



Universidad de Valladolid

Máster en Investigación Biomédica

Relación de TLR4 y la autofagia con la enfermedad renal crónica

Memoria del Trabajo de Fin de Máster elaborada por:

Óscar López Llanos

Valladolid, Julio de 2023

Dirigido por:

- Roberto Palacios Ramírez

- Laura Senovilla González

Índice

Introducción	4
1. Enfermedad renal crónica	4
1.1 Causas de la ERC	4
1.2 Fisiopatología	4
1.3 Estado del arte	4
2. TLR4	5
2.1 TLR's	5
2.2 TLR4	5
2.3 Estructura de TLR4	5
2.4 Señalización	6
2.5 TLR4 en la enfermedad	7
3. AUTOFAGÍA	8
3.1 Tipos de autofagia	8
3.2 Formación del autofagosoma	8
3.3 Autofagia en ERC	9
3.4 Autofagia y TLR4	10
4. MICROBIOTA INTESTINAL	10
4.1 Microbiota en ERC	10
Hipótesis y objetivos	12
Materiales y métodos	13
1. Material biológico	13
2. Western blot	14
3. Análisis de la microbiota intestinal	15
4. Cuantificación de ARNm	15
5. Histología	16
Resultados	17
1. Modelo animal	17
2. Estudio de la vía de TLR4	17
2.1 Cuantificación de la expresión de MyD88 e pIRAK4 en tejido renal	17
2.2 Cuantificación de la quimiocina CXCL10 en tejido renal	18
3. Análisis de los niveles de fibrosis en tejido renal	19
4. Estudio de la autofagia	19
4.1 Cuantificación de la expresión de ATG7 en tejido renal	19
4.2 Cuantificación de la expresión de LC3B-I y LC3B-II en tejido renal	21
5. Estudio de daño a ADN en tejido renal	22
6. Análisis de la microbiota intestinal	22
Discusión y conclusiones	24
1. Discusión	24
2. Sumario y conclusiones	25
Bibliografía	26

Abreviaturas

ATG7: Proteína relacionada con la autofagia 7

AP1: Proteína activadora 1

CD14: Cluster de diferenciación 14

CKD: *Chronic kidney disease*

DAMP: Patrón molecular asociado a daño

ERC: Enfermedad renal crónica

FD: *Forward*

INF1: Interferón de tipo 1

IRAK4: Quinasa asociada al receptor de interleucina 1

KO: *Knockout*

LBP: Proteína de unión a LPS

LC3B: Proteína de cadena ligera 3B

LPS: Lipopolisacárido

MAPK: Proteína quinasa activadas por mitógeno

MyD88: Proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88

NF-κB: Factor nuclear potenciador de las cadenas kappa de las células B activadas

PAMP: Patrón molecular asociado a patógeno

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ADN: Ácido desoxirribonucleico

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

RT-(qPCR): Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con retrotranscripción

RV: *Reverse*

TFG: Tasa de filtración glomerular

TIR: Receptor toll de interleucinas

TIRAP: Proteína adaptadora con dominio TIR

TLR4: Receptor de tipo toll 4

TRAM: Molécula adaptadora asociada a TRIF

TRIF: Proteína con dominio TIR inductora de INF-β

Resumen

La enfermedad renal crónica (ERC), es una patología progresiva que compromete la estructura y función de los riñones. Actualmente, constituye la 10ª causa de mortalidad, pero se espera que para el 2040 alcance el 5º puesto por delante de enfermedades como el cáncer de colon o la diabetes. La enfermedad está caracterizada por un ambiente inflamatorio y fibrótico crónicos en el riñón, que comprometen la función del órgano con el paso del tiempo. En este trabajo se estudiará la relación de la ERC con la proteína del sistema inmune innato TLR4, el proceso de la autofagia y la microbiota intestinal, todos ellos propuestos como mecanismos subyacentes de la enfermedad.

Hemos encontrado diferencias entre la expresión de proteínas relacionadas con TLR4 y la autofagia entre ratones sanos y ratones a los que se les ha inducido la ERC. Además, hemos visto ciertas tendencias de disbiosis entre las poblaciones de distintos grupos de microorganismos de la microbiota intestinal. Todos estos hallazgos sugieren que existe una relación entre los tres pilares de nuestro estudio y la enfermedad, y que los tres podrían ser posibles ejes de intervención para mejorar el tratamiento de los pacientes con ERC.

Abstract

The chronic kidney disease (CKD) is a progressive pathology, in which the structure and function of the kidneys are compromised. Currently, CKD is the 10th cause of death but it is expected to reach the 5th position in 2040 before diseases such as colon cancer or diabetes. This disease is characterized by chronic inflammatory and fibrotic environments in the kidney that damage the function of it over time. This work will focus on the study between the link of CKD with the innate immune system protein TLR4, the autophagy mechanisms and microbiota, all of which are proposed as underlying mechanisms of the disease. We found differences in expression of TLR4 and autophagy-associated proteins between Sham and CKD mice. Moreover, we have observed a shift in the bacterial composition of the gut microbiota. Altogether, these findings suggest that there is a link between these three components of the study with CKD. Therefore, the three of them might constitute an intervention to improve the therapy of the CKD patients.

Palabras clave: Enfermedad renal crónica, TLR4, autofagia, microbiota intestinal

Introducción

1. Enfermedad renal crónica

La enfermedad renal crónica es una patología caracterizada por una afectación estructural y funcional en los riñones a lo largo del tiempo, la enfermedad renal crónica se define clásicamente como una reducción de la función renal y conforme va avanzando la enfermedad se va produciendo una disminución en la tasa de filtración glomerular (tabla 1), normalmente medida con valores de filtración o hematuria (Kalantar-Zadeh et al., 2021).

FASE DE LA ENFERMEDAD	TASA DE FILTRACIÓN GLOMERULAR (TFG)
FASE 1 (Leve)	TFG = 60-89 mL/min
FASE 2 (Moderada)	TFG = 30-59 mL/min
FASE 3 (Grave)	TFG = 15-29 mL/min
FASE 4 (Terminal)	TFG < 15 mL/min

Tabla 1. Tasa de filtración glomerular en las distintas fases de la enfermedad renal crónica

La incidencia de la enfermedad está creciendo por todo el mundo y actualmente el 10% de los adultos del planeta están afectados por alguna forma de la ERC, esto resulta en 1.2 millones de muertes al año. Se estima que en el 2040 la ERC será la quinta causa mas común de muerte globalmente (Kalantar-Zadeh et al., 2021).

1.1 Causas de la ERC

La etiología de la enfermedad es variada dependiente de la región del planeta, pero en países desarrollados las causas principales de la ERC son la obesidad, el envejecimiento, y las enfermedades cardiovasculares como la diabetes y la hipertensión (S Levey et al., 2012). Hoy en día es bien conocida la relación entre la hipertensión y la ERC, se sabe que la enfermedad puede ser una causa o una consecuencia de la hipertensión (S Levey et al., 2012).

1.2 Fisiopatología

Las manifestaciones principales de la enfermedad son inflamación y fibrosis renal. La inflamación del órgano es de bajo grado y se mantiene de forma crónica, esto va dañando el riñón con el tiempo y acaba produciendo fibrosis. La fibrosis es un proceso fallido de reparación de heridas provocadas por la inflamación, esta inflamación está causada por la ERC sostenida en el tiempo y está caracterizada por glomeruloesclerosis, atrofia tubular y fibrosis intersticial (C Webster et al., 2017). La acumulación de esta matriz fibrótica va alterando la estructura del riñón, disminuyendo el suministro de sangre y comprometiendo la función del órgano. La fibrosis elimina la capacidad de reparación del tejido y finalmente provoca el fallo renal (D. Humphreys et al., 2018).

1.3 Estado del arte

A día de hoy se conocen algunos mecanismos sobre los que actuar para frenar el avance de la enfermedad como son el control de la glicemia o de la presión arterial (Rovin et al., 2021). Aunque en la bibliografía reciente se han empezado a elucidar nuevas facetas de la enfermedad. Existen trabajos que relacionan el avance de la enfermedad con la proteína TLR4, como es el caso de una investigación del año 2015,

donde se descubrió, que ratones mutantes para TLR4, estaban protegidos frente a la fibrosis renal y a la progresión de la ERC (Souza *et al.*, 2015). En 2019 se publicó una investigación, donde se relacionaba la ERC con la desregulación del proceso de la autofagia (Lin *et al.*, 2019), un proceso fisiológico intracelular de reciclado de proteínas y orgánulos. También hay estudios donde se ha descrito la relación entre disbiosis de la microbiota intestinal y la ERC (Sircana *et al.*, 2019). Todos estos trabajos nos llevan a pensar que estas 3 vías podrían estar estrechamente relacionados, por lo tanto, este trabajo trataremos de comprobar utilizando un modelo animal, si existe relación entre TLR4, la microbiota y la autofagia con la ERC.

2. TLR4

2.1 TLR's

La proteína Toll que fue descubierta en *Drosophila* demostró ser crucial para determinar el patrón dorso-ventral, además de ser una forma temprana del sistema inmune innato (Takeda *et al.*, 2003). En mamíferos encontramos la familia de proteínas *Toll like receptors* (TLR's), en humanos existen 11 TLR's diferentes. Los TLR's se encuentran expresados en células del sistema inmune innato que son estimuladas, entre otras cosas, por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) como bacterias virus y hongos. La interacción de estos PAMPs con los TLR's desencadena la producción de moléculas proinflamatorias, así como la maduración funcional de las células presentadoras de antígenos del sistema inmune innato. Además, los TLR's también pueden activarse al interactuar con patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), los DAMPs son moléculas endógenas que se liberan en situaciones de daño (Chen Lu *et al.*, 2008).

2.2 TLR4

TLR4 pertenece a la familia de las TLR's y se sabe que reacciona ante algunos PAMPs, entre ellos el más estudiado es el lipopolisacárido (LPS), un PAMP característico de las bacterias gram negativas, aunque también puede reaccionar a otros como la proteína de fusión (F) del virus sincitial respiratorio (RSV), o la proteína de la envuelta del virus del tumor mamario de ratón (MMTV) (Chen Lu *et al.*, 2008).

