



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID
FACULTAD DE MEDICINA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

GRADO EN BIOMEDICINA Y TERAPIAS AVANZADAS



**REGULACIÓN DE LA AUTOFAGIA MEDIADA POR LA
ACTIVACIÓN DE TLR4 EN ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA**

Regulation of Autophagy Mediated by TLR4 Activation in Chronic Kidney Disease

Autora:

Laura Aguado González

Tutores:

Roberto Palacios Ramírez y Laura Senovilla González

TÍTULO: Regulación de la Autofagia Mediada por TLR4 en
Enfermedad Renal Crónica.

AUTORA: Laura Aguado González

TUTOR/ES: Roberto Palacios Ramírez y Laura Senovilla González

ÁREA/DEPARTAMENTO: Departamento de Fisiología y Biología Molecular

TRIBUNAL

PRESIDENTE: David Bernardo Ordiz

SECRETARIO: Sara Cuesta Sancho

VOCAL: Roberto Palacios Ramírez

SUPLENTE 1: Nieves Fernández García

SUPLENTE 2: Alessandra Girotti

FECHA: **CALIFICACIÓN:**

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a todos mis compañeros del laboratorio CSI, que me han acompañado en esta experiencia, y que me han acogido como si fuese una más. Gracias por haber compartido vuestro conocimiento conmigo, pero sobre todo por vuestra cercanía. En especial, quiero agradecer a mis tutores Laura y Roberto por haberme dado la oportunidad de trabajar con ellos y tutorizarme en este proyecto tan especial. También a Juan, por haberme enseñado todo lo que he aprendido estos meses y ayudarme a sacar este trabajo adelante. Por último, quiero agradecer también a mi familia, mi pareja, y mis amigos por estar siempre conmigo y acompañarme a lo largo de mi vida; así como a todos mis compañeros y las personas que han formado parte de estos 4 años de carrera de alguna forma u otra.

RESUMEN

La enfermedad renal crónica (ERC) se define como un deterioro progresivo de los riñones presente por más de 3 meses, con una alta prevalencia a nivel mundial. Se asocia con una inflamación crónica, en la que TLR4 desempeña un papel clave produciendo mediadores inflamatorios. Además, TLR4 puede regular la autofagia, que se encuentra alterada en la patología, contribuyendo a su progresión. La hipótesis de este trabajo es que TLR4 es partícipe de la desregulación de la autofagia en la ERC, y que tanto autofagia como inflamación se regulan mutuamente. Para comprobarlo, se han hecho estudios en cultivos celulares HEK293 con TLR4 sobreexpresado, estimulados con LPS, su ligando canónico, para medir el nivel de inflamación y autofagia. Además, se utilizaron inhibidores de ambos procesos para estudiar su regulación. Los resultados demostraron que la activación de TLR4 en células HEK-TLR4 producía citoquinas inflamatorias como TNF- α , IL-6, IL-1 β o P-JNK, y un aumento de p62 que se traduce en una disminución de autofagia. Además, en el estudio de la regulación de la inflamación sobre la autofagia, los resultados parecían sugerir una regulación cruzada, en la que la inhibición inflamatoria parecía reestablecer la autofagia. Sin embargo, en el estudio de la regulación de la autofagia sobre la inflamación no se obtuvieron datos concluyentes. Como conclusión, la activación de TLR4 parece disminuir la autofagia, y ese efecto podría estar regulada por mediadores inflamatorios como las MAPK, siendo necesario continuar investigando los mecanismos de estos procesos.

Palabras clave

TLR4, Autofagia, Enfermedad Renal Crónica

ABSTRACT

Chronic kidney disease (CKD) is defined as a progressive deterioration of kidney function lasting more than 3 months, with a high global prevalence. It is associated with chronic inflammation, in which TLR4 plays a key role by producing inflammatory mediators. Additionally, TLR4 regulates autophagy, which is dysregulated in this pathology and contributes to disease progression. The hypothesis of this work is that TLR4 participates in the dysregulation of autophagy in CKD, and that both autophagy and inflammation regulate each other. To validate it, studies were conducted in TLR4-overexpressing HEK293 cell cultures, stimulated with LPS, its canonical ligand, in order to measure levels of inflammation and autophagy. In addition, inhibitors of both processes were used to investigate their potential regulation. The results showed that TLR4 activation in HEK-TLR4 cells leads to the production of inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6, IL-1 β , and P-JNK, and an increase in p62, which translates in a decrease on autophagy, was also observed. Furthermore, in the study of the regulation of inflammation on autophagy, the results suggest a regulatory relationship between the two processes, in which inflammatory inhibition seemed to restore autophagy. However, in the study of the regulation of inflammation by autophagy, no relevant data was obtained. In conclusion, TLR4 activation appears to reduce autophagy, and this process may be regulated by inflammatory mediators such as MAPKs, highlighting the need for continued investigation into the mechanisms underlying these processes.

Keywords

TLR4, Autophagy, Chronic Kidney Disease

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. <i>Enfermedad renal crónica (ERC)</i>	1
1.2. <i>Mecanismos moleculares y fisiopatología de la ERC</i>	2
1.3. <i>Tratamientos para la ERC</i>	3
1.4. <i>Receptores Toll-Like: función y estructura</i>	3
1.5. <i>Receptor TLR4</i>	4
1.5.1. <i>Vía de señalización de TLR4</i>	4
1.5.2. <i>Relación entre TLR4 y ERC</i>	5
1.6. <i>Autofagia y su papel en la célula</i>	6
1.6.1. <i>Vía de la autofagia y sus proteínas clave</i>	6
1.6.2. <i>Autofagia y TLR4</i>	7
1.6.3. <i>Autofagia y ERC</i>	8
2. Hipótesis y objetivos	9
3. Materiales y métodos	9
3.1. <i>Cultivos celulares y tratamiento</i>	9
3.2. <i>Extracción y cuantificación de proteína, y Western-Blot</i>	10
3.3. <i>Extracción y cuantificación de ARNm, y RT-qPCR</i>	12
3.4. <i>Análisis estadístico</i>	13
4. Resultados	14
4.1. <i>Respuesta inflamatoria en células HEK293-TLR4 estimuladas con LPS</i>	14
4.2. <i>Cambios en la autofagia en respuesta al LPS en células HEK-TLR4</i>	14
4.3. <i>Efecto de la inflamación en la autofagia en células HEK293-TLR4</i>	15
4.4. <i>Efecto de la autofagia sobre la inflamación en células HEK-TLR4</i>	16
5. Discusión	17
6. Conclusiones/Conclusions	19
BIBLIOGRAFÍA	21

ABREVIATURAS

ADNc: ADN complementario

ARNm: ARN mensajero

ATG: proteína relacionada con la autofagia

BSA: albúmina sérica bovina

DAMP: patrón molecular asociado a daño

DM: diabetes mellitus

DMSO: dimetilsulfóxido

ERA: enfermedad renal aguda

ERC: enfermedad renal crónica

ERET: enfermedad renal en etapa terminal

ERK: quinasa regulada por señales extracelulares

FBS: suero fetal bovino

FGF: factor de crecimiento de fibroblastos

HEK293: riñón embrionario humano 293

HSP: proteína de choque térmico

IFN: interferón

IL: interleucina

IRF: factor regulador del interferón

LBP: proteína de unión al LPS

LC3: cadena ligera 3 de la proteína asociada a microtúbulos 1

LRR: repeticiones ricas en leucina

LPS: lipopolisacárido

MAPK: proteínas quinasas activas por mitógeno

MD-2: factor 2 de diferenciación mieloide

MEC: matriz extracelular

mTOR: diana de rapamicina en células de mamífero

NF- κ B: factor nuclear potenciador de la cadena ligera kappa de las células B activadas.

NLPR3: receptor tipo dominio de oligomerización de unión a nucleótidos que

contiene el dominio pirina

OUU: obstrucción uretral unilateral

PAMP: patrón molecular asociado a patógenos

P-ATM: proteína ataxia telangiectasia mutada fosforilada

PE: fosfatidiletanolamina

PI3KC3: subunidad catalítica tipo 3 de la fosfatidilinositol 3-quinasa

PI3P: fosfatidilinositol 3-fosfato

RAAS: sistema renina-angiotensina-aldosterona.

RT-qPCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa en tiempo real

SNARE: proteína receptora de unión al factor sensible a N-etilmaleimida soluble

SGLT2: cotransportador-2-sodio-glucosa

TBS-T: solución salina tamponada con Tris - 0,1% Tween20

TEM: transición epitelio mesénquima

TFG: tasa de filtración glomerular

TIR: receptor citosólico Toll-IL-1B

TLR: receptor tipo toll

TNF: factor de necrosis tumoral

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta

ULK: quinasa similar a Unc

1. Introducción

1.1. Enfermedad renal crónica (ERC)

La enfermedad renal crónica (ERC) es una alteración caracterizada por un deterioro progresivo de la función y de la estructura de los riñones, que evoluciona de manera lenta e irreversible (1). Se define por la presencia en un periodo de 3 o más meses, de una tasa de filtración glomerular (TFG) menor de $60\text{mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$, y otros indicadores de daño renal. Entre estos indicadores se encuentran la albuminuria (más de 30 mg/g de albúmina en una muestra de orina ajustada por creatinina), la hematuria, los cambios en la histología renal, alteraciones electrolíticas secundarias a daño tubular renal etc. (1–3). Es importante remarcar el tiempo de la presencia de estos marcadores, para distinguir la ERC de la enfermedad renal aguda (daño renal y función disminuida presente por menos de 3 meses), y del daño agudo renal (cambios en la función renal presentes entre 2 y 7 días) (3).

La prevalencia de la enfermedad está aumentando, actualmente más del 10% de la población mundial padece algún desorden renal crónico, resultando en 1,2 millones de muertes al año (2). Su incidencia y prevalencia están en continuo crecimiento, y se estima que para el año 2040 la ERC sea la quinta causa de muerte en el mundo. (2,4). En España la incidencia de la ERC es del 15%. La prevalencia varía también en función del área geográfica, aumentando particularmente en países desarrollados. Esta tendencia puede atribuirse a la creciente esperanza de vida, y por consiguiente al envejecimiento. No obstante, aunque la causa de la ERC es difícil de determinar, factores de riesgo sistémicos como la diabetes mellitus (DM), la hipertensión, y la obesidad, son considerados cofundadores de la enfermedad (1,3,5), siendo la DM la etiología más común (6). Se conocen también factores asociados al estilo de vida que contribuyen a su desarrollo y progresión, así como la dieta, la falta de sueño, el tabaco, o la falta de ejercicio (5); además de la edad, el sexo y la raza. Asimismo, como en muchas enfermedades multifactoriales, esta patología también está influida por el componente genético, pues se ha visto que existen algunos alelos de riesgo que aumentan la probabilidad de padecer ERC (3). Aun así, el diagnóstico de la enfermedad supone un gran reto, y su tasa de detección en las etapas tempranas de la enfermedad suele ser muy baja (7).

