueba *t*-student de muestras independientes y con $**p < 0.05$, comparados con el grupo sham.

Al realizar el análisis estadístico usando los valores obtenidos de la densitometría en la captura del fotodocumentador se obtuvo la **Figura 7B**, en ella se puede observar que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.02$) entre la media de albuminuria del grupo sham y la media de albuminuria del grupo IR siendo esta última más alta en comparación con la media del grupo sham.

Posteriormente se determinó el comportamiento de la proteinuria al quinto día de seguimiento. Se siguió el mismo procedimiento que en el gel con las muestras de 24 horas para la obtención de la imagen en el fotodocumentador. En la **Figura 8A** se puede observar que la proteinuria presente en las muestras de 5 días en el grupo de los ratones IR no está tan marcada en comparación con las muestras de 24 horas lo que quiere decir que a pesar del daño que hay en el riñón, los ratones se han podido recuperar parcialmente, lo que da como resultado una menor cantidad de proteínas excretadas en la orina.

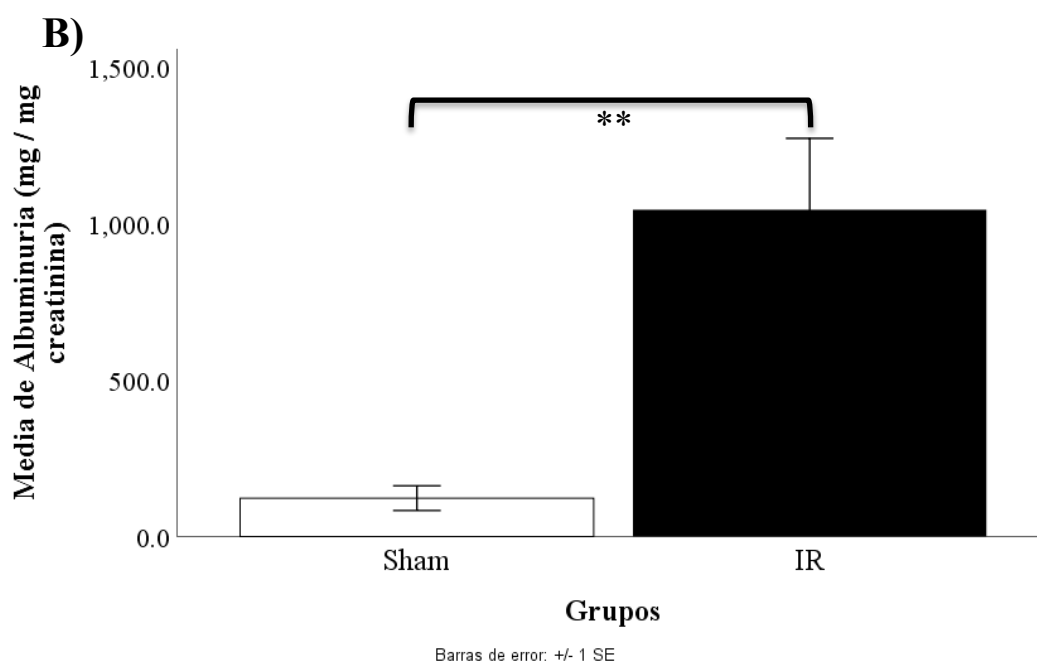
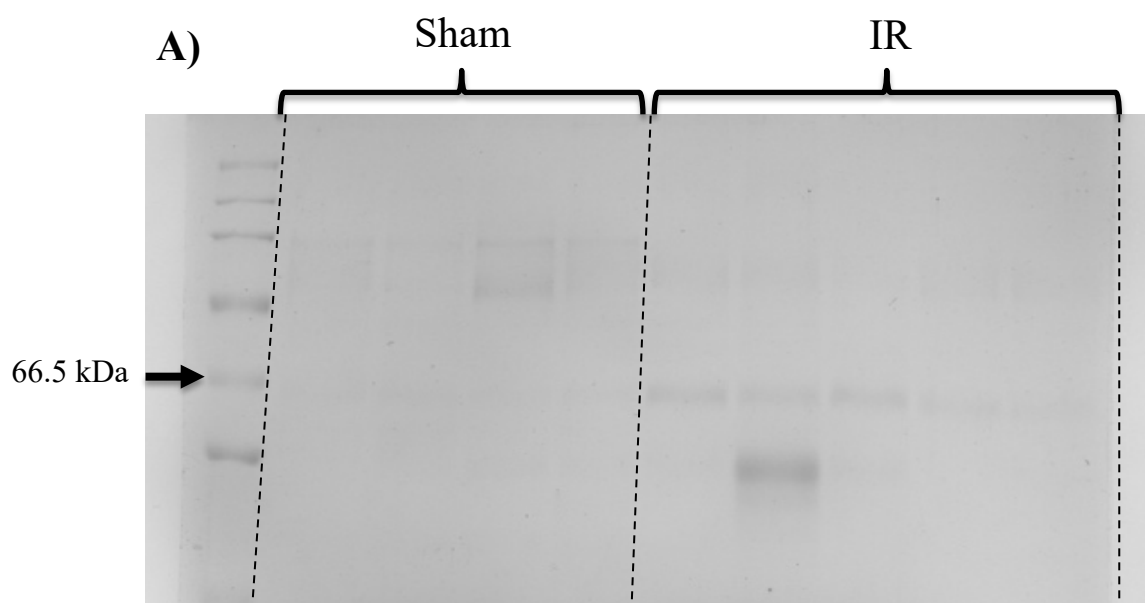


Figura 8. *A)* Imagen del gel teñido con azul de Coomassie con las muestras de 5 días, obtenida del fotodocumentador *BIO RAD*. Se utilizó el colorante de azul de coomassie para teñir las proteínas después de haber realizado el SDS-PAGE y así comprobar y comparar la presencia de proteinuria en ambos grupos de ratones (sham e IR) así como comparar los resultados con las muestras de 24 horas, la banda que indica la flecha fue el frente de referencia para dicha comparación. *B)* Proteinuria en orina de los ratones del grupo sham e IR a los 5 días de la cirugía. Gráfico obtenido

a partir del análisis estadístico con prueba *t*-student de muestras independientes y con $^{**}p < 0.05$, comparados con el grupo sham.

A pesar de la disminución en la intensidad de las bandas que se aprecian visualmente, al realizar el análisis estadístico se demostró que si existe una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.015$) entre la media de albuminuria del grupo Sham y la media de albuminuria del grupo IR (**Figura 8B**), por lo que se reafirma que sigue habiendo un daño renal.

Para determinar si a los 5 días posteriores a la IR ya comienza el remodelamiento fibrótico a nivel renal que conduce al desarrollo de ERC, se detectaron los niveles de colágena en riñón como marcador de daño estructural y fibrosis. En la imagen representativa del WB de colágena I se pueden observar varias bandas, sin embargo, se identificaron las dos filas correspondientes a esta proteína de acuerdo con su peso molecular, así como se muestra en la **Figura 9A**. Como se puede observar en la imagen, la proteína se encuentra más expresada en el grupo de ratones IR en comparación con el grupo sham lo que quiere decir que existe fibrosis y un daño estructural. Para realizar la densitometría se tomaron los valores de ambas filas de bandas y, al ser muestras que se prepararon en condiciones no desnaturizantes, se tiñó la membrana con rojo de ponceau para normalizar y obtener las proteínas totales, **Figura 9B**.

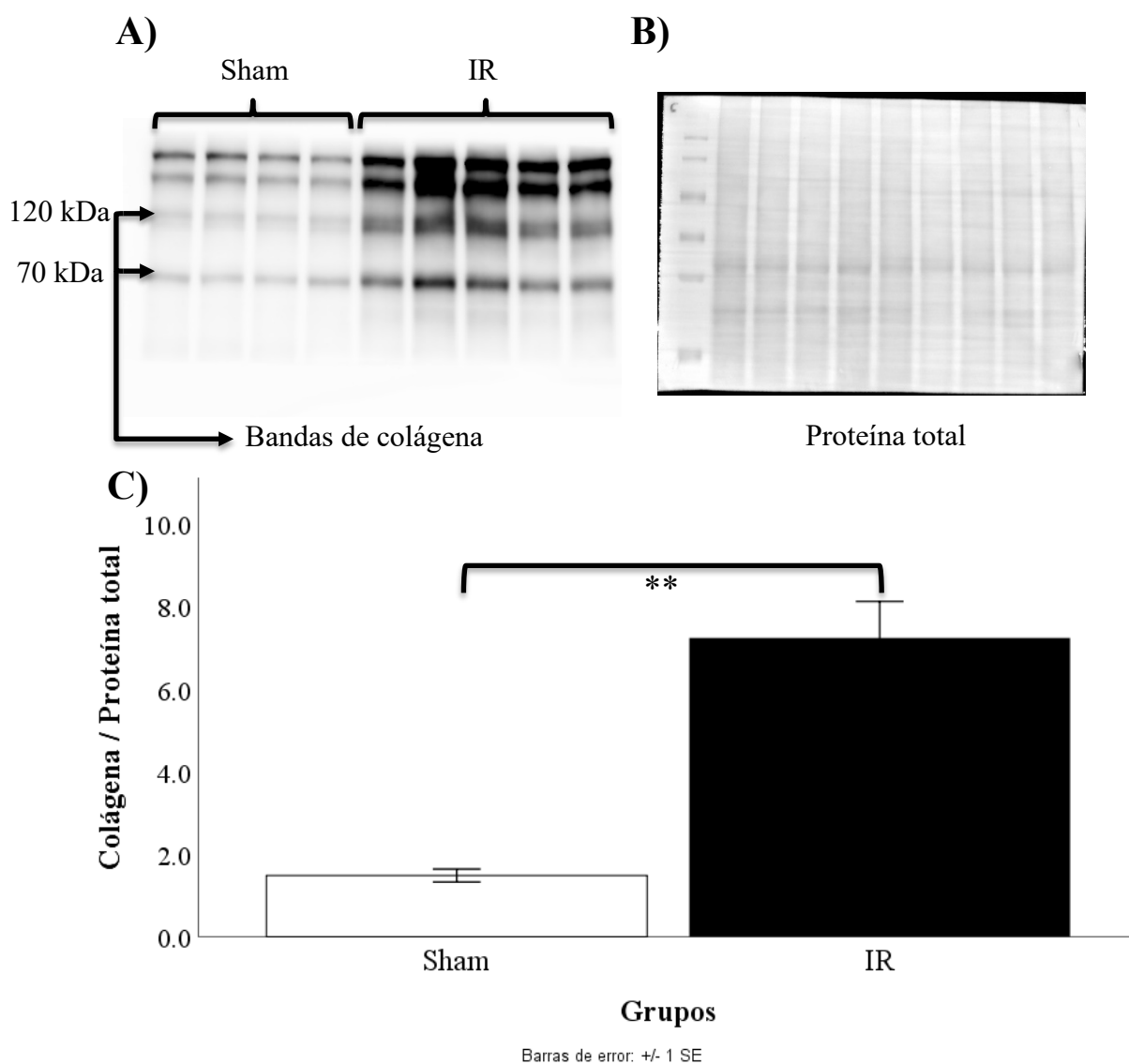


Figura 9. *A) Inmunotransferencia de colágena como marcador de daño estructural y fibrosis en riñón y corazón. Se identificaron ambas bandas de colágena las cuales se encuentran entre 70 y 120 kDa. En el análisis de densitometría se consideró el valor de ambas. B) Imagen de la membrana de PVDF con muestras para detectar colágena teñida con rojo de Ponceau, obtenida del fotodocumentador BIO RAD. La membrana se tiñó con rojo de Ponceau para detectar proteínas totales. C) Representación gráfica de la expresión de colágena en riñón de los ratones del grupo sham y del grupo IR. Gráfico obtenido a partir del análisis estadístico con prueba t-student de muestras independientes y con $**p < 0.05$, comparados con el grupo sham.*

En el análisis estadístico, se tomaron los valores ya normalizados de colágena, y se puede observar que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.002$) en la concentración de colágena entre el grupo sham y el grupo IR lo que quiere decir que la colágena se expresa en mayor medida en los ratones con daño renal en comparación con los ratones sanos *Figura 9C*.

7.2. Lesión tubular en el riñón como consecuencia de la isquemia / reperfusión durante la fase temprana

Para determinar la lesión tubular en el riñón se realizó una histología a porciones del riñón tiñéndolas con hematoxilina y eosina. En las imágenes obtenidas de los ratones del grupo sham (*Figura 10A y 10B*) se puede observar la estructura de los túbulos y glomérulos renales de forma normal, es decir, sin alteraciones o anomalías en su estructura, por el contrario, en las imágenes del grupo IR a los 5 días de evolución (*Figura 10C y 10D*) se puede apreciar que hay una dilatación tubular ya que los túbulos se encuentran expandidos así como la presencia de cilindros tubulares (*Figura 10C*) y el desprendimiento de células epiteliales hacia el lumen tubular (*Figura 10D*), esto como consecuencia de la lesión inducida por la IR. Con ello también se demuestra que el daño renal inducido por IR fue efectivo.