Algunas moléculas endógenas también pueden interactuar directamente con TLR4, como las proteínas de choque térmico (HSPs), el ácido hialurónico, la β -defensina 2 y los proteoglicanos (Nakamura *et al.*, 2022).

2.3 Estructura de TLR4

TLR4 tiene un dominio extracelular compuesto por 22 repeticiones ricas en leucina (LRRs), cuya función es mediar el reconocimiento del LPS y la dimerización del receptor, también presenta un dominio transmembrana y el dominio Toll/IL-1 (TIR) que es esencial para la transducción de la señal *downstream* (Rallabhandi *et al.*, 2006).

El LPS necesita estar unido a la proteína de unión a LPS (LBP). La presencia del correceptor CD14 es clave para el correcto funcionamiento de TLR4 ya que interactúa con LBP (R.R Schumann *et al.*, 1992). para poder activar el complejo TLR4-MD2 (R.R Schumann *et al.*, 1992). Además, TLR4 necesita un correceptor llamado MD2. MD2 está asociado a la parte extracelular del TLR4 y se une directamente al LPS, permitiendo la respuesta de TLR4 al LPS (Ohto *et al.*, 2012).

2.4 Señalización

Cuando se produce la unión del ligando, TLR4 se oligomeriza y recluta todos los adaptadores *downstream*, mediante interacción con los dominios TIR. Los dominios TIR tienen tres regiones altamente conservadas, que se encargan de mediar las interacciones proteína-proteína entre TLR4 y las proteínas adaptadoras (Chen Lu *et al.*, 2008).

El dominio TIR de TLR4 es clave para la transducción de la señal, porque una única mutación en el dominio TIR puede impedir la respuesta al ligando. Existen 5 proteínas adaptadoras que interactúan con TIR: el gen de diferenciación mieloide primario 88 (Myd88), la proteína adaptadora con dominio TIR (TIRAP), la proteína con dominio TIR inductora de INF- β (TRIF), la proteína adaptadora TRAM (molécula adaptadora asociada a TRIF). Cada TLR utiliza diferentes combinaciones de estas proteínas adaptadoras, pero TLR4 es el único TLR conocido que utiliza todos los adaptadores (Chen Lu *et al.*, 2008).

Estudios con ratones deficientes en MyD88 mostraron que los ratones eran resistentes a el choque séptico inducido por LPS, y los macrófagos con Myd88 deficiente no eran capaces de producir citocinas proinflamatorias en respuesta a la estimulación por LPS (Kawai T. *et al.*, 1999).

La señalización de TLR4 se ha dividido en dos partes, la vía dependiente de MyD88 y la vía independiente de MyD88 (dependiente de TRIF). Los estudios en macrófagos deficientes en MyD88, han demostrado que la vía dependiente de MyD88 es la responsable de la producción de citocinas proinflamatorias, mientras que la vía independiente de MyD88 es la encargada de producir interferones de tipo I (INF1) (Figura 1).

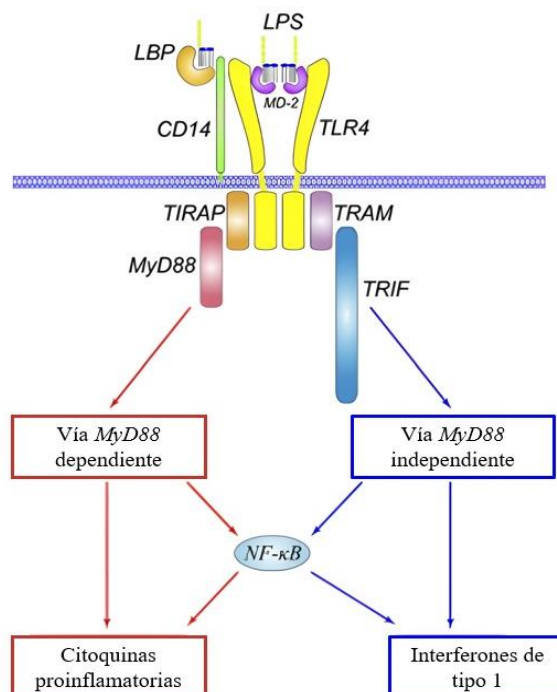


Figura 1. Esquema de las diferentes vías de señalización de TLR4. Imagen adaptada de Lu *et al* (2008)

2.4.1 La vía dependiente de MyD88

MyD88 además de un dominio TIR, tiene un dominio de muerte (DD), esto le permite reclutar otras proteínas que tengan dominios DD. Tras la unión del LPS, MyD88 recluta y activa a la proteína IRAK esta proteína pertenece a la familia IRAK y contiene un dominio DD y un dominio quinasa (Suzuki *et al.*, 2002). Algunos estudios similares a los realizados con los macrófagos KO para MyD88, con IRAK4 demostraron que la deficiencia de IRAK4 otorga resistencia a el choque séptico inducido por LPS (Suzuki *et al.*, 2002). También se han encontrado deficiencias en pacientes con infecciones piogénicas por *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* (Picard *et al.*, 2003). Todas estas evidencias sugieren que IRAK4 es clave para la transducción de la señal tras la activación de TLR4.

Otra proteína adaptadora de la vía dependiente de Myd88 es TRAF6, esta forma un complejo con UBC13 y UEV1A, esto provoca la activación de TAK1. TAK1 activará *downstream* a las vías de IKK y MAPK. La activación de IKK provoca la fosforilación de I κ B, esta fosforilación provocará la degradación de I κ B y la consecuente translocación de el factor de transcripción NF- κ B, que controla la expresión de citocinas proinflamatorias y otros genes relacionados con la inmunidad como quimiocinas (Lu *et al.*, 2008).

La activación de la vía de las MAPK implica la activación del factor de transcripción proteína Activadora-1 (AP-1), que también activa la expresión de citocinas proinflamatorias (Chang *et al.*, 2001).

2.4.2 La vía independiente de MyD88

En esta vía juega un papel importante el adaptador TRIF, ya que, se encarga de activar el factor de transcripción IRF3, este factor es responsable de la producción de interferones de tipo I (IFN-I), importantes en la respuesta inmune frente a virus. TRIF también juega un papel clave en la activación tardía de NF- κ B y las MAPK, esto lo hace interactuando a la proteína RIP1, que es capaz de interactuar con NF- κ B y las MAPK (Chen Lu *et al.*, 2008).

2.5 TLR4 en la enfermedad

El papel subyacente de TLR4 en algunas enfermedades crónicas inflamatorias, ha sido objeto de investigación por muchos autores en los últimos años. Estudios con un modelo de ratas hipertensas, demostraron que existía una hiperactivación de TLR4 en los animales. Se demostró que esta activación de la vía de TLR4 estaba contribuyendo al desarrollo y mantenimiento de la enfermedad induciendo estrés oxidativo y provocando la disfunción endotelial característica de la hipertensión (R. De Batista *et al.*, 2014).

Un estudio en infección crónica del virus de la hepatitis C demostró que la activación de TLR4 estaba contribuyendo a la fibrosis en el hígado, y se demostró que ratones KO para TLR4 no presentaban alteraciones en la regeneración del hígado (Seki *et al.*, 2007).

Otro estudio reveló que, en fibrosis pulmonar, TLR4 se encontraba sobreactivado por distintos DAMPS, lo cual resultaba en la producción de citocinas proinflamatorias. Los DAMPS provocaban la reprogramación de los macrófagos residentes en un fenotipo proinflamatorio y profibrótico dependiente de TLR4 (Bolourani *et al.*, 2021).

Todos estos estudios nos llevan a pensar, que el receptor TLR4 podría estar sobreactivado en la ERC, y esta sobreactivación podría estar provocando un aumento de la fibrosis y por lo tanto contribuyendo al desarrollo y mantenimiento de la enfermedad.

3. AUTOFAGÍA

La autofagia es el principal proceso intracelular de degradación y reciclado de proteínas y orgánulos. Al igual que la apoptosis y la muerte celular programada, la autofagia es esencial para el crecimiento, regulación y el mantenimiento de la homeostasis celular y la respuesta a estrés. Mientras que la mayoría de las proteínas con vida media corta son degradadas por el complejo ubiquitin-proteosoma, las proteínas de vida media larga y los orgánulos son reciclados a través del proceso de la autofagia (Kelekar., 2006).

3.1 Tipos de autofagia

Existen tres formas principales de autofagia descritas en células de mamíferos: la macroautofagia, la microautofagia y la autofagia mediada por chaperonas. La microautofagia y la macroautofagia son mecanismos altamente conservados desde las levaduras hasta los mamíferos, mientras que la autofagia mediada por chaperonas es exclusiva de los organismos mamíferos (Kelekar., 2006).

En el mecanismo de microautofagia se produce un hundimiento de citoplasma en la superficie del lisosoma por protusión, invaginación y otras deformaciones de la membrana lisosomal. En el caso de la macroautofagia se produce una degradación de proteínas citoplasmáticas grandes y orgánulos como las mitocondrias o retículo endoplásmico dañado en el lisosoma. En la autofagia mediada por chaperonas se forman complejos entre las proteínas citosólicas que se van a degradar y las chaperonas, que interactúan con un receptor de la membrana lisosomal para que se internalicen las proteínas al lisosoma (Kelekar., 2006).

3.2 Formación del autofagosoma

La formación del autofagosoma se produce en tres fases dependientes de ATP llamadas: iniciación, ejecución y maduración. El proceso comienza con la formación de una membrana o fagóforo con forma de luna creciente que secuestra el citoplasma y orgánulos. El fagóforo se ira expandiendo y finalmente se cerrará dando lugar al autofagosoma. La maduración de estas vesículas implica la fusión con los endosomas y/o con los lisosomas y finaliza con la liberación de los elementos secuestrados para su degradación y reciclaje por enzimas catabólicas en el lumen del autolisosoma. El paso de fusión con el endosoma provee al autofagosoma inmaduro de factores que le permitirán fusionarse con el lisoma (Kelekar., 2006).