Una vez diagnosticada, la ERC puede estratificarse en varios estadios en base a la tasa de filtración glomerular y la albuminuria del paciente (Figura 1). A medida que disminuye la TFG aumenta la gravedad de la enfermedad. Si la tasa de filtración glomerular es menor que $15\text{ mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$, el paciente se encuentra en la fase terminal. En esta etapa el riñón es incapaz de realizar sus funciones correctamente. Esta fase es conocida como “Enfermedad Renal en Etapa

Terminal" (ERET) y el tratamiento es una terapia de sustitución como la hemodiálisis o el transplante. (3,4,8).

				Albuminuria persistente: categorías, descripción y rango		
				A1	A2	A3
				Normal-levemente aumentada	Moderadamente aumentada	Severamente aumentada
				<30 mg/g	30–300 mg/g	>300 mg/g
Categorías TFG, descripción y rango (mL/min/1.73 m ²)	G1	Normal o alta	≥90			
	G2	Levemente disminuida	60–89			
	G3a	Leve-moderadamente disminuida	45–59			
	G3b	Moderada-severamente disminuida	30–44			
	G4	Severamente disminuida	15–29			
	G5	Fallo renal	<15			

Figura 1. Clasificación propuesta en 2012 por la “Kidney Disease: Improving Global Outcomes” (KDIGO sus siglas en inglés) para la enfermedad renal crónica. Se divide en distintas categorías por riesgo de progresión de la enfermedad. El color verde indica bajo riesgo (si no hay otros marcadores de daño renal y no hay ERC), amarillo un riesgo moderado, naranja un riesgo alto, y rojo riesgo muy alto (adaptado de Chen et al., 2019).

Cabe destacar que, además de la pérdida de función renal, la ERC contribuye de manera significativa al desarrollo de enfermedad cardiovascular, ya sea fallo cardíaco, arritmias, enfermedad arterial coronaria, o infartos; sobre todo en las fases finales de la enfermedad.(5,6,8)

1.2. Mecanismos moleculares y fisiopatología de la ERC

La ERC se caracteriza por un estado de inflamación persistente de bajo grado, que aumenta a medida que disminuye la función renal (7,9). Los riñones albergan variedad de células inmunes residentes en condiciones fisiológicas para mantener la homeostasis (10). Cuando estas células son activadas, por diferentes causas como pueden ser la hipertensión, la diabetes, la enfermedad cardiovascular, el exceso de proteínas, o la disbiosis intestinal entre otras (7,9,11,12); activan vías inflamatorias que producen mediadores, contribuyendo al constante estado inflamatorio (7). Algunas de las vías que se han encontrado sobre activadas en la ERC son la de los receptores Toll-like (TLR), la del factor nuclear potenciador de la cadena ligera kappa en células B activadas (NF-κB), y la del inflammasoma NLPR3 (10). El ambiente inflamatorio persistente es el desencadenante de un proceso fibrótico, en el que como consecuencia de una respuesta reparadora que se perpetúa en el tiempo, se acumula descontroladamente matriz extracelular (MEC), y se destruyen las nefronas. Al desarrollo de la fibrosis renal contribuyen también macrófagos M2, que producen factores pro fibróticos como FGF2 o TGF-β (11,13). Además, algunas células renales pueden convertirse en fibroblastos o miofibroblastos mediante la transición epitelio-mesénquima (TEM), secretando colágeno en grandes cantidades, y contribuyendo a la fibrosis (14).

Los mediadores producidos en el daño renal ocasionan también alteraciones hemodinámicas y daño cardíaco. En pacientes con ERC se producen calcificaciones vasculares, y esto en arterias

centrales incrementa la carga bombeada por el corazón resultando en fallo cardiaco. Los pacientes muestran también cambios patológicos en el miocardio, debido a la fibrosis producida por la deposición de colágeno en el corazón (6).

1.3. Tratamientos para la ERC

Como se ha mencionado anteriormente, la ERC puede clasificarse en varias categorías, en función de su riesgo de progresión y severidad, mostrando una gran heterogeneidad. Tanto la disparidad de estos estadios, como los diferentes orígenes y patologías subyacentes a la enfermedad, suponen un gran reto para tratarla. Actualmente, la ERC es irreversible y solo se dispone de tratamientos de una eficacia limitada que reducen la velocidad de progresión de la enfermedad o mejoran la función renal mediante la mejora de síntomas (por ejemplo, la reducción de la presión arterial o de la glicemia). Para manejar la ERC, los principales fármacos usados son inhibidores del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS), como los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, o los antagonistas del receptor de angiotensina II (2,15). Adicionalmente, los inhibidores del cotransportador-2-sodio-glucosa, han demostrado que, además de ser eficaces en la diabetes, beneficios cardiovasculares, un retraso en la degeneración renal y una disminución de la proteinuria (15,16). En pacientes en ERET, existen opciones de terapia de reemplazamiento, así como la diálisis, o el transplante renal; pero ambas opciones presentan grandes limitaciones tanto a largo como a corto plazo (3). Aún con los avances actuales en el tratamiento de la ERC, los pacientes continúan teniendo una esperanza de vida muy reducida con respecto a las personas con función renal normal (6).

1.4. Receptores Toll-Like: función y estructura

Los TLRs son una familia de receptores muy conservada evolutivamente (17,18). Son receptores que reconocen patrones moleculares (PRRs) que juegan un papel crucial en la inmunidad innata, actuando en primera línea como sensores inmunológicos y reconociendo moléculas tanto endógenas como exógenas. Los PRRs reconocen de manera muy específica patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), componentes microbianos esenciales para los microorganismos (17–19). Además de reconocer PAMPs, los TLRs también pueden reconocer patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), como proteínas de choque térmico, proteoglicanos, células necróticas, oligosacáridos etc. (20).

Los miembros de esta familia son proteínas transmembrana tipo I, con una estructura que se compone de 3 dominios. Primero, un dominio extracelular con motivos con repeticiones ricas en leucina (LRRs), cuya función es reconocer el ligando. Además, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático responsable de la señalización intracelular, conocido como dominio TIR (17,18,20) Cada TLR tiene una combinación única de LRRs en su ectodominio que lo hace específico para ciertos patrones. En humanos, se han identificado 10 miembros de la familia

TLR que pueden clasificarse en función de su ubicación (21). TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, y TLR10 son receptores que se posicionan en el exterior de la membrana celular, mientras que TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9, son clasificados como receptores intracelulares, localizándose en algunos orgánulos (18,21).

1.5. Receptor TLR4

TLR4 es el primer receptor de la familia TLR identificado en mamíferos, y el más estudiado (22). Puede localizarse tanto en la superficie celular, como en fagosomas intracelulares de células como macrófagos, monocitos, o células dendríticas. Su activación mediante DAMPs y PAMPs inicia respuestas inmunes adaptativas e innatas, mediante citoquinas proinflamatorias y quimiocinas. No solo eso, participa en procesos como la fagocitosis, el balance REDOX o la apoptosis (19). Su estructura es la misma que se ha comentado anteriormente, con dominios extracelular, transmembrana y citoplasmático. De la familia de los TLRs, este es el único que necesita obligatoriamente otra molécula para reconocer su ligando. Esta molécula es MD-2, con la que forma un heterodímero, aumentando así la sensibilidad y especificidad de este receptor. (23).

El ligando canónico de TLR4 es el lipopolisacárido (LPS), un glicolípido localizado en la membrana externa de las bacterias gramnegativas. Puede inducir respuestas inmunes tanto innatas como no innatas. Está formado por el lípido A, componente específico capaz de estimular al receptor, y un antígeno O (20,23). En la activación de TLR4, participan una serie de moléculas además del LPS. La proteína de unión al LPS (LBP), es una glicoproteína con un dominio N-terminal que reconoce a LPS y se une a él, en un proceso estabilizado por la albúmina. Gracias al LBP es más fácil que una sola molécula de LPS sea transferida a CD14, y de ahí el LPS será cedido a MD-2, que formará un heterodímero con TLR4, activando la señalización intracelular (22–25).

1.5.1. Vía de señalización de TLR4

Existen dos vías diferentes en la activación de TLR4 claves en la respuesta innata. La vía de Myd88 dependiente y la vía Myd88 independiente. Ambas acaban activando a NF- κ B, que conlleva a la liberación de mediadores proinflamatorios. Myd88 es una proteína adaptadora de TLR4, que interacciona con su dominio TIR para iniciar la cascada de señalización (26).

-Vía dependiente de Myd88: Al unirse LPS a MD2 y formarse el heterodímero TLR4-MD2, TLR4 es capaz de activarse, lo que hace que se recluten Myd88 y TIRAP, mediante la interacción entre sus dominios TIR. TIRAP y Myd88 reclutan otras moléculas de manera secuencial, como IRAK o TRAF6 que acaban activando a NF- κ B. Este factor se transloca al núcleo, y actúa como factor de transcripción para producir mediadores inflamatorios, como TNF- α , IL-6, o IL-1 β (24,25) (Figura 2A).

-Vía independiente de Myd88: Cuando LPS se une al receptor, el heterodímero TLR4-MD2 se internaliza, mediante un proceso dependiente de CD14 y de flujo de calcio. Se forma un endosoma, que recluta moléculas, como TRAM, TRIF, o TRAF3 que activan también a NF- κ B y a IRFs. De esta forma, en esta vía se activa la producción de interferones de tipo 1. El canal TRPM7 participa en el proceso haciendo que entre en la célula el calcio necesario para la endocitosis del heterodímero (24,25) (Figura 2B).