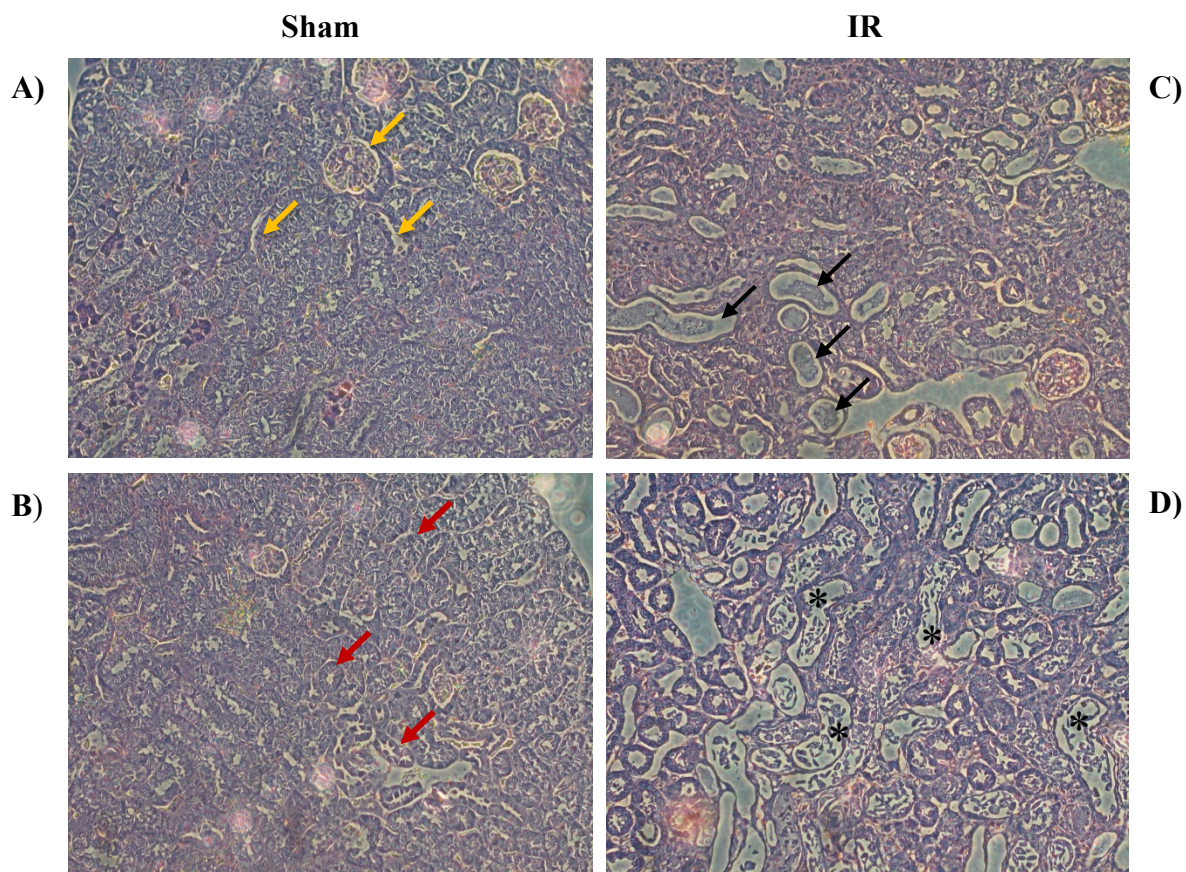


Figura 10. *Histología de tinciones en los riñones de los ratones de los grupos sham e IR de la fase temprana (5 días de evolución).* En las dos imágenes de la izquierda (**A** y **B**), que corresponden al grupo sham, se observan las estructuras tubulares y de los glomérulos de manera normal (señalados con flechas naranjas en la figura **A** y con flechas rojas en la figura **B**), por el contrario, en las dos imágenes del grupo IR a los 5 días, se observa inflamación tubular, es decir, dilatación de los túbulos, además, se observa la presencia de cilindros tubulares (**C**, señalados con flechas negras) y desprendimiento de células epiteliales (**D**, señalados con asteriscos) en el lumen tubular.

7.3. Factores proinflamatorios que se sobre expresan en la fase temprana de la progresión de la ERC en el corazón

Para determinar los mediadores inflamatorios que podrían ser responsables de la infiltración de células inflamatorias hacia el corazón en las fases tempranas de la ERC, se decidió determinar los niveles de RNA mensajero de CxCL-1 y CxCL-2 (quimiocinas);

ICAM-1 y VCAM-1 (moléculas de adhesión) e IL-6, MCP-1, TNF α e IL-10 (citocinas) en los corazones de los ratones con ERC temprana (5 días). Respecto a las quimiocinas, se observó que tanto para CxCL-1 como para CxCL-2 la expresión del gen es más alta en los corazones de los ratones del grupo IR en comparación con los del grupo sham y estadísticamente se observa que existe una diferencia significativa entre la media de la expresión relativa RNAm del grupo control (sham) y la media del grupo IR, **Figura 11**.

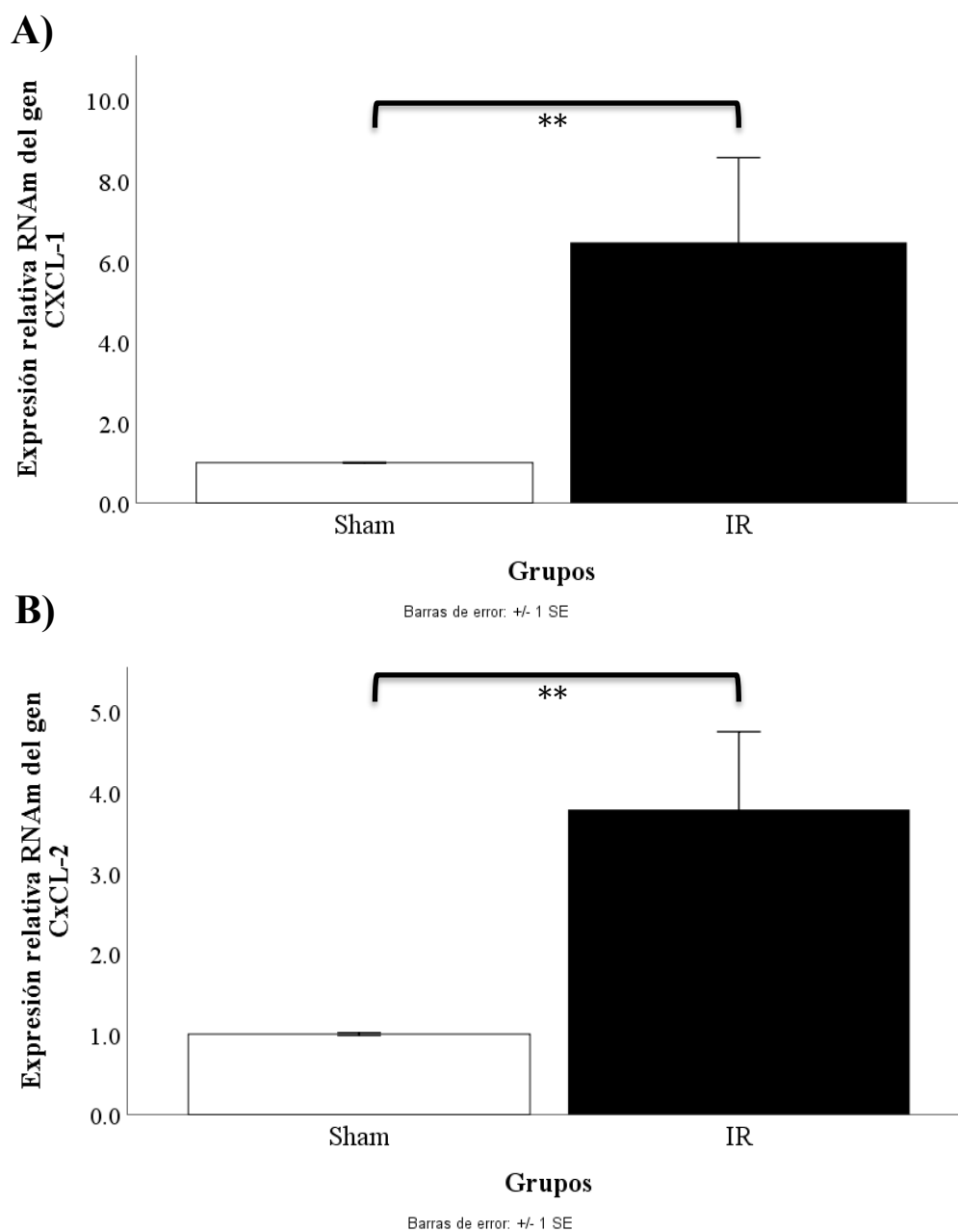


Figura 11. A) Representación gráfica de la expresión del gen *CxCL-1* en el grupo sham y el grupo IR. Gráfico obtenido a partir del análisis estadístico con prueba *t*-student de muestras independientes y con $**p < 0.05$. Los valores obtenidos muestran que existe una diferencia significativa entre la media de la expresión del gen *CxCL-1* del grupo sham y la media del grupo IR ($p = 0.029$). **B)** Representación gráfica de la expresión del gen *CxCL-2* en el grupo sham y el grupo IR. Gráfico obtenido a partir del análisis estadístico con prueba *t*-student de muestras independientes y con $**p$

< 0.05. Los valores obtenidos muestran que existe una diferencia significativa entre la media de la expresión del gen CxCL-2 del grupo sham y la media del grupo IR ($p = 0.02$).

Respecto a las moléculas de adhesión, ICAM-1 y VCAM-1, se observó el mismo patrón de los dos genes anteriores (CxCL-1 y CxCL-2) en la expresión relativa de RNAm en el grupo IR, siendo esta más alta que en los ratones del grupo sham y, estadísticamente, se observa que existe una diferencia significativa entre la media de la expresión del grupo sham y la media del grupo IR, *Figura 12*.

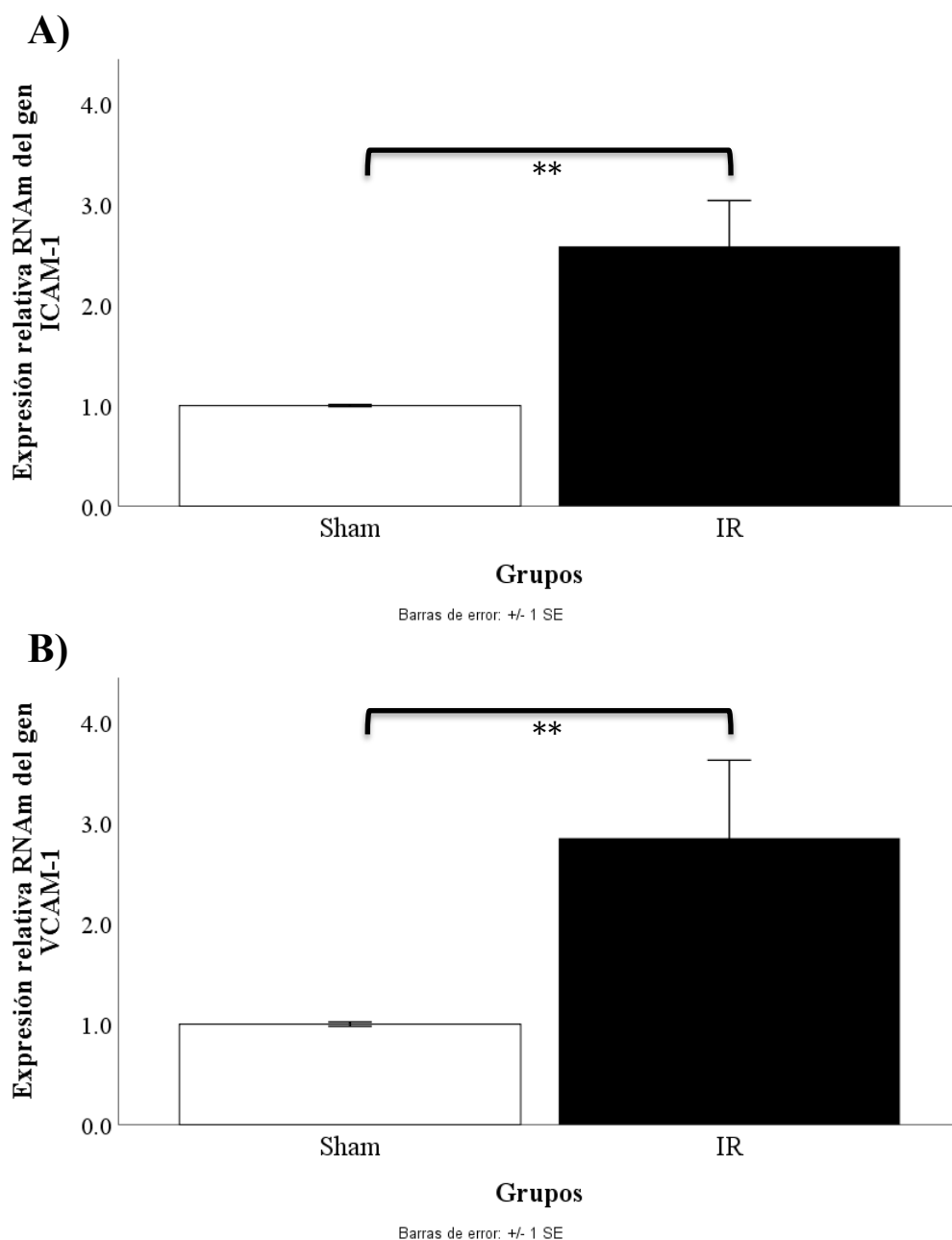


Figura 12. A) Representación gráfica de la expresión del gen ICAM-1 en el grupo sham y el grupo IR. Gráfico obtenido a partir del análisis estadístico con prueba *t*-student de muestras independientes y con $**p < 0.05$. Los valores obtenidos muestran que existe una diferencia significativa entre la media de la expresión del gen ICAM-1 del grupo sham y la media del grupo IR ($p = 0.007$). **B)** Representación gráfica de la expresión del gen VCAM-1 en el grupo sham y el grupo IR. Gráfico obtenido a partir del análisis estadístico con prueba *t*-student de muestras independientes y con $**p$

< 0.05 . Los valores obtenidos muestran que existe una diferencia significativa entre la media de la expresión del gen VCAM-1 del grupo sham y la media del grupo IR ($p = 0.041$).

Respecto a las moléculas proinflamatorias, IL-6, MCP-1, TNF α e IL-10, (**Figura 13**) se observó que la expresión de todas ellas aumenta en los ratones del grupo IR respecto al grupo control y estadísticamente, TNF- α tiene una diferencia significativa entre la media del grupo sham y la media del grupo IR, por el contrario IL-6, MCP-1 e IL-10 no son estadísticamente significativos, sin embargo, se observa que la presencia de estas moléculas a nivel cardíaco muestra una tendencia a incrementar cuando existe un daño renal.

