

Universitat de Lleida

Papel de BTLA en el eje cardio-renal

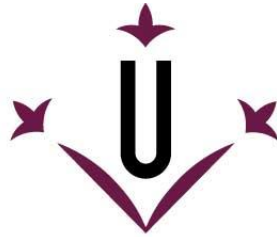
Nuria Doladé Masot

<http://hdl.handle.net/10803/687933>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat de Lleida

TESI DOCTORAL

Papel de BTLA en el eje cardio-renal

Nuria Doladé Masot

Memòria presentada per optar al grau de Doctor per la Universitat de
Lleida

Programa de Doctorat en salut

Director/a

Jose Manuel Valdivielso Revilla

Sandra Rayego Mateos

Tutor/a

Jose Manuel Valdivielso Revilla

2023



Lleida, 22 de setembre de 2022

Jose Manuel Valdivielso Revilla, professor agregat de la Facultat de Medicina de Lleida, investigador principal del IRBLleida co-director i tutor de la tesi amb títol 'Papel de BTLA en el eje cardio-renal' de la doctoranda Nuria Dolade Masot, i Sandra Rayego Mateo, co-directora de la mateixa tesi

CERTIFICAN:

Que la memòria presentada per la doctoranda compleixi tots els criteris explicats en la normativa de l'escola de doctorands per a optar al grau de Doctor per la Universitat de Lleida dins el programa de doctorat en salut.

Atentament,

Jose Manuel Valdivielso

Sandra Rayego Mateos

A mis padres
Al padrí Arturo
A la yaya Paqui
A Sandra

“Aprendí a levantarme y a seguir el camino con la mochila llena de lecciones para la siguiente caída”

AGRADECIMIENTOS

No puedo creer que finalmente haya llegado este día, ojalá pudiera hablar con esa chica de 23 años asustada que se metió en este proceso persiguiendo un sueño, ojalá poder hablar con esa persona que fui durante todo este proceso y decirle que fue duro, que sufrimos, pero que finalmente lo conseguimos, que el miedo que sentíamos al principio nunca se fue del todo pero que poco a poco aprendimos a vivir con él y entendimos que solo los ignorantes creen saberlo todo, y que, cuanto más aprendíamos, menos sabíamos y más aumentaban nuestras ganas de aprender. Cada día de esta etapa ha sido una lucha, una lucha conmigo misma por superarme profesional y personalmente, una lucha que me ha hecho crecer, que me ha enseñado que, con apoyo de tu gente, todo, absolutamente TODO es posible, y una lucha de la que me llevo grandes personas y grandes lecciones.

Recuerdo perfectamente el día que realicé mi entrevista con Elvira y Jose, los nervios que sentía y lo pequeñita que me veía a su lado, dentro de un instituto de investigación, imaginando que algún día podría formar parte de todo aquello. Tengo que darles las gracias a ambos, porque desde ese día, decidieron apostar por mí sin ni siquiera conocerme, gracias por darme esta oportunidad. Aunque con Elvira no tuve mucho contacto, pues ella ya estaba en sus últimos años antes de jubilarse, Jose enseguida me presentó a los que iban a ser mis próximos compañeros. Recuerdo con especial cariño cuando me dejó en manos de una tal "Sandra de Madrid", una chica recién aterrizada en el laboratorio que cuando me vio tuvo que pensar: "menudo lo que se me viene encima", de esto no tengo pruebas, pero tampoco dudas. Sandra, en ese momento jamás imaginé que ibas a convertirte en alguien tan importante para mí. Aunque nos separaban años de conocimientos, siempre respondiste todas mis preguntas (que no fueron pocas xD) y me explicaste detalladamente cada uno de nuestros pasos (aunque sé que muchas veces te sacaba de quicio 😊). Recuerdo todos aquellos años con muchísimo cariño, porque juntas somos invencibles, como la Pili y la Mili, todo el día juntas para arriba, para abajo, sacrificios eternos, cultivos fallidos, PCRs y más PCRs... con más paciencia que un santo para aguantar mis liadas de principiante (y no tan principiante, hay que ser honestos). Poco a poco, nuestras charlas dejaron de ser únicamente laborales y de ti recibí los mejores consejos y afirmo, con total seguridad, que me fortalecí como persona junto a ti y, sobre todo, gracias a ti. Contigo pasé unos de los mejores años de mi vida, a pesar de algunas circunstancias, siempre riéndonos, siempre sobreponiéndonos a todo y a todos, disfrutando de esa enorme amistad que habíamos forjado. Tu siempre creíste en mí, incluso cuando ni yo misma lo hacía, siempre me tendiste la mano, me ayudaste y me distes fuerzas cuando ni tu misma las tenías, lo compartiste todo conmigo y no tengo páginas suficientes para agradecerte todas las cosas que hiciste y haces por mí, día a día, eres una grandísima científica y una persona espectacular, ojalá llegue algún día a parecerme, aunque sea un poquito, a ti. El doctorado me ha regalado una de las personas más importantes de mi vida y a ella le debo todo este trabajo, porque sin ella, nada hubiera sido posible. Además, me gustaría agradecer con el corazón a todo su entorno, sus padres, Pablo y Esther, a Jose, Carla, Chipi, Patri y a la pequeña galita, que desde el minuto 0 me acogieron como una más en sus vidas y me hicieron sentir parte de la familia, de verdad os deseo lo mejor a todos y cada uno de vosotros, no os quepa duda que vendré a Madrid a celebrarlo con vosotros. Os quiero.

Durante esta etapa han pasado muchas personas por mi lado y ahora soy yo la que se va, pero no sin antes agradecer esos primeros años que me dieron el grupo de "IRB excursionistas" haciéndome sentir parte de algo, gracias por las comidas, las charlas, las fiestas, carnavales... TODO. Especialmente quiero agradecer a mis compañeras de laboratorio. A Aurora, con la que he compartido todo este trayecto, le agradezco toda su ayuda, esa complicidad de los primeros años, esas conversaciones interminables, esas cervezas postwork y esos ánimos que siempre me

ha dado, siempre a la par, en ti encontré una amiga. A Maria y a Pau, esa pareja tan adorable, siempre les agradeceré su humildad, su sinceridad, la paz que siempre me transmitieron y, como no, las cenas navideñas en su casa. A Maite le agradezco que siempre tuviera un momento para ayudarme, ella siempre sabía las respuestas a todas mis preguntas, y, aunque me repitiera mas que el ajo, siempre estuvo dispuesta a responderme. A Juanmi, que llegó revolucionándolo todo, gracias por transmitir esa alegría que te caracteriza. A Ana, gracias por gestionarnos todos los pedidos sin oponer problema y estar dispuesta a ayudar siempre que se la necesitaba. A mi pequeña Alicia, que siempre estuvo allí apoyándome, escuchando todos mis dramas y permaneciendo a mi lado, quiero agradecerle, por un lado, todo el gran soporte técnico que me ha brindado durante estos años, siendo una gran profesional, pero también quiero agradecerle enormemente todas esas comidas (con nuestros tupperes de verduras, claro) que me hicieron darme cuenta de la gran persona que tenía a mi lado, gracias por hacer siempre todo lo posible por ayudarme, por acompañarme día tras día y por alegrarme los días cuando más lo necesitaba, eres oro amiga. Como compañera, no puedo olvidarme de Jessica, “la del sur”, que tantas risas me robó y la que hizo que me sintiera orgullosa de haberla guiado durante sus prácticas de máster y a la que desearía volver a ver. También agradezco muchísimo al Dr. Serafi Cambray y al Dr. Marcelino Bermúdez por su soporte, apoyo y motivación durante todo este proceso. Agradezco también a todos los nuevos compañeros que, lamentablemente, ya no he podido conocer en profundidad y os deseo a todos lo mejor.

También quiero dar las gracias a la Dra. Marta Ruiz, que me acogió en su laboratorio como una más, me permitió aprender junto a ella, me ayudó incluso sin pedírselo y acrecentó mi amor por la ciencia. Gracias a ella, conocí a otra gran científica, la Dra. Anna Sola a la que quiero agradecerle enormemente la libertad, la comprensión y la ayuda que me ha brindado durante estos últimos meses redactando mi tesis. Le agradezco enormemente a ella y al Dr. Josep Maria Cruzado la oportunidad que me están brindado. Además, me gustaría agradecer especialmente a mis compañeros actuales, Ana y Cristian, por su paciencia conmigo y todo su apoyo en esta última etapa. Sé que juntos haremos grandes cosas.

Una mención especial a mi compañera de universidad, la próxima doctora Capitán. Qué suerte haberte encontrado y seguir teniéndote cada día. Gracias por estos 10 años de amistad, por demostrarme que no importa la distancia cuando alguien te importa de verdad, por enseñarme a querer a alguien como hermana, sin serlo, por esas videollamadas semanales y esas birras a distancia que tan bien sientan y por nuestras quedadas que son imperdonables. Sabes que te adoro, vas a llegar muy lejos, confía en ti.

Y ahora, dejando de lado todos los amigos y compañeros que me llevo de mis años en el mundo científico. Toca pasar a los que llevan a mi lado toda una vida y que sin ellos nada hubiera sido posible.

Gracias a mis niñas de Fraga, mi piña favorita, la familia que uno elige. Gracias a ellas por compartir mis locuras, por creer en mí, animarme, entenderme y hacer que se me olviden todos mis problemas cuando estoy con vosotras... en fin, gracias por estar ahí a pesar del tiempo y la distancia, sois mi hogar, sois las de siempre y espero que estéis por siempre. Os quiero mucho Maria, Raquel, Tere, Albeta, Andrea U, Andrea E, Belu, Carol, Chin, Sali, Eva P, Eva O, Ido, Leyre, Silvia, Nogui y Xanxi.