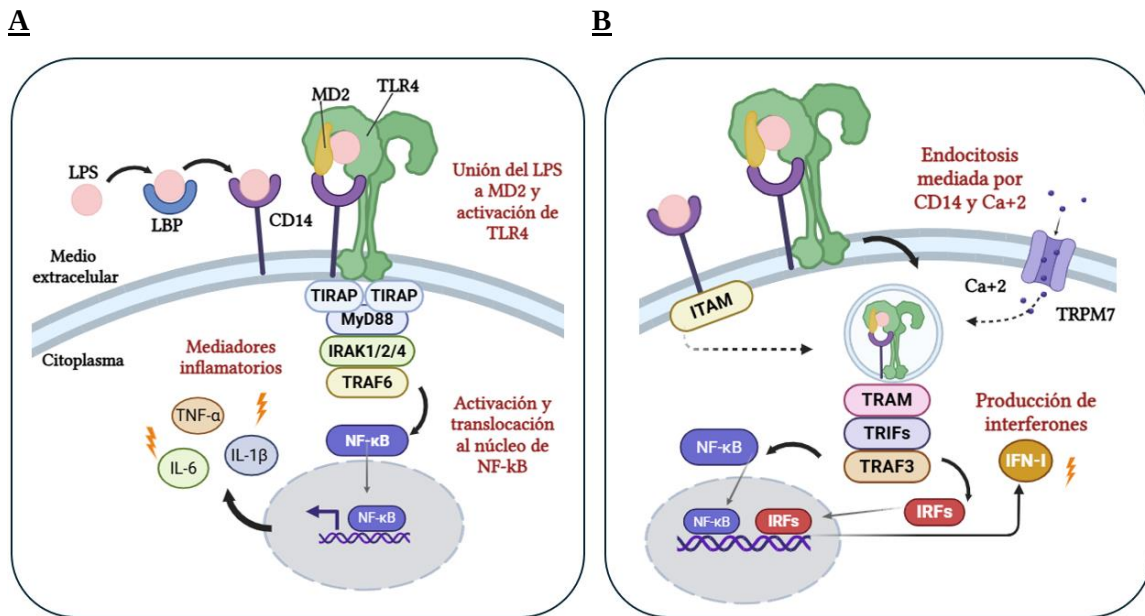


Figura 2. Vía de señalización de TLR4 mediada por LPS. **A.** Vía dependiente de MyD88, LPS estimula el heterodímero TLR4-MD-2 y se reclutan Myd88 y TIRAP, para reclutar otras moléculas. NF- κ B se activa y genera factores inflamatorios. **B.** Vía independiente de Myd88, LPS se une a TLR4-MD-2 y este se endocita mediante CD14 e ITAM y flujo de calcio. El endosoma recluta otras moléculas que activan NF- κ B e IRFs, y se producen interferones tipo-I. (Creado con BioRender.com. Adaptado de Luo et al., 2025).

Además, es importante saber que la activación de la vía TLR4, no solo activa NF- κ B e IRF, sino que también activa a la ruta de las MAPK, como JNK, o ERK (26).

1.5.2. Relación entre TLR4 y ERC

En condiciones fisiológicas, hay una expresión de TLR4 en las células renales, más elevada en la corteza que en la médula. Se encuentra sobre todo en los túbulos, pero también en otras células como los podocitos o las células endoteliales. Aunque su expresión basal es baja, se ha visto que aumenta en respuesta a infecciones o daño renal, y hay estudios que respaldan la sobre activación de TLR4 en afecciones renales como la nefropatía diabética, el nefritis lúpica o en el daño renal agudo (21,27). No solo eso, se demostró en ratones que TLR4 también está implicado en el desarrollo de la fibrosis y la inflamación intestinal (28), y que además tiene un papel clave en el desarrollo de la fibrosis pulmonar (29). Estudios preclínicos en ratones, muestran también la contribución de la activación de TLR4 a un aumento de la inflamación y del daño renal (30). Todo esto se puede resumir en que la activación de TLR4 tiene un rol fundamental en los mecanismos de la ERC.

1.6. Autofagia y su papel en la célula

La autofagia es un proceso que se describió en células de mamífero hace 50 años (31). Se trata de una vía de degradación altamente conservada para mantener la homeostasis de la célula. Su función es la eliminación y reciclaje de componentes citoplasmáticos en los lisosomas, además de participar en varios procesos fisiológicos esenciales como el funcionamiento del sistema inmune, o el desarrollo de algunos orgánulos (31,32). Durante la autofagia, una estructura de doble membrana rodea la parte del citoplasma que se va a degradar. Esta estructura es el autofagosoma, que se fusionará con el lisosoma para formar el autolisosoma (33,34). Las diferentes hidrolasas (proteasas, lipasas, fosfatasa) del autolisosoma son las que degradaran los componentes.

Existen 3 tipos de autofagia: macroautofagia, microautofagia, y autofagia mediada por chaperonas (34). La macroautofagia, a menudo referida con el termino de autofagia, secuestra en el autofagosoma partes del citoplasma consideradas grandes, como proteínas u orgánulos defectuosos (31,32). Por otro lado, la microautofagia secuestra componentes citosólicos más pequeños, mediante una invaginación de la membrana lisosomal. Por último, la autofagia mediada por chaperonas es un proceso más selectivo, degradando solo aquellas proteínas que contengan el motivo KFERQ (32,35).

1.6.1. Vía de la autofagia y sus proteínas clave

Existen un grupo de proteínas llamadas proteínas ATG (proteínas relacionadas con la autofagia), que forman complejos funcionales y son reclutadas en las membranas al inicio de la autofagia. Estas proteínas son necesarias para que el proceso se lleve a cabo (36).

La molécula mTOR, una quinasa serina-treonina capaz de integrar señales metabólicas (37), es un regulador negativo de la autofagia, por lo que este proceso se activa cuando mTOR es inhibida (31,37). Esto puede ocurrir en situaciones de estrés en la célula, como reducción de nutrientes esenciales como la glucosa, o estrés oxidativo, por ejemplo (31,35). mTOR inhibe en condiciones normales al complejo ULK1, por lo que, al inhibirse en presencia de estrés, se activará este complejo iniciando la formación del fagóforo (que madurará para convertirse en el autofagosoma). El complejo ULK1 activará al complejo PI3KC3 que produce PI3P (fosfatidilinositol), facilitando el anclaje de los siguientes complejos que participan y la expansión del fagóforo. A continuación, por un lado, ATG4 procesa la molécula pro-LC3 a LC3, que se activa mediante ATG7 a LC3II, y se transfiere a ATG3. Por otra parte, ATG7 activa a ATG12 y se la transfiere a ATG10, que la conjuga con ATG5. A estas dos proteínas conjugadas, ATG12 y ATG5, se une de manera no covalente ATG16L, formando un complejo multimérico que se puede unir a la membrana del fagóforo mediante las proteínas WIPI, proteínas de unión al PI3P. El complejo ATG16L hace que LC3 se una a la

fosfatidiletanolamina (PE), y LC3-PE es capaz de anclarse a la membrana del fagóforo para que pueda crecer y dar lugar al autofagosoma (Figura 3). El autofagosoma mediante los microtúbulos y otras proteínas como SNARE se fusiona con el lisosoma para dar lugar al autolisosoma (31–33,38). Finalmente, el contenido se degrada por las diferentes enzimas, se recicla en el citosol, y esto actúa como señal para volver a activar a mTOR y que se detenga la autofagia (31).

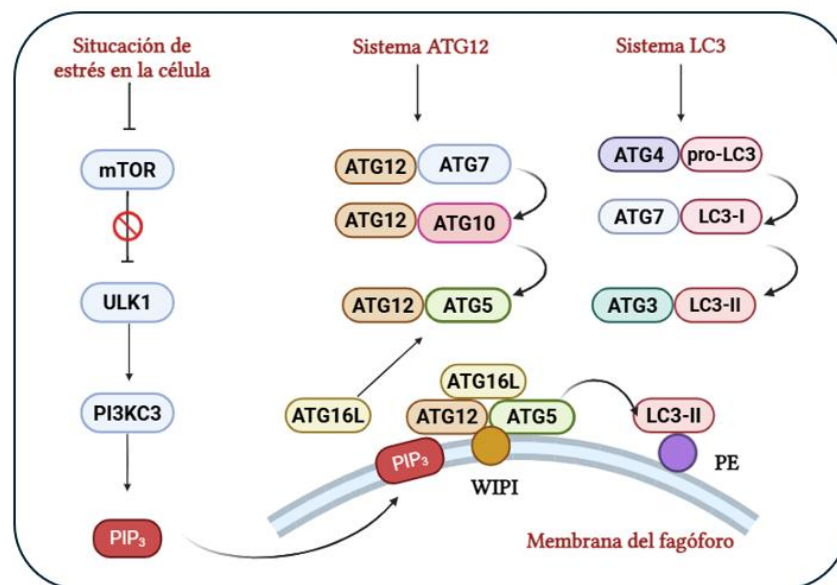


Figura 3. Vía de señalización de la autofagia. El estrés celular inhibe mTOR, por lo que se activa el complejo ULK1, que activa a su vez P3KC3 que produce PIP3. Por otro lado, LC3 es procesado por proteínas autofágicas y se une a PE en la membrana del fagóforo gracias al complejo ATG12-ATG5-ATG16L. De esta manera comienza el crecimiento del fagóforo. (Creado con BioRender.com. Adaptado de Iriando et al., 2023).

La autofagia, además, puede ser un proceso selectivo en el que se degraden moléculas específicas marcadas, por ejemplo, mediante el sistema de ubiquitinación (39,40). Esto es posible gracias a proteínas adaptadoras, como p62, que actúa como adaptador entre las moléculas que se quieren degradar y el sistema autofágico. P62 tiene un dominio que reconoce la ubiquitina de las proteínas dañadas y otro que se une a LC3 en la membrana del autofagosoma. De este modo las “guía” para degradarlas. Si el proceso autofágico funciona correctamente, p62 se degrada también con la carga. Si la autofagia está bloqueada, p62 se puede acumular, por lo que sirve también como un marcador de actividad autofágica (40).

1.6.2. Autofagia y TLR4

La autofagia en condiciones basales es un regulador negativo de la inflamación, para mantener la homeostasis (41), y se sabe que, puede inducirse mediante la activación de los TLRs (42). Las vías de TLR4 y de la autofagia, están relacionadas en algunos puntos y su regulación está estrechamente controlada. Por ejemplo, la vía TLR4/Myd88/MAPK y la vía TLR4/PI3K/Akt,

pueden activar a mTOR, inhibiendo la autofagia (42). Por otro lado, se ha descrito también un papel de TLR4 en la activación de la autofagia, mediante la molécula TRAF6 (activada cuando el receptor se estimula), que ubiquitina Beclin-1, favoreciendo el inicio del proceso autofágico (41,43). Por ejemplo, en un estudio de colitis inducida en células, se demostró la relación de TLR4-Myd88-MAPK y la autofagia, pues aumentaba mTOR y resultaba en su inhibición (44). Por último, en otros estudios realizados en microglía, la activación de TLR4 mediante LPS demostraba reducir la autofagia mediante la inhibición del factor de transcripción FOXO3 (42).