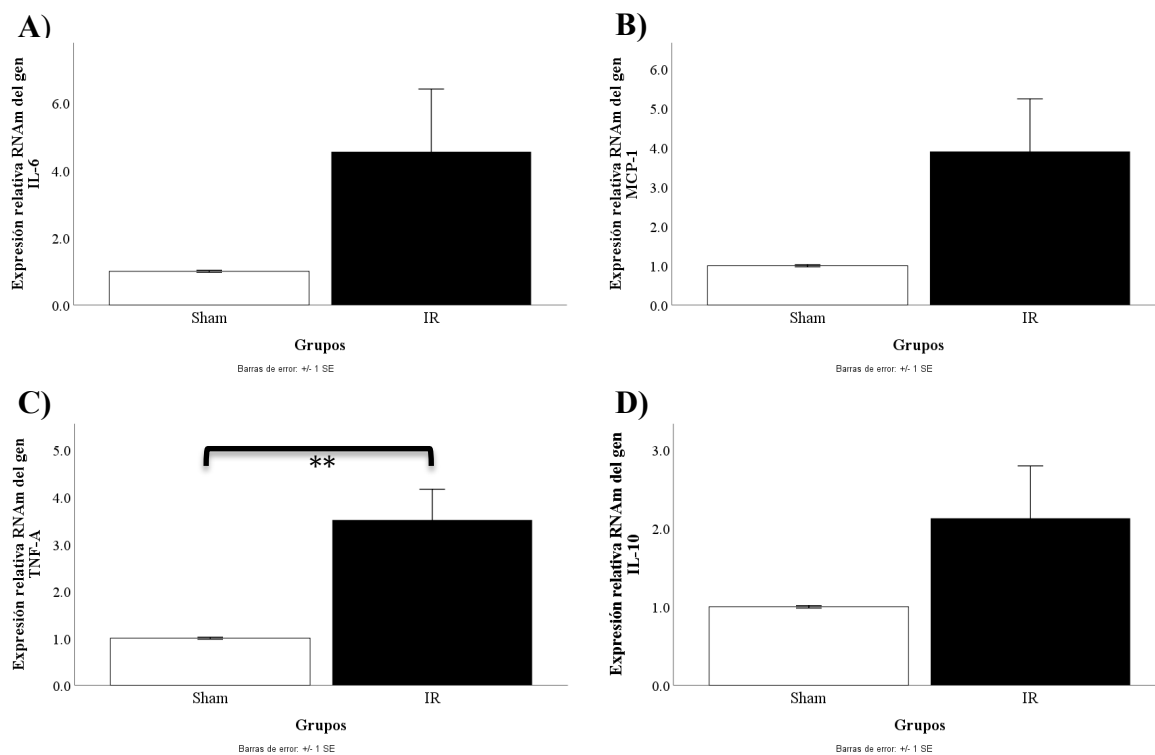


Figura 13. **A)** Representación gráfica de la expresión del gen IL-6 en el grupo sham y el grupo IR. Los valores obtenidos muestran que no existe una diferencia significativa entre la media de la expresión del gen IL-6 del grupo sham y la media del grupo IR ($p = 0.093$). **B)** Representación gráfica de la expresión del gen MCP-1 en el grupo sham y el grupo IR. Los valores obtenidos

muestran que no existe una diferencia significativa entre la media de la expresión del gen MCP-1 del grupo sham y la media del grupo IR ($p = 0.062$). **C) Representación gráfica de la expresión del gen $TNF-\alpha$ en el grupo sham y el grupo IR.** Los valores obtenidos muestran que existe una diferencia significativa entre la media de la expresión del gen $TNF-\alpha$ del grupo sham y la media del grupo IR ($p = 0.008$). **D) Representación gráfica de la expresión del gen $IL-10$ en el grupo sham y el grupo IR.** Los valores obtenidos muestran que no existe una diferencia significativa entre la media de la expresión del gen $IL-10$ del grupo sham y la media del grupo IR ($p = 0.129$). Todos los gráficos fueron obtenidos a partir del análisis estadístico con prueba de t -student de muestras independientes. Se consideró $**p < 0.05$ para valores significativos.

7.4. Caracterización de la lesión renal en la fase crónica

Para confirmar la persistencia de la lesión renal en los grupos de ratones con IR, después de 8 semanas de progresión de la ERC, se determinaron los niveles de creatinina y urea. Se realizaron análisis estadísticos de ANOVA, de una vía, para determinar las diferencias en las medias de los niveles de creatinina y urea en los tres grupos de ratones y finalmente se obtuvieron los gráficos que se muestran en la **Figura 14**. Como se puede observar en la **Figura 14A**, los niveles de creatinina en el grupo de los ratones con depleción de linfocitos T $CD4^+$ (IR + anti-T $CD4^+$) son ligeramente mayores respecto a los niveles del grupo control (sham) y del grupo sin depleción de linfocitos T $CD4^+$ (IR + IgG) sin embargo, la diferencia entre estas medias no fue estadísticamente significativa ($p = 0.190$). Por su parte, en la **Figura 14B**, se puede observar que existe una diferencia significativa ($p = 0.001$) entre los niveles de urea de los tres grupos de ratones, siendo los del grupo IR + IgG mayores respecto al grupo sham ($p = 0.018$) y al grupo IR + anti-T $CD4^+$ ($p = 0.001$).

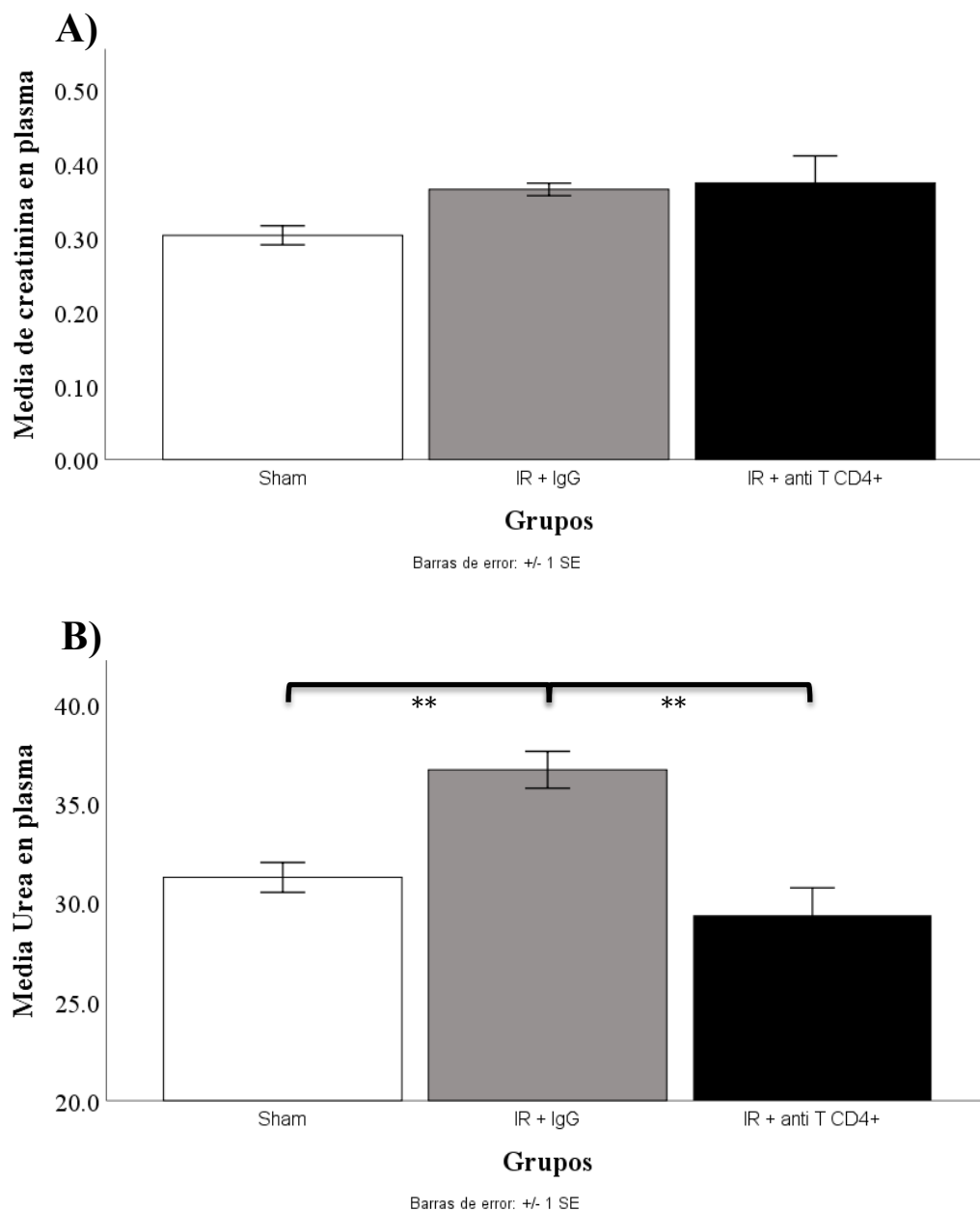


Figura 14. A) Representación gráfica de la media de los niveles de creatinina en plasma en los tres grupos de ratones de la fase crónica. Los niveles de creatinina en el grupo de los depletados (IR + anti-T CD4⁺) son mayores en comparación con el grupo control (sham) y el grupo sin depleción de linfocitos T CD4⁺ (IR + IgG) sin embargo esta diferencia no es significativa ($p = 0.190$). **B)** Representación gráfica de la media de los niveles de urea en plasma en los tres grupos de ratones de la fase crónica. Los niveles de urea del grupo IR + IgG son mayores respecto al grupo control y al grupo de los depletados siendo esta diferencia significativa ($p = 0.001$). Los gráficos fueron

obtenidos a partir del análisis estadístico ANOVA de una vía. Se consideró $**p < 0.05$ para valores significativos.

7.5. Caracterización de la lesión cardíaca en la fase crónica

Para demostrar que hubo un daño estructural en el corazón como consecuencia de la ERC, se obtuvieron los pesos de los corazones de los ratones después de 8 semanas de progresión de ERC. Al hacer el análisis estadístico correspondiente se obtuvo el gráfico que se muestra en la **Figura 15** y con ello, se observó que existe una diferencia significativa ($p = 0.015$) entre las medias de los pesos de los corazones sobre los pesos corporales de los ratones, en los tres grupos, siendo los del grupo IR + IgG mayores respecto al grupo control ($p = 0.037$) y al grupo IR + anti-T CD4⁺ ($p = 0.029$).

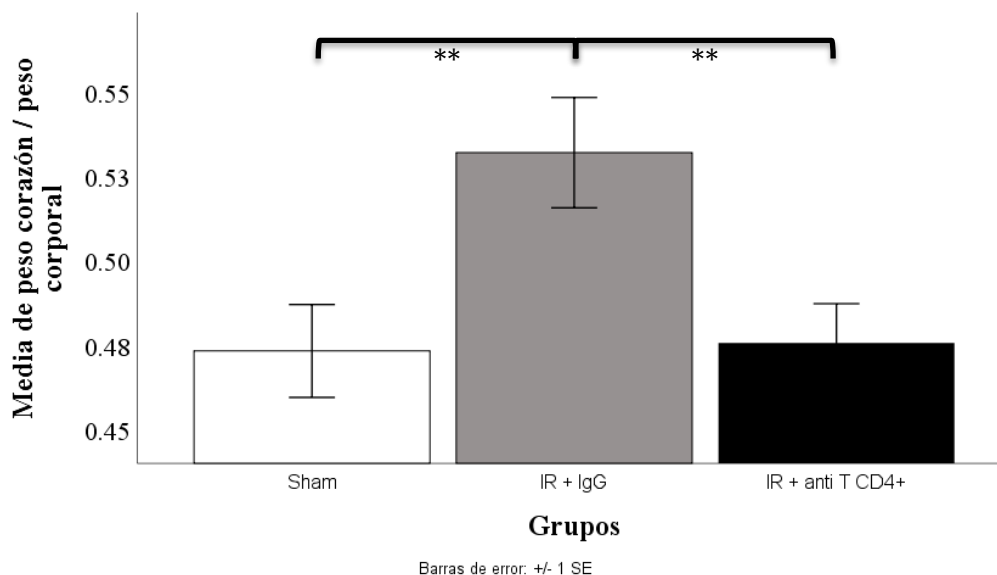


Figura 15. Media del peso del corazón sobre el peso corporal de los ratones en los tres grupos.

Los resultados indican que la media de los pesos del grupo IR + IgG son mayores con respecto a los pesos de los ratones del grupo control y del grupo IR + anti-T CD4⁺ siendo esta diferencia significativa ($p = 0.015$). El gráfico fue obtenido a partir del análisis estadístico ANOVA de una vía. Se consideró $**p < 0.05$ para valores significativos.

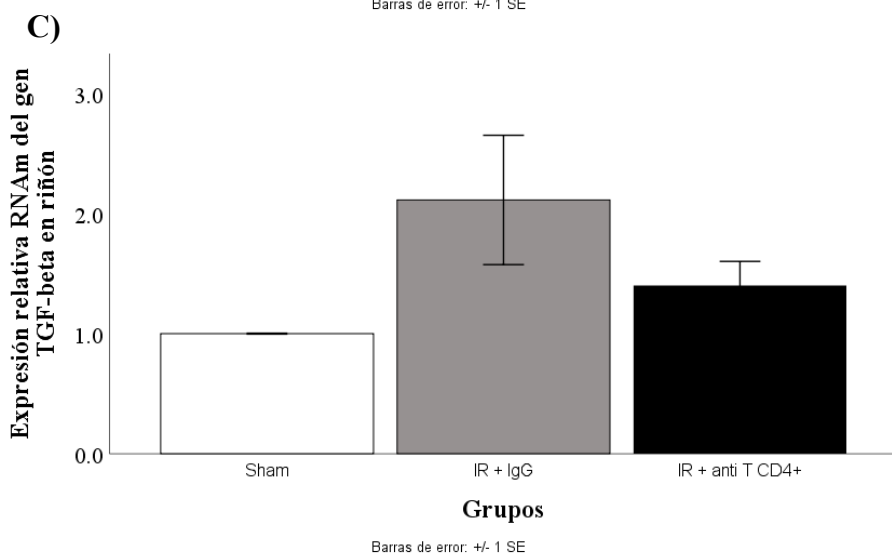
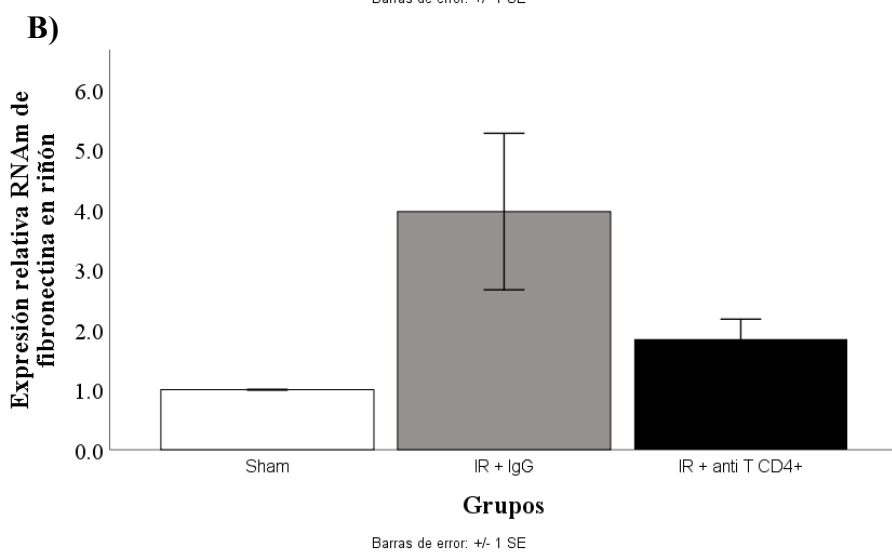
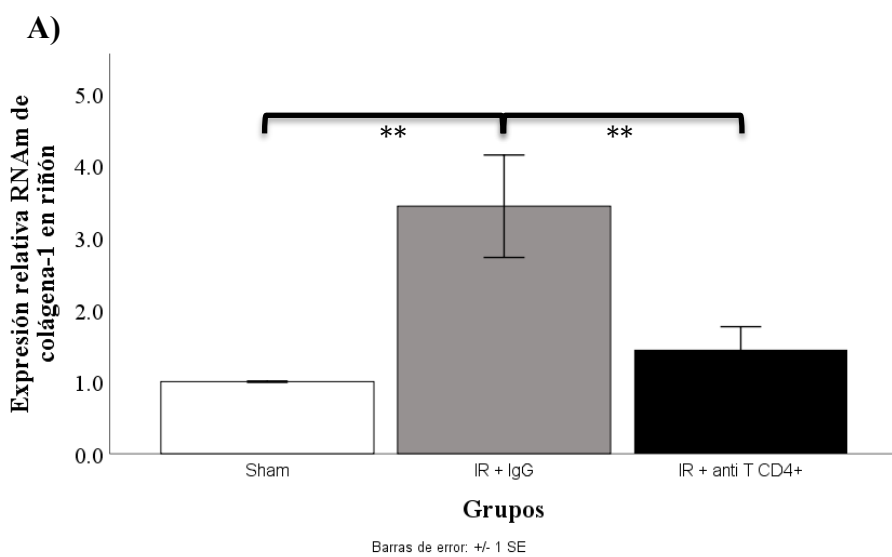
7.6. Factores pro-fibróticos que se sobre expresan en la fase crónica de la progresión de la ERC en el corazón y el riñón y el efecto de la depleción de linfocitos T CD4⁺ sobre estos factores