Gracias a toda mi familia, que siempre han estado aquí apoyándome y animándome a superarme día tras día, porque sois la suerte de mi vida y os quiero con todas mis fuerzas! Gracias a mi alma gemela, Raquel, que además de una prima es una grandísima amiga, un te

quiero se queda corto, y, aunque redujera estos agradecimientos a los últimos años, con 4 líneas no me da ni siquiera para empezar, aun así todos los momentos me los llevo conmigo para siempre, no me faltes nunca. Me gustaría agradecer de forma especial a la “yaya Paqui” por estar siempre ahí para todos nosotros, por cuidarnos y querernos como solo tu sabes hacer, te quiero muchísimo, gracias por estar siempre junto a mí. También quiero agradecer al “padrú Arturo”, al que se le llenaba la boca diciendo que su nieta estaba haciendo un doctorado, aunque no supiera muy bien que significaba eso, ojalá estuvieras aquí a mi lado y pudiera compartir contigo toda la alegría que siento, estes donde estes, te recuerdo siempre, te quiero y te echo de menos.

Mamá, Papá, sabéis que un pequeño párrafo en unas páginas no puede expresar toda la gratitud que siento por vosotros. Apostasteis por mi desde el principio, me cuidasteis, me disteis valores y me enseñasteis a luchar por lo que quiero, costara lo que costara. Si de alguien es esta tesis, es VUESTRA, porque gracias a vosotros estoy aquí, y de verdad, no podría estar más agradecida. Gracias por todos y cada uno de vuestros esfuerzos para que yo y mis hermanos podamos cumplir todos nuestros sueños. Sois mi GRAN pilar, os admiro y os quiero hasta quedarme sin voz.

Tengo la gran suerte de no recorrer el camino de la vida sola, de hecho, tengo la grandísima suerte de no haberlo echo nunca gracias a mis hermanos mayores. María, tengo que agradecerte tantas cosas que nunca terminaría, pero sobre todo quiero darte las gracias por quererme tan bien, por cuidarme y tenerme presente en todo momento (aunque a veces ha tenido que ser un verdadero coñazo, lo sé), gracias por ser mi ejemplo a seguir en todos los ámbitos de la vida, gracias simplemente por estar allí pase lo que pase. Gracias también a mi cuñado pelirrojo, por hacerme reír y cuidarme como a una hija, pero sobre todo gracias por hacer feliz a mi hermana. Gracias también al cabraloca de mi hermano, Joan, a ti quiero agradecerte de todo corazón todos los momentos vividos a tu lado, gracias por hacerme reír hasta llorar, por quererme y aconsejarme, en el fondo sabes que no podría vivir sin ti. Y finalmente, quiero agradecerles a ambos el mayor regalo que un herman@ podría hacerme, mis pequeños, Sergio, Carlota y Gabriel, la alegría de la casa, gracias por enseñarme qué es el amor incondicional. Os quiero muchísimo a todos.

Finalmente, pero no por ello menos importante, me gustaría agradecer a una personita que ha estado a mi lado durante tantos años. Maxi, muchísimas gracias de todo corazón por todos estos años, contigo aprendí el significado del amor, gracias por aguantar todas mis frustraciones y mi mal humor durante esas temporadas que todo me salía del revés. Gracias por ayudarme a creer en mí, por tu paciencia, tus ánimos, tus estupideces para sacarme una sonrisa en mis días malos, gracias por entenderme, escucharme, cuidarme, pero, sobre todo, gracias por aguantar todo lo que has aguantado. Te querré por siempre.

No puedo terminar sin agradecer antes a la que ha sido mi segunda familia durante estos años, Juani, Edu, Sara, Carla e Ingrid, gracias y mil gracias por quererme como familia, por los bingos, los paseos, las conversaciones, la playa, las sesiones fotográficas, las comidas navideñas... Gracias por tantas cosas, os echo de menos. Os quiero.

Y gracias a todos vosotros, que estáis dedicando vuestro tiempo a leer esta tesis.

Nuria Doladé Masot

Breathe

ÍNDICE

RESUMENES	1
ABREVIATURAS	11
INTRODUCCIÓN	19
1. La enfermedad renal crónica	21
1.1. Características clínicas y epidemiología.....	21
1.2. Fisiopatología de la ERC	24
1.2.1. Proceso inflamatorio renal.....	24
1.2.2. Proceso fibrótico renal.....	25
2. La aterosclerosis	26
2.1. Características clínicas y epidemiología.....	26
2.2. Fisiopatología de la aterosclerosis	29
2.2.1. Iniciación y progresión de la lesión aterosclerótica.....	30
2.2.2. Rotura de la placa de ateroma.....	31
3. Papel de la ERC como factor de riesgo en la progresión de la patología aterosclerótica	33
3.1. Papel de la inflamación crónica presente en la ERC sobre el desarrollo aterosclerótico	37
4. La respuesta inmune.....	38
4.1. Activación de linfocitos T efectores	39
4.1.1. Respuesta Th1 y Th2	39
4.1.2. Respuesta Treg.....	40
4.1.3. Respuesta Th17	41
5. Interleuquina 17A (IL-17A)	43
5.1. Familia IL-17.....	43
5.2. IL-17 en ERC	45
5.3. IL-17 en enfermedades cardiovasculares	48
6. BTLA (<i>B and T lymphocyte attenuator</i>)	49
7. Micro-ARNs.....	53
7.1. Biogénesis y regulación.....	54
7.2. Micro-ARNs en el eje cardio-renal.....	56
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	59
1. Hipótesis.....	61
2. Objetivos.....	63
MATERIAL Y MÉTODOS	67

1. Sujetos de estudio	69
2. Extracción de sangre en muestras humanas	73
3. Extracción de ARN en muestras humanas	73
4. Extracción de PBMCs y células viables en muestras humanas.....	74
5. Secuenciación de micro-ARNs y array de ARNm	75
5.1. Secuenciación de micro-ARNs	75
5.2. Array de ARNm	76
6. Estudio de validación de la expresión génica de micro-ARNs y ARNm en muestras humanas	77
6.1. Síntesis simultánea de ADNc para micro-ARN y ARNm	77
6.2. Amplificación simultánea de micro-ARNs y ARNm mediante el uso de TLDAs	78
7. Modelos experimentales	80
7.1. Modelo experimental de enfermedad renal crónica (ERC) mediante nefrectomía subtotal o nefrectomía 5/6.....	81
7.2. Modelo experimental de daño renal por infusión de Angiotensina II.....	83
7.3. Modelo de glomerulonefritis rápidamente progresiva (GNRP) o nefritis inmune	84
8. Análisis bioquímicos	85
9. Estudios <i>in vitro</i>	85
9.1. Cultivos celulares	85
9.1.1. Línea celular murina de macrófagos (RAW 264.7)	85
9.1.2. Líneas celulares humanas de linfocitos T (Jurkat) y linfocitos B (NALM6)	86
9.2. Tratamientos de los cultivos celulares.....	86
9.2.1. Tratamiento de macrófagos, linfocitos T y B con suero urémico	86
9.2.2. Tratamiento de linfocitos T con antagomir para miR-500a-3p.....	86
10. Citometría de flujo de PBMCs humanas	87
11. Estudios de histología e inmunohistoquímica	88
11.1. Estudios en tejido fresco.....	88
11.1.1. Tinción Oil Red.....	88
11.1.2. Tinción Rojo Sirio.....	88
11.1.3. Inmunofluorescencia.....	89
11.2. Estudios en tejido incluido en parafina	89
11.2.1. Tinción IL-17A.....	89
12. Estudios genéticos en ratón	90

12.1. Extracción de ARN.....	90
12.2. Síntesis de ADN complementario (RT-PCR)	90
12.2.1. A partir de ARNm.....	90
12.2.2. A partir de micro-ARN	91
12.3. PCR en tiempo real	91
12.3.1. Para ARNm.....	91
12.3.2. Para micro-ARNs.....	92
13. Estudios de la expresión proteica.....	92
14. Análisis estadístico.....	94
RESULTADOS	97
1. Patrón de micro-ARNs y ARNm que participan en el proceso patológico de la aterosclerosis acelerada en pacientes con ERC	99
1.1. Estudio de la expresión de micro-ARNs y ARNm involucrados en estadio inicial de la formación de una placa aterosclerótica	99
1.2. Validación intra-especie de los micro-ARNs y ARNm que se postulan como posibles reguladores en la aterosclerosis acelerada en pacientes renales crónicos.	105
1.3. Estudio de la posible implicación de micro-ARNs/ARNm seleccionados en la progresión de la placa en pacientes con enfermedad aterosclerótica ya establecida	110
1.4. Estudio de la expresión de micro-ARNs/ARNm seleccionados en la progresión aterosclerótica independiente de la presencia/ausencia de placa de ateroma en el momento de la toma de muestra.	113
1.5. BTLA como posible diana para miR-500a-3p	115
2. Establecimiento de un modelo experimental de aterosclerosis acelerada en ERC	117
3. Los niveles de BTLA se encuentran disminuidos en un modelo experimental de aterosclerosis acelerada por ERC.....	122
4. BTLA y miR-500a-3p están desregulados en pacientes con ERC	124
5. BTLA está involucrado en el daño renal en diferentes modelos experimentales de daño renal	129
5.1. BTLA está implicado en el daño renal causado por hipertensión.....	129
5.2. BTLA está implicado en la glomerulonefritis rápidamente progresiva.....	130
6. El papel de BTLA en el daño renal es mediado principalmente por linfocitos T	132
7. miR-500a-3p regula los niveles de expresión de BTLA en linfocitos T	133