La regulación entre TLR4 y autofagia es muy compleja, pudiendo este receptor activarla o inhibirla en función de las condiciones, del tipo celular, o del órgano. Por ello, en este trabajo queremos conocer el efecto de la activación de TLR4 en la autofagia de células renales.

1.6.3. Autofagia y ERC

Es sabido que la autofagia, como norma es un proceso primariamente protector en la célula, pero un fallo o desregulación de esta, resulta en multitud de patologías humanas, incluyendo cáncer, enfermedades neurodegenerativas, o enfermedades crónicas inflamatorias, entre otras (45).

La autofagia es fundamental en la homeostasis del riñón para su estructura y funcionalidad, aunque su actividad y regulación no es la misma en todos los tipos de células renales. Por ejemplo, los podocitos tienen un nivel basal de autofagia muy alto en condiciones fisiológicas, manteniendo su capacidad para eliminar agregados proteicos, mientras que en las células del túbulo proximal en cambio, existen bajos niveles de autofagia basal (32). Estudios realizados en ratones deficientes de la proteína ATG5 en podocitos (proteína fundamental para el proceso autofágico) mostraban un aumento de apoptosis renal y un envejecimiento prematuro indicando un rol protector en el riñón (35,46).

Aunque el papel de la autofagia en la ERC no está bien descrito aún, hay indicios de que existe una desregulación que contribuye a su progresión. Por ejemplo, en la enfermedad renal aguda (ERA), la autofagia juega un papel clave protegiendo contra el daño renal. En ratones con ERA inducida, se vio un aumento de autofagia, sobre todo en células tubulares como mecanismo de defensa al daño (32). Sin embargo, en la transición de ERA a ERC, que se produce cuando la reparación no es efectiva o incompleta, hay evidencias que sugieren que una autofagia excesiva es un mecanismo partícipe del proceso. Adicionalmente, un exceso de actividad autofágica puede tener un papel profibrótico en la ERC pues varios estudios sustentan su actividad en la lesión renal y en algunas nefropatías, activando FGF2 y TGF- β , claves en la progresión fibrótica (47). Por otro lado, y contrariamente, también puede contribuir a la degradación del colágeno y resolución de la fibrosis (31).

Por último, cabe destacar los hallazgos en modelos de ratones con obstrucción unilateral de la

uretra (OUU), en los que se muestra un aumento de autofagia en los túbulos renales obstruidos, sobre todo en los riñones fibróticos, demostrando ser una respuesta adaptativa contra el daño, pero también pudiendo favorecer al desarrollo de la fibrosis (48).

2. Hipótesis y objetivos

Es necesaria la investigación de nuevas terapias para poder tratar y detener o revertir el curso de la enfermedad renal crónica, y para ello se deben conocer bien las vías y los mecanismos moleculares que participan en esta patología tan compleja. Como ya se sabe, TLR4 se expresa en varios tipos de células renales, y se ve implicado en enfermedades renales, además de en múltiples enfermedades inflamatorias. Además, se ha observado que la autofagia podría ser un factor clave en la ERC. Teniendo en cuenta que es conocida la regulación de la autofagia producida por TLR4, y la respuesta proinflamatoria que desencadena, la hipótesis de este trabajo es que la activación de TLR4 contribuye a la desregulación de la autofagia observada en ERC, y que autofagia e inflamación producidas por TLR4 se regulan mutuamente.

El objetivo principal de este trabajo es analizar la relación entre la activación de TLR4 por LPS, la respuesta inflamatoria, y la modulación de la autofagia en cultivos celulares de células HEK293 que sobreexpresan TLR4.

Para llevar a cabo este objetivo, se definen los siguientes objetivos específicos:

- Demostrar la activación inflamatoria y los cambios autofágicos en un modelo celular renal sobre activado con TLR4 y estimulado mediante LPS.
- Estudiar el papel de la inflamación en la respuesta autofágica
- Estudiar el papel de la autofagia en la respuesta inflamatoria

3. Materiales y métodos

3.1. Cultivos celulares y tratamiento

Se utilizaron células HEK-293 (“wild-type”) y células HEK-293-TLR4/MD2/CD14. En el caso de las “wild-type”, solo se usaron para comprobar que la sobreexpresión de TLR4 funcionaba correctamente en las células transfectadas. Para ello se hizo una RT-qPCR comparando la expresión de TLR4 en ambos tipos celulares, para asegurar la correcta transfección del plásmido (Figura 4). Las células HEK-293-TLR4/MD2/CD14 se emplearon para conocer la respuesta al LPS, y para su posterior extracción de proteína y ARNm.

Las células se mantuvieron a 37°C y 5% de CO₂, en un medio DMEM (1X) [+] glucosa 4,5 g/L, suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) y un 1% de penicilina estreptomicina (P/S), en Flasks de 75 cm² (Corning®, CLS430641U). Para las células con TLR4 sobreexpresado, se utilizaron los antibióticos selectivos Blastidina (10 µg/ml) e Higromicina

(50 µg/ml), para asegurar solo el crecimiento de las células deseadas.

Las células HEK-293 se levantaron utilizando tripsina TrypLE™ Express (1X) (Gibco™), y la reacción enzimática se detuvo con FBS; mientras que las HEK-293-TLR4/MD2/CD14 se levantaron utilizando PBS a pH 7,4, [-] CaCl₂ y MgCl₂ (Gibco™, 10010015).

Para los estudios de respuesta al LPS, una vez las células alcanzaron una confluencia adecuada (en torno al 70%), se sembraron en placas de 6 pocillos (Corning®, CLS3516). A los dos días se comenzó el tratamiento con LPS (Sigma-Aldrich, L4391), y el día previo a dicho tratamiento el medio de las células fue sustituido por un medio de ayuno, DMEM [+] D-glucosa 4,5g/L suplementado con 1% de FBS y 1% de P/S. En primer lugar, se realizó una curva de tiempo-respuesta, en el que se trató con LPS a 1µg/mL a las 2h, 4h, 6h, 8h y 24h, dejando un pocillo sin tratar, usado como control (0h). Por otro lado, otras placas iguales se trataron con diferentes condiciones, un pocillo con LPS a 1µg/mL 24 horas antes de recoger las células, otro pocillo con LPS 24 horas de recogerlo y el inhibidor SP600-125 (Sigma-Aldrich, S5567) de P-JNK, y otro pocillo utilizado como control, en el que solo se añadió DMSO, pues el inhibidor está disuelto en DMSO. Por último, otras placas se trataron de forma que se añadió a un pocillo LPS a 1µg/mL 4 horas antes de recoger las células, otro pocillo con LPS 4 horas y Bafilomicina A1 (Sigma-Aldrich, B1793), y un último pocillo usado como control.

Una vez finalizados los tratamientos, se recogieron las células en distintos microtubos y se almacenaron a -80°C para extracción de proteína y de ARNm.

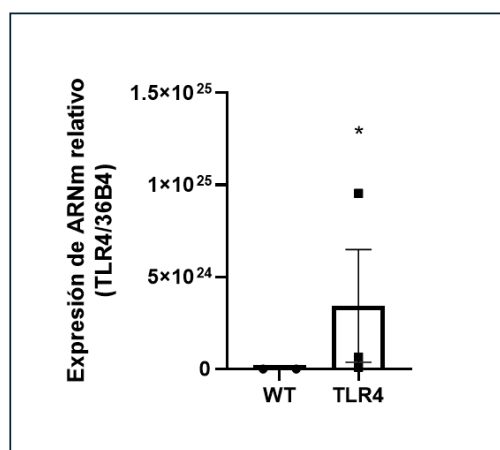


Figura 4. Transfección efectiva de TLR4 en la línea celular HEK-293-TLR4/MD2/CD14. Nivel de ARNm relativo respecto a 36B4 de *TLR4* (n=2-3), representado como el valor 2-ΔΔCt promedio ± error estándar.

3.2. Extracción y cuantificación de proteína, y Western-Blot

Para extraer proteína de las células recogidas, se aplicó tampón de lisis de proteínas a cada microtubo, que contiene tampón comercial NP-40 (Thermo Fisher, 15493479) y un inhibidor de proteasas y fosfatasa (Thermo Fisher, 15624189); y se incubó durante 2h y 30 minutos en

hielo. Se centrifugó 15 minutos a 4°C a 12000 r.p.m. y se descartó el pellet (los restos celulares) para conservar el sobrenadante (el lisado de proteínas purificado).

Se realizó posteriormente un ensayo colorimétrico para la cuantificación de los lisados proteicos, usando el Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific™, 23225). Se añadieron en una placa el H₂O y las muestras de lisado correspondientes, además del reactivo BCA encargado de la reacción de color. Para la preparación de la curva patrón se utilizaron concentraciones crecientes conocidas de albúmina sérica bovina (BSA), con la cantidad de H₂O y BCA correspondiente. Se midieron las absorbancias a 562 nm, con el espectrofotómetro SpectraMax ABS (Molecular Devices). Una vez obtenidas las concentraciones proteicas de cada muestra mediante la curva patrón, se prepararon las mezclas correspondientes para desnaturalizar las proteínas, de forma que hubiese 25 µg de proteína de cada muestra, tampón de muestra Bolt™ LDS (4X) (130007), y agente reductor de muestras Bolt™ (10X) (130009). A continuación, para proceder a la desnaturalización, se incubaron las muestras preparadas durante 5 minutos a 100°C en un termobloque seco.