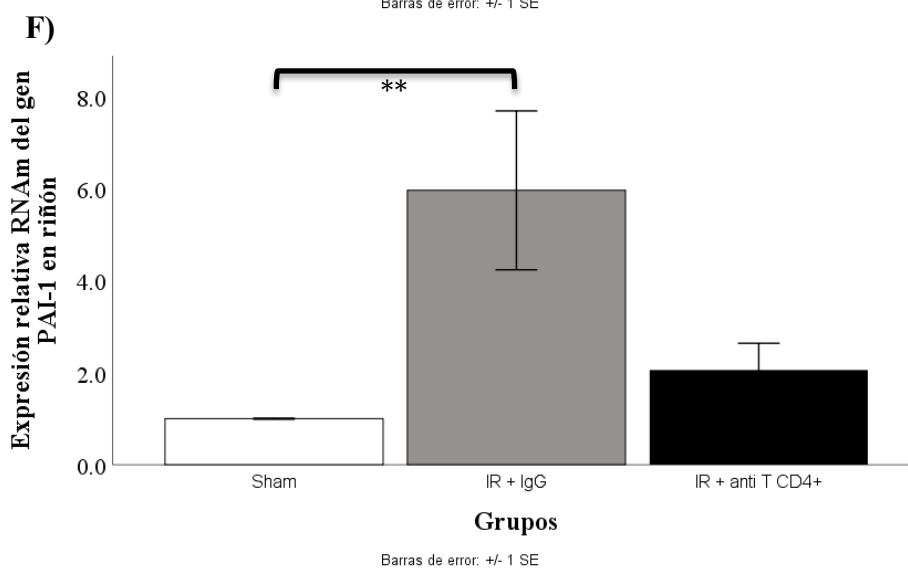
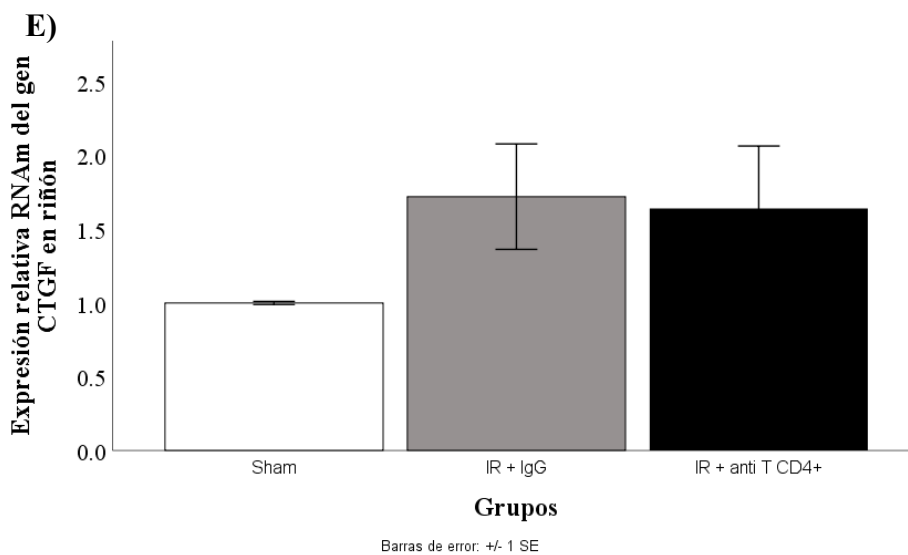
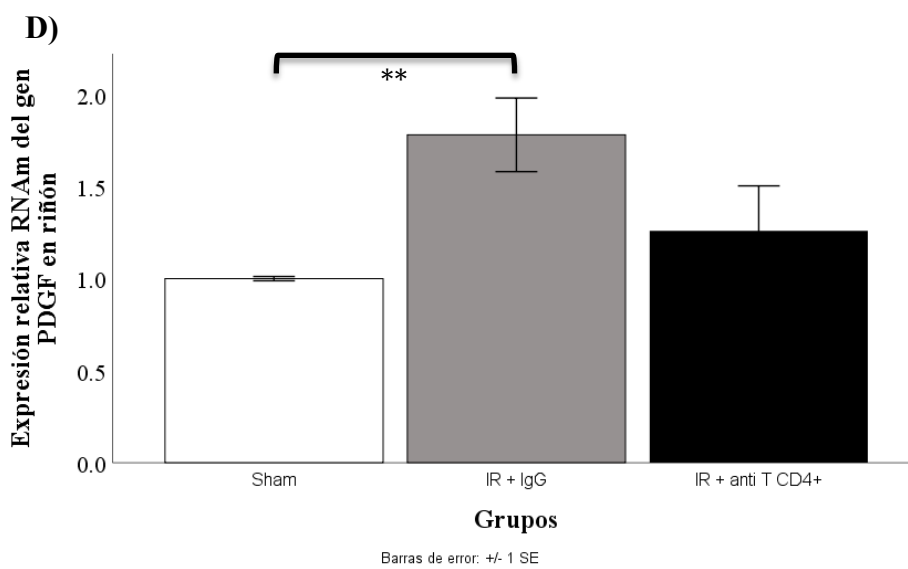
Para determinar las alteraciones renales y cardíacas mediadas por la progresión de la ERC se determinaron los niveles de expresión de colágena y fibronectina, así como de mediadores de fibrosis en los riñones y corazones de los ratones.

Respecto a los resultados analizados en riñón (*Figura 16*), se observó que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.006$) entre los niveles de la concentración de colágena-1 en los tres grupos de ratones (*Figura 16A*) ya que, los del grupo IR + IgG son mayores respecto al grupo control ($p = 0.010$) y al grupo IR + anti-T CD4⁺ ($p = 0.027$), del mismo modo, se observó que los niveles de fibronectina tienden a ser mayores en el grupo IR + IgG respecto al grupo control y al grupo de los depletados, sin embargo, para este caso la diferencia de medias no es estadísticamente significativa (*Figura 16B*). En el mismo panorama, se puede observar que los niveles de colágena-1 y de fibronectina son similares entre el grupo sham y el grupo IR + anti-T CD4⁺ lo que quiere decir que hay una disminución considerable en la expresión de ambas proteínas cuando se induce la depleción de linfocitos T CD4⁺ en la fase temprana de la ERC.

Respecto a los genes fibróticos analizados en el mismo órgano, TGF- β , PDGF, CTGF, PAI-1, MMP9 y α -SMA (*Figura 16C-H*), se observó que la expresión de todos ellos es mayor en el grupo IR + IgG en comparación con el grupo control y el grupo IR + anti-T CD4⁺ siendo estas diferencias de medias estadísticamente significativas para PDGF

y PAI-1 mientras que para TGF- β , CTGF, MMP9 y α -SMA no se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control y al grupo IR + anti-T CD4⁺, a pesar de eso, se puede observar que los niveles de estas moléculas se incrementan cuando hay una lesión crónica en el riñón y que, a su vez, se pueden ver levemente disminuidas con la depleción de linfocitos T CD4⁺.





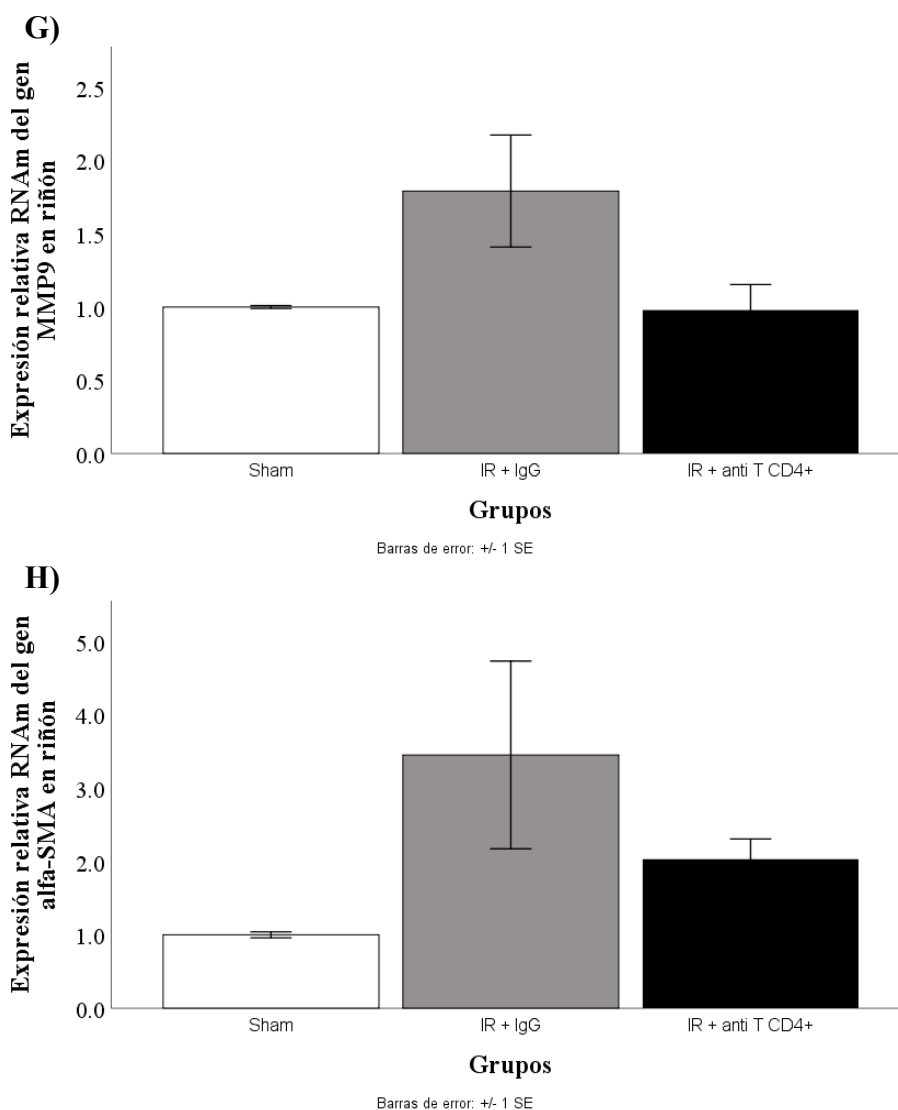


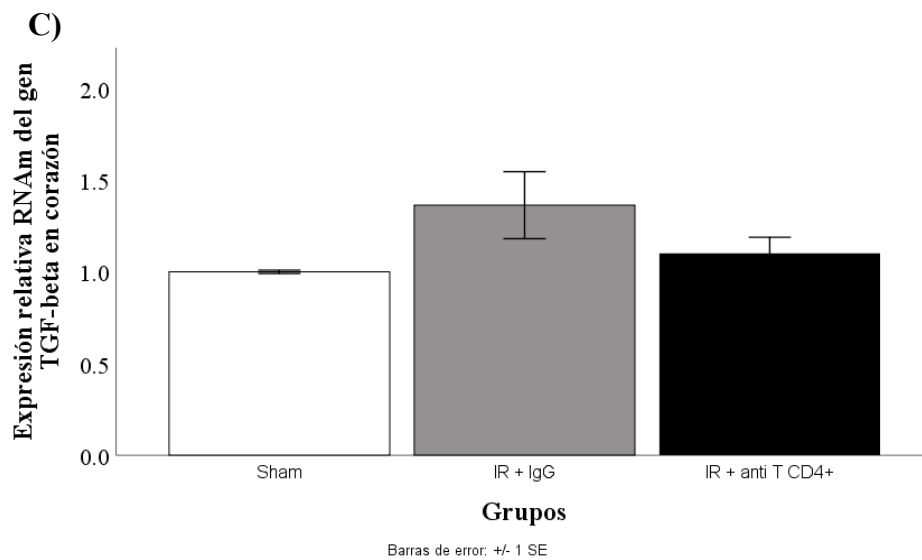
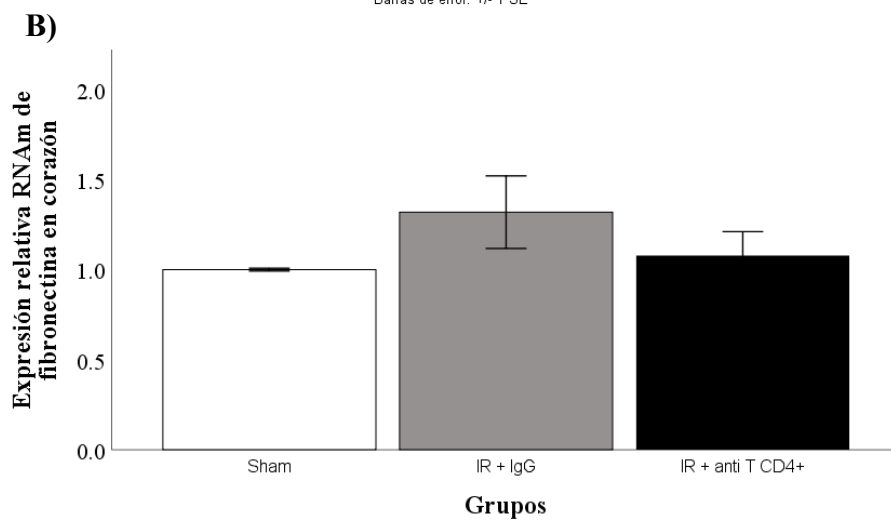
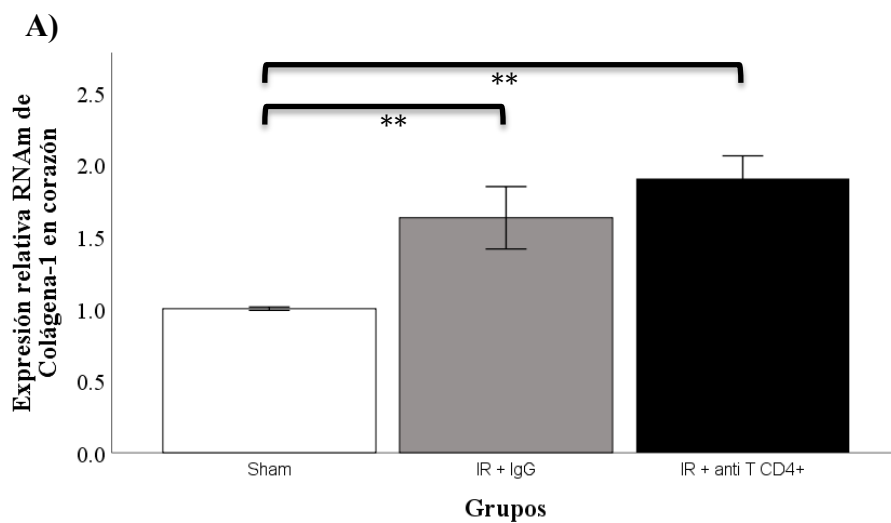
Figura 16. A) Representación gráfica de la expresión de colágena-1 en los tres grupos de ratones. Los resultados indican que existe una diferencia entre las medias de la concentración de colágena-1 en los tres grupos siendo esta estadísticamente significativa ($p = 0.006$). **B)** Representación gráfica de la expresión de fibronectina en los tres grupos de ratones. Se observa que existe una diferencia entre las medias de la concentración de fibronectina en los tres grupos de ratones, sin embargo, esta no es estadísticamente significativa ($p = 0.05$). **C, D, E, F, G y H)** Representaciones gráficas de la expresión de los genes *TGF- β* , *PDGF*, *CTGF*, *PAI-1*, *MMP9* y *α -SMA* en los riñones de los ratones de los tres grupos. **(C)** Se observa una diferencia entre las medias de la expresión del gen *TGF- β* en los tres grupos de ratones aunque no es estadísticamente significativa ($p = 0.118$), **(D)** se observa una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de la expresión del gen *PDGF* en los