8. BTLA podría estar implicado en la ERC, así como en la progresión acelerada de la aterosclerosis inducida por la ERC mediante la activación de la vía de señalización de la IL-17A.....	135
8.1. Activación de la vía de señalización de la IL-17A en un modelo experimental de aterosclerosis acelerada por ERC.....	136
8.2. Activación de la vía de señalización de IL-17A en pacientes con ERC	138
8.3. Activación de la vía de señalización de IL-17A en modelos de daño renal crónico	139
8.4. Activación de la vía de señalización de IL-17A en condiciones de uremia en linfocitos T.....	141
8.5. miR-500a-3p regula la activación de la vía de señalización de IL-17A en condiciones de uremia en linfocitos T.....	141
9. Regulación epigenética en un modelo experimental de aterosclerosis acelerada por ERC	142
DISCUSIÓN	149
CONCLUSIONES	167
BIBLIOGRAFÍA	173
ANEXOS	203

RESUMENES

La enfermedad cardiovascular (ECV) es la principal causa de muerte en países desarrollados, así como en pacientes con enfermedad renal crónica (ERC). El aumento en la incidencia de ERC en el mundo a causa del aumento en sus factores de riesgo como la edad, la diabetes, la hipertensión o la obesidad, pronostica un aumento en la incidencia de ECV y, concretamente, de aterosclerosis en la población en un futuro cercano. Por tanto, es de gran importancia el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para luchar contra la aterosclerosis y la ERC. Los factores de riesgo a nivel cardiovascular en enfermos renales difieren de los observados en la población general, destacando la inflamación persistente como un importante predictor de eventos cardiovasculares en pacientes con ERC. En este sentido, la glucoproteína transmembrana BTLA está involucrada en la respuesta inmune y la inflamación como un fuerte inhibidor de la activación de linfocitos y su disminución se ha relacionado previamente con una respuesta anormal de las células T dependiente de IL-17. Los mecanismos epigenéticos como la regulación de la expresión génica por micro-ARNs, han emergido como factores clave en condiciones patológicas como son las enfermedades cardiovasculares y renales. Además, la elevada estabilidad de estas moléculas en los diferentes fluidos corporales, hace de ellas unos potentes biomarcadores. Por todo esto, el objetivo de esta tesis es la identificación de diferentes micro-ARNs y/o ARNm como potenciales biomarcadores de la predicción de eventos ateroscleróticos en enfermedad renal y las vías de señalización implicadas en este proceso, así como el estudio de la vía miR-500a-3p/BTLA/IL-17 en el contexto de la enfermedad renal. Para ello, se han realizado estudios clínicos en pacientes con ERC y progresión de la enfermedad aterosclerótica, estudios *in vivo* en un modelo experimental de aterosclerosis acelerada por ERC, así como en dos modelos experimentales de daño renal: un modelo de administración sistémica de Angiotensina II; y un modelo de nefritis inmune y estudios *in vitro* en linfocitos T y B estimulados con suero urémico. Los estudios de expresión de ARNm y micro-ARNs realizados en pacientes con ERC y aterosclerosis tanto incipiente como progresiva, indican un papel de BTLA, miR-23a-3p, miR-652-3p y miR-500a-3p en el desarrollo inicial de la placa aterosclerótica y un papel de miR-185-5p, miR-629-5p, miR-362-5p, miR-130b-5p, miR-23a-3p, miR-652-3p y miR-500a-3p en la progresión de la enfermedad aterosclerótica establecida en pacientes con ERC. Los posteriores estudios *in vivo* de la expresión de miR-23a-3p y miR-652-3p, indican un efecto atero-protector de estos micro-ARNs en los ratones alimentados con dieta alta en grasas (ApoE^{-/-} + HFD) y en aquellos que, además, fueron sometidos a una nefrectomía subtotal (ApoE^{-/-} + 5/6Nx + HFD). Sin embargo, los ratones ApoE^{-/-} sometidos únicamente a una nefrectomía subtotal (ApoE^{-/-} + 5/6Nx), muestran un aumento significativo en la expresión de ambos micro-ARNs en sangre total, así como un aumento significativo en la expresión de miR-23a-3p en tejido aórtico al compararlos con ratones control (ApoE^{-/-}). Además, la expresión de miR-23a-3p en arco aórtico se correlaciona con los niveles de NEK7, gen diana para miR-23a-3p descrito anteriormente, indicando una posible vía de acción de miR-23a-3p en ERC y aterosclerosis. Por otro lado, los niveles de BTLA disminuyen significativamente en sangre total de todos los grupos de ratones (ApoE^{-/-} + 5/6Nx, ApoE^{-/-} + HFD y ApoE^{-/-} + 5/6Nx + HFD), sin mostrar un efecto aditivo de la enfermedad renal experimental sobre la expresión de BTLA en aterosclerosis. Sin embargo, el tratamiento con suero urémico de macrófagos, los cuales presentan una elevada implicación en el proceso aterosclerótico, muestra una disminución significativa en los niveles de expresión de BTLA que, junto con el resto de resultados, podría sugerir un efecto de BTLA en el proceso aterosclerótico en un ambiente urémico. Además, los niveles de BTLA disminuyen en PBMCs de enfermos renales y a nivel renal en dos modelos experimentales de daño renal y se confirma la principal implicación de los linfocitos T en la bajada de BTLA en condiciones de uremia, observándose una relación inversa entre BTLA y su posible micro-ARN regulador, miR-500a-3p. Finalmente, se observa un aumento en la vía de señalización de IL-17 a nivel aórtico en los ratones ApoE^{-/-} + HFD y ApoE^{-/-} + 5/6Nx + HFD, en PBMCs de pacientes con ERC, en riñón de los modelos experimentales de administración sistémica de Angiotensina II y glomerulonefritis inmune y en linfocitos T estimulados con suero urémico. Todos estos resultados sugieren un papel de BTLA en el desarrollo de una aterosclerosis en condiciones de uremia, así como un papel de BTLA en diferentes enfermedades renales, que podría vincularse con una respuesta exacerbada mediada por IL-17 a través de miR-500a-3p. Además, se describen diferentes micro-ARNs involucrados en el proceso aterosclerótico en ERC.

Cardiovascular disease (CVD) is the leading cause of death in developed countries and is the main cause of death in chronic kidney disease patients. The increase in the incidence of CKD due to the increase in its risk factors such as age, diabetes, hypertension or obesity, predicts an increase in the incidence of CVDs, specifically, atherosclerosis in the near future. Hence, the development of new strategies that focus in the regulation of the immune response may represent an important tool to diminish the cardiovascular mortality in renal patients. Risk factors for cardiovascular events are different in the CKD population highlighting persistent inflammation as an important predictor of poor outcome in CKD patients. In this sense, the transmembrane glycoprotein BTLA is involved in immune response and inflammation as a strong inhibitor of lymphocyte activation and has been related with an abnormal IL-17 dependent T-cell response. Epigenetic mechanisms such as micro-ARNs gene expression regulation have emerged as a key factors in pathological conditions including cardiovascular and renal diseases. In addition, the high stability of these molecules in body fluids makes them powerful biomarkers for cardiovascular disease prediction. For that reason, the objective of this thesis is the identification of different microRNAs and/or mRNAs as a potential biomarkers for atherosclerosis events in kidney disease and the signaling pathways involves in this process, as well as the study of the miR-500a-3p/BTLA/IL-17 pathway in kidney disease. With this purpose, clinical studies in CKD-atherosclerotic progressive patients, *in vivo* studies in an experimental model of CKD accelerated atherosclerosis, as well as in two experimental models of kidney damage (systemic Angiotensin II administration and immune nephritis) and *in vitro* studies in T and B lymphocytes stimulated with uremic serum have been carried out. microRNA and mRNA expression studies carried out in patients with CKD and both incipient and progressive atherosclerosis, indicated a role for BTLA, miR-23a-3p, miR-652-3p and miR-500a-3p in the initial development of an atherosclerotic plaque and also indicated a role of miR-185-5p, miR-629-5p, miR-362-5p, miR-130b-5p, miR-23a-3p, miR-652-3p y miR-500a-3p in atherosclerotic progression in patients with CKD. Subsequent *in vivo* studies of miR-23a-3p and miR-652-3p expression levels, indicated an atheroprotective effect of these microRNAs in mice fed with high fat diet (ApoE^{-/-} + HFD) and animals that, apart from the HFD, suffered a subtotal nephrectomy (ApoE^{-/-} + 5/6Nx + HFD). However, ApoE^{-/-} mice submitted to subtotal nephrectomy (ApoE^{-/-} + 5/6Nx), showed a significant increase in expression of both miRNAs in whole blood, as well as a significant increase in the aortic arch expression levels of miR-23a-3p when compared to control mice (ApoE^{-/-}). Moreover, the aortic arch miR-23a-3p expression levels inversely correlates with NEK7 expression levels, a target gene for miR-23a-3p described above, indicating a possible miR-23a-3p dependent pathway regulation in CKD and atherosclerosis. Apart from that, BTLA levels appeared significantly decreased in whole blood of all mice groups (ApoE^{-/-} + 5/6Nx, ApoE^{-/-} + HFD y ApoE^{-/-} + 5/6Nx + HFD), without showing an additive effect of experimental kidney disease on BTLA expression in atherosclerosis context. Nevertheless, the uremic serum treatment of macrophages, a highly involved cells in atherosclerotic process, showed a significant decrease in BTLA expression levels which, in concordance with the rest of the results, could suggest BTLA-uremic dependent effect on the atherosclerotic process. In addition, BTLA levels decrease in PBMCs from kidney patients and at renal level in two kidney damage experimental models and it was confirmed the main involvement of T lymphocytes in the BTLA-uremia dependent decrease, showing an inverse correlation between BTLA and its possible regulator micro-ARN, miR-500a-3p. Finally, it was observed an increase in the IL-17 signaling pathway in the aortic arch of ApoE^{-/-} + HFD and ApoE^{-/-} + 5/6Nx + HFD mice, in PBMCs from CKD patients, in kidney from experimental mouse models of kidney damage and in T lymphocytes stimulated with uremic serum. All these results suggest a role for BTLA in the development of atherosclerosis in uremic conditions, as well as a role for BTLA in different kidney diseases, which could be mediated by an IL-17-exacerbated response through miR-500a-3p deregulation. In addition, different micro-RNAs involved in the atherosclerotic process in CKD are described