Existen multitud de proteínas implicadas en todo este proceso de maduración del autofagosoma. La proteína Atg12 esta unida covalentemente con la proteína Atg5 durante el proceso de iniciación. Este complejo Atg12-Atg5 se comporta como una única molécula y se asociará no covalentemente con Atg16L. El complejo completo de unos 800kDa se encuentra asociado a la membrana durante todo el proceso de elongación. La proteína MAP LC3 (Atg8), también se localiza en la membrana hasta que se forme el autofagosoma maduro, a diferencia del complejo Atg5-Atg12-Atg16, que se disociará antes de que se complete su formación (Kelekar., 2006).

LC3 es postranscripcionalmente modificada a LC3-I y posteriormente a LC3-II en una serie de pasos que comienzan con la unión de LC3 a Atg4 seguido por una serie de reacciones de ubiquitinación que siguen con las uniones de Atg7 y Atg3, para finalizar con una lipidación con fosfatidiletanolamina (LC3-II). Las proteínas LC3 modificadas son exclusivas de los autofagosomas y son necesarias para la fusión con el lisosoma (Kelekar., 2006).

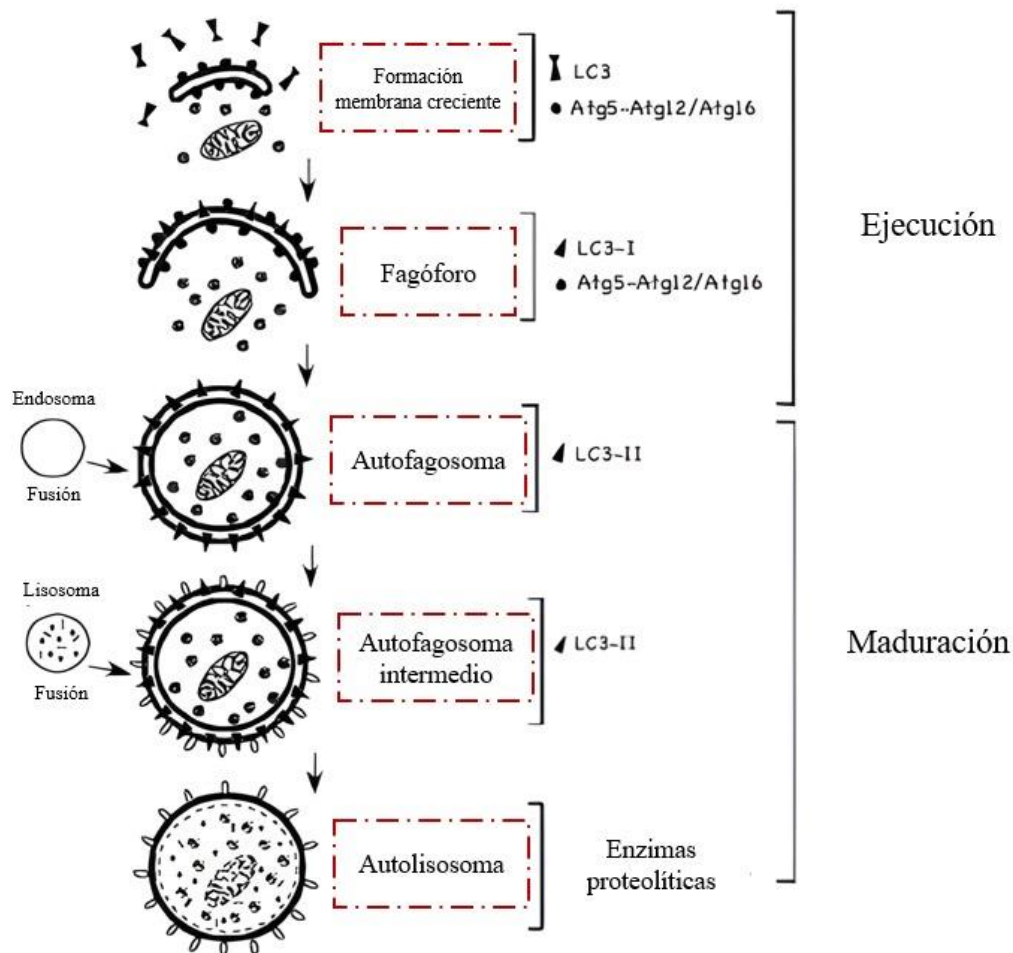


Figura 2. Esquema de las distintas fases del proceso de formación del autofagosoma. Imagen adaptada de Kelekar *et al* (2006)

3.3 Autofagia en ERC

Actualmente se sabe que bastantes enfermedades humanas están asociadas con la disregulación de la autofagia. Los pacientes con ERC tienen elevados niveles de estrés oxidativo y producción de radicales libres de oxígeno, además de una alteración de la homeostasis corporal, agregación proteica e inflamación. La autofagia es esencial en el mantenimiento de la homeostasis corporal y el reciclado de las proteínas. La activación de la autofagia es clave en respuestas inflamatorias y los datos clínicos muestran que los pacientes con ERC tienen alteradas las respuestas autofágicas (Chen *et al.*, 2013).

Las proteínas LC3 están involucradas en la formación del fagóforo y se consideran como marcadores de la actividad autofágica en los pacientes, midiendo incrementos de su síntesis o de su lipidación como reflejo de un aumento de la formación de autofagosomas (Klionsky *et al.*, 2016). El método más utilizado como indicador del nivel de autofagia es la relación LC3-II/LC3-I (Lin *et al.*, 2019). °

En este trabajo analizaremos los principales marcadores de autofagia para tratar de determinar si existen desregulaciones del mecanismo durante la ERC.

3.4 Autofagia y TLR4

Actualmente sabemos que existe una relación entre la autofagia y el sistema inmune. El proceso de autofagia ayuda a disminuir el daño en el tejido renal provocado por los procesos inflamatorios característicos de la ERC e incluso se ha visto que el proceso contribuye a evitar el desarrollo de glomeruloesclerosis en ratones ancianos (Hartleben B *et al.*, 2010). En cuanto a la relación de TLR4 y la autofagia, se sabe que el receptor puede activar la autofagia mediante sus ligandos clásicos en riñón (JS Leventhal *et al.*, 2018). En este trabajo analizaremos los principales marcadores de autofagia para tratar de determinar si existen desregulaciones del mecanismo durante la ERC y si TLR4 participa en esta desregulación.

4. MICROBIOTA INTESTINAL

La microbiota intestinal humana está formada por unos 100×10^{18} microorganismos y tiene aproximadamente 100 veces más genes que nuestro genoma (Sekirov *et al.*, 2010). Los microorganismos que habitan el intestino humano co-existen en el mismo hábitat y forman un complejo ecosistema. Los estudios moleculares y genéticos han mostrado que existen comunidades complejas que interactúan entre sí (Sekirov *et al.*, 2010).

Una disbiosis se define como la alteración de la composición de la microbiota humana en un lugar concreto del organismo. Esta alteración se ha asociado con el desarrollo de algunos tipos de enfermedades como: enfermedades cardiovasculares, trastornos metabólicos, ERC y enfermedades neurológicas (A. Sircana *et al.*, 2019).

4.1 Microbiota en ERC

Varios autores han descrito cambios en la composición de la microbiota intestinal en pacientes y animales con ERC avanzada. Estos estudios han mostrado disminuciones en la relación *Firmicutes/Bacteroidetes* (Hamdi *et al.*, 2019). Además, los experimentos de caracterización de microbiota con enfermos de CKD, han mostrado que la enfermedad está caracterizada con un decremento de las poblaciones de *Bifidobacterium*, *Lactobacillaceae*, *Bacteroidacea* y *Prevotellaceae* (A. Sircana *et al.*, 2019).

La pérdida de función renal en la ERC causa alteraciones en la concentración sanguínea de varias sustancias. La urea se produce gracias al ciclo de la urea utilizando aminoácidos endógenos y de la dieta, el catabolismo de los aminoácidos en los tejidos periféricos da como resultado la urea. Generalmente el 80% de la urea se elimina por la orina y el 20% vía gastrointestinal. Los mamíferos no podemos metabolizar la urea, pero nuestras bacterias intestinales la convierten en amoníaco (NH_3) y dióxido de carbono (CO_2) gracias a la enzima ureasa.

Wikoff *et al* demostraron en el 2009 que la presencia de varias toxinas urémicas, como el indoxil-sulfato (IS), son dependientes de la composición microbiana y de dietas pobres en fibra, que pueden llevar a disbiosis y acumulación de grandes cantidades de estas toxinas urémicas (A. Sircana *et al.*, 2019).

El sistema gastrointestinal representa una barrera que aísla la sangre de compuestos potencialmente tóxicos que se encuentran en el intestino. En la ERC, se producen cambios histológicos en la barrera intestinal entre los que destacan: reducción de la

longitud de las vellosidades intestinales, alteración de las criptas e inflamación de la lámina propia (A. Sircana *et al.*, 2019). El amoníaco producido provoca rupturas de las *tight junctions* del epitelio intestinal, causando aumentos de la permeabilidad y contribuyendo a la endotoxemia e inflamación sistémica (A. Sircana *et al.*, 2019).

La disminución de las poblaciones de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* permite el sobrecrecimiento de otras especies microbianas y la traslocación desde el intestino al resto del organismo de microorganismos patogénicos (WR Wikoff *et al.*, 2009).

La traslocación de bacterias y de endotoxinas como el LPS puede activar TLR4, aumentando la producción de citocinas proinflamatorias a través de la vía de NF- κ B, produciendo una inflamación crónica, que además contribuye a un ambiente profibrótico. Todos estos procesos podrían estar facilitando la progresión de la ERC y estudiarlos podría ser una pieza clave para frenar el desarrollo de la enfermedad.