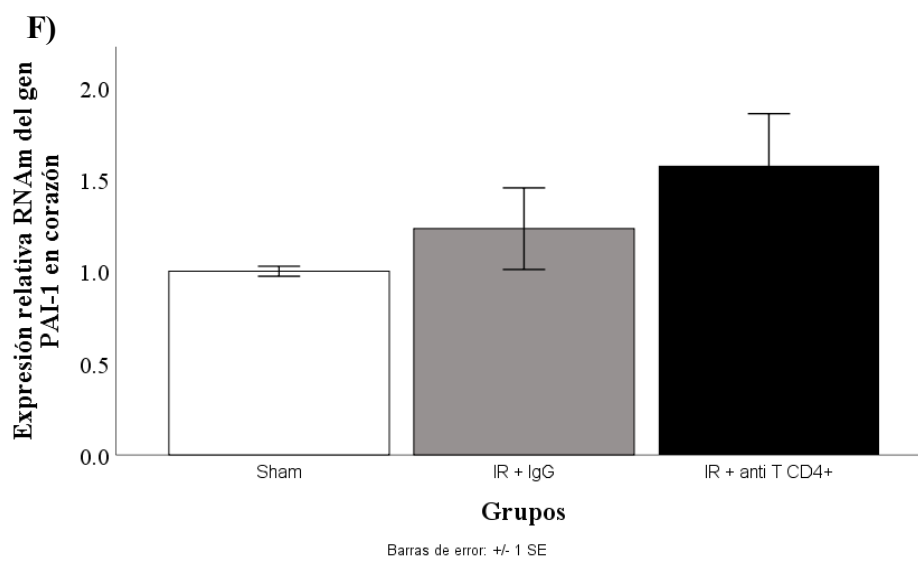
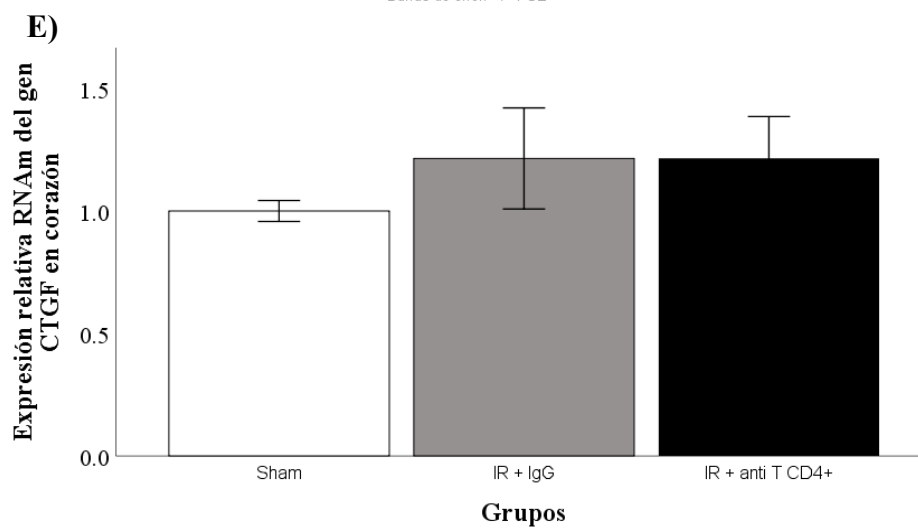
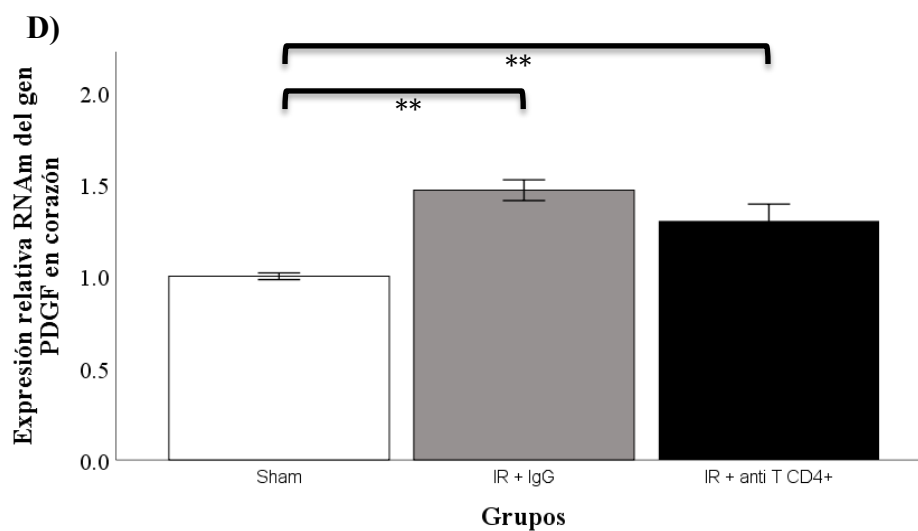
tres grupos de ratones ($p = 0.045$), (**E**) existe una diferencia entre las medias de la expresión del gen CTGF en los tres grupos de ratones, sin embargo, no es estadísticamente significativa ($p = 0.305$), (**F**) existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de la expresión del gen PAI-1 en los tres grupos de ratones ($p = 0.018$), (**G**) se observa una diferencia entre las medias de la expresión del gen MMP9 en los tres grupos de ratones aunque no es estadísticamente significativa ($p = 0.067$), (**F**) al igual que el gen anterior, se observa una diferencia entre las medias de la expresión del gen α -SMA en los tres grupos de ratones, sin embargo, no es estadísticamente significativa ($p = 0.139$). Todos los gráficos fueron obtenidos a partir del análisis estadístico ANOVA de una vía. Se consideró $**p < 0.05$ para valores significativos.

Respecto a los resultados obtenidos en corazón (**Figura 17**), se observó que los niveles de colágena son mayores en el grupo de IR + anti-T CD4⁺ en comparación con el grupo control y el grupo IR + IgG siendo la diferencia de medias estadísticamente significativa respecto al grupo control ($p = 0.004$) lo que quiere decir que la depleción de linfocitos T CD4⁺ en etapas temprana de ERC logra disminuir la expresión de colágena-I en corazón (**Figura 17A**). En el caso de fibronectina la diferencia de medias entre los grupos de ratones no es estadísticamente significativa, sin embargo, se observa el mismo patrón que en el riñón, ya que los niveles de fibronectina entre el grupo control y el grupo IR + anti-T CD4⁺ son similares, (**Figura 17B**).

Respecto a los genes analizados en el corazón, TGF- β , PDGF, CTGF, PAI-1, MMP9 y α -SMA (**Figura 17C-H**), se observó que la expresión de TGF- β , PDGF y MMP9 es mayor en el grupo IR + IgG en comparación con el grupo control y el grupo IR + anti-T CD4⁺ siendo únicamente las diferencias de medias de PDGF estadísticamente significativas, mientras que para TGF- β y MMP9 se demostró que no hay diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control y al grupo IR + anti-T CD4⁺. En el caso de CTGF y α -SMA la expresión es mayor en los grupos IR + IgG e IR + anti-T

CD4⁺ siendo similares entre sí y sin diferencias estadísticamente significativas. Por último, la expresión de PAI-1 es mayor en el grupo IR + anti-T CD4⁺ en comparación con el grupo control y el grupo IR + IgG, aunque sin diferencias estadísticamente significativas. A pesar de que no se repite el mismo patrón para todos los genes en el corazón, es decir, que no todos se ven disminuidos con la depleción de linfocitos T CD4⁺, se puede decir que los niveles de estas moléculas se incrementan como consecuencia de una lesión crónica en el riñón.





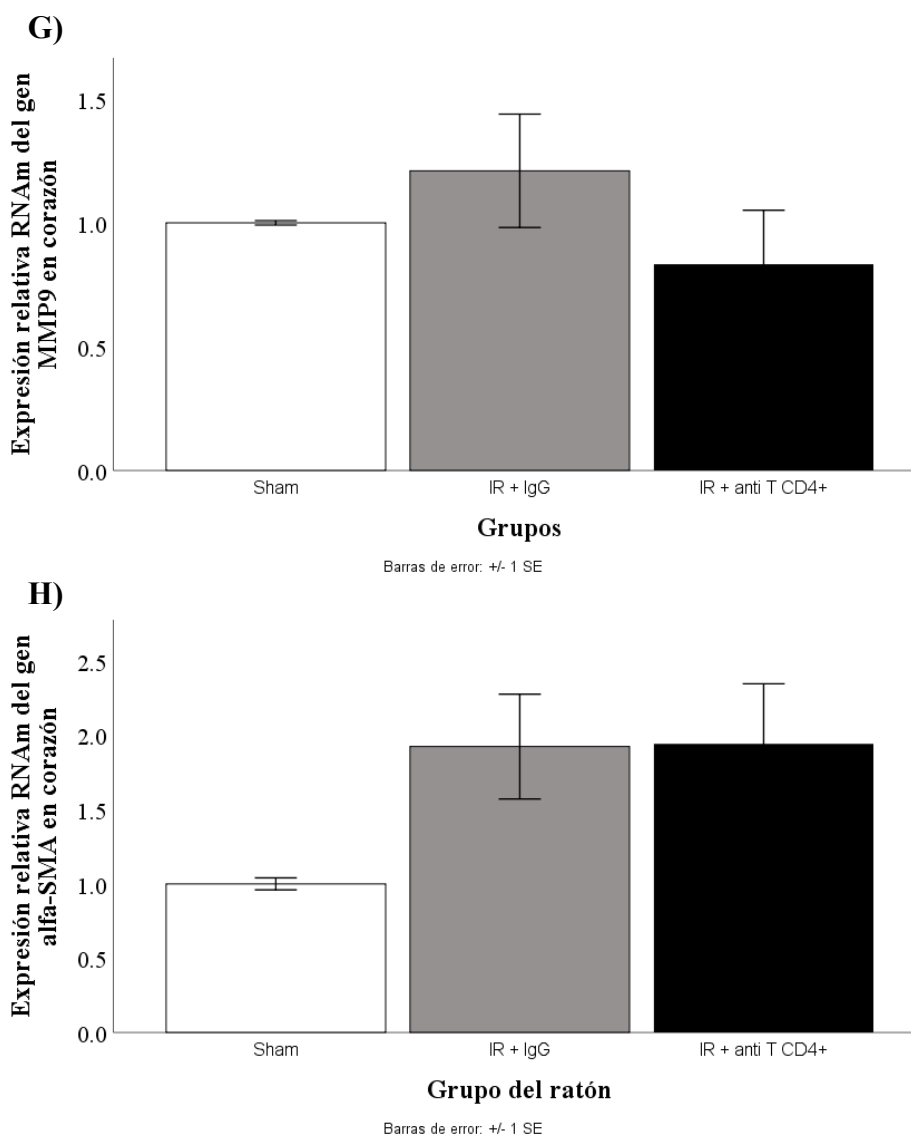


Figura 17. A) Representación gráfica de la expresión de colágena-1 en los tres grupos de ratones. Los resultados indican que existe una diferencia entre las medias de la concentración de colágena-1 en los tres grupos siendo esta estadísticamente significativa ($p = 0.004$). **B)** Representación gráfica de la expresión de fibronectina en los tres grupos de ratones. Se observa que existe una diferencia entre las medias de la concentración de fibronectina en los tres grupos de ratones, sin embargo, esta no es estadísticamente significativa ($p = 0.279$). **C, D, E, F, G y H)** Representaciones gráficas de la expresión de los genes *TGF- β* , *PDGF*, *CTGF*, *PAI-1*, *MMP9* y *α -SMA* en los corazones de los ratones de los tres grupos. **(C)** Se observa una diferencia entre las medias de la expresión del gen *TGF- β* en los tres grupos de ratones aunque no es estadísticamente significativa ($p = 0.116$), **(D)** se observa una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de la expresión del gen *PDGF*

en los tres grupos de ratones ($p = 0.001$), (**E**) existe una diferencia entre las medias de la expresión del gen CTGF en los tres grupos de ratones, sin embargo, no es estadísticamente significativa ($p = 0.604$), (**F**) existe una diferencia entre las medias de la expresión del gen PAI-1 en los tres grupos de ratones pero no es estadísticamente significativa ($p = 0.226$), (**G**) se observa una diferencia entre las medias de la expresión del gen MMP9 en los tres grupos de ratones aunque no es estadísticamente significativa ($p = 0.393$), (**H**) al igual que el gen anterior, se observa una diferencia entre las medias de la expresión del gen α -SMA en los tres grupos de ratones, sin embargo, no es estadísticamente significativa ($p = 0.120$). Todos los gráficos fueron obtenidos a partir del análisis estadístico ANOVA de una vía. Se consideró $**p < 0.05$ para valores significativos.