La malaltia cardiovascular (MCV) es la principal causa de mort als països desenvolupats, així com en els pacients amb malaltia renal crònica (MRC). El augment en la incidència de la MRC al mon degut a la alta prevalença dels seus factors de risc com la edat, la diabetis, la hipertensió o la obesitat, pronostiquen un augment en la incidència de la MCV i, concretament, de l'aterosclerosi en un futur proper. Per tant, es de gran importància el desenvolupament de noves estratègies terapèutiques que permetin lluitar en front l'aterosclerosi i la MRC. Els factors de risc cardiovascular en malalts renals difereixen dels observats a la població general, ressaltant la inflamació continuada com un important predictor d'esdeveniments cardiovasculars als pacients amb MRC. En aquest sentit, la glucoproteïna transmembrana, BTLA, està involucrada en la resposta immunitària i la inflamació com a un fort inhibidor de l'activació de limfòcits i la seva disminució s'ha relacionat prèviament amb una resposta anormal de les cèl·lules T dependent de IL-17. Els mecanismes epigenètics com la regulació de la expressió gènica per micro-ARNs, han aflorat com a factors clau en condicions patològiques com són les malalties cardiovasculars i renals. A més, la alta estabilitat d'aquestes molècules en els diferents fluids corporals, fa d'elles uns potents biomarcadors per preveure malalties cardiovasculars com l'aterosclerosi en malalts renals. Per tot això, el objectiu d'aquesta tesi es la identificació de diferents micro-ARNs y/o ARNm com a potencials biomarcadors en la predicció d'esdeveniments ateroescleròtics en la malaltia renal y el descobriment de les vies de senyalització implicades en aquest procés, així com l'estudi de la via miR-500a-3p/BTLA/IL-17 en un context de malaltia renal. En conseqüència, s'han realitzat estudis clínics en pacients amb MRC i progressió de la malaltia ateroescleròtica, estudis *in vivo* en un model experimental de ateroesclerosi accelerada per MRC, així com en dos models experimentals de dany renal: un model d'administració sistèmica d'Angiotensina II; i un model de nefritis immune i estudis *in vitro* amb limfòcits T i B estimulats amb sèrum urèmic. Els estudis d'expressió de ARNm i micro-ARNs realitzats en pacients amb MRC i ateroesclerosi tant incipient com progressiva, indiquen un paper de BTLA, miR-23a-3p, miR-652-3p i miR-500a-3p en el desenvolupament inicial de la placa ateroescleròtica i un paper de miR-185-5p, miR-629-5p, miR-362-5p, miR-130b-5p, miR-23a-3p, miR-652-3p i miR-500a-3p en la progressió de la malaltia ateroescleròtica establerta en pacients amb MRC. Els posteriors estudis *in vivo* en la expressió de miR-23a-3p y miR-652-3p, indiquen un efecte atero-protector de aquests micro-ARNs en els ratolins alimentats amb dieta alta en grassa (ApoE^{-/-} + HFD) i en els ratolins que, apart de la dieta, van ser sotmesos a una nefrectomia subtotal ApoE^{-/-} + 5/6Nx + HFD. No obstant, els ratolins ApoE^{-/-} sotmesos a una nefrectomia subtotal (ApoE^{-/-} + 5/6Nx), mostren un augment significatiu en la expressió de aquests micro-ARNs en sang total, així com un augment significatiu en la expressió de miR-23a-3p en teixit aòrtic al comparar-los amb ratolins control (ApoE^{-/-}). A més, la expressió de miR-23a-3p en arc aòrtic es correlaciona amb els nivells de NEK7, gen diana per a miR-23a-3p descrit anteriorment, indicant una possible via d'acció de miR-23a-3p en MRC i ateroesclerosi. Per altra banda, els nivells de BTLA disminueixen significativament en sang total de tots els grups de ratolins (ApoE^{-/-} + 5/6Nx, ApoE^{-/-} + HFD y ApoE^{-/-} + 5/6Nx + HFD), sense mostrar un efecte additiu de la malaltia renal experimental sobre la expressió de BTLA en ateroesclerosi. No obstant, el tractament de macròfags amb sèrum urèmic, els quals presenten una elevada implicació en el procés ateroescleròtic, mostra una disminució significativa en els nivells de expressió de BTLA que, juntament amb la resta de resultats, podria suggerir un efecte de BTLA en el procés ateroescleròtic en un ambient urèmic. A més, els nivells de BTLA disminueixen en PBMCs de malalts renals, així com a nivell renal en dos models experimentals de malaltia renal, confirmant-se la principal implicació dels limfòcits T en la baixada de BTLA en condicions d'urèmia observant-se una relació inversa entre BTLA i el seu possible micro-ARN regulador, miR-500a-3p. Finalment, s'observa un augment en la via de senyalització de IL-17 a nivell aòrtic en els ratolins ApoE^{-/-} + HFD i ApoE^{-/-} + 5/6Nx + HFD, en PBMCs de pacients amb MRC, en ronyó dels models experimentals d'administració sistèmica d'angiotensina II i glomerulonefritis immune i en limfòcits T estimulats amb sèrum urèmic. Tots aquests resultats suggereixen un paper de BTLA en el desenvolupament d'una ateroesclerosi en condicions d'urèmia, així com un paper de BTLA en diferents malalties renals, que podria vincular-se amb una resposta exacerbada duta a terme per IL-17 mitjançant miR-500a-3p. A més, es descriuen diferents micro-ARNs involucrats en el procés ateroescleròtic en MRC.

ABREVIATURAS

1-10

5/6 Nx *5/6 Nephrectomy*

A

Ang II *Angiotensina II*

Act1 *NF-κB activator 1*

Ap-1 *Activator protein 1*

AKT *Protein kinase B*

(PKB)

ANCA *Anti-neutrophil cytoplasmatic antibodies*

ARN *Ácido ribonucleico*

ARNm *ARN mensajero*

AGO2 *Proteína argonauta 2*

ABI *Ankle brachial index*

B

BTLA *B- and T-lymphocyte attenuator*

BUN *Blood ureic nitrogen*

C

CTGF *Connective tissue growth factor*

CME *Componentes de matriz extracelular*

CEs *Células endoteliales*

CMLVs *Células de músculo liso vascular*

CUL3 *Cullin-3*

CPA *Células presentadora de antígenos*

CTLA-8 *Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 8*

CBAD *C/EBPβ activation domain*

C/EBPδ *CCAAT/Enhancer-Binding Protein Delta*

CTLA-4 *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*

CXCL-16 *C-X-C Motif Chemokine Ligand 16*

CXCL1 *C-X-C Motif Chemokine Ligand 1*

CCL2 *C-C motif Chemokine ligand 2*

CCR2 *C-C motif Chemokine receptor 2*

Ccr6 *C-C motif Chemokine receptor 6*

Ccr4 *C-C motif Chemokine receptor 4*

Ccl20 *C-C motif Chemokine ligand 20*

CCL5 *Chemokine (C-C motif) ligand 5 (RANTES)*

CIMT *Carotid intima media thickness*

Ct45a4 *Cancer/testis antigen family 45, member A4*

C9orf53 *CDKN2A divergent transcript*

CTSG *Cathepsin G*

CPA3 *Carboxypeptidase A3*

CEACAM5 *CEA Cell Adhesion Molecule 5*

CDK6 *Cyclin Dependent Kinase 6*

D

DROSHA *Double-Stranded RNA-Specific Endoribonuclease*

DGCR8 *DiGeorge Critical Region 8*

DP *Diálisis peritoneal*

Defa1b *Defensin, alpha 1B*

E

ERC *Enfermedad renal crónica*

ECV *Enfermedad cardiovascular*

ENRICA *Estudio de Nutrición y Riesgo Cardiovascular en España*

EPIRCE *Estudio Epidemiológico de la Insuficiencia Renal en España*

EAE *Encefalomiелitis autoinmune experimental*

Erk1/2 *Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2*

EDTA *Ethylenediamine tetraacetic acid*

E2F7 *Transcription factor E2F7*

F

FRA	Fracaso renal agudo
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FER	<i>FER Tyrosine Kinase</i>
FBW7	<i>F-box and WD repeat domain-containing 7</i>
FcRL-1	<i>Fc receptor-like 1</i>
FOXP3	<i>Forkhead box P3</i>

G

GPX	<i>Glutation peroxidasa</i>
GATA3	<i>Glutamyl aminotransferase subunit A</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
Grb-2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>