Las muestras desnaturalizadas se cargaron en los pocillos de geles de poliacrilamida Bolt™ 4-12%, Bis-Tris Plus WedgeWell™ (NW04125BOX), cargando también en los pocillos laterales el marcador de peso molecular SeeBlue™ Plus2 Prestained Standard. Para correr los geles y separar las proteínas se utilizó el sistema Mini-Gel-Tank (Invitrogen™, A25977) en el que se añadió tampón de desplazamiento Bolt™ Mes SDS (20X) (Invitrogen™, B0002); a 90V durante 15 minutos primero, y posteriormente a 120V durante 1 hora y 15 minutos. La transferencia de las proteínas se hizo utilizando el sistema iBlot3 (Invitrogen™, IB31001), utilizando un set de membranas (Invitrogen™, IB34001), y estas se tiñeron con Ponceau S red Solution (Labkem) con el fin de visualizar la efectividad de la transferencia. El colorante se retiró lavando las membranas con TBS 1X, preparado a partir de TBS 20X (Invitrogen, J75892-K8) suplementado con Tween® 20 al 1% (Sigma-Aldrich, P1379); y estas se incubaron durante 1 hora, en leche en polvo disuelta al 5% en TBS-T, para bloquear la membrana y eximirla de uniones inespecíficas entre proteínas y anticuerpos.

Posteriormente se incubaron las membranas con los anticuerpos primarios, específicos de las proteínas de interés, incubando durante la noche entera a 4°C. Los anticuerpos usados fueron: anti-p62 (1:5000, en TBS-T, Mouse) y anti-P-JNK (1:1000, en TBS-T, Rabbit).

Una vez incubadas, se hicieron lavados de las membranas de 10 minutos, 3 o 4 veces, para dejar solo los anticuerpos que se hubieran unido; y se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundario específico para cada primario: anti-mouse IgG (1:5000, 5% leche, Goat, Southern Biotech, 1031-05), o anti-rabbit IgG (1:5000, 5% leche, Goat, Southern Biotech, 4050-05). Antes de proceder al revelado, nuevamente se lavaron las membranas durante 10 minutos 3 veces, y

después se usó el reactivo SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminiscent substrate (Invitrogen™, 34577). Este reactivo, cuando entra en contacto con la peroxidasa de rábano picante (HRP) unida al anticuerpo secundario, produce una reacción química que libera luz. Esta luz se registró con el sistema de revelado Amersham ImageQuant™ 800 (Cytiva), y los resultados se cuantificaron usando el software Fiji Image J.

3.3. Extracción y cuantificación de ARNm, y RT-qPCR

La expresión génica se analizó a partir de ARNm extraído de las células, y cuantificado por RT-qPCR. Se utilizó trizol (ThermoFisher Scientific, 15596018) para la extracción, en un proceso basado en el protocolo del fabricante. Se añadieron 0,5 ml de trizol por cada muestra, y tras 5 minutos de incubación se añadió bromo-3-cloropropano 99%. Se agito y se incubó entre 2-10 minutos. Se centrifugó durante 15 minutos a 12.000 RCFs para separar cada muestra en 3 fases: ARN, ADN, y proteína. La fase acuosa, correspondiente al ARN, se transfirió a nuevos microtubos, y se añadió isopropanol mezclando por inversión, para una incubación de 5-10 minutos. Para facilitar la centrifugación, se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 12.000 Gs, descartando el sobrenadante y lavando cuidadosamente el pellet con etanol 75%. Se hizo nuevamente una centrifugación durante 5 minutos a 7000 RCFs para descartar el sobrenadante, y dejar secar el pellet, para finalmente terminar resuspendiendo en agua libre de nucleasas.

La concentración y la calidad del ARN extraído se midió con el dispositivo NanoDrop™ One (Thermo Scientific), cargando 1,5 µl de cada muestra. A continuación, se sintetizó el ADN complementario utilizando el protocolo RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, K1622). En este paso se retrotranscribieron 2ug de ARN de cada muestra utilizando el kit anterior. La reacción, llevada a cabo en el Termociclador MiniAmp (Applied Biosystems™, 15856152), consistió en un periodo de incubación a 25°C durante 5 minutos para la hibridación de los primers, seguido de 60 minutos a 42°C para la retrotranscripción, y, por último, 5 minutos a 70°C para la inactivación enzimática.

Una vez obtenido el ADNc, se realizaron RT-qPCR usando primers específicos (Tabla 1) y la Mezcla maestra PowerTrack™ SYBR Green (Applied Biosystems™, A46109)

Gen diana	Especie	Primer forward (5'→3')	Primer reverse (3'→5')
36B4	Humano	CAGGCGTCCTCGTGGAAGTGAC	CCAGGTCGCCCTGTCTTCCCT
IL-1β	Humano	TCGAGGCACAAGGCACAACAGG	GCCATGGCTGCTTCAGACACTTGA
IL-6	Humano	CCTGAACCTTCCAAAGATGGC	TTCACCAGGCAAGTCTCCTCA
TNF-α	Humano	GAGGCCAAGCCCTGGTATG	CGGGCCGATTGATCTCAGC

Tabla 1. Tabla que muestra los cebadores utilizados en la RT-qPCR de células HEK-293-TLR4/MD2/CD14, indicando su especie, y la secuencia de nucleótidos de ambos cebadores, forward y reverse.

Se amplificaron las muestras en Roche LightCycler® 480, en un proceso que consistió en: pre-incubación (3 minutos a 95°C), amplificación (10 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C, y 30 segundos a 67°C), curva de melting (5 segundos a 95°C, 1 minuto a 65°C), y enfriamiento (10 segundos a 40°C). La fluorescencia fue registrada al final de cada ciclo. Al final del proceso se realizó una curva de *melting* para comprobar la especificidad del producto de amplificación.

3.4. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa informático GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, California, Estados Unidos). Para los análisis estadísticos de los experimentos de RT-qPCR y Western Blot, se hicieron análisis pareados, y se usó la prueba de Shapiro-Wilk para comprobar si los valores seguían una distribución normal. Según el resultado de normalidad, se eligió entre hacer una prueba paramétrica o no paramétrica. Para resultados paramétricos se ejecutó un ANOVA de una vía, y para comparar dos muestras entre sí (por ejemplo, el control con las otras condiciones), se utilizó la prueba de Dunnet. Para resultados no paramétricos se utilizó la prueba de Friedman para comparaciones múltiples, y la prueba de Wilcoxon para comparaciones entre dos muestras.

El p-valor se fijó en 0,05, y todas las muestras inferiores a este valor se consideraron significativas. Para los resultados de la RT-qPCR, se representó el valor $2^{-\Delta\Delta C_t}$ junto a las barras de error estándar. Para los resultados densitométricos del Western Blot, se normalizaron con el control (GAPDH) y se representaron junto al error estándar también.

4. Resultados

4.1. Respuesta inflamatoria en células HEK293-TLR4 estimuladas con LPS

Para evaluar la respuesta inflamatoria en células renales con sobre expresión de TLR4, se estimularon dichas células con LPS a distintos tiempos, para saber el tiempo de tratamiento óptimo. Se midieron los niveles de tres citoquinas proinflamatorias presentes en la vía de TLR4, TNF- α , IL-1 β e IL-6; mediante RT-qPCR. Se observa un gran aumento de TNF- α respecto al control, en todas las condiciones donde se aplicó el tratamiento, mostrando significancia a las 2,4 y 6 horas. La IL-1 β , aunque no es significativo, presenta un incremento que alcanza su pico más alto a las 4 horas, y va decreciendo con el tiempo hasta prácticamente volver a los niveles basales. En el caso de la IL-6, se observa también un aumento, con un incremento significativo a las 2 y 4 horas, mostrando una tendencia a volver a los valores basales con el tiempo (Figura 5A, B y C). Por otro lado, se quiso medir la expresión de P-JNK, presente en la vía de las MAPK que es también activada por la vía de TLR4, mediante un Western Blot. En los resultados se observó, a pesar de no ser significativo, un aumento a las 2 y 4 horas de tratamiento con LPS (Figura 5D).

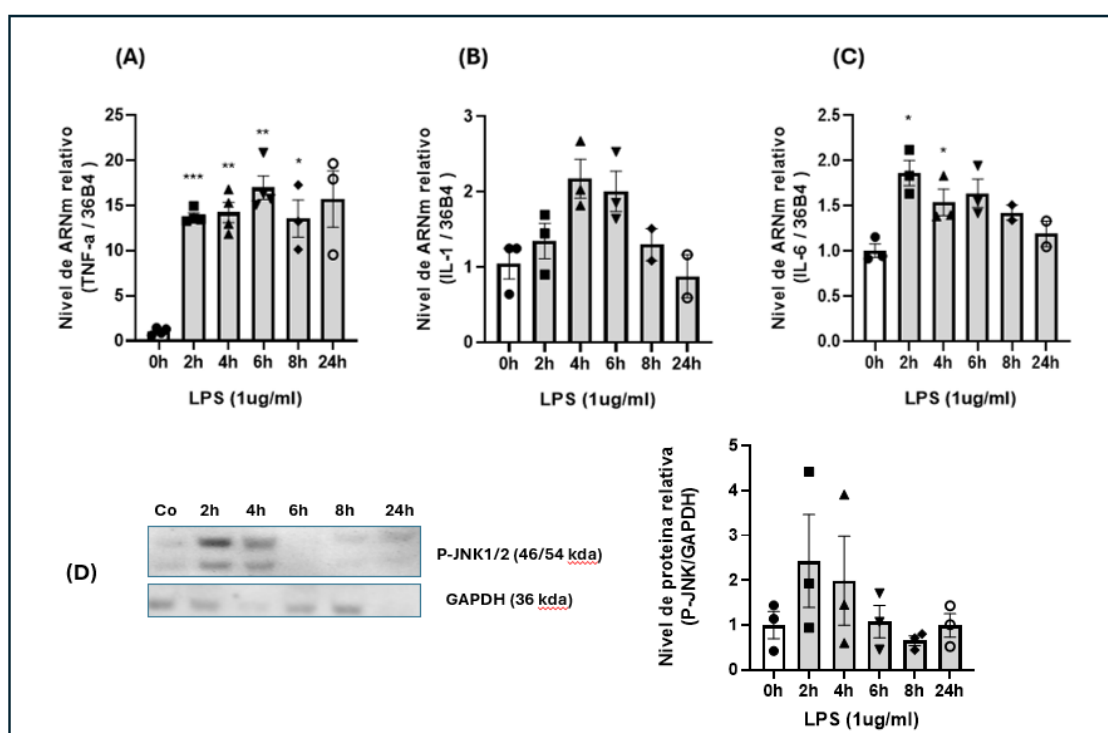


Figura 5. Efecto en la inflamación en células HEK-293-TLR4/MD2/CD14 tratadas con LPS (1 µg/ml). (A, B y C) Nivel de ARNm relativo respecto a 36B4 de TNF- α , IL-1 β , y IL-6 respectivamente (n=2-4), representado como el valor $2^{-\Delta\Delta C_t}$ promedio $\pm$ error estándar, *p < 0,05 vs control, **p < 0,01 vs control, ***p < 0,001 vs control. (D) Análisis por Western Blot y cuantificación del nivel proteico relativo de P-JNK respecto a GAPDH (n=3) representado como el valor densitométrico relativo promedio $\pm$ error estándar.