8. Discusión de resultados

8.1. Caracterización del modelo de ERC inducido por IR renal

Los resultados que se obtuvieron indican que nuestro modelo fue efectivo para inducir un daño renal. Como se ha mencionado anteriormente, la proteinuria en orina es una de las características principales que se pueden observar cuando hay un daño renal y en este caso, en las imágenes obtenidas con el fotodocumentador se observa que la presencia de proteínas en la orina de los ratones del grupo IR, a las 24 horas después de la cirugía, es muy alta en comparación con el grupo sham. Comparando estos resultados con los que se observan en las muestras de orina a los 5 días, se aprecia que las bandas del grupo IR no están tan marcadas en comparación con las bandas de las muestras de 24 h, y como se había explicado anteriormente, esto se debe a una recuperación parcial en los riñones de los ratones aunque esto no significa que el daño renal haya desaparecido, ya que como bien se sabe, este tipo de alteraciones provoca que más de una región de las nefronas sean afectadas lo que da comienzo a un daño renal generalizado inminente además, en los resultados de los análisis estadísticos se observa que, a pesar de tener una disminución de la presencia de proteínas en orina, sigue habiendo una diferencia significativa entre las medias de albuminuria en ambos grupos de ratones por lo que se confirma que existe un daño renal.

La detección de colágena fue utilizada como un marcador de daño estructural y fibrosis renal por lo que su detección fue determinante para confirmar la presencia de dichas alteraciones en los ratones sometidos a IR. Los niveles de colágena fueron más altos en el grupo de ratones IR en comparación con los del grupo sham. La colágena es una molécula de proteína compuesta de aminoácidos que proporciona soporte estructural al

espacio extracelular de los tejidos conectivos por lo que se encuentra en distribuida en todo el organismo (43,44) y en este caso, es probable que el aumento de colágena en el riñón, al menos en parte, se deba a una mayor síntesis de colágeno durante una lesión renal y una reparación defectuosa.

Otra evidencia para demostrar que el modelo funcionó, es decir, que el daño renal inducido por IR resultó efectivo, fue a través de histologías realizadas a porciones del riñón en donde se identificaron anomalías en las estructuras tubulares ya que presentan inflamación, cilindros tubulares y desprendimiento de células epiteliales. Esto es debido a que la isquemia renal afecta principalmente a la estructura y función de las células epiteliales tubulares. La dilatación tubular, que se observa como una expansión del lumen de los túbulos, es causada por el daño hipóxico en las células debido al aumento en la vasoconstricción vascular y la disminución de la síntesis de sustancias vasodilatadoras como en óxido nítrico, así como por el aumento de la actividad de citocinas proinflamatorias, como $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 y las quimiocinas como resultado de la respuesta inmune frente al proceso inflamatorio inicial (45). Por otra parte, la participación de los cilindros intraluminales en la obstrucción tubular es debido a que, por las alteraciones en la dinámica de los túbulos, aumenta la concentración de sodio en el líquido urinario, debido a que se reduce su reabsorción, favoreciendo la conversión de un polímero obstructivo similar a un gel lo que provoca una disminución del flujo del líquido tubular (45,46). Finalmente, el desprendimiento de las células epiteliales hacia el lumen tubular es provocado, principalmente, por la lesión hipóxica inicial la cual tiene una producción subsiguiente de especies reactivas de oxígeno (ROS), debido a la reoxigenación, lo que lleva a apoptosis y necrosis celular y una profunda respuesta inflamatoria. (45)

8.2. Factores proinflamatorios sobre expresados en la fase temprana de la progresión de la ERC en el corazón

8.2.1. Citocinas, moléculas de adhesión y proinflamatorias

Como se puede observar en la *Figura 11* los niveles en la expresión del gen CxCL-1 y del gen CxCL-2 son mayores en los ratones del grupo IR en comparación con los del grupo sham. Estos dos genes codifican un miembro de la subfamilia de quimiocinas CXC. CxCL-1 es una proteína que juega un papel en la inflamación y actúa como quimioatrayente para los neutrófilos y su sobreexpresión está asociada con el crecimiento y la progresión de ciertos tumores (47), del mismo modo CxCL-2 codifica proteínas secretadas involucradas en procesos inmunorreguladores e inflamatorios, además se expresa en sitios de inflamación y puede suprimir la proliferación de células progenitoras hematopoyéticas (48) por ello, los niveles altos que presentan los ratones del grupo IR de estos genes están asociados, en parte, a los procesos inflamatorios, resultado del daño renal. En el mismo panorama, y siguiendo la cadena de activación celular del sistema inmune frente a los procesos de inflamación por daño estructural (lesión renal) ICAM-1 y VCAM-1 (*Figura 12*), se encuentran más expresados en los ratones del grupo IR en comparación con los del grupo sham, esto se debe principalmente a que estas proteínas median en la adhesión de células endoteliales leucocitarias y en la transducción de señales frente a daños estructurales una vez que son activadas por las citocinas ya que codifican una glucoproteína de la superficie celular que normalmente se expresa en las células endoteliales y las células del sistema inmune (49,50). De igual manera se observó que los niveles de expresión de las moléculas proinflamatorias IL-6, MCP-1, TNF- α e IL-10, son mayores en los ratones con daño renal (grupo IR) (*Figura 13*), aunque en este caso la diferencia entre las medias

de la expresión relativa RNAm de IL-6, MCP-1 e IL-10 del grupo sham y las medias del grupo IR no son estadísticamente significativas, sin embargo su sobreexpresión en los ratones del grupo IR se justifican ya que la IL-6 es un gen que codifica una citocina que funciona en la inflamación y la maduración de las células B y la proteína codificada se produce principalmente en sitios de inflamación aguda y crónica (en este caso, en el riñón), donde se secreta en el suero e induce una respuesta inflamatoria transcripcional a través del receptor de interleucina 6 alfa (51) aunado a esto, el gen MCP-1 codifica una proteína de respuesta al daño del ADN siendo la proteína codificada la que desempeña un papel en la detención del punto de control G2 / M mediante el mantenimiento de la fosforilación inhibitoria de la quinasa dependiente de ciclina 1 (52), por su parte, la IL-10 también tiene un papel importante en la inmunorregulación y la inflamación ya que regula a la baja la expresión de citocinas Th1, Ags del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase II y moléculas coestimuladoras en los macrófagos lo que mejora la supervivencia de las células B, la proliferación y la producción de anticuerpos, esto lo hace mediante la codificación de una proteína (citocina) que es producida principalmente por monocitos y, en menor medida, por linfocitos (53). Por último y no menos importante, TNF- α es un gen que codifica una citocina proinflamatoria multifuncional que pertenece a la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) que funciona a través de sus receptores TNFRSF1A / TNFR1 y TNFRSF1B / TNFR2 (54). Esta citocina se ve involucrada en un amplio espectro de procesos biológicos que incluyen la proliferación celular, la diferenciación, la apoptosis, el metabolismo de los lípidos y la coagulación y además está implicada en enfermedades autoinmunes por lo que su rol en la respuesta frente a la lesión renal es muy importante.

La importancia de haber observado los niveles de expresión de estos genes en los ratones con daño renal en la fase temprana de la ERC es debido a que, por sus mecanismos de acción frente a la inflamación causada por una lesión renal, es probable que también se esté dando una infiltración no controlada de células del sistema inmune en el corazón como consecuencia de las complicaciones cardíacas originadas cuando se tiene una lesión renal (SCR) lo que implica que exista un proceso inflamatorio en el corazón. Este proceso inflamatorio en el tejido cardíaco provoca la activación de las citocinas, moléculas de adhesión y proinflamatorias que, a su vez, permiten la infiltración de las células del sistema inmune tales como macrófagos y linfocitos, especialmente linfocitos T CD4⁺ y como se ha revisado anteriormente, la infiltración en exceso de este tipo de células puede contribuir a la remodelación del tejido cardíaco y fibrosis.

8.3. Caracterización de la lesión renal y cardíaca en la fase crónica

Como se ha mencionado anteriormente, la creatinina se utiliza como un indicador de función renal por lo que los niveles altos de esta en suero, es uno de los marcadores principales de un daño renal y en este caso, como se aprecia en la (*Figura 14A*), la presencia de este producto de desecho persiste, aunque no en niveles tan altos, en los grupos de ratones con lesión renal, inducida por IR, a las 8 semanas de progresión de la ERC, en particular, en el grupo de ratones con IR + anti-T CD4⁺ los niveles de creatinina se encuentran un poco más elevados en comparación con el grupo control y ligeramente por encima del grupo IR + IgG, aunque se aprecia una pequeña diferencia entre las medias esta no es estadísticamente significativa.

Respecto a los altos niveles de urea, se sabe que esta se utiliza como otro indicador que se puede encontrar elevado en aquellos pacientes que cursan con ERC y como se

observa en la *Figura 14B*, estos niveles se encuentran más elevados en el grupo de IR + IgG en comparación con el grupo control y el grupo de los depletados, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Así mismo, se puede observar que los niveles de urea del grupo IR + anti-T CD4⁺ son similares e incluso se encuentran ligeramente por debajo de los niveles del grupo control, por lo que se puede asumir que, la depleción de los linfocitos T CD4⁺ interfiere de alguna manera con la disminución en la acumulación de la urea en suero, esto podría explicarse ya que, como se ha mencionado anteriormente, la infiltración excesiva de linfocitos T CD4⁺ en las zonas donde se origina una lesión, en este caso en el riñón, puede ser responsable de un aumento en la inflamación y en la fibrosis renal por lo que, en consecuencia, las estructuras de la nefrona se ven afectadas, lo que resulta en una disfunción renal y con ello la afección de la principal vía de excreción de la urea ya que como bien se sabe, el 90% de la urea se elimina a través de la orina (55), por ello, es probable que los ratones del grupo anti-T CD4⁺ no presentan estas complicaciones debido a un efecto protector inducido por la depleción de las células T CD4⁺ lo que da como resultado una recuperación significativa en el riñón.

A nivel cardíaco, la determinación de las diferencias de las medias de los pesos de los corazones sobre los corporales fue utilizada para demostrar el desarrollo de hipertrofia cardíaca como consecuencia de la ERC. Como se ha explicado anteriormente, una de las complicaciones principales de la ERC son las alteraciones cardiovasculares derivadas de la activación de un gran número de mecanismos de transcripción de factores proinflamatorios y de la infiltración excesiva de células del sistema inmune, principalmente, de los linfocitos T CD4⁺ por lo que era de esperarse que los corazones de los ratones del grupo IR + IgG tuvieran alteraciones en su estructura lo que se observa

como un aumento en el peso de los corazones ocasionado por la inflamación y remodelamiento cardíaco. Por el contrario, el grupo de los ratones que tuvieron depleción de las células T CD4⁺ mostraron una mejoría en la disminución de la inflamación y remodelamiento del tejido cardíaco ya que las medias de estos pesos son similares a las del grupo control y la diferencia no es estadísticamente significativa entre estos, sugiriendo que los linfocitos tienen un papel importante en el desarrollo de hipertrofia cardíaca en este modelo murino de ERC, a través de amplificar el proceso inflamatorio y perpetuar el daño ocasionado al tejido cardíaco debido a la excesiva producción de factores inflamatorios.

8.4. Efecto de la depleción de linfocitos T CD4⁺ sobre los factores pro-fibróticos sobre expresados en la fase crónica de la progresión de la ERC en el riñón y el corazón

8.4.1. *Colágena y fibronectina como marcadores de daño estructural*

Las determinaciones de colágena y fibronectina fueron utilizadas como marcadores de daño estructural y fibrosis renal y cardíaca por lo que su detección fue determinante para confirmar la presencia de dichas alteraciones en los ratones sometidos a IR.

La expresión de colágena y fibronectina en riñón fue más alta en el grupo IR + IgG en comparación con el grupo Sham y el grupo IR + anti- T CD4⁺. Como se mencionó anteriormente, la colágena proporciona soporte estructural al espacio extracelular de los tejidos conectivos por lo que se encuentra distribuida en todo el organismo (43,44), por su parte, la fibronectina es una glicoproteína que contribuye en los procesos importantes para el desarrollo, organogénesis, adhesión y migración celular, y hemostasia así como procesos fisiopatológicos como la angiogénesis y la remodelación vascular (56), por ello , es probable que el aumento de colágena y fibronectina en el riñones de los ratones del grupo

IR + IgG, al menos en parte, se deba a una mayor síntesis de ambas proteínas durante una lesión renal. Por el contrario, la disminución de los niveles de colágena y fibronectina en los ratones del grupo IR + anti-T CD4⁺ puede ser atribuida a que, por la depleción de los linfocitos T CD4⁺, ya no se genera la inflamación y fibrosis excesiva por lo que se asume que hay una recuperación parcial en los riñones de los ratones con ERC.

En el mismo panorama, la expresión de fibronectina en corazón fue más alta en el grupo IR + IgG en comparación con el grupo Sham y el grupo IR + anti-T CD4⁺ sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa. A pesar de esto se logra apreciar que la expresión de esta proteína se ve levemente atenuada en el grupo IR + anti-T CD4⁺ lo que quiere decir que la fibrosis cardíaca disminuyó ligeramente con la depleción de las células T CD4⁺. En el caso de colágena, la expresión de esta fue más alta en los grupos de ratones IR + IgG e IR + anti-T CD4⁺ respecto al grupo control, siendo esta diferencia estadísticamente significativa, por ello, se puede decir que la síntesis de colágena en el tejido cardíaco no se logró normalizar con la depleción de los linfocitos T CD4⁺.

8.4.2. *Citocinas pro-fibróticas, factores de crecimiento, e inhibidores de proteasas*

Como se observa en la *Figura 16C-H* y *Figura 17C-H*, la expresión de los genes estudiados en riñón y corazón presenta patrones similares entre sí, aunque con ciertas diferencias en algunos de ellos. En el caso del gen TGF- β , tanto en riñón como en corazón se aprecia que se encuentra más expresado en el grupo IR + IgG en comparación con el grupo control y el grupo IR + anti-T CD4⁺ y aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas, se observa que la depleción de las células T CD4⁺ logró disminuir los niveles de esta citocina llegando a estar ligeramente por encima de los que presenta el grupo control. El gen TGF- β puede desempeñar una comunicación tanto

autocrina como paracrina y tiene un rol importante en el crecimiento y desarrollo embrionario y adulto, así como en la inflamación y la reparación, incluyendo la angiogénesis y en la regulación de los mecanismos de respuesta inmune del huésped (57), por ello, la disminución de esta citocina en el grupo de ratones con depleción de linfocitos T CD4⁺ quiere decir que se logró disminuir, en parte, la fibrosis renal y cardíaca así como los procesos inflamatorios y el remodelamiento cardíaco.