H

HDL	<i>High-density lipoprotein</i>
HVEM	<i>Herpesvirus entry mediator</i>
HSV-1 gD	<i>Herpes simplex virus glycoprotein D</i>
HCMV	<i>Human cytomegalovirus</i>
HD	<i>Hemodiálisis</i>
HDC	<i>Histidine decarboxylase</i>
HLA-DQB1	<i>Major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1</i>
HFD	<i>High fat diet</i>

I

IFG	Índice de filtrado glomerular
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
IM	Infarto de miocardio
INE	Instituto nacional de estadística
IFNγ	<i>Interferon gamma</i>
ISGF	<i>Immunoglobulin super gene Family</i>
ICOS	<i>Inducible costimulator</i>
ITSM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based switch motif</i>
ITIM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>
IMC	Índice de masa corporal

K

KDIGO	<i>Kidney disease improving global outcomes</i>
KIM1	<i>Kidney injury molecule-1</i>
KCNG1	<i>Potassium voltage-gated channel subfamily C member 1</i>

L

LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LRTG	<i>Lipoproteína rica en triglicéridos</i>
LOX-1	<i>Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor</i>
LIGHT (TNFSF14)	<i>Tumor necrosis factor superfamily member 14</i>

M

MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MIP-1,2-3	<i>Macrophage Inflammatory Proteins 1,2-3</i>
MAPKs	<i>Mitogen activated protein kinases</i>
MHCII	Major histocompatibility complex class II
MDRD	<i>Modification of the diet in renal disease</i>
MS4A1	<i>Membrane-spanning 4A</i>
MRPL35	<i>Mitochondria ribosomal protein ligand 35</i>
MLKL	<i>Mixed lineage kinase domain-like</i>

N

NRF2	<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
NLRP3	<i>NLR family pyrin domain containing 3</i>
NEK7	<i>NIMA Related Kinase 7</i>
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
NGS	<i>New generation sequencing</i>
NTS	<i>Nefrotoxic serum</i>
N-GAL (LCN2)	<i>Lipocalin-2</i>
NT5E	<i>5'-Nucleotidase Ecto</i>

O

ONT	Organización nacional de trasplante
OMS	Organización mundial de la salud
ON	<i>Oxide nitric</i>

P

PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PESA	<i>Progression of early subclinical atherosclerosis</i>
PCSK9	<i>Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9</i>
PCR	<i>Proteína C reactiva</i>
PD-1	<i>Programmed death 1</i>
PTK	Proteína tirosina quinasa
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3-Kinase</i>
PRKRA	<i>Interferon-inducible double-stranded RNA-dependent protein kinase activator A</i>
PA	<i>Presión arterial</i>
PAD	<i>Peripheral arterial disease</i>
PBMCs	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PGK1	<i>Phosphoglycerate Kinase 1</i>
PLAC8	<i>Placenta-specific protein 8</i>
PPIA	<i>Peptidylprolyl isomerase A</i>
R	
RORγt	<i>RAR-related orphan receptor gamma</i>
RORα	<i>RAR-related orphan receptor alpha</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
REDinRED	Red española de investigación renal
RNASE3	<i>RNA A family member 3</i>

S

SEN	Sociedad Española de nefrología
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
SEC	Sociedad Española de cardiología
SR	<i>Scavenger receptor</i>
SCR	Síndrome cardiorenal
SOD	<i>Superoxide dismutase</i>
SMAD3	<i>Suppressor of mothers against decapentaplegic family member 3</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
SHP-1,2	Tyrosine phosphatase 1,2
SLC38A11	<i>Solute carrier family member 38 A11</i>

T

TNF-α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TGF-β	<i>Transforming growth factor</i>
TEM	Transición epitelio mesénquima
TendM	Transición endotelio mesénquima
TCR	<i>T-cell receptor</i>
T-bet	<i>T-box protein expressed in T cells</i>
Th1	<i>Helper 1 T-lymphocytes</i>
Th2	<i>Helper 2 T-lymphocytes</i>
Th17	<i>Helper 17 T-lymphocytes</i>
Treg	<i>Regularoy T-lymphocytes</i>

TRAF6	<i>Tumor necrosis factor receptor associated factor 6</i>
TILL	<i>TIR-like loop</i>
TTP	<i>Tristetraprolin</i>
TNFRSF	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily</i>
TRBP	<i>TAR RNA-binding proteiN</i>
TLDAs	<i>Taqman low density array cards</i>
TNFSF10	<i>Tumor necrosis factor superfamily member 10</i>

U

UUO	<i>Unilateral ureteral obstruction</i>
UTR	<i>Untranslated region</i>

V

VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
---------------	--

INTRODUCCIÓN

1. La enfermedad renal crónica

1.1. Características clínicas y epidemiología

La enfermedad renal crónica (ERC) es un término general que engloba trastornos heterogéneos con anomalías en la estructura y función del riñón durante al menos 3 meses. A nivel global, se estima que ~850 millones de personas sufren de una ERC¹. En 2017 se registraron 1,2 millones de muertes a causa de la ERC en todo el mundo y en los próximos 20 años se estima un aumento en su mortalidad, que la situarán como la quinta causa de muerte a nivel mundial². A nivel europeo, la investigación llevada a cabo por el consorcio europeo de ERC indica una prevalencia de ERC de hasta un 17,3%³. Finalmente, los estudios ENRICA (Estudio de Nutrición y Riesgo Cardiovascular en España) y EPIRCE (Estudio Epidemiológico de la Insuficiencia Renal en España) mostraron una prevalencia de la ERC en España de entre el 10% y el 15%, incrementándose hasta un 20% en personas mayores de 60 años^{4,5}. Además, según datos recogidos en 2020 por la Organización Nacional de Trasplantes (ONT) y la Sociedad Española de Nefrología (SEN), en la población española se ha producido un aumento del 30% de los individuos con ERC en fases avanzadas, llegando a generar un coste de hasta el 3% del gasto sanitario español⁶.

Debido al importante problema de salud pública que genera la ERC, la clasificación de esta enfermedad es de gran interés. Típicamente, la función renal ha sido evaluada por el índice de filtrado glomerular (IFG o *GFR*, del inglés, *Glomerular Filtration Rate*), siendo considerados pacientes con ERC todos aquellos individuos que presenten un IFG < 60mL/min/1,73m² durante 3 meses o más. Sin embargo, la información obtenida a partir del IFG por sí sola no es una herramienta óptima para el pronóstico de la ERC⁷. En este sentido, la albuminuria se presenta como uno de los predictores más importantes en la progresión de la ERC⁸. Este planteamiento se reflejó en las guías KDIGO 2012 (del inglés, *Kidney Disease Improving Global Outcomes*), en las que se determinó una clasificación más precisa de la ERC y sus estadios, que dependía tanto del IFG como de los niveles de albuminuria de los pacientes, estandarizando de esta manera la clasificación de la enfermedad⁷. Siguiendo esta premisa, se han propuesto diferentes estadios de la ERC dependiendo del IFG (G1, G2, G3a, G3b, G4 y

G5) y del estado de albuminuria (A1, A2 y A3) cuya combinación nos proporciona el riesgo de morbi-mortalidad y de progresión de esta enfermedad⁷ (**Figura 1**).

				Categorías de albuminuria persistente, descripción y rango		
				A1	A2	A3
				Normal a aumento leve <30 mg/g	Aumento leve 30-300 mg/g	Aumento severo >300 mg/g
Categorías de IFG (ml/min/1.73m ²), descripción y rango	G1	Moderado o alto	≥ 90			
	G2	Disminución leve	60-89			
	G3a	Disminución leve a moderado	45-59			
	G3b	Disminución moderada a severa	30-44			
	G4	Disminución severa	15-29			
	G5	Insuficiencia renal	<15			

Figura 1. Pronóstico de ERC con el uso de las categorías de IFG y albuminuria. Verde: riesgo bajo; amarillo: riesgo moderado; naranja: riesgo alto; rojo: riesgo muy alto. Modificado de *Levin et al*⁷

El aumento en la incidencia de la ERC en las últimas décadas está asociado con el incremento de otras enfermedades crónicas como la diabetes, hipertensión y obesidad que, a su vez, son factores de riesgo en el desarrollo de la ERC^{9,10}. De la misma forma, el envejecimiento de la población es un factor que también contribuye al deterioro renal¹¹. Además de estos factores de riesgo tradicionales, se han descrito otras posibles causas en el desarrollo de la ERC y/o el fracaso renal agudo (FRA, el cual es un factor de riesgo *per se* en el desarrollo de la ERC)¹², como la continua exposición a fármacos con efectos nefrotóxicos¹³ e infecciones sistémicas^{14,15}.

Es importante destacar las complicaciones derivadas de la ERC, relacionadas con la pérdida de la función endocrina y exocrina de los riñones, que otorgan una gran importancia al estudio de esta enfermedad. Algunas de estas complicaciones son: la anemia, resultante de la disminución en la producción de eritropoyetina endógena¹⁶; la acidosis metabólica, caracterizada por la acumulación de protones y la alteración en la producción de bicarbonato que resulta en la bajada sistémica del pH¹⁷; así como las alteraciones en el metabolismo mineral, asociadas con enfermedades óseas, hiperparatiroidismo secundario y calcificaciones coronarias, vasculares y valvulares¹⁸.

Finalmente, la enfermedad cardiovascular (ECV), es una de las complicaciones de la ERC más ampliamente estudiada por su gran impacto en la mortalidad de estos pacientes¹⁹.