4.2. Cambios en la autofagia en respuesta al LPS en células HEK293-TLR4

Para evaluar los cambios en la autofagia en respuesta a la inflamación generada por el

tratamiento con LPS a distintos tiempos, se midieron los niveles de expresión de la proteína p62. La proteína p62 es un marcador de flujo autofágico. Para ello se realizó un Western Blot, y los resultados demuestran un aumento de p62 respecto al control. Este aumento de p62 se traduciría en una disminución de la autofagia, en respuesta a la activación LPS (Figura 6).

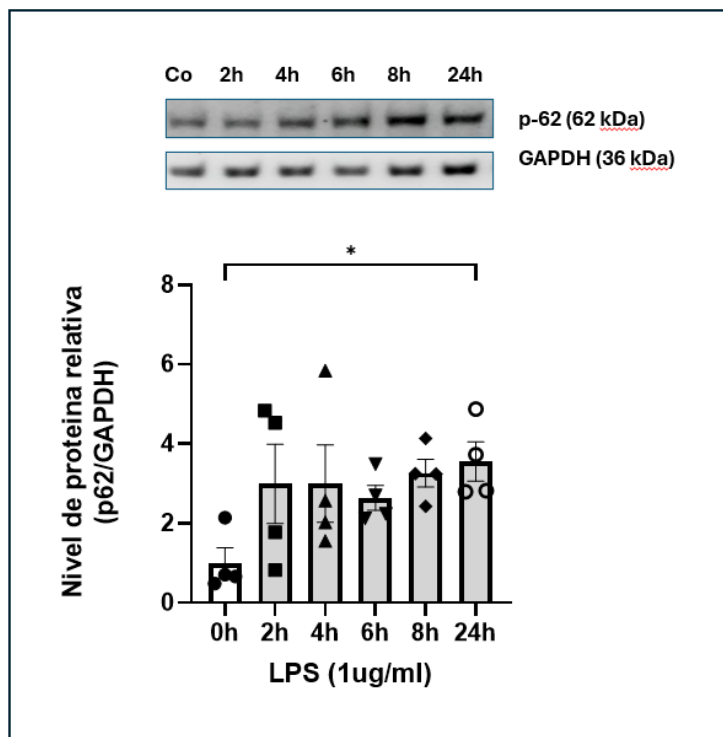


Figura 6. Efecto en la autofagia en células HEK-293-TLR4/MD2/CD14 tratadas con LPS (1 μ g/ml). Análisis por Western Blot y cuantificación del nivel proteico relativo de p62 respecto a GAPDH (n=4) representado como el valor densitométrico relativo promedio $\pm$ error estándar, *p < 0,05.

4.3. Efecto de la inflamación en la autofagia en células HEK293-TLR4

Para estudiar la posible relación entre la vía que activa TLR4 y la autofagia, se quiso ver si la inflamación tiene algún efecto en la regulación de la autofagia en estas células. Para ello se midieron los niveles de la proteína p62 estimulado con LPS a 24 horas, que es el tiempo de tratamiento en el que se había anotado un mayor aumento de esta proteína en presencia o ausencia de un inhibidor de P-JNK (SP600-125), para comprobar si una inhibición en esta vía cambiaría el flujo autofágico. Como se aprecia, el LPS produce un aumento significativo del nivel de p62 respecto al control, y por lo tanto una disminución de la autofagia. Al añadir el inhibidor de P-JNK se observa una disminución significativa de p62, que regresa prácticamente a los niveles basales, que se traduce en un restablecimiento de la autofagia.

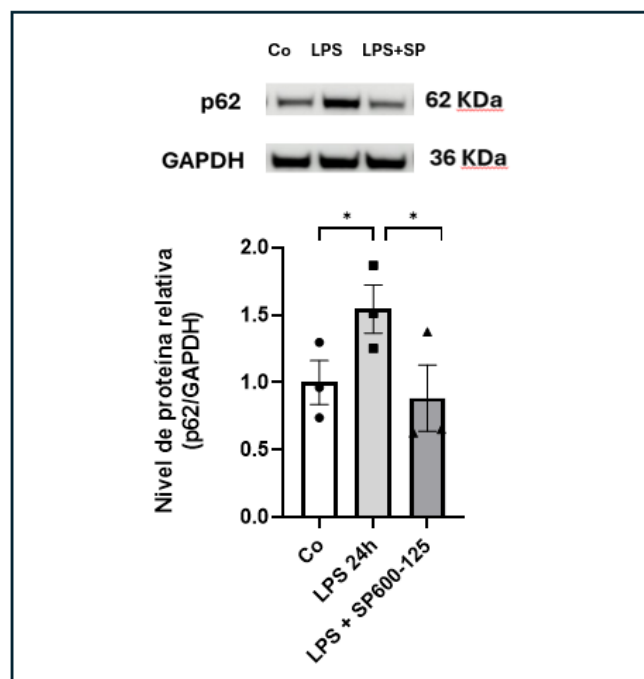


Figura 7. Efecto de la inflamación sobre la autofagia en células HEK-293-TLR4/MD2/CD14 tratadas con LPS (1 μ g/ml). Análisis por Western Blot representativo y cuantificación del nivel proteico relativo de p62 respecto a GAPDH (n=3) representado como el valor densitométrico relativo promedio $\pm$ error estándar, *p < 0,05 vs control.

4.4. Efecto de la autofagia sobre la inflamación en células HE293K-TLR4

Siguiendo con el estudio de la posible relación y regulación entre la vía de TLR4 y la autofagia, en este caso se quiso analizar el papel de la autofagia sobre la inflamación. Para ello se estimularon las células con LPS a 4 horas, que es en el punto en el que se había visto que aumentaba más la inflamación, y se trató con bafilomicina, un antibiótico que inhibe la autofagia. En primer lugar, se quiso ver como variaba la expresión proteica de P-JNK, y aunque los resultados no fueron estadísticamente significativos, se aprecia un aumento de nivel de expresión con la bafilomicina, respecto a las células tratadas solo con LPS. Además, se midió la expresión de las citoquinas clásicas analizadas anteriormente, TNF- α , IL-1 β e IL-6. No se observaron diferencias significativas con la bafilomicina en el caso de TNF- α , tan solo se observa lo ya analizado anteriormente, un aumento de expresión al aplicar LPS. En el caso de las interleucinas 1 y 6, tampoco se ven diferencias significativas, aunque podría observarse una ligera disminución de la inflamación en el caso de las células tratadas con LPS y bafilomicina, respecto a las células tratadas solo con LPS.

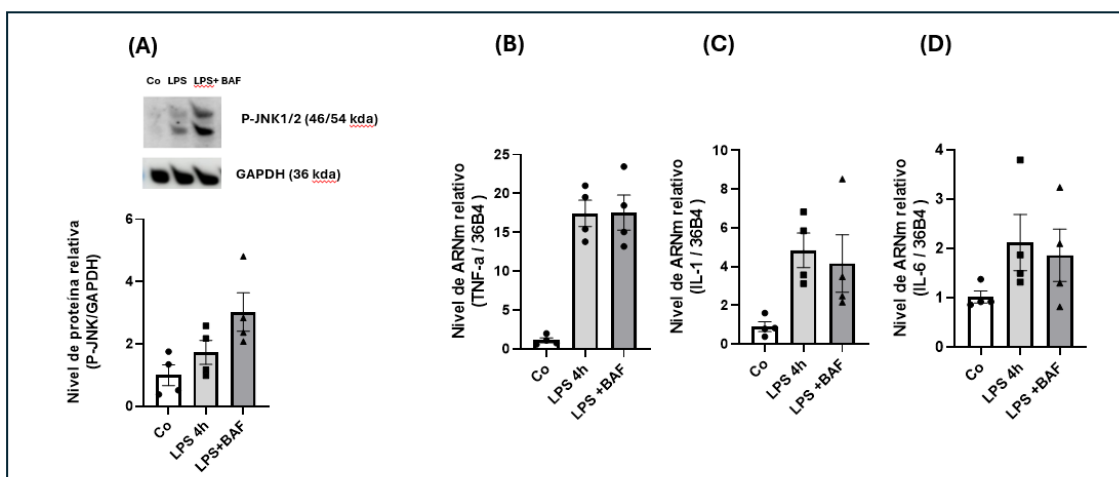


Figura 8. Efecto de la autofagia sobre la inflamación en células HEK-293-TLR4/MD2/CD14 tratadas con LPS (1 μ g/ml) y bafilomicina. (A). Análisis por Western Blot y cuantificación del nivel proteico relativo de P-JNK respecto a GAPDH (n=4) representado como el valor densitométrico relativo promedio $\pm$ error estándar, *p < 0,05. (B, C y D) Nivel de ARNm relativo respecto a 36B4 de TNF- α , IL-1 β , y IL-6 respectivamente (n=4), representado como el valor $2^{-\Delta\Delta C_t}$ promedio $\pm$ error estándar.

5. Discusión

El receptor TLR4 es un mediador central en la inflamación, que participa en el progreso de la ERC, contribuyendo a su desarrollo y a la inflamación persistente de bajo grado que la caracteriza. El estudio de nuestra hipótesis sobre la regulación de la autofagia por este receptor es importante para un mayor conocimiento de los mecanismos moleculares de la enfermedad. El entendimiento de cómo funciona la enfermedad a nivel celular es clave para que en un futuro puedan desarrollarse nuevas terapias que consigan frenar la progresión de esta patología. Este trabajo ha comprobado que la activación del receptor TLR4 con LPS en células HEK-TLR4 induce una respuesta inflamatoria, relacionada con los mecanismos de progresión de la ERC. Además, se detecta una desregulación de la autofagia tras dicha activación, pudiendo este proceso ser partícipe también de la patología. Los resultados sugieren que la inflamación y la regulación de la autofagia observados tras la activación de TLR4 no son dos sucesos independientes. En estas células, la inflamación participa en la regulación de autofagia observada.