El gen factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), al igual que el anterior, tiene una mayor expresión en los grupos de ratones con IR + IgG en comparación con los grupos control y los grupos de IR + anti-T CD4⁺ de riñón y corazón siendo la diferencia entre el grupo control y el grupo IR + IgG estadísticamente significativa. Aunque la diferencia de las medias de la expresión del gen entre el grupo control y el grupo IR + anti-T CD4⁺ no es significativa, se puede apreciar que los niveles disminuyeron respecto al grupo IR + IgG. El gen PDGF, pertenece a la familia de factores de crecimiento y que dentro de sus funciones biológicas se encuentra las de regular la proliferación y supervivencia celular, angiogénesis, migración celular, estimulación de la síntesis de los principales componentes de la matriz del tejido conectivo, tales como colágeno entre otras (58,59), por lo que la disminución de PDGF es causada por una recuperación parcial en los tejidos renales y cardíacos debido a la depleción de las células T CD4⁺.

En el caso del gen CTGF se observó que la disminución de los niveles de expresión no es tan grande en el grupo de los ratones con depleción de linfocitos T CD4⁺ respecto al grupo IR + IgG, tanto en riñón como en corazón, además esta pequeña diferencia de medias no fue estadísticamente significativa. En diversos estudios, se ha demostrado que este gen puede modular la expresión de mediadores inflamatorios como las citocinas y quimiocinas

tales como TNF- α , MCP-1, IL-6 e INF- γ , a través de distintas vías de señalización en diversos sistemas celulares lo que favorece los procesos de inflamación y fibrosis (60,61), además, en un estudio, Sánchez-López informó que al administrar sistémicamente CTGF en ratones durante 24 horas se induce la infiltración excesiva de linfocitos T y macrófagos en el intersticio renal lo que provoca finalmente una actividad elevada del factor NF- κ B (61), por ello, es probable que los niveles de esta proteína no se encuentren disminuidos aún con la depleción de linfocitos T CD4⁺ debido a que, esta funciona como un mediador para inducir infiltración de más células T por lo que el efecto podría verse contrarrestado con la depleción y con ello no ver cambios significativos. En otro estudio se ha demostrado que la exposición de células mesangiales a CTGF aumenta significativamente los niveles de producción de fibronectina y colágena tipo 1 (62), lo que podría estar relacionado con los niveles altos de colágena en el corazón, aún con la depleción de linfocitos T CD4⁺.

Para el gen PAI-1 se observa que el patrón de la expresión en el riñón es diferente al de la expresión en el corazón, ya que, en el caso del riñón, los niveles de este gen se encuentran más elevados en el grupo IR + IgG respecto al grupo control y al grupo IR + anti-T CD4⁺ y siendo esta diferencia estadísticamente significativa, por el contrario, en el corazón, la expresión de este gen se encuentra elevada tanto en el grupo IR + IgG como en el grupo IR + anti-T CD4⁺. El gen PAI-1 es una proteína, inhibidor de la serina proteasa, que pertenece al grupo de la superfamilia de serpinas y que tiene la función de proteger a las proteínas de la matriz extracelular (MEC) de la degradación proteolítica y también promueve la aceleración de las cicatrices en las heridas, sin embargo, la producción sostenida de esta proteína puede contribuir a una acumulación excesiva de colágeno en diferentes tejidos lo que puede provocar una fibrosis tisular (63), también se ha demostrado

que un aumento de esta proteína en las células endoteliales se asocia con apoptosis celular (64), por lo anterior, se puede asumir que la depleción de linfocitos T CD4⁺ disminuyó los niveles de PAI-1 en el riñón, lo que se asocia con una recuperación significativa en su estructura y función lo que, a su vez, concuerda con los resultados obtenidos de colágena y urea en riñón ya que estos estaban igualmente disminuida en el grupo de los ratones con depleción de células T CD4⁺ y como se mencionó anteriormente, la acumulación de colágena en los tejidos puede ser mediada con un aumento considerable de PAI-1, por el contrario, en corazón no se logra apreciar el mismo efecto ya que, se observó que los niveles de esta proteína no disminuyen aun con la depleción de las células T CD4⁺ lo que, a su vez, se puede relacionar con los niveles altos de colágena en este mismo órgano y esto quiere decir, que en el corazón no hubo una recuperación tan notoria como en el riñón.

En el caso del gen MMP9 no se observaron diferencias estadísticamente significativas, únicamente una tendencia a que los niveles de expresión son mayores en el grupo de IR + IgG respecto al grupo control y al grupo IR + anti-T CD4⁺ tanto en el riñón como en el corazón. Además, se aprecia que los niveles de expresión de MMP9 en el grupo de los depletados son muy similares a los del grupo sham en ambos casos (riñón y corazón). La metalopepsidasa de matriz 9 (MMP9) es un miembro de las MMP las cuales tienen un rol importante en la degradación y remodelación de las proteínas MEC durante los procesos de desarrollo en condiciones normales, como la morfogénesis de órganos y la angiogénesis en procesos como la inflamación y la invasión tumoral (65) además, su expresión está regulada por diferentes citocinas, como la IL-1 β y TNF- α , y factores de crecimiento como PDGF (58) así mismo, su expresión se ve regulada por la vía de señalización MAPK (66), por ello, es probable que su disminución en el grupo de ratones con depleción de células T

CD4⁺ sea debido a que, al no tener un exceso de linfocitos T, no se den procesos de inflamación y fibrosis para lo cual no sea requerida la producción sostenida de este gen, lo que quiere decir que hubo una disminución de los procesos inflamatorios y pro-fibróticos tanto en el corazón como en el riñón.

Por último, el gen de alfa-actina del musculo liso (α -SMA) presentó el mismo patrón que el gen PAI-1 en ambos órganos ya que, en el riñón, la expresión de este gen es mayor en el grupo IR + IgG respecto al grupo control y el grupo IR + anti-T CD4⁺ mientras que, en el corazón, la expresión es mayor tanto en el grupo IR + IgG como en el grupo IR + anti T CD4⁺ respecto al grupo control. La α -SMA es la isoforma de actina que predomina en las células del músculo liso vascular en donde su expresión está relacionada, principalmente, con la contracción del tejido de granulación por lo que tiene un rol importante en la fibrogénesis, y debido a su localización en los fibroblastos, estos juegan un papel central en el cierre de los tejidos de las heridas mediante su capacidad para producir una fuerte fuerza contráctil (67), por ello, se puede asumir que la depleción de los linfocitos T CD4⁺ en los ratones con ERC, disminuyó la fibrosis renal, sin embargo, en el corazón, se observa que estos efectos no fueron similares ya que la expresión de esta proteína se encuentra elevada aun con la depleción lo que quiere decir que la recuperación ante la fibrosis en tejido cardíaco no es tan notoria respecto al riñón.

La importancia de haber observado y analizado la expresión de estos genes en los riñones y en los corazones de los ratones de la fase crónica es debido a que, con esto se pudo evaluar el efecto de la depleción de los linfocitos T CD4⁺ en la fase crónica de la progresión de la ERC y se pudo comparar estos efectos respecto a los ratones de la fase temprana y con ello, demostrar que la depleción de las células T CD4⁺ trae consigo, efectos

benéficos ya que se logró disminuir los procesos inflamatorios en riñón y corazón y con ello disminuir la fibrosis renal y cardíaca así como el remodelamiento del tejido cardíaco, aunque los efectos de la depleción fueron más notorios en el riñón, debido a una mayor disminución en la expresión de los genes. En el corazón, el mayor efecto benéfico que tuvo la depleción de linfocitos T CD4⁺ fue sobre la hipertrofia cardíaca. Esto quiere decir que la depleción de linfocitos T CD4⁺ puede contribuir con la disminución de las complicaciones cardíacas durante la progresión de la ERC siendo esto de interés terapéutico ya que este efecto podría aplicarse en las etapas tempranas de los pacientes que cursan con ERC para así asegurar que haya una recuperación parcial del riñón y con ello evitar el menor daño cardíaco posible con lo que puede verse mejorada la calidad de vida y reducir la tasa de mortalidad en este grupo de pacientes.

9. Conclusiones

La ERC inducida por IR produce un incremento temprano en los niveles cardíacos de las quimiocinas CXCL1 y CXCL2, las moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1 y la citocina proinflamatoria TNF- α .

La depleción temprana y transitoria de los linfocitos T CD4⁺ redujo la severidad de la ERC demostrado por la prevención de la elevación de los niveles plasmáticos de urea, así como de marcadores de fibrosis como Colágena I, PDGF y PAI-1. Además, la depleción de los linfocitos T CD4⁺ redujo la hipertrofia cardíaca que aparece como consecuencia de la ERC.

Por lo anterior, es de gran interés, en el área clínica, seguir avanzado en la investigación en estos temas para comprender con más claridad las vías de señalización y los tipos celulares específicos que participan en la interacción riñón-corazón durante las primeras etapas de la ERC ya que se puede conseguir desarrollar nuevas alternativas terapéuticas que consigan obtener mayores efectos benéficos ralentizando la evolución de la ERC, reduciendo la mortalidad por una complicación cardiovascular y mejorando el pronóstico en este grupo de pacientes.

10. Esquema de hallazgos

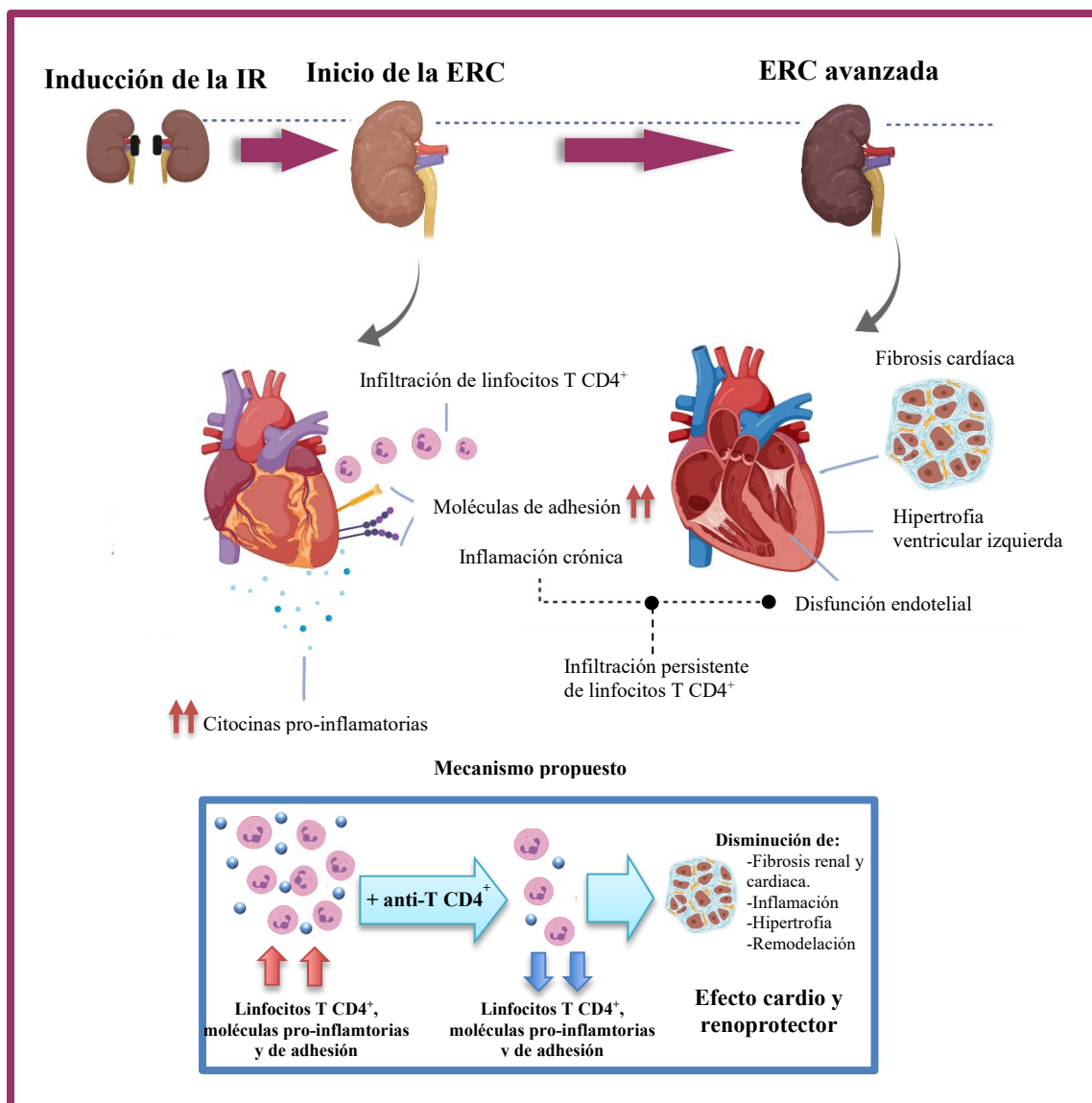


Figura 18. Esquema sobre los hallazgos más importantes encontrados en el presente trabajo. Al inducir IR se da comienzo a la ERC en donde se observa una infiltración no controlada de células del sistema inmune en el tejido cardíaco, en especial, de linfocitos T CD4⁺ los cuales son mediados por la activación de citocinas proinflamatorias, moléculas quimioatrayentes y de adhesión, provocando cambios epigenéticos en el órgano que dan como resultado un proceso de inflamación crónica. Ya en la etapa avanzada de la ERC, en donde la inflamación es consistente y que juntamente con la infiltración persistente de linfocitos T CD4⁺ en el tejido cardíaco, dan como resultado una disfunción endotelial, así como el desarrollo de hipertrofia ventricular izquierda y fibrosis cardíaca. Sin embargo, al realizar una depleción de estas células CD4⁺ se observó que hubo una disminución

en los niveles de las quimiocinas, citocinas y otras moléculas pro-inflamatorias otorgando así un efecto benéfico tanto en el corazón como en el riñón con lo que se puede explicar un posible mecanismo en donde el rol que juegan los linfocitos T CD4⁺ sobre las alteraciones cardiovasculares es de gran relevancia y que actuando directamente sobre estas células, se pueden obtener efectos cardio y renoprotectores pero a pesar de esto aún es necesario seguir estudiando este mecanismo para dilucidar sobre el mecanismo de acción específico y ofrecer una mayor oportunidad de ir creando posibles tratamientos terapéuticos que permitan mejorar el pronóstico de vida de los pacientes que cursan con ERC y disminuyendo la tasa de mortalidad por complicaciones cardiovasculares.