Uno de los principales problemas en el campo de la nefrología, reside en la ausencia de síntomas clínicos obvios en las etapas tempranas de la enfermedad, complicando el diagnóstico y tratamiento temprano y exponiendo una necesidad urgente de obtener nuevos biomarcadores sensibles y específicos para su uso en clínica. Los actuales tratamientos clínicos para la ERC están enfocados en la ralentización de su progresión, enfocándose en el tratamiento de diferentes factores de riesgo, con el fin de reducir el riesgo de sufrir eventos cardiovasculares y, por lo tanto, la mortalidad asociada a la ERC. En particular, el tratamiento de la hipertensión mediante el uso de inhibidores del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) ha supuesto un gran impacto en el manejo de la ERC²⁰. A pesar de todo, existe un aumento de los pacientes en estadios terminales de la enfermedad²¹, los cuales solo pueden ser tratados mediante terapias de reemplazo como la diálisis (hemodiálisis o diálisis peritoneal) o el trasplante renal. Esto genera un gran interés en el estudio de nuevas estrategias que sean capaces de restaurar la función del riñón o prevenir la progresión de la enfermedad²². En la **figura 2** se muestra un esquema de todas las características clínicas mencionadas.

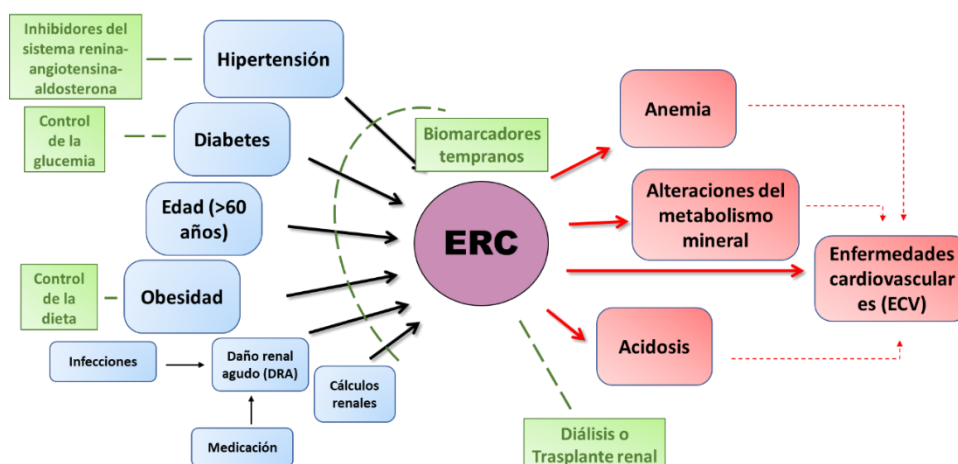


Figura 2. Esquema de las causas (azul), complicaciones (rojo) y terapias clínicas (verde) en la enfermedad renal crónica (ERC).

1.2. Fisiopatología de la ERC

Independientemente de su etiología, la ERC presenta un deterioro gradual del parénquima renal, una inflamación mantenida y una pérdida de la funcionalidad de la nefrona²³, que pueden ser resueltas o, en caso contrario, conducir a una enfermedad renal en etapa terminal, caracterizada por la inflamación crónica y finalmente, la fibrosis tisular (**Figura 3**).

1.2.1. Proceso inflamatorio renal

Independientemente de la lesión inicial en un tejido, la reparación del daño siempre se asocia con una respuesta inflamatoria que desencadena un proceso inmunológico que puede resultar en la recuperación del daño o derivar en un proceso fibrótico. En el riñón, el proceso inflamatorio se caracteriza por la infiltración de células inmunitarias (neutrófilos, macrófagos y linfocitos) en el túbulointersticio renal, así como en el espacio glomerular^{24,25}. Patologías como la hipertensión, diabetes, enfermedades autoinmunes, isquemia, infecciones, exposición a toxinas o una sobrecarga proteica inducen la activación de las células renales, las cuales desencadenan un proceso inflamatorio caracterizado por la liberación de citoquinas proinflamatorias como TNF α , IL-1 β y IL-6²⁶⁻²⁸, moléculas de adhesión entre las que destacan ICAM-1²⁹, quimioquinas tales como MCP-1,2-3, RANTES, CXCL-16, CXCL-1 y MIP-1,2-3³⁰, péptidos vasoactivos como angiotensina II (Ang II) y endotelina-1³¹⁻³³, factores de crecimiento entre los que se encuentran CTGF, TGF- β y PDGF³⁴ y especies reactivas de oxígeno (OH \cdot , H₂O₂, O₂ \cdot^-)³⁵. Estos factores promueven cambios endoteliales que permiten un mayor flujo de sangre a la zona dañada, así como una mayor permeabilidad vascular, provocando una extravasación de células inflamatorias (macrófagos y leucocitos) a la región dañada generando a su vez, un “*feedback*” positivo de liberación de más moléculas proinflamatorias y el reclutamiento de más células inmunitarias *in situ*³⁶. Todo este proceso inflamatorio, está mediado principalmente por la activación de las vías de señalización intracelulares como la vía de activación de NF- κ B (p50/p65) o de las quinasas activadas por mitógenos (MAPKs, del inglés, *Mitogen-activated protein kinases*) entre otras^{37,38}.

1.2.2. Proceso fibrótico renal

Si la inflamación no se resuelve y se cronifica, el exceso de tejido conectivo acumulado durante el proceso de reparación, induce el desarrollo de fibrosis y la pérdida de la funcionalidad renal³⁹. El proceso fibrótico es un proceso dinámico y complejo caracterizado por la deposición excesiva de componentes de matriz extracelular (CME) (Colágeno I, III, V, VI, VII y XV)⁴⁰ que da lugar a la posterior formación de una cicatriz fibrosa, reducción del parénquima renal y una pérdida de función. La fisiopatología de la fibrosis renal implica múltiples vías moleculares y varios tipos de células renales e infiltrantes. Los miofibroblastos, son las células responsables de la liberación de CME con el fin de cicatrizar la herida, sin embargo, la acumulación de estas células y el exceso de CME conducen a la reparación anormal del tejido (fibrosis)⁴¹. A nivel renal, se han descrito diferentes precursores que explican el aumento de miofibroblastos y, en consecuencia de CME: 1) Fibroblastos residentes que sufren una diferenciación hacia miofibroblastos⁴²; 2) Células epiteliales y/o endoteliales que sufren un cambio fenotípico debido al proceso de transición epitelio mesénquima (TEM) o endotelio mesénquima (TendM), respectivamente^{43,44} y 3) Diferenciación a partir de células derivadas de la médula ósea⁴⁵. En este sentido, Le Bleu *et al* describieron que, el 50% de los miofibroblastos procedían de la proliferación de fibroblastos residentes, y el otro 50% procedían de la diferenciación de células de médula ósea (35%), TEM (5%) y TendM (10%)⁴⁶. A su vez, durante todos estos procesos, se produce la liberación de factores pro-fibróticos tales como TGF- β , CTGF y PDGF⁴⁷⁻⁴⁹, los cuales generan una retroalimentación que impulsa el proceso fibrótico, estimulando la liberación de más CME y la acumulación de miofibroblastos. Aun así, a pesar de la gran información sobre los procesos moleculares involucrados en el proceso de fibrosis, todavía no existe un tratamiento anti-fibrótico eficaz que permita una reversión del daño ya establecido.

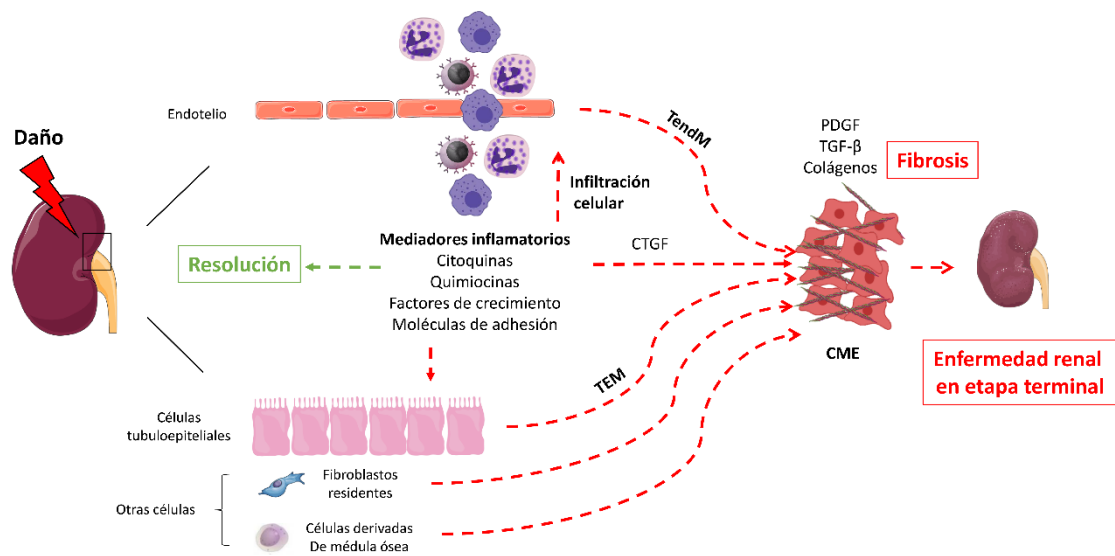


Figura 3. Esquema de los mecanismos celulares y moleculares que se producen en respuesta a un daño renal. En condiciones de daño renal, se desencadena una respuesta inflamatoria que genera la infiltración renal de células inmunitarias a través del endotelio dañado y la subsecuente liberación de citoquinas, quimiocinas, factores de crecimiento y moléculas de adhesión por parte de las CE e inmunitarias que exacerban la respuesta inflamatoria. En este punto, la lesión puede resolverse o, en caso contrario cronificarse induciendo el desarrollo de un proceso fibrótico caracterizado por la acumulación de CME por parte de los miofibroblastos activados.