Hipótesis y objetivos

Frenar el avance de la ERC es clave a la hora de mejorar la calidad de vida de los pacientes y para ello tenemos que entender bien todos los mecanismos subyacentes a la enfermedad. Se sabe que procesos como la activación de TLR4, la autofagia o las disbiosis microbianas, pueden estar ligados a la ERC.

Así, proponemos que debido a la ERC se producen acumulaciones de desechos metabólicos que se filtran a la luz intestinal desde el torrente sanguíneo, estos desechos metabólicos pueden ser utilizados por las bacterias de la microbiota haciendo que proliferen unos tipos de bacterias por encima de otros y cambiando así su composición. Esta disbiosis puede producir una alteración de la permeabilidad intestinal, que permitiría el paso de componentes bacterianos como el LPS, que podrían estar sobreactivando TLR4, resultando en un aumento de la producción de citocinas proinflamatorias, autofagia y generando un ambiente profibrótico. El conjunto de todos estos mecanismos podría estar contribuyendo al desarrollo y empeoramiento de la ERC (Figura 3).

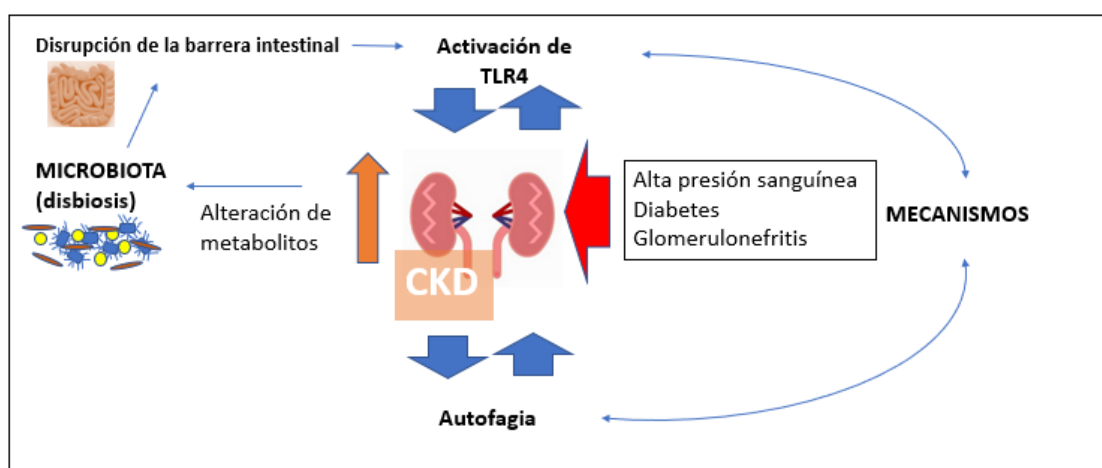


Figura 3. Hipótesis de trabajo

Por lo tanto, el objetivo principal de este trabajo es estudiar la relación entre TLR4, la autofagia, y la microbiota intestinal en la ERC. Para ello nos hemos planteado una serie de objetivos concretos:

- Comprobar si existe una sobreactivación de TLR4 en ratones con ERC mediante técnicas de biología molecular.
- Estudiar el proceso de autofagia en los ratones con ERC, y comprobar si existen disregulaciones del proceso en los animales enfermos.
- Realizar un estudio de los principales grupos taxonómicos microbianos relacionados con la ERC, y ver si existen disbiosis.

Materiales y métodos

1. Material biológico

Para llevar a cabo este trabajo se han utilizado ratones C57BL6/j, hembras de 6 a 8 semanas, alojados en el animalario de la facultad de medicina de la universidad de Valladolid, donde se mantuvieron bajo las normas institucionales establecidas (temperatura constante, ciclo de luz y oscuridad de 12h y dieta *ad libitum*). Para inducir la enfermedad renal crónica en los animales se ha realizado una nefrectomía parcial de 2/3 del riñón izquierdo de los ratones, tras 10 días se realiza una nefrectomía total del riñón derecho de los ratones (n=5). Los ratones control (Sham) fueron sometidos a dos operaciones los mismos días que los ratones CKD, en ambas operaciones se expuso el riñón de los ratones en el exterior, durante el mismo tiempo que duraba la operación de los ratones con CKD pero volviéndolo a colocar en su lugar sin producirle ningún daño (n=6).

Para inducir la enfermedad renal crónica en los animales se realizó una nefrectomía de 5/6. Todas las operaciones se realizaron con los animales anestesiados con inyecciones de ketamina/xilacina (100mg/kg) y sobre una manta térmica a 37°. Durante la primera operación el riñón izquierdo fue expuesto al exterior y pinzado, mientras tanto, las porciones superior e inferior del riñón fueron atadas con hilo de sutura de ácido poliglicólico y se cortaron, posteriormente se aplicó una gasa hemostática (Surgicel, Jonhson & Jonhson, New Jersey, USA) previo a la liberación del pinzado, para evitar hemorragias. En la segunda operación se pinzó el riñón completo y se eliminó tras el anudado de uréteres, arteria y vena renal, para posteriormente coser a los animales.

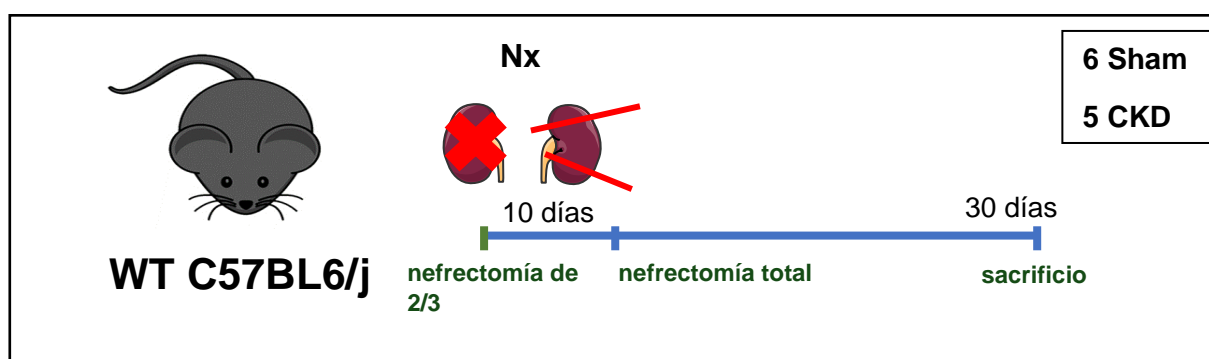


Figura 4. Esquema del modelo animal utilizado para inducir enfermedad renal crónica en ratones hembras de 6 a 8 semanas de edad

Todos los animales fueron sacrificados 1 mes después de la segunda operación mediante extracción del corazón tras anestesiarse. Todos los experimentos se realizaron siguiendo la legislación española y europea (RD 223/88 MAPA y 609/86).

El día previo al del sacrificio se recolectaron orina y heces de todos los ratones, además se extrajo sangre de todos los animales mediante punción cardiaca. Para los estudios histológicos y moleculares se extrajo el riñón de todos los animales, también se extrajeron muestras de colon de todos los ratones. Una parte de los tejidos se almacenó en formol mientras que la otra fue guardada en microtubos y almacenados a -80° hasta su utilización.

2. Western blot

Para los estudios de expresión proteica se realizó la técnica de Western Blot con lisados de tejido renal. Los lisados se realizaron colocando entre 20 y 30 mg de tejido renal con 300 microlitros de Buffer de lisis (NP-40 lysis buffer; Thermo scientific, Kandel, Alemania) previamente mezclado con un inhibidor de proteasas y fosfatasas (Thermo scientific), en un homogeneizador de Douncer. El tejido se destruyó por acción mecánica. Después se transfirió a microtubos y se dejó lisar durante 2 horas a 4°. A continuación, se centrifugaron las muestras durante 10 min a 12000xg en una centrifuga (Thermo scientific, Sorvall Legends Micro 17R centrifuge). La cuantificación proteica se realizó con el reactivo de Lowry y se midió su absorbancia a 562 nm en un espectrofotómetro (Molecular Devices, SpectraMax ABS, San Jose, USA)

La concentración de las muestras fue estimada mediante la interpolación de los valores de absorbancia en una recta patrón construida a partir de diluciones de albúmina de suero bovino de concentración conocida. Se prepararon las muestras para cargar la misma cantidad de proteína en todos los pocillos, añadiendo tampón Bolt™ LDS Sample Buffer 4x (Invitrogen, Carlsbad, Canada). La mezcla de buffer y proteínas se incubó 2 minutos a 99° para desnaturalizar las proteínas.

Se utilizó un sistema de electroforesis (Invitrogen, Mini Gel Tank) se utilizaron geles comerciales de poliacrilamida (Invitrogen, Bolt™ 4-12% Bis-Tris Plus) y se cargó en cada pocillo el volumen adecuado de proteína, para tener la misma concentración, unos 25 µg de proteína en cada uno de los pocillos, como control de carga se utilizó el SeeBlue™ Plus2 Prestained Standard (Invitrogen). La electroforesis se realizó a 90V durante 15 minutos y 120V durante 90 minutos.

Para realizar las transferencias se utilizaron membranas iBlot® 2NC Regular Stacks (Invitrogen), la transferencia se realizó en un sistema de transferencia de geles iBlot™2 (Invitrogen) durante 7 minutos.

Una vez completada la transferencia, se tiñeron las membranas con el reactivo de Ponceau S (LanKem, Ponceau S red solution, Barcelona, España) para comprobar que la transferencia se había completado correctamente, se tomaron imágenes de las membranas teñidas con Ponceau en el sistema VersaDoc (Bio-rad, Hercules, California, USA), para posteriormente poder normalizar el resultado de los experimentos. A continuación, se bloquearon las membranas en leche desnatada al 5% disuelta en solución salina tamponada con Tris (TBS)- Tween 20 (0,05%) durante 1h con el fin de evitar las uniones inespecíficas de anticuerpos.