11. Referencias

1. Hickling DR, Sun T-T, Wu X-R. Anatomy and Physiology of the Urinary Tract: Relation to Host Defense and Microbial Infection. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2015 Aug 6 [cited 2021 Jan 29];3(4).
2. Ogobuiro I, Tuma F. Physiology, Renal [Internet]. StatPearls. StatPearls Publishing; 2019 [cited 2020 May 13]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30855923>
3. Pollak MR, Quaggin SE, Hoenig MP, Dworkin LD. The glomerulus: The sphere of influence. *Clin J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2014 [cited 2020 Jul 14];9(8):1461–9.
4. McCormick JA, Ellison DH. Distal convoluted tubule. *Compr Physiol* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2020 Jul 14];5(1):45–98.
5. Madrazo-Ibarra A, Vaitla P. Histology, Nephron [Internet]. StatPearls. StatPearls Publishing; 2020 [cited 2020 Jun 16]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32119298>
6. Jager KJ, Kovesdy C, Langham R, Rosenberg M, Jha V, Zoccali C. A single number for advocacy and communication-worldwide more than 850 million individuals have kidney diseases. *Nephrol Dial Transplant*. 2019;34(11):1803–5.
7. Crews DC, Bello AK, Saadi G. Carga, acceso y disparidades en enfermedad renal. *Arch Argent Pediatr*. 2019 Jun 1;117(3):e243–51.
8. Garcia-Garcia G, Gutiérrez-Padilla A, Perez-Gomez HR, Chavez-Iñiguez JS, Morraz-Mejia EF, Amador-Jimenez MJ, et al. Chronic kidney disease of unknown cause in Mexico: The case of Poncitlan, Jalisco. *Clin Nephrol*. 2019 Aug 9;
9. Kellum JA, Lameire N, Aspelin P, Barsoum RS, Burdmann EA, Goldstein SL, et al.

- Kidney disease: Improving global outcomes (KDIGO) acute kidney injury work group. KDIGO clinical practice guideline for acute kidney injury. Vol. 2, Kidney International Supplements. Nature Publishing Group; 2012. p. 1–138.
10. Vaidya SR AN. Chronic Renal Failure - StatPearls - NCBI Bookshelf [Internet]. StatPearls Publishing. 2019 [cited 2020 May 9]. Available from: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov.pbidi.unam.mx:2443/books/NBK535404/?report=reader](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pbidi.unam.mx:2443/books/NBK535404/?report=reader)
 11. OPS/OMS | La OPS/OMS y la Sociedad Latinoamericana de Nefrología llaman a prevenir la enfermedad renal y a mejorar el acceso al tratamiento [Internet]. [cited 2020 Jan 29]. Available from: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10542:2015-opsoms-sociedad-latinoamericana-nefrologia-enfermedad-renal-mejorar-tratamiento&Itemid=1926&lang=es
 12. Obrador GT, Paniagua R. A decade after the KDOQI CKD guidelines: A perspective from Mexico. *Am J Kidney Dis* [Internet]. 2012;60(5):736–7.
 13. Diwan V, Brown L, Gobe GC. Adenine-induced chronic kidney disease in rats. Vol. 23, *Nephrology*. Blackwell Publishing; 2018. p. 5–11.
 14. Mehta R, Cai X, Lee J, Xie D, Wang X, Scialla J, et al. Serial Fibroblast Growth Factor 23 Measurements and Risk of Requirement for Kidney Replacement Therapy: The CRIC (Chronic Renal Insufficiency Cohort) Study. *Am J Kidney Dis*. 2019;1–11.
 15. Knowles S. Chronic kidney disease. *Nurs Stand*. 2007;21(38):59.
 16. Official Journal Of the internatiOnal SOciety Of nephroLOgy KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney

- Disease [Internet]. [cited 2020 Jan 30]. Available from: www.publicationethics.org
17. Khajavi Rad A, Mohebbati R, Hosseinian S. Drug-induced nephrotoxicity and medicinal plants. *Iran J Kidney Dis.* 2017;11(3):169–79.
 18. Tiong HY, Huang P, Xiong S, Li Y, Vathsala A, Zink D. Drug-induced nephrotoxicity: Clinical impact and preclinical in vitro models. *Mol Pharm.* 2014;11(7):1933–48.
 19. Swirski FK, Nahrendorf M. Cardioimmunology: the immune system in cardiac homeostasis and disease. Vol. 18, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2018. p. 733–44.
 20. Oberman R, Bhardwaj A. Physiology, Cardiac [Internet]. StatPearls. StatPearls Publishing; 2019 [cited 2020 May 13]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30252345>
 21. Tuegel C, Bansal N. Heart failure in patients with kidney disease. Vol. 103, *Heart*. BMJ Publishing Group; 2017. p. 1843–53.
 22. Ronco C, Haapio M, House AA, Anavekar N, Bellomo R. Cardiorenal Syndrome. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52(19):1527–39.
 23. Tsuruya K, Eriguchi M, Yamada S, Hirakata H, Kitazono T. Cardiorenal Syndrome in End-Stage Kidney Disease. *Blood Purif.* 2015;40(4):337–43.
 24. Di Lullo L, House A, Gorini A, Santoboni A, Russo D, Ronco C. Chronic kidney disease and cardiovascular complications. *Heart Fail Rev.* 2015;20(3):259–72.
 25. Herzog CA, Asinger RW, Berger AK, Charytan DM, Díez J, Hart RG, et al. Cardiovascular disease in chronic kidney disease. A clinical update from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* 2011;80(6):572–86.

26. Jagieła J, Bartnicki P, Rysz J. Selected cardiovascular risk factors in early stages of chronic kidney disease. *Int Urol Nephrol* [Internet]. 2020;(0123456789).
27. Hannoodee S, Nasuruddin DN. Acute inflammatory response. *Nature*. 1965 Mar 12;206(4979):20.
28. Poveda J, Sanz AB, Rayego-Mateos S, Ruiz-Ortega M, Carrasco S, Ortiz * A, et al. NFκB protein downregulation in acute kidney injury: Modulation of inflammation and survival in tubular cells. *Elsevier* [Internet]. 2016 [cited 2020 May 12];
29. Guo YJ, Pan WW, Liu SB, Shen ZF, Xu Y HL. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Exp Ther Med* [Internet]. 2020 [cited 2020 May 12];19(3).
30. Andrade-Oliveira V, Foresto-Neto O, Watanabe IKM, Zatz R, Câmara NOS. Inflammation in renal diseases: New and old players. *Front Pharmacol*. 2019;10.
31. Tapmeier TT, Fearn A, Brown K, Chowdhury P, Sacks SH, Sheerin NS, et al. Pivotal role of CD4⁺ T cells in renal fibrosis following ureteric obstruction. *Kidney Int*. 2010;78(4):351–62.
32. Liu L, Kou P, Zeng Q, Pei G, Li Y, Liang H, et al. CD4⁺ T lymphocytes, especially Th2 cells, contribute to the progress of renal fibrosis. *Am J Nephrol*. 2012 Oct;36(4):386–96.
33. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: The leukocyte adhesion cascade updated. Vol. 7, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2007. p. 678–89.
34. Gentek R, Hoeffel G. The innate immune response in myocardial infarction, repair, and regeneration. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC; 2017. p. 251–72.

35. John R.Giudicessi, BA.Michael J.Ackerman. 2013. Inflammatory activation: cardiac, renal, and cardio-renal interactions in patients with the cardiorenal syndrome. NIH PA [Internet]. 2008;23(1):1–12.
36. Bansal SS, Ismahil MA, Goel M, Patel B, Hamid T, Rokosh G, et al. Activated T lymphocytes are essential drivers of pathological remodeling in ischemic heart failure. *Circ Hear Fail*. 2017 Mar 1;10(3):e003688.
37. Rojo J, Criado G. CD4: asociaciones moleculares y papel en la respuesta a antígeno. *Inmunol*. 2000;19(4):122–33.
38. Chávez Sánchez FR, Rojas-Lemus M, Fortoul van der Goes TI, Tenorio Zumárraga EP, Chávez Sánchez FR, Rojas-Lemus M, et al. *Revista de la Facultad de Medicina de la Unam. Rev la Fac Med* [Internet]. 2017;60(5):36–44.
39. Yang Z, Day Y-J, Toufektsian M-C, Xu Y, Ramos SI, Marshall MA, et al. Myocardial Infarct–Sparing Effect of Adenosine A_{2A} Receptor Activation Is due to Its Action on CD4⁺ T Lymphocytes. *Circulation* [Internet]. 2006 Nov 7 [cited 2020 May 15];114(19):2056–64.
40. Hofmann U, Frantz S. Role of T-cells in myocardial infarction. [cited 2020 May 15]; Available from: <https://academic.oup.com/eurheartj/article-abstract/37/11/873/2398331>
41. Herskowitz A, Choi S, Ansari AA, Wesselingh S. Cytokine mRNA expression in postischemic/reperfused myocardium. *Am J Pathol*. 1995;146(2):419–28.
42. Birdsall HH, Green DM, Trial J, Youker KA, Burns AR, MacKay CR, et al. Complement C5a, TGF-β1, and MCP-1, in Sequence, Induce Migration of Monocytes Into Ischemic Canine Myocardium Within the First One to Five Hours

- After Reperfusion. *Circulation* [Internet]. 1997 Feb 4 [cited 2020 May 15];95(3):684–92.
43. Wu M, Crane JS. Biochemistry, Collagen Synthesis [Internet]. StatPearls. StatPearls Publishing; 2018 [cited 2020 Jul 17]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29939531>
44. Abramowitz MK, Paredes W, Zhang K, Brightwell CR, Newsom JN, Kwon HJ, et al. Skeletal muscle fibrosis is associated with decreased muscle inflammation and weakness in patients with chronic kidney disease. *Am J Physiol - Ren Physiol* [Internet]. 2018 Dec 4 [cited 2020 Jul 17];315(6):F1658–69.
45. Kezić A, Stajic N, Thaiss F. Innate immune response in kidney ischemia/reperfusion injury: Potential target for therapy. Vol. 2017, *Journal of Immunology Research*. Hindawi Limited; 2017.
46. Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury [Internet]. Vol. 17, *Journal of the American Society of Nephrology*. American Society of Nephrology; 2006 [cited 2020 Aug 15]. p. 1503–20..
47. HGNC. CXCL1 CXC motivo quimiocina ligando 1 [Homo sapiens (humano)] - Gen - NCBI [Internet]. 2020 [cited 2020 Jul 18]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=2919
48. HGNC. CXCL2 CXC motivo quimiocina ligando 2 [Homo sapiens (humano)] - Gen - NCBI [Internet]. 2020 [cited 2020 Jul 18]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2920#gene-expression>
49. HGNC. ICAM1 molécula de adhesión intercelular 1 [Homo sapiens (humano)] -

- Gen - NCBI [Internet]. 2020 [cited 2020 Jul 18]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3383>
50. HGNC. VCAM1 molécula de adhesión celular vascular 1 [Homo sapiens (humano)] - Gen - NCBI [Internet]. 2020 [cited 2020 Jul 18]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7412>
51. HGNC. IL6 interleucina 6 [Homo sapiens (humano)] - Gen - NCBI [Internet]. 2020 [cited 2020 Jul 18]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3569>
52. HGNC. MCPH1 microcefalina 1 [Homo sapiens (humano)] - Gen - NCBI [Internet]. 2020 [cited 2020 Jul 18]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/79648>
53. HGNC. IL10 interleucina 10 [Homo sapiens (humano)] - Gen - NCBI [Internet]. 2020 [cited 2020 Jul 18]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3586>
54. HGNC. Factor de necrosis tumoral TNF [Homo sapiens (humano)] - Gen - NCBI [Internet]. 2020 [cited 2020 Jul 18]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7124>
55. Wang H, Ran J, Jiang T. Urea. *Subcell Biochem* [Internet]. 2014 [cited 2020 Oct 11];73:7–29.
56. Maurer LM, Ma W, Mosher DF. Dynamic structure of plasma fibronectin [Internet]. Vol. 51, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. Taylor and Francis Ltd; 2016 [cited 2020 Oct 11]. p. 213–27.
57. Clark DA, Coker R. Transforming growth factor-beta (TGF- β). *Int J Biochem Cell Biol*. 1998 Mar 1;30(3):293–8.
58. Borkham-Kamphorst E, Weiskirchen R. Mini review The PDGF system and its

- antagonists in liver fibrosis. 2015 [cited 2020 Oct 11]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.10.002>
59. Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor [Internet]. Vol. 79, *Physiological Reviews*. American Physiological Society; 1999 [cited 2020 Oct 11]. p. 1283–316.
 60. Toda N, Mukoyama M, Yanagita M, Yokoi H. CTGF in kidney fibrosis and glomerulonephritis [Internet]. Vol. 38, *Inflammation and Regeneration*. BioMed Central Ltd.; 2018 [cited 2020 Oct 12].
 61. Sánchez-López E, Rayego S, Rodrigues-Díez R, Rodríguez JS, Rodrigues-Díez R, Rodríguez-Vita J, et al. CTGF promotes inflammatory cell infiltration of the renal interstitium by activating NF- κ B. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2009 Jul [cited 2020 Oct 12];20(7):1513–26.
 62. Riser BL, Denichilo M, Cortes P, Baker C, Grondin JM, Yee J, et al. Regulation of Connective Tissue Growth Factor Activity in Cultured Rat Mesangial Cells and Its Expression in Experimental Diabetic Glomerulosclerosis. 2000.
 63. Ghosh AK, Vaughan DE. PAI-1 in tissue fibrosis [Internet]. Vol. 227, *Journal of Cellular Physiology*. NIH Public Access; 2012 [cited 2020 Oct 12]. p. 493–507.
 64. Balsara RD, Ploplis VA. Plasminogen activator inhibitor-1: The double-edged sword in apoptosis [Internet]. Vol. 100, *Thrombosis and Haemostasis*. NIH Public Access; 2008 [cited 2020 Oct 12]. p. 1029–36.
 65. Zhang H, Liu L, Jiang C, Pan K, Deng J, Wan C. MMP9 protects against LPS-induced inflammation in osteoblasts. *Innate Immun* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2020 Oct 12];26(4):259–69.

66. Niu H, Li F, Wang Q, Ye Z, Chen Q, Lin Y. High expression level of MMP9 is associated with poor prognosis in patients with clear cell renal carcinoma. *PeerJ* [Internet]. 2018 [cited 2020 Oct 12];2018(7).
67. Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2001 [cited 2020 Oct 12];12(9):2730–41.