2. La aterosclerosis

2.1. Características clínicas y epidemiología

La aterosclerosis es un proceso patológico caracterizado por la acumulación de grasas tales como el colesterol y otras sustancias en la pared arterial, y es considerada una de las principales causas en el desarrollo de ECVs. El conjunto de grasas (lípidos y colesterol) y otras sustancias, es conocido comúnmente como placa aterosclerótica y su desarrollo tiene lugar, principalmente, en la capa íntima (capa más interna) de las bifurcaciones de arterias medianas y grandes⁵⁰. Las complicaciones de esta patología, sitúan a la aterosclerosis como una enfermedad de gran interés en salud pública a nivel mundial, debido a la capacidad de la placa aterosclerótica de limitar el flujo de sangre o romperse generando un trombo que puede conducir a la oclusión parcial o total de las arterias afectadas. Las principales manifestaciones clínicas de la aterosclerosis incluyen: cardiopatía isquémica, accidente cerebrovascular isquémico o enfermedad vascular periférica⁵¹.

La mortalidad derivada de ECVs ha disminuido en los países desarrollados, sin embargo, continúan constituyendo la principal causa de muerte a nivel global. En 2019, la Organización Mundial de la Salud (OMS), estimó que el 32% de las muertes a nivel mundial se asociaban con eventos cardiovasculares, principalmente con cardiopatías isquémicas como los infartos de miocardio (IM), una de las principales manifestaciones clínicas de la aterosclerosis⁵². De la misma forma, datos europeos recogidos en 2017 por la Sociedad Europea de Cardiología (SEC) indican que se registraron 19,9 millones de casos nuevos de ECV. Además, la SEC estimó una mortalidad asociada con ECV en Europa del 43%, la cual se veía significativamente aumentada en personas >70 años⁵³. A nivel nacional y siguiendo la tendencia europea y mundial, las ECVs también se sitúan como la primera causa de muerte. En este sentido, datos recogidos por el Instituto Nacional de Estadística (INE) en 2020 mostraron como el 24,3% de los fallecimientos en España fueron por causas cardiovasculares⁵⁴, siendo la cardiopatía isquémica la causa principal⁵⁵. De forma interesante, un estudio nacional sobre la prevalencia de la aterosclerosis en España (PESA; Progression of Early Subclinical Atherosclerosis) mostró la presencia de aterosclerosis subclínica en > 50% de los individuos asintomáticos de 40-54 años incluidos en el estudio⁵⁶.

Esta elevada incidencia y mortalidad de las ECVs se relaciona directamente con la elevada prevalencia de sus factores de riesgo. En este sentido, las anomalías en el metabolismo lipídico, representan una de las principales causas en el desarrollo de la aterosclerosis y su prevalencia ha mostrado un aumento significativo en las últimas dos décadas⁵⁷. Estas anomalías, engloban un aumento de los niveles en sangre de LDL-c (colesterol transportado en lipoproteínas de baja densidad) y LRTG (lipoproteínas ricas en triglicéridos), así como una disminución en los niveles de HDL-c (colesterol transportado en lipoproteínas de alta densidad)^{58,59}. En relación a estas anomalías lipídicas, niveles elevados de lipoproteína a [Lp(a)], una glucoproteína presente en las LDL con alta capacidad aterogénica, se ha descrito como una posible causa, con bases genéticas, en el desarrollo de la aterosclerosis⁶⁰. La hipertensión también es considerada un importante factor de riesgo en el desarrollo aterosclerótico^{61,62}, de hecho, en las últimas 3 décadas se ha observado un aumento de los individuos hipertensos que terminan desarrollando una ECV⁵⁷. Otros de los factores de riesgo en una ECV que han

presentado un aumento significativo en las últimas décadas son: la diabetes y la ERC⁵⁷, la inflamación crónica, el estrés oxidativo, la obesidad y el sedentarismo, el tabaquismo y el alcoholismo y la edad^{57,63-65}.

Como se ha comentado, la aterosclerosis es un importante problema de salud pública y su estudio constituye uno de los principales focos de atención entre la comunidad científica. En esta patología, las principales estrategias terapéuticas están dirigidas a mitigar los diferentes factores de riesgo. En este sentido, el primer enfoque para evitar el desarrollo de placa aterosclerótica, consiste en el cambio de los hábitos de vida del individuo^{66,67}. A su vez, se han desarrollado terapias farmacológicas dirigidas al tratamiento directo de algunas características de la patología aterosclerótica como la dislipidemia. De esta manera, el uso de estatinas⁶⁸, fibratos⁶⁹ y/o una combinación de ambos⁷⁰ han demostrado una clara eficacia en la reducción de los niveles de colesterol y triglicéridos. Otras terapias más innovadoras mediante el uso de inhibidores de PCSK9 (proteína que interviene en la degradación del receptor de LDL) han mostrado una gran eficacia en la reducción de los eventos cardiovasculares al disminuir los niveles de LDL^{71,72}. Asimismo, se han desarrollado terapias no enfocadas al tratamiento de la dislipidemia como son las terapias antihipertensivas (inhibidores del sistema renina-angiotensina-aldosterona, beta bloqueantes, diuréticos)^{73,74}, terapias antiplaquetarias (ácido acetilsalicílico, heparina)^{75,76}, y/o tratamientos antiinflamatorios mediante el uso de anticuerpos (IL-1 β , Fosfolipasa, A₂, leucotrienos, CCL2-CCR2, TNF α)^{77,78}. En la **figura 4** se muestra un esquema de todas las características clínicas mencionadas.

La elevada mortalidad derivada de las ECV, el alto precio de los tratamientos quirúrgicos y la reducción de la calidad de vida de los pacientes, evidencia la necesidad de seguir profundizando en el estudio de la aterosclerosis y sus mecanismos subyacentes.

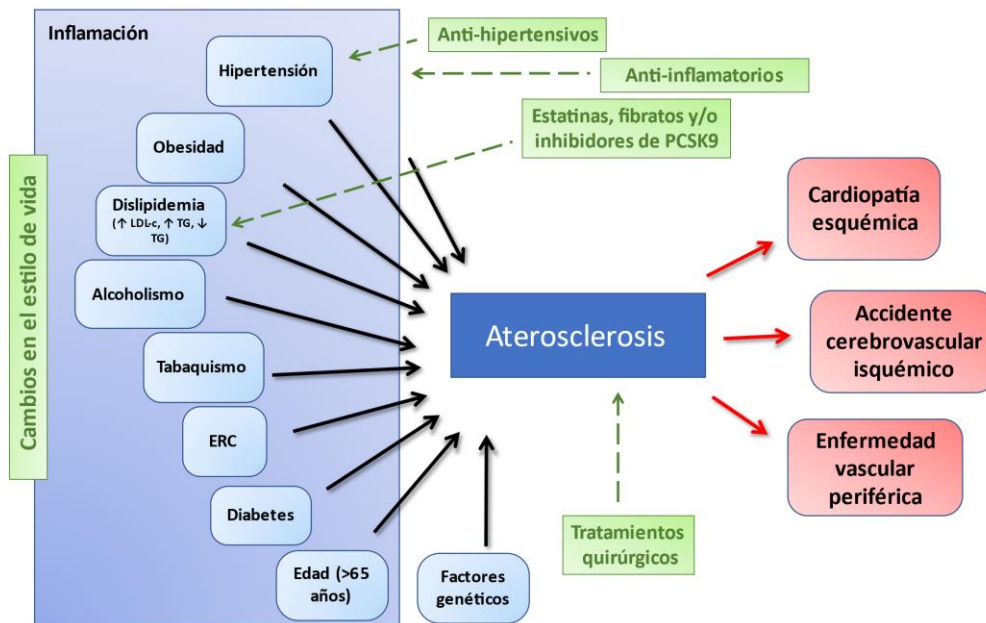


Figura 4. Esquema de las causas (azul), complicaciones (rojo) y terapias clínicas (verde) en la aterosclerosis.

2.2. Fisiopatología de la aterosclerosis

Para la perfecta comprensión de los mecanismos moleculares que intervienen en la formación de una placa aterosclerótica, es necesario conocer la estructura de los vasos sanguíneos donde tienen lugar estos eventos cardiovasculares. Los vasos sanguíneos están constituidos por tres capas estructuralmente diferentes: 1) la **túnica íntima** o endotelio, formada por una monocapa de células endoteliales (CEs), colágeno y fibras de elastina que constituye la primera barrera estructural para moléculas, células o patógenos circulantes; 2) la **túnica media**, formada principalmente por células de músculo liso vascular (CMLVs), tejido elástico y conectivo que proporciona la fuerza muscular necesaria para modificar el diámetro del vaso y, finalmente, 3) la **túnica adventicia**, la capa más externa formada principalmente por una matriz densa de tejido conectivo⁷⁹ (Figura 5).

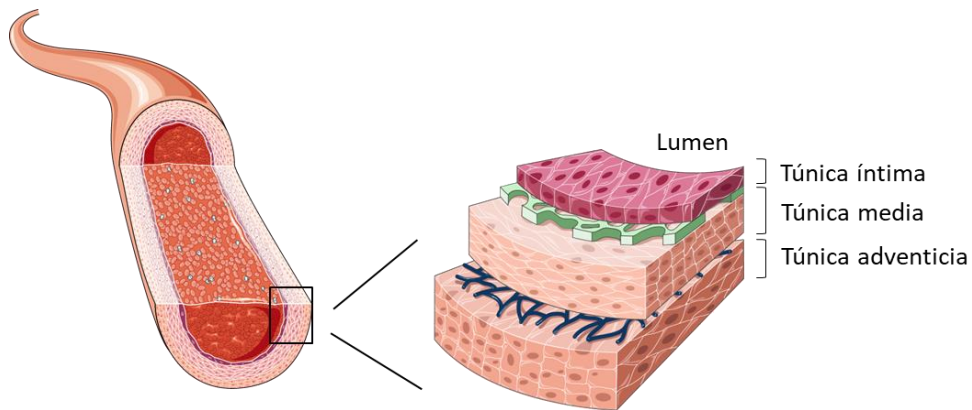


Figura 5. Estructura de la pared de una arteria.