Los anticuerpos primarios para colágeno I, fosfo-ATM, fosfo-IRAK4 y LC3B se utilizaron a una dilución 1:500. Todos los anticuerpos primarios se incubaron durante la noche a 4°C, tras las incubaciones con los anticuerpos primarios se realizaron 3 lavados con T-TBS de 10 minutos cada uno. A continuación, se incubaron los anticuerpos secundarios (Anti-ratón 1: 5000, anticuerpo monoclonal de cabra, Southern Biotech, Birmingham, USA y Anti-conejo 1:5000, anticuerpo monoclonal de cabra, Southern Biotech) durante 60 min a temperatura ambiente, posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con T-TBS.

Para el revelado de las membranas se utilizó un sistema VersaDoc (Bio-rad) y el reactivo de revelado (Thermo scientific, SuperSignal® West Pico Plus Chemiluminescent Substrate). Las imágenes obtenidas se analizaron con el software de uso libre ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

3. Análisis de la microbiota intestinal

Para realizar los estudios de microbiota de los animales se utilizaron las heces recolectadas de los animales. El material genético fue extraído de las heces utilizando el kit PowerFecal® Pro DNA Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania). El ADN se cuantificó en un sistema NanoDrop (Thermo scientific, NanoDrop 2000c), que determina su absorbancia a 260 nm, también se midieron las absorbancias a 230 y 280 nm para determinar las relaciones obtenidas entre 260 y 280 nm y 260 junto con 230 nm para comprobar que están dentro de los rangos de calidad recomendables. Posteriormente se calculó el volumen necesario de ADN para la concentración que se quería utilizar. Las diluciones necesarias se realizaron con agua libre de nucleasas (Thermo scientific, nuclease free water).

El análisis de la microbiota se realizó mediante qPCR, en una placa de 96 pocillos. Se usaron 5 ng de ADN con primers diseñados específicamente para amplificar zonas conservadas o variables del ADN 16S bacteriano (detallados en la tabla 2) La PCR se realizó usando una master mix de (PowerTrack SYBR Green Master Mix, Thermo Fisher scientific) en un termociclador (Roche Diagnostics, LightCycler® 480 System, Rotkreuz, Switzerland) durante 30 segundos 95° C y 40 ciclos (15 segundos a 95° C, 1 min a 60° C). Los resultados fueron normalizados con la PCR de la zona conservada del ADN 16S y se expresó como incremento sobre grupo control (Sham).

BACTERIAS	SECUENCIA
Eubacteria Fd	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
Eubacteria Rv	ATTACCGCGGCTGCTGGC
Firmicutes Fd	GCTGCTAATACCGCATGATATGTC
Firmicutes Rv	CAGACGCGAGCTCATCTCAGA
All Bacteria Fd	CGGTGAATACGTTCCCGG
All Bacteria Rv	TACGGCTACCTTGTTACGACTT
Bacterioidetes Fd	CRAAACAGGATTAGATACCCT
Bacterioidetes Rv	GGTAAGGTTCTCGCGTAT
Bacterioide Fd	GAGAGGAAGGTCCCCAC
Bacterioide Rv	CGCTACTTGGCTGGTTCAG

Tabla 2. Cebadores utilizados en el análisis de la microbiota de los ratones. Fd= cebador forward, Rv= cebador reverse

4. Cuantificación de ARNm

Los niveles de ARNm de los distintos genes a estudiar se midieron con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). El ARN se extrajo del tejido de riñón utilizando el kit RNeasy® Plus Mini Kit (QIAGEN), a continuación, se cuantificó utilizando un sistema NanoDrop de forma análoga a como se hizo para el ADN fecal, pero, en este caso, configurando el aparato para medir ARN.

Una vez cuantificado se realizó la retrotranscripción de RNA utilizando el kit NZY First-Strand cDNA Synthesis (NZYTECH, Lisboa, Portugal) siguiendo las indicaciones del fabricante: 10' a 25°, 30 minutos a 50° para las indicaciones del fabricante: 10' a 25°, 30 minutos a 50° para la retrotranscripción y 5 minutos a 85° para inactivar la reacción en un Thermo scientific Drybath Std 200-240V. Todas las diluciones necesarias se realizaron con agua libre de nucleasas. Una vez obtenido el DNA se preparó la

reacción de qPCR añadiendo los primers adecuados según el gen a estudiar (tabla 3) y se agregó la master mix. Los resultados fueron normalizados con la qPCR del gen HPRT

GEN DIANA	SECUENCIA
MyD88 Fd	TCCGGCAACTAGAACAGACAGACT
MyD88 Rv	GCGGCGACACCTTTTCTCAAT
CXCL10 Fd	ATGACGGGCCAGTGAGAATG
CXCL10 Rv	CCGGATTCAGACATCTCTGCTCAT
ATG7 Fd	TGATGATCTGTGTGCGAGCCG
ATG7 Rv	ATCCAGGGTACTGGGCTAGG
HPRT Fd	CTC AAC TTT AAC TGG AAA GAA TGT C
HPRT Rv	TCC TTT TCA CCA GCA AGC T

Tabla 3. Cebadores utilizados en la cuantificación del ARNm de tejido renal; gen diana y secuencia. Fd= cebador forward, Rv= cebador reverse

5. Histología

Para hacer un estudio de los niveles de fibrosis, realizamos la tinción tricrómico de Masson, que permite ver el colágeno en los tejidos. Para ello incluimos tejido renal, previamente fijado en formalina, en parafina e hicimos secciones de 5 μ m en un microtomo. Una vez realizados los cortes, se procedió a realizar la tinción siguiendo el protocolo que describieron Suvik *et al* en 2012. Una vez teñidos los cortes, se prepararon en portaobjetos y se visualizaron con un microscopio de fluorescencia (Nikon 90i).

6. Estadística

Los resultados se expresan como el valor promedio \pm error estándar (ES). n hace referencia al número de animales utilizados. El análisis estadístico que se ha llevado a cabo fue el test no paramétrico Mann Whitney. Los valores se consideraron significativos cuando el valor p es menor de 0.05 ($p < 0,05$).

Resultados

1. Modelo animal

Previamente al sacrificio, los animales fueron pesados y una vez sacrificados se obtuvo el peso de los riñones. No observamos diferencias significativas entre el peso de los ratones enfermos y sanos, ni tampoco en el peso de sus riñones (figura 5a, 5b)

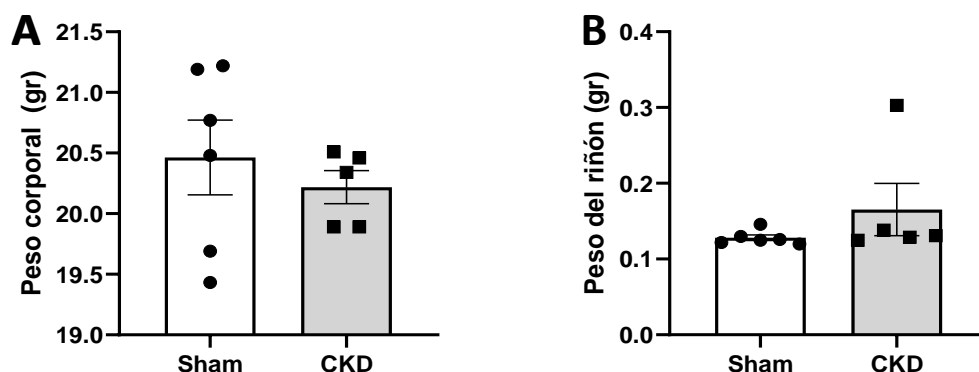


Figura 5. A: Peso de los corporales de los ratones en gramos el día de su sacrificio. B: Peso del riñón de los ratones en gramos el día de su sacrificio. Las barras de error representan el error estándar. n= 5-6.

2. Estudio de la vía de TLR4

Como se indicó en la introducción de este trabajo, se ha descrito el papel subyacente de TLR4 en algunas enfermedades crónicas inflamatorias. Para determinar si TLR4 podría estar sobreactivado en los ratones CKD, decidimos analizar los niveles de expresión de algunas proteínas pertenecientes a la vía de señalización de TLR4. Para ello utilizamos western blot y RT-qPCR.

2.1 Cuantificación de la expresión de MyD88 e pIRAK4 en tejido renal

Para cuantificar la expresión de MyD88 en los ratones CKD y los ratones SHAM se utilizó RT-qPCR, observando la figura 6, podemos observar diferencias significativas de la expresión de MyD88 entre los dos grupos de animales. Se observa que existe una mayor expresión mRNA de MyD88 en los ratones CKD.

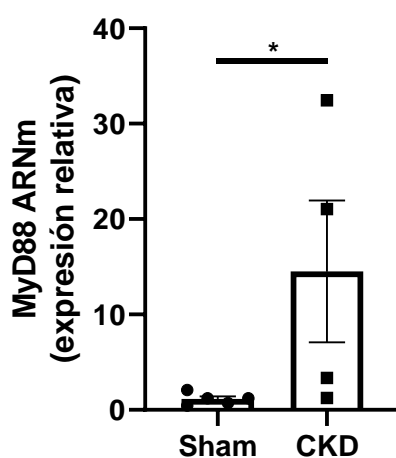


Figura 6. Cuantificación de la expresión relativa de mRNA de MyD88 mediante RT-qPCR. Los resultados (media \pm ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en situación control (Sham). * = $p < 0,05$ vs Sham, mediante Mann Whitney. n= 4-5.

En el caso de pIRAK4, la forma activa de IRAK4, se utilizó western blot para cuantificar su expresión. Como se puede apreciar en la figura 7, existe un aumento de la expresión de pIRAK4 en los ratones CKD comparando con los ratones Sham.