La activación de TLR4 dependiente de Myd88 por LPS conduce al comienzo de una cascada de señalización clásica activando NF- κ B y otras vías inflamatorias. Para demostrar que se estaba produciendo un estado inflamatorio en células HEK293-TLR4, se analizaron las citoquinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, y también P-JNK, resultando en un aumento de todas ellas respecto a los controles. El aumento de estas citoquinas en otros estudios, mediante estimulación por LPS, ha sido ya documentado anteriormente en diferentes tipos celulares, por ejemplo, en células de músculo liso vascular, células de la microglía, en macrófagos, en células del epitelio bronquial o en células linfoides (49–53) Además, en células renales como las del epitelio tubular (HK2) también se vio reflejado este resultado (54). La activación sostenida de estos factores

proinflamatorios podría estar relacionada directamente con la inflamación crónica de bajo grado presente en la ERC.

La autofagia es un proceso clave en el mantenimiento de la homeostasis y en la supervivencia de las células bajo condiciones de estrés, que se activa bajo ciertos estímulos como la hipoxia, la inanición, o el daño (31,35). En este estudio la activación del receptor TLR4 mediante LPS se asoció también a una posible alteración en el proceso autofágico. Los resultados indican que la activación de TLR4 reduce la autofagia en células HEK293 que sobreexpresan TLR4. Otros estudios realizados en podocitos y células epiteliales de pacientes con enfermedad renal diabética respaldan los hallazgos, pues la autofagia se ve también disminuida, produciéndose una acumulación de LC3-II y p62. (55). Además, en otras patologías que afectan al riñón como la cistinosis, que causa daño tubular, también se ha documentado una disminución de la autofagia indicada por una acumulación de p62 (56). Previamente la influencia de la autofagia en patología y daño renal ha sido reportada. Como se describe anteriormente, ratones inducidos con daño agudo renal y con el gen ATG5 o ATG7 “knock-out”, tuvieron peor pronóstico presentando pérdida de función renal, daño en el ADN y fibrosis, comparados con los “wild-type”, demostrando así el papel protector de la autofagia en alteraciones renales (35,46,57). Sin embargo, no en todos los casos se reporta una disminución de la autofagia como mecanismo patológico, sino que en algunos casos ocurre lo contrario, y un exceso de autofagia se ve relacionado directamente con el proceso de fibrosis renal, activando FGF2, y aumentando la producción de fibroblastos (47). Esta relación entre autofagia y fibrosis se ha reportado en estudios con el modelo de UUO (48).

Al analizar el nivel de autofagia con y sin el inhibidor de P-JNK, se observó una diferencia significativa de expresión de p62 en la que el inhibidor parecía reestablecer el flujo autofágico disminuido en la inflamación. Este efecto podría tratarse de una regulación de la inflamación, y más concretamente de la vía de las MAPK, sobre la autofagia, siendo la responsable de su disminución. No existe mucha información recopilada sobre esta interacción, pero hay algunos artículos en los que se documenta una relación entre autofagia y MAPK. Concretamente se documentó que p38, de la familia de las MAPK, fosforilaba de manera directa a ATG5, y posteriormente se comprobó que esta fosforilación conducía a una alteración del flujo autofágico (58). No solo eso, investigaciones pasadas hablan de probable efecto de algunas interleucinas, como IL-6, sobre la inhibición autofágica. En este caso se describía el papel regulatorio de IL-6, que mediante STAT3, inhibía la autofagia, en una línea celular mieloide (59).

La disminución de autofagia ocurre a las 24 horas, mientras que el aumento de inflamación ocurre en momentos más tempranos. Por esta razón, entendemos que la regulación de la autofagia no está relacionada con la inflamación producida por la activación de TLR4. Aun así,

quisimos comprobar si la inhibición de la autofagia basal podía influir en la inflamación producida por LPS. Los resultados sugieren que la autofagia basal no participa en la inflamación producida por LPS en células HEK293-TLR4. Sin embargo, recientemente se investigó una probable regulación de la autofagia sobre las MAPK, en la que parecía que la autofagia activaba MAPK/ERK en células tubulares renales. Se demostró también que la inhibición de estos mediadores inflamatorios disminuía la transcripción de FGF2, y que por lo tanto la autofagia mediante esta vía MAPK contribuía a la fibrosis (47). Otras investigaciones evidenciaron también que la autofagia sí que es capaz de regular mediadores inflamatorios en macrófagos con deficiencia de algunas ATGs. La falta de autofagia exacerbaba la secreción de algunas citoquinas como la IL-1 β o IL-18 en respuesta a estímulos que activaban a TLR3 o TLR4 (60). Quizá podría estudiar la regulación de la autofagia sobre la inflamación a tiempos mas tardíos, más allá de 24 horas.

El estudio ha tenido una serie de limitaciones, que han de tenerse en cuenta. Una de ellas, y de las más importantes es el pequeño tamaño muestral con el que se ha trabajado, y por tanto la baja potencia estadística. Algunos de los resultados obtenidos, señalan posibles hallazgos y muestran una tendencia interesante, pero carecen de significancia estadística, por lo que sería conveniente realizar estudios con un mayor número de muestras para comprobarlo.

6. Conclusiones/Conclusions

Como conclusión del trabajo, la activación de TLR4 en células HEK-TLR4, produce una desregulación de la autofagia, que además parece estar regulada por la inflamación.

- Se demostró que la estimulación con LPS en estas células producía una respuesta inflamatoria, y esta respuesta está relacionada una disminución de la autofagia.
- La inhibición de la inflamación restablece la autofagia, disminuida como consecuencia de la activación de TLR4, indicando una posible regulación entre estos procesos.
- La autofagia no muestra indicios de establecer una regulación sobre la inflamación, al menos en los tiempos estudiados.

De cara al futuro y para continuar con el proyecto, sería recomendable profundizar en el estudio de la posible regulación entre inflamación y autofagia para obtener resultados más concluyentes. Aunque nuestros datos sustentan gran parte de la hipótesis planteada, ampliar el tamaño muestral permitiría mejorar la potencia estadística, además de analizar otros mediadores de la vía autofágica como por ejemplo diferentes ATGs para comprobar la disminución observada.

As a conclusion of this project, the activation of TLR4 in HEK-TLR4 cells leads to dysregulation of autophagy, which also appears to be influenced by inflammation.

- *It was demonstrated that stimulation with LPS in these cells induced an inflammatory response and caused a decrease in autophagy.*
- *Inhibition of inflammation leads to restoration of autophagy, which was reduced as a result of TLR4 activation, indicating a possible regulatory relationship between these processes.*
- *Autophagy does not appear to have any regulatory effect on inflammation.*

Looking ahead and to continue the Project, it would be recommendable to continue investigating the potential regulation between inflammation and autophagy, to obtain more conclusive results. Although significant data were not obtained for the objectives, other studies support the proposed hypothesis. Increasing the sample size would improve statistical power, and analysing additional mediators of the autophagy pathway, such as LC3 or ATGs could help confirm the observed decrease.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ammirati AL. Chronic Kidney Disease. *Rev Assoc Médica Bras*. 13 de enero de 2020;66:s03-9.
2. Kalantar-Zadeh K, Jafar TH, Nitsch D, Neuen BL, Perkovic V. Chronic kidney disease. *The Lancet*. 28 de agosto de 2021;398(10302):786-802.
3. Chen TK, Knicely DH, Grams ME. Chronic Kidney Disease Diagnosis and Management. *JAMA*. 1 de octubre de 2019;322(13):1294-304.
4. Bikbov B, Purcell C, Levey AS, Smith M, Abdoli A, Abebe M, et al. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*. 2020;395(10225):709-33.
5. Diabetic Nephropathy: Update on Pillars of Therapy Slowing Progression | Diabetes Care | American Diabetes Association [Internet]. [citado 23 de junio de 2025]. Disponible en: <https://diabetesjournals.org/care/article/46/9/1574/153530/Diabetic-Nephropathy-Update-on-Pillars-of-Therapy>
6. Jankowski J, Floege J, Fliser D, Böhm M, Marx N. Cardiovascular Disease in Chronic Kidney Disease. *Circulation*. 16 de marzo de 2021;143(11):1157-72.
7. Kadatane SP, Satariano M, Massey M, Mongan K, Raina R. The Role of Inflammation in CKD. *Cells*. enero de 2023;12(12):1581.
8. Vijay K, Neuen BL, Lerma EV. Heart Failure in Patients with Diabetes and Chronic Kidney Disease: Challenges and Opportunities. *Cardiorenal Med*. 19 de noviembre de 2021;12(1):1-10.
9. Salanova Villanueva L, Santos Sánchez-Rey B, Sanz Sainz M. Mecanismos inflamatorios y fibróticos en la enfermedad renal. Protagonistas y terapéutica. *Rev Lab Clínico*. 1 de octubre de 2018;11(4):227-37.
10. Andrade-Oliveira V, Foresto-Neto O, Watanabe IKM, Zatz R, Câmara NOS. Inflammation in Renal Diseases: New and Old Players. *Front Pharmacol*. 8 de octubre de 2019;10:1192.
11. Lee H, Fessler MB, Qu P, Heymann J, Kopp JB. Macrophage polarization in innate immune responses contributing to pathogenesis of chronic kidney disease. *BMC Nephrol*. 13 de julio de 2020;21(1):270.
12. Holle J, Bartolomaeus H, Löber U, Behrens F, Bartolomaeus TUP, Anandakumar H, et al. Inflammation in Children with CKD Linked to Gut Dysbiosis and Metabolite Imbalance. *J Am Soc Nephrol JASN*. diciembre de 2022;33(12):2259-75.
13. Wu W, Wang X, Yu X, Lan HY. Smad3 Signatures in Renal Inflammation and Fibrosis. *Int J Biol Sci*. 28 de marzo de 2022;18(7):2795-806.
14. Russa AL, Serra R, Faga T, Crugliano G, Bonelli A, Coppolino G, et al. Kidney Fibrosis and Matrix Metalloproteinases (MMPs). *Front Biosci-Landmark*. 16 de mayo de 2024;29(5):192.
15. Yan MT, Chao CT, Lin SH. Chronic Kidney Disease: Strategies to Retard Progression. *Int J Mol Sci*. 18 de septiembre de 2021;22(18):10084.
16. Georgianos PI, Vaios V, Eleftheriadis T, Papachristou E, Liakopoulos V. Therapeutic Advances in Diabetic Kidney Disease. *Int J Mol Sci*. 1 de febrero de 2023;24(3):2803.
17. Kawai T, Ikegawa M, Ori D, Akira S. Decoding Toll-like receptors: Recent insights and perspectives in innate immunity. *Immunity*. 9 de abril de 2024;57(4):649-73.
18. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 24 de febrero de 2006;124(4):783-801.
19. Wang S, Zhang K, Huang Q, Meng F, Deng S. TLR4 signalling in ischemia/reperfusion injury: a promising target for linking inflammation, oxidative stress and programmed cell death to improve organ transplantation outcomes. *Front Immunol*. 18 de julio de 2024;15:1447060.
20. Fitzgerald KA, Kagan JC. Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell*. 19 de marzo de 2020;180(6):1044-66.
21. Vázquez-Carballo C, Guerrero-Hue M, García-Caballero C, Rayego-Mateos S, Opazo-Ríos L, Morgado-Pascual JL, et al. Toll-Like Receptors in Acute Kidney Injury. *Int J Mol Sci*. 15 de enero de 2021;22(2):816.
22. Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H, Lee JO. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4–MD-2 complex. *Nature*. abril de 2009;458(7242):1191-5.
23. Ryu JK, Kim SJ, Rah SH, Kang JI, Jung HE, Lee D, et al. Reconstruction of LPS Transfer Cascade Reveals Structural Determinants within LBP, CD14, and TLR4-MD2 for Efficient LPS Recognition and Transfer. *Immunity*. 17 de enero de 2017;46(1):38-50.
24. Luo R, Yao Y, Chen Z, Sun X. An examination of the LPS-TLR4 immune response through the analysis of molecular structures and protein–protein interactions. *Cell Commun Signal CCS*. 18 de marzo de 2025;23:142.