La fisiopatología de la aterosclerosis o formación de la placa de ateroma, puede dividirse en tres pasos: iniciación, progresión y rotura de la placa. Durante todos estos pasos, existe una interacción entre las CEs, las CMLVs y células inflamatorias que intervienen en la acumulación de lípidos en las arterias y en la consecuente formación de la placa⁸⁰.

2.2.1. Iniciación y progresión de la lesión aterosclerótica

En la fase de iniciación y, debido a un proceso de disfunción endotelial que aumenta su permeabilidad, las moléculas LDL se infiltran en el espacio subendotelial⁸¹. La disfunción endotelial está causada por la alteración de la homeostasis vascular, que se encuentra afectada por cambios en ciertos procesos mecánicos como la alteración del flujo laminar⁸², o en mecanismos moleculares como un aumento del estrés oxidativo que, entre otros efectos, disminuye la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO), un potente agente anti-aterogénico involucrado en la vasodilatación⁸³. Todo esto da lugar a un aumento en la síntesis endotelial de citoquinas pro-aterogénicas (TNF- α , IL-1 e IL-6), moléculas de adhesión (VCAM-I e ICAM-1), quimioquinas (MCP-1) y factores de crecimiento (PDGF)⁸⁴⁻⁸⁶ (**Figura 6**). Durante la progresión de la enfermedad, las partículas de LDL están expuestas a un proceso de oxidación que las convierte en componentes inflamatorios clave que favorecen el desarrollo de la placa aterosclerótica. Los principales mecanismos que conducen a la **oxidación de las partículas de LDL** son: la acción directa de los radicales libres de oxígeno (H_2O_2 , OH^- , O_2^-)⁸⁷ y de

moléculas/enzimas con capacidad oxidante como fosfolipasas, lipooxigenasas y oxidasas⁸⁸⁻⁹⁰ y/o la pérdida de los propios antioxidantes presentes en las partículas LDL (ácidos grasos poliinsaturados y vitamina E)⁹¹. Posteriormente las partículas de LDL oxidadas (LDLox) inducen la activación de las CEs, las cuales aumentan la expresión de varias moléculas de adhesión como MCP-1 e ICAM-1⁹², responsables del reclutamiento y migración de monocitos al lugar de la lesión⁹³. Una vez en la capa íntima, los monocitos son activados y diferenciados a macrófagos pro-inflamatorios (M1) o anti-inflamatorios (M2)⁹⁴ y se desencadena la captación de LDLox por parte de estos mediante la expresión de diferentes receptores *scavenger* (SR) (CD36, SR-A1 o LOX-1)⁹⁵. Las LDLox captadas por los macrófagos, se degradan en los lisosomas y el colesterol liberado es esterificado formando esteres de colesterol. La acumulación de esteres de colesterol junto con la disminución en la eficacia de la salida del colesterol, culmina en la transformación de estos macrófagos en las llamadas “células espumosas”^{96,97}. En este punto, las CMLVs, intervienen también en la captación de LDLox, siendo capaces de migrar hacia la túnica íntima y contribuir en la producción de “células espumosas” y su acumulación⁹⁸. Cabe destacar que, a pesar de que los macrófagos constituyen las células predominantes en el desarrollo aterosclerótico, los linfocitos T también juegan un papel importante. En este sentido, los linfocitos T reconocen las LDLox como antígenos, promoviendo una cascada que resulta en la expresión de citoquinas que benefician principalmente la respuesta de células Th1 y Th17⁹⁹. Finalmente, el conjunto de todos estos eventos conduce al desarrollo de lo que es conocido como núcleo necrótico, formado por “células espumosas” muertas, células inflamatorias, CEs y CMLVs que adquieren características miofibroblásticas para formar una capa fibrosa cubriendo la estría grasa (placa aterosclerótica)⁹⁶. Además, se produce la cristalización de calcio y fósforo en forma de hidroxapatita tanto en la capa íntima como media de la arteria, afectando a la estabilidad de la placa aterosclerótica¹⁰⁰ (**Figura 6**).

2.2.2. Rotura de la placa de ateroma

La formación de esta capa fibrosa, protege a la placa aterosclerótica de la rotura, manteniendo el material pro-trombótico en su interior. Sin embargo, a lo largo del tiempo, la continua muerte de CMLVs y macrófagos, la consecuente reducción en la producción de CME, la elevada presencia de moléculas pro-inflamatorias y la

calcificación vascular^{101,102}, disminuyen la capacidad de conservación de una cubierta fibrosa fuerte y rígida, volviéndola inestable y susceptible de romperse mediante fuerzas hemodinámicas^{101,103}. En conclusión, una placa se considera inestable cuando presenta un gran núcleo necrótico, una fina capa fibrótica y un fuerte componente inflamatorio.

Finalmente, la rotura de la placa induce procesos de coagulación, así como el reclutamiento y adherencia de plaquetas con el fin de cicatrizar la herida¹⁰⁴, formando lo que es conocido como trombo. El trombo reduce el flujo sanguíneo generando cardiopatías isquémicas o, si la obstrucción es completa, provocando un infarto de miocardio^{101,105}. Además, si el trombo se desprende de la pared arterial, se produce un coágulo conocido como émbolo, el cual puede alojarse en las arterias distales, obstruyendo el flujo sanguíneo y provocando una isquemia local, una disfunción orgánica o un infarto¹⁰⁶ (**Figura 6**).

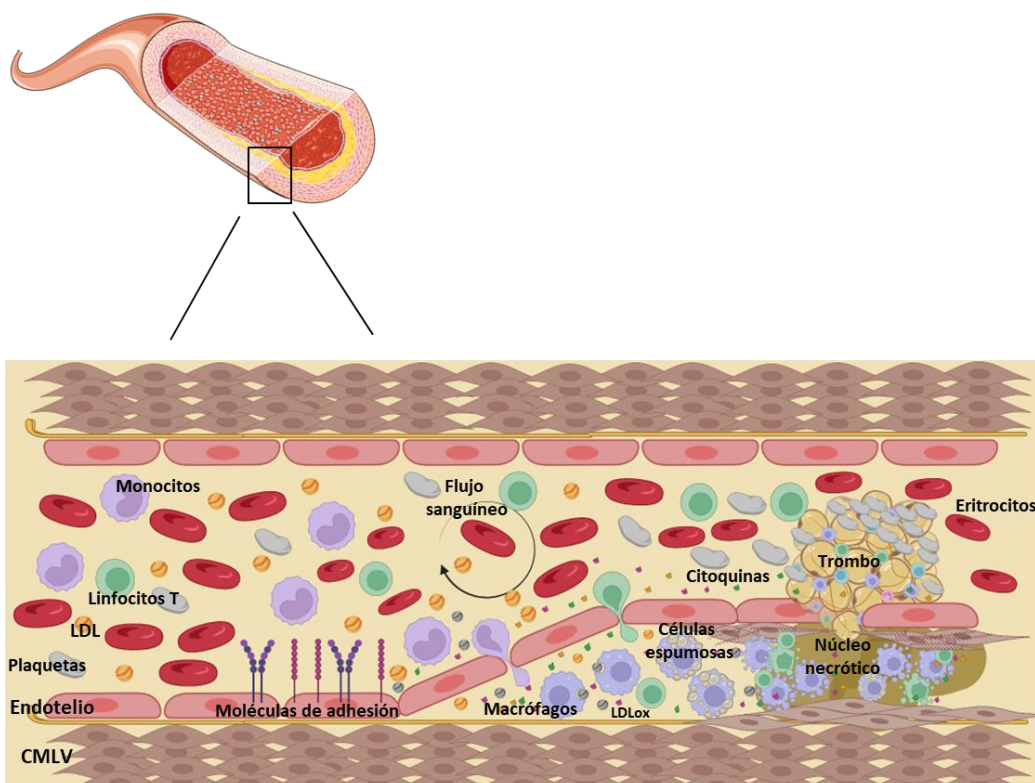


Figura 6. Esquema de los mecanismos celulares y moleculares que se producen en la aterosclerosis. En primer lugar, se produce la activación de las CE y la consecuente disfunción endotelial que conlleva a la liberación de citoquinas proinflamatorias y moléculas de adhesión. Las moléculas liberadas por las CE dirigen el reclutamiento de células inflamatorias (macrófagos, linfocitos) que generan un “feedback” positivo para el reclutamiento de más células inmunitarias. Las partículas de LDL son también oxidadas y fagocitadas por macrófagos, los cuales se convierten en células espumosas ricas en lípidos. Las CMLVs migran hacia la túnica íntima contribuyendo a la formación del núcleo necrótico y la fibrosis. Finalmente, la rotura de la placa genera el reclutamiento de factores de coagulación y plaquetas, generando lo que es conocido como trombo.

3. Papel de la ERC como factor de riesgo en la progresión de la patología aterosclerótica

Como se ha comentado anteriormente, la ERC es uno de los principales factores de riesgo en el desarrollo de ECVs⁵⁷, de