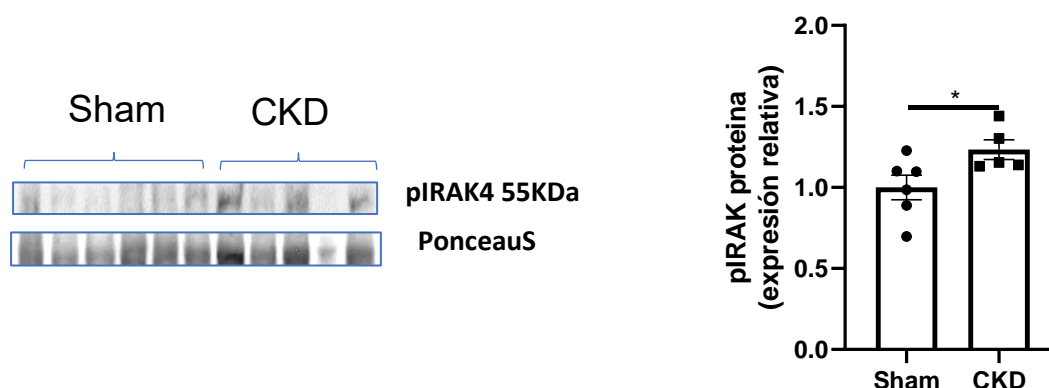


Figura 7. Cuantificación de la expresión de pIRAK4 mediante western blot. Sobre los histogramas de expresión proteica se muestran blots representativos. Las barras de error representan el error estándar. * = $p < 0,05$ vs Sham, mediante Mann Whitney. $n = 5-6$

2.2 Cuantificación de la quimiocina CXCL10 en tejido renal

Para comprobar que la vía independiente de MyD88 estaba siendo también activada, comprobamos la expresión de la quimiocina CXCL10, que se produce como resultado de la activación de esta vía. Para ello, realizamos una RT-qPCR y, como se puede apreciar en la figura 8, se produce un incremento significativo de la expresión de la proteína en los ratones enfermos respecto a los sanos.

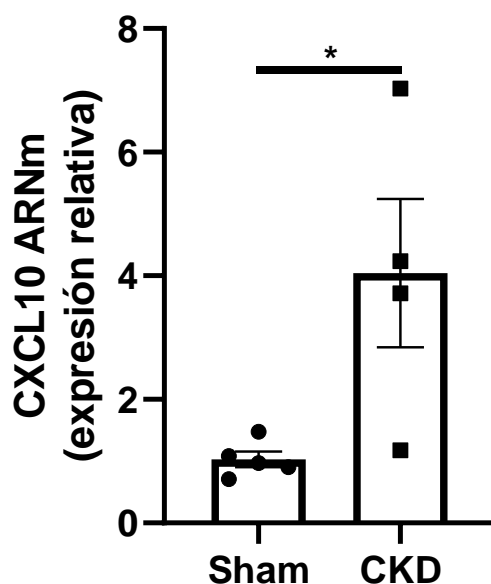


Figura 8. Cuantificación de la expresión relativa de mRNA de CXCL10 mediante RT-qPCR. Los resultados (media \pm ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en situación control (Sham). * $p < 0,05$ vs Sham, mediante Mann Whitney. $n = 4-5$.

3. Análisis de los niveles de fibrosis en tejido renal

Decidimos analizar los niveles de colágeno de tipo I en el tejido renal mediante western blot, al hacerlo observamos que el colágeno estaba significativamente aumentado en los ratones CKD respecto a los ratones Sham (figura 9a), esto nos confirmó que los niveles de fibrosis en el tejido renal enfermo eran muy superiores a los de los ratones sanos, estos resultados concuerdan con lo esperado ya que la activación de TLR4 y la fibrosis son procesos que están muy estrechamente relacionados. Para completar el estudio molecular hicimos una tinción con tricrómico de Masson en la que se puede apreciar mayor intensidad de azul (correspondiente al colágeno) en los ratones CKD respecto a los Sham (figura 9b).

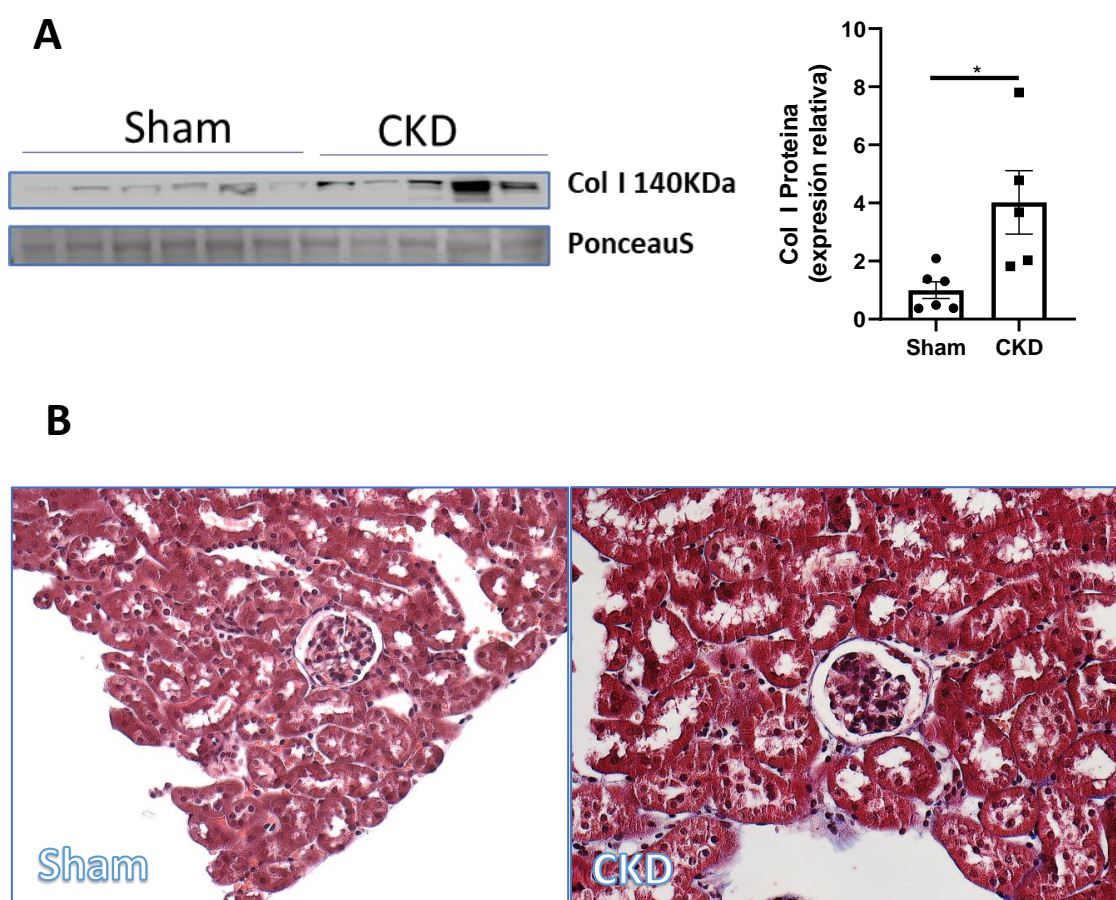


Figura 9. A: Cuantificación de la expresión de colágeno I mediante western blot. Sobre los histogramas de expresión proteica se muestran blots representativos. Las barras de error representan el error estándar. $*=p<0,05$ vs Sham, mediante Mann Whitney. $n=5-6$. B: Tricrómico de Masson de tejido renal.

4. Estudio de la autofagia

El siguiente paso del trabajo fue comprobar si existían alteraciones en el proceso de la autofagia en los ratones enfermos respecto a los sanos. Para ello decidimos analizar la expresión de las proteínas LC3 y ATG7, que como se resume en la introducción de este trabajo, se consideran buenos marcadores de autofagia.

4.1 Cuantificación de la expresión de ATG7 en tejido renal

En el caso de la proteína ATG7 analizamos su expresión mediante RT-qPCR. En la figura 10 se puede apreciar que, si bien no hay diferencias significativas entre ratones

CKD y ratones Sham, la proteína presenta mayores niveles de expresión en los ratones CKD.

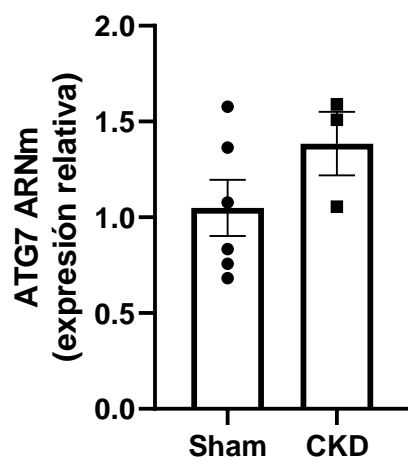


Figura 10. Cuantificación de la expresión relativa de mRNA de ATG7 mediante RT-qPCR. Los resultados (media \pm ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en situación control (Sham). n= 3-6.

4.2 Cuantificación de la expresión de LC3B-I y LC3B-II en tejido renal

En cuanto a las proteínas LC3B-I y LC3B-II, cuantificamos su expresión mediante western blot, al observar la figura 11, podemos apreciar dos bandas, la superior corresponde a LC3B-I, mientras que la inferior es la banda que corresponde a LC3B-II. Al hacer la relación entre LC3B-II y LC3B-I, podemos ver que existen diferencias significativas entre los ratones CKD y los ratones Sham, podemos concluir en que los niveles de autofagia se encuentran aumentados en los ratones CKD (Figura 11).