25. Ciesielska A, Matyjek M, Kwiatkowska K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 15 de octubre de 2020;78(4):1233-61.
26. Pereira M, Durso DF, Bryant CE, Kurt-Jones EA, Silverman N, Golenbock DT, et al. The IRAK4 scaffold integrates TLR4-driven TRIF and MYD88 signaling pathways. *Cell Rep*. 16 de agosto de 2022;40(7):111225.
27. Anderberg SB, Luther T, Frithiof R. Physiological aspects of Toll-like receptor 4 activation in sepsis-induced acute kidney injury. *Acta Physiol Oxf Engl*. marzo de 2017;219(3):573-88.
28. Jun YK, Kwon SH, Yoon HT, Park H, Soh H, Lee HJ, et al. Toll-like receptor 4 regulates intestinal fibrosis via cytokine expression and epithelial-mesenchymal transition. *Sci Rep*. 16 de noviembre de 2020;10(1):19867.
29. Li XX, Jiang DY, Huang XX, Guo SL, Yuan W, Dai HP. Toll-like receptor 4 promotes fibrosis in bleomycin-induced lung injury in mice. *Genet Mol Res GMR*. 21 de diciembre de 2015;14(4):17391-8.
30. Palacios-Ramirez R, Soulié M, Fernandez-Celis A, Nakamura T, Boujardine N, Bonnard B, et al. Mineralocorticoid receptor (MR) antagonist eplerenone and MR modulator bicalcicrenone prevent renal extracellular matrix remodeling and inflammation via the MR/proteoglycan/TLR4 pathway. *Clin Sci*. 22 de agosto de 2024;138(16):1025-38.
31. Matsuzawa-Ishimoto Y, Hwang S, Cadwell K. Autophagy and Inflammation. *Annu Rev Immunol*. 26 de abril de 2018;36:73-101.
32. Tang C, Livingston MJ, Liu Z, Dong Z. Autophagy in kidney homeostasis and disease. *Nat Rev Nephrol*. septiembre de 2020;16(9):489-508.
33. Liu S, Yao S, Yang H, Liu S, Wang Y. Autophagy: Regulator of cell death. *Cell Death Dis*. 4 de octubre de 2023;14(10):648.
34. Morishita H, Mizushima N. Diverse Cellular Roles of Autophagy. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 6 de octubre de 2019;35(Volume 35, 2019):453-75.
35. Bhatia D, Choi ME. Autophagy and mitophagy: physiological implications in kidney inflammation and diseases. *Am J Physiol-Ren Physiol*. julio de 2023;325(1):F1-21.
36. Yu L, Chen Y, Tooze SA. Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. *Autophagy*. 31 de diciembre de 2017;14(2):207-15.
37. Cayo A, Segovia R, Venturini W, Moore-Carrasco R, Valenzuela C, Brown N. mTOR Activity and Autophagy in Senescent Cells, a Complex Partnership. *Int J Mol Sci*. 29 de julio de 2021;22(15):8149.
38. Interacciones lípido-proteína en autofagia [Internet]. [citado 24 de junio de 2025]. Disponible en: <https://sebbm.es/revista/dosier/interacciones-lipido-proteina-en-autofagia/>
39. Khaminets A, Behl C, Dikic I. Ubiquitin-Dependent And Independent Signals In Selective Autophagy. *Trends Cell Biol*. enero de 2016;26(1):6-16.
40. Lippai M, Löw P. The Role of the Selective Adaptor p62 and Ubiquitin-Like Proteins in Autophagy. *BioMed Res Int*. 2014;2014:832704.
41. Zhang K, Huang Q, Deng S, Yang Y, Li J, Wang S. Mechanisms of TLR4-Mediated Autophagy and Nitroxidative Stress. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 22 de octubre de 2021 [citado 24 de junio de 2025];11. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/cellular-and-infection-microbiology/articles/10.3389/fcimb.2021.766590/full>
42. Lee JW, Nam H, Kim LE, Jeon Y, Min H, Ha S, et al. TLR4 (toll-like receptor 4) activation suppresses autophagy through inhibition of FOXO3 and impairs phagocytic capacity of microglia. *Autophagy*. 13 de diciembre de 2018;15(5):753-70.
43. Min Y, Kim MJ, Lee S, Chun E, Lee KY. Inhibition of TRAF6 ubiquitin-ligase activity by PRDX1 leads to inhibition of NFκB activation and autophagy activation. *Autophagy*. 23 de julio de 2018;14(8):1347-58.
44. Zhou M, Xu W, Wang J, Yan J, Shi Y, Zhang C, et al. Boosting mTOR-dependent autophagy via upstream TLR4-MyD88-MAPK signalling and downstream NF-κB pathway quenches intestinal inflammation and oxidative stress injury. *EBioMedicine*. 29 de agosto de 2018;35:345-60.
45. Kaushal GP, Chandrashekar K, Juncos LA, Shah SV. Autophagy Function and Regulation in Kidney Disease. *Biomolecules*. 7 de enero de 2020;10(1):100.
46. Zhang Y, Yu C, Li X. Kidney Aging and Chronic Kidney Disease. *Int J Mol Sci*. 14 de junio de 2024;25(12):6585.
47. Livingston MJ, Zhang M, Kwon SH, Chen JK, Li H, Manicassamy S, et al. Autophagy activates EGR1 via MAPK/ERK to induce FGF2 in renal tubular cells for fibroblast activation and fibrosis during maladaptive kidney repair. *Autophagy*. mayo de 2024;20(5):1032-53.
48. Livingston MJ, Ding HF, Huang S, Hill JA, Yin XM, Dong Z. Persistent activation of autophagy in kidney

- tubular cells promotes renal interstitial fibrosis during unilateral ureteral obstruction. *Autophagy*. 28 de abril de 2016;12(6):976-98.
49. Yunna C, Mengru H, Lei W, Weidong C. Macrophage M1/M2 polarization. *Eur J Pharmacol*. 15 de junio de 2020;877:173090.
50. Lin FY, Chen YH, Tasi JS, Chen JW, Yang TL, Wang HJ, et al. Endotoxin induces toll-like receptor 4 expression in vascular smooth muscle cells via NADPH oxidase activation and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. diciembre de 2006;26(12):2630-7.
51. Zhang X, Dong H, Zhang S, Lu S, Sun J, Qian Y. Enhancement of LPS-induced microglial inflammation response via TLR4 under high glucose conditions. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol*. 2015;35(4):1571-81.
52. TLR4-mediated IRAK1 activation induces TNF- α expression via JNK-dependent NF- κ B activation in human bronchial epithelial cells - Sae Hoon Park, Hye-Jin Choi, So Young Lee, Joong-Soo Han, 2015 [Internet]. [citado 26 de junio de 2025]. Disponible en: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1721727x15619185>
53. She L, Alanazi HH, Xu Y, Yu Y, Gao Y, Guo S, et al. Direct activation of toll-like receptor 4 signaling in group 2 innate lymphoid cells contributes to inflammatory responses of allergic diseases. *iScience*. 23 de octubre de 2024;27(11):111240.
54. Xu JW, Wang MY, Mao Y, Hu ZY, Miao XL, Jiang F, et al. Inhibition of STAT3 alleviates LPS-induced apoptosis and inflammation in renal tubular epithelial cells by transcriptionally down-regulating TASP1. *Eur J Med Res*. 6 de enero de 2024;29(1):34.
55. Liu WJ, Gan Y, Huang WF, Wu H luan, Zhang X qin, Zheng HJ, et al. Lysosome restoration to activate podocyte autophagy: a new therapeutic strategy for diabetic kidney disease. *Cell Death Dis*. 24 de octubre de 2019;10(11):806.
56. Sansanwal P, Sarwal MM. p62/SQSTM1 prominently accumulates in renal proximal tubules in nephropathic cystinosis. *Pediatr Nephrol Berl Ger*. noviembre de 2012;27(11):2137-44.
57. Kaushal GP, Chandrashekar K, Juncos LA, Shah SV. Autophagy Function and Regulation in Kidney Disease. *Biomolecules*. 7 de enero de 2020;10(1):100.
58. Höcker R, Walker A, Schmitz I. Inhibition of autophagy through MAPK14-mediated phosphorylation of ATG5. *Autophagy*. 1 de marzo de 2013;9(3):426-8.
59. Qin B, Zhou Z, He J, Yan C, Ding S. IL-6 Inhibits Starvation-induced Autophagy via the STAT3/Bcl-2 Signaling Pathway. *Sci Rep*. 9 de noviembre de 2015;5:15701.
60. Qian M, Fang X, Wang X. Autophagy and inflammation. *Clin Transl Med*. 26 de julio de 2017;6:24.

Declaración de uso de herramientas de inteligencia artificial: en este trabajo se utilizaron herramientas de inteligencia artificial, únicamente para la comprensión y aclaración de ciertos conceptos, y también para la reformulación de algunos párrafos. El contenido científico, análisis y conclusiones se han elaborado de manera personal.