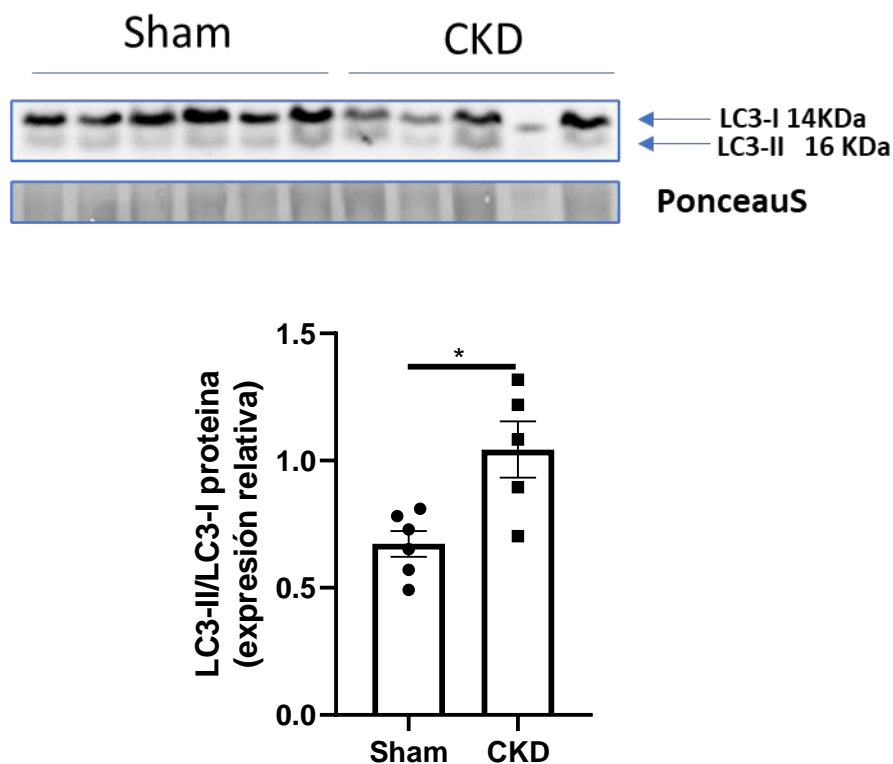


Figura 11. A: Cuantificación de la expresión de LC3B-I/II mediante western blot. Sobre los histogramas de expresión proteica se muestran blots representativos. B: Relación entre la expresión de LC3B-II/LC3B-I. Las barras de error representan el error estándar. $*=p<0,05$ vs Sham, mediante Mann Whitney. $n=5-6$.

5. Estudio de daño a ADN en tejido renal

A continuación, decidimos analizar algún marcador de daño a ADN, debido a que en situaciones de inflamación crónica como es la ERC, se pueden llegar a producir compuestos dañinos para el ADN tales como especies reactivas de oxígeno. Decidimos analizar mediante western blot la proteína pATM, ampliamente descrita como marcador de daño al ADN. Descubrimos que los niveles de pATM eran significativamente superiores en los ratones CKD respecto a los ratones Sham (figura 12). Pudiendo indicar estos hallazgos que el ADN del tejido renal de los ratones enfermos presenta daños.

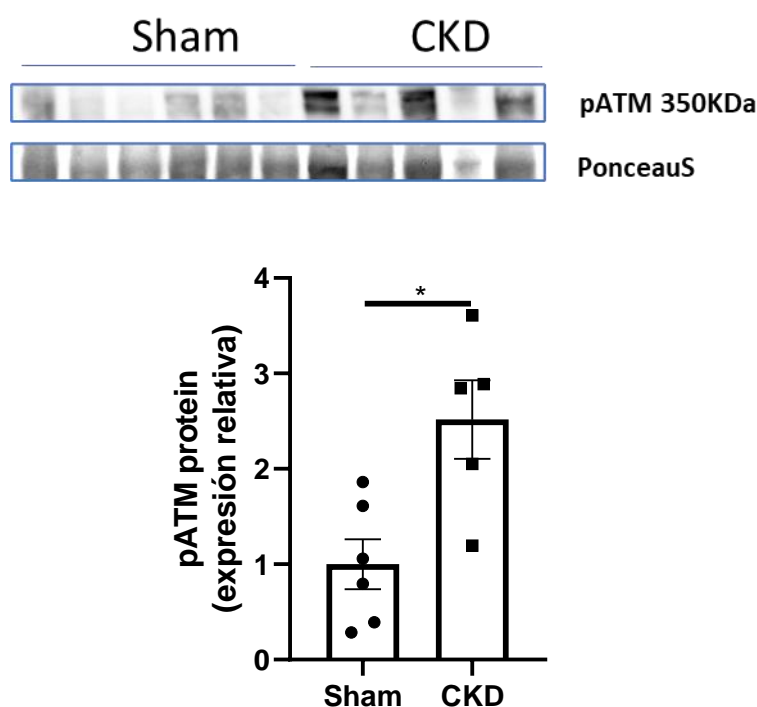


Figura 12. Cuantificación de la expresión de pATM mediante western blot. Sobre los histogramas de expresión proteica se muestran blots representativos. Las barras de error representan el error estándar. * = $p < 0,05$ vs Sham, mediante Mann Whitney. $n = 5-6$.

6. Análisis de la microbiota intestinal

Como se ha mencionado anteriormente, en la enfermedad renal crónica se produce disbiosis, que puede comprometer la integridad de la barrera intestinal y por diferentes mecanismos, contribuyendo al empeoramiento de la ERC.

Es por esto que decidimos realizar cuantificaciones de distintos grupos taxonómicos del microbiota intestinal y comparar entre ratones sanos y ratones CKD, para estudiar si podían estar produciéndose esta disbiosis. Para ello analizamos el ADN de las heces de los ratones mediante qPCR.

Pudimos observar que pese a no apreciar diferencias significativas entre Sham y CKD, existe tendencia a la disminución del filo *Bacteroidetes* (figura 13a) así como una disminución de los géneros *Bifidobacterium* (figura 13d), y *Bacterioides* (figura 13e), en los ratones CKD. También parece haber un aumento del Filo *Firmicutes* en los ratones CKD (figura 13b). La relación *Bacteroidetes/firmicutes* parece estar ligeramente aumentada en los ratones CKD (figura 13c).

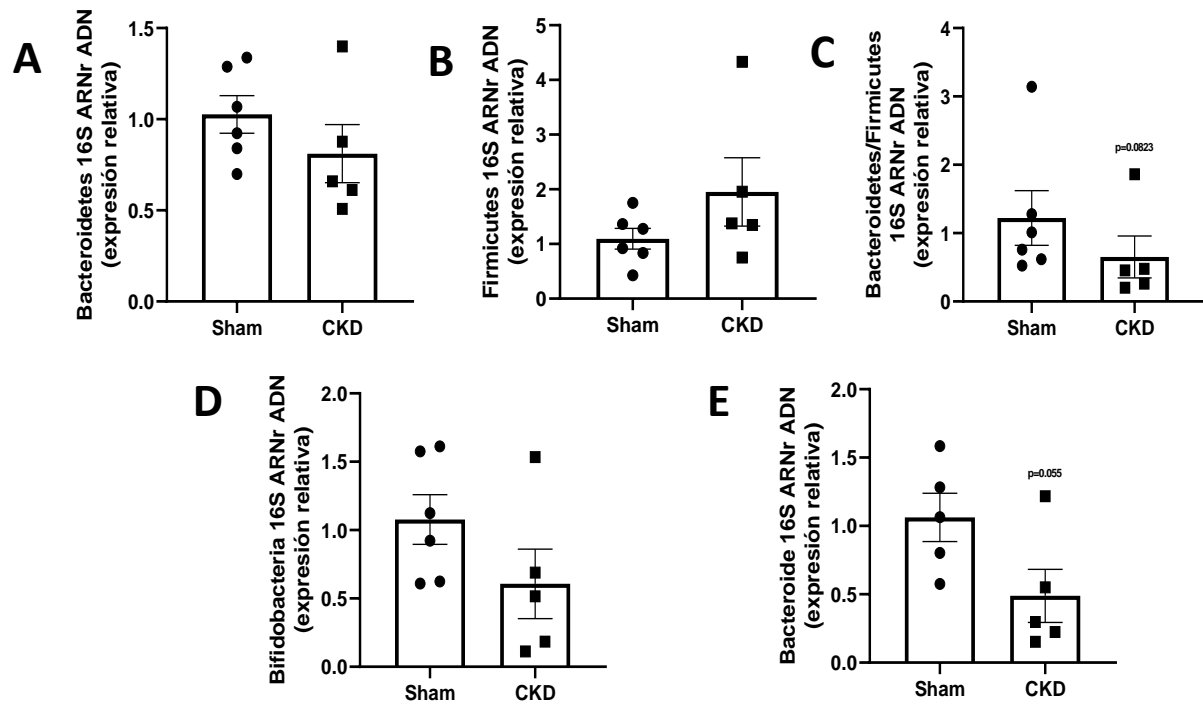


Figura 13. Cuantificación relativa de ADN microbiano mediante qPCR. Los resultados (media \pm ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en situación control (Sham). n= 5-6.

Discusión y conclusiones

1. Discusión

Como objetivo de este trabajo nos propusimos determinar si existía relación entre TLR4, la autofagia y la microbiota intestinal con la ERC, utilizando para ello un modelo animal de ratones a los que les indujimos la enfermedad mediante dos operaciones en las que se les reseccionaron 5/6 de los riñones.

Decidimos comenzar el estudio analizando la expresión de proteínas claves en la señalización de TLR4, debido al creciente interés que esta ganando esta proteína en el estudio de enfermedades crónicas inflamatorias como la ERC (Lucas *et al.*, 2013). Al estudiar la expresión de las proteínas MyD88 e pIRAK4 ambas implicadas en la señalización de TLR4 dependiente de MyD88, descubrimos que la expresión de ambas estaba aumentada en los ratones con ERC respecto a los ratones sanos, estos descubrimientos nos llevan a pensar que, efectivamente, podría existir una sobreactivación de TLR4 en los ratones enfermos. Para cerciorarnos si existía esta sobreactivación, decidimos analizar la expresión de la quimiocina CXCL10, una proteína que se produce como resultado de la vía independiente de MyD88 de TLR4. Descubrimos que efectivamente, sí que existía una producción mayor de CXCL10 en los ratones enfermos respecto a los sanos, sugiriendo que existe una sobreactivación de las dos vías de TLR4 en la enfermedad.

Son múltiples los estudios que relacionan la sobreactivación de TLR4 en algunas enfermedades crónicas con un aumento de la fibrosis (Bolourani *et al.*, 2021; Seki *et al.*, 2007). Estos hallazgos están acordes a lo que hemos observado en este estudio, encontrando un aumento de Colageno I.

Por otro lado, la autofagia es un mecanismo clave en la regulación de la homeostasis y de la respuesta a estrés celular y se sabe que existen desregulaciones del proceso en distintas enfermedades, entre ellas la ERC. Al analizar la relación entre la expresión de las proteínas LC3B-II/LC3B-I, descubrimos que existía un aumento significativo en los niveles de autofagia en los ratones enfermos respecto a los sanos. Este aumento de la autofagia podría estar produciéndose, para intentar reparar el daño que se está produciendo debido a la sobreactivación de TLR4 en el tejido, como un mecanismo compensatorio para tratar de reciclar componentes dañados por la inflamación crónica.

Se sabe que enfermedad renal se produce estrés oxidativo, además TLR4 también puede provocarlo (Hernanz *et al.*, 2015). El estrés oxidativo, es capaz de dañar el ADN, activando mecanismos de reparación. Esto concuerda con nuestros resultados, ya que, hemos observado incrementos significativos en la expresión de pATM en ratones CKD, proteína que inicia la señalización de la vía de reparación de ADN (Jin *et al.*, 2017).

Cuando pensamos en cual podría ser el causante de la sobreactivación de TLR4 en el riñón enfermo, rápidamente pensamos en el LPS, ya que se ha visto que, en la ERC, existen acumulaciones de metabolitos como la urea, que al no eliminarse con normalidad, provocan disbiosis en la microbiota intestinal, estas disbiosis contribuyen a la sobreproducción de toxinas urémicas, que provocan un daño en la barrera intestinal y por lo tanto aumentan la permeabilidad. En este estudio, si bien no hemos medido los niveles de LPS, sí que hemos comprobado que existe una diferencia (no significativa)

en las poblaciones bacterianas. Todos estos hallazgos nos llevan a pensar que en la microbiota de los ratones enfermos podría estar alterando la barrera intestinal, filtrando componentes como el LPS a la sangre.

2. Sumario y conclusiones

Las conclusiones de este trabajo de fin de master son las siguientes:

- 1.- Existe una sobreactivación de TLR4, tanto de la vía dependiente de MyD88, como de la vía independiente de MyD88 en ratones con enfermedad renal crónica.
- 2.- Existe un aumento de la fibrosis en los riñones de ratones con enfermedad renal crónica
- 3.- El proceso de autofagia está incrementado considerablemente en tejido renal de ratones con enfermedad renal crónica.
- 4.- Los ratones CKD presentan un aumento de la proteína pATM, encargada de activar la vía de reparación del ADN.
- 5.- Podría haber un cambio en la composición bacteriana de la microbiota intestinal en ratones con enfermedad renal crónica

Nuestros resultados sugieren que la activación de TLR4, probablemente a través de LPS filtrado al torrente sanguíneo, podría estar aumentando la inflamación, la fibrosis y la autofagia, así como el daño a ADN, participa en el desarrollo de la ERC. No obstante, en este estudio no hemos demostrado una relación directa entre la activación de TLR4 y la inflamación, la fibrosis y la autofagia encontrada en los riñones de ratones CKD. Si estos efectos están relacionados con la activación de TLR4 es algo que no se puede asegurar con los datos actuales y que requiere futuros estudios.

Bibliografía

1. Bolourani, Siavash, Max Brenner, and Ping Wang. "The interplay of DAMPs, TLR4, and proinflammatory cytokines in pulmonary fibrosis." *Journal of Molecular Medicine* 99.10 (2021): 1373-1384.qas
2. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 2001;410:37–40.
3. Chen, W.T.; Hung, K.C.; Wen, M.S.; Hsu, P.Y.; Chen, T.H.; Wang, H.D.; Fang, J.T.; Shie, S.S.; Wang, C.Y. Impaired leukocytes autophagy in chronic kidney disease patients. *Cardiorenal Med.* 2013, 3, 254–264. [CrossRef] [PubMed]. Klionsky, D.J.; Abdelmohsen,
4. Cheng, Yan, et al. "Therapeutic targeting of autophagy in disease: biology and pharmacology." *Pharmacological reviews* 65.4 (2013): 1162-1197.
5. De Batista, Priscila R., et al. "Toll-like receptor 4 upregulation by angiotensin II contributes to hypertension and vascular dysfunction through reactive oxygen species production." *PloS one* 9.8 (2014): e104020.
6. Hartleben, Björn, et al. "Autophagy influences glomerular disease susceptibility and maintains podocyte homeostasis in aging mice." *The Journal of clinical investigation* 120.4 (2010): 1084-1096.
7. Humphreys, Benjamin D. "Mechanisms of renal fibrosis." *Annual review of physiology* 80 (2018): 309-326.
8. Ishida, Itaru, et al. "Hypoxia diminishes toll-like receptor 4 expression through reactive oxygen species generated by mitochondria in endothelial cells." *The Journal of Immunology* 169.4 (2002): 2069-2075.
9. Jama, Hamdi A., David M. Kaye, and Francine Z. Marques. "The gut microbiota and blood pressure in experimental models." *Current opinion in nephrology and hypertension* 28.2 (2019): 97-104.
10. K.; Abe, A.; Abedin, M.J.; Abeliovich, H.; Acevedo Arozena, A.; Adachi, H.; Adams, C.M.; Adams, P.D.; Adeli, K.; et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 2016, 12, 1–222.
11. Kalantar-Zadeh, Kamyar, et al. "Chronic kidney disease." *The lancet* 398.10302 (2021): 786-802.
12. Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999;11:115–22.
13. Leventhal, Jeremy S., John C. He, and Michael J. Ross. "Autophagy and immune response in kidneys." *Seminars in Nephrology*. Vol. 34. No. 1. WB Saunders, 2014.
14. Levey, Andrew S., and Josef Coresh. "Chronic kidney disease." *The lancet* 379.9811 (2012): 165-180.
15. Lin, Tien-An, Victor Chien-Chia Wu, and Chao-Yung Wang. "Autophagy in chronic kidney diseases." *Cells* 8.1 (2019): 61.
16. Lu, Yong-Chen, Wen-Chen Yeh, and Pamela S. Ohashi. "LPS/TLR4 signal transduction pathway." *Cytokine* 42.2 (2008): 145-151.
17. Lucas, Kurt, and Michael Maes. "Role of the Toll Like receptor (TLR) radical cycle in chronic inflammation: possible treatments targeting the TLR4 pathway." *Molecular neurobiology* 48.1 (2013): 190-204.
18. Meylan E, Burns K, Hofmann K, Blancheteau V, Martinon F, Kelliher M, et al. RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol* 2004;5:503–7..
19. Nakamura, Toshifumi, et al. "Biglycan Is a Novel Mineralocorticoid Receptor Target Involved in Aldosterone/Salt-Induced Glomerular Injury." *International Journal of Molecular Sciences* 23.12 (2022): 6680.

20. O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2007;7:353–64.
21. Ohto, Umeharu, et al. "Structural analyses of human Toll-like receptor 4 polymorphisms D299G and T399I." *Journal of Biological Chemistry* 287.48 (2012): 40611-40617.
22. Picard C, Puel A, Bonnet M, Ku CL, Bustamante J, Yang K, et al. Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. *Science* 2003;299:2076–9.
23. Picard, Capucine, et al. "Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency." *Science* 299.5615 (2003): 2076-2079.
24. Rallabhandi, Prasad, et al. "Analysis of TLR4 polymorphic variants: new insights into TLR4/MD-2/CD14 stoichiometry, structure, and signaling." *The Journal of Immunology* 177.1 (2006): 322-332.
25. Ranganathan, Natarajan, et al. "Probiotic dietary supplementation in patients with stage 3 and 4 chronic kidney disease: a 6-month pilot scale trial in Canada." *Current medical research and opinion* 25.8 (2009): 1919-1930.
26. Rovin, Brad H., et al. "KDIGO 2021 clinical practice guideline for the management of glomerular diseases." *Kidney international* 100.4 (2021): S1-S276.
27. Schumann, R. R. "Function of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein (LBP) and CD14, the receptor for LPS/LBP complexes: a short review." *Research in immunology* 143.1 (1992): 11-15.
28. Seki, Ekihiro, et al. "TLR4 enhances TGF- β signaling and hepatic fibrosis." *Nature medicine* 13.11 (2007): 1324-1332.
29. Sekirov, Inna, et al. "Gut microbiota in health and disease." *Physiological reviews* (2010).
30. Sircana, Antonio, et al. "Gut microbiota, hypertension and chronic kidney disease: recent advances." *Pharmacological Research* 144 (2019): 390-408.
31. Souza, Ana CP, et al. "TLR 4 mutant mice are protected from renal fibrosis and chronic kidney disease progression." *Physiological reports* 3.9 (2015): e12558.
32. Suvik, Assaw, and A. W. M. Effendy. "The use of modified Masson's trichrome staining in collagen evaluation in wound healing study." *Mal J Vet Res* 3.1 (2012): 39-47.
33. Suzuki N, Suzuki S, Duncan GS, Millar DG, Wada T, Mirtsos C, et al. Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature* 2002;416:750–6..
34. Takeda, Kiyoshi, Tsuneyasu Kaisho, and Shizuo Akira. "Toll-like receptors." *Annual review of immunology* 21.1 (2003): 335-376.
35. Webster, Angela C., et al. "Chronic kidney disease." *The lancet* 389.10075 (2017): 1238-1252.
36. Weir, Matthew R., et al. "Use of renin-angiotensin system blockade in advanced CKD: an NKF-KDOQI controversies report." *American Journal of Kidney Diseases* 72.6 (2018): 873-884.
37. Wikoff, William R., et al. "Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites." *Proceedings of the national academy of sciences* 106.10 (2009): 3698-3703.
38. Zhao, Jin, et al. "pATM and γ H2AX are effective radiation biomarkers in assessing the radiosensitivity of 12C6+ in human tumor cells." *Cancer cell international* 17.1 (2017): 1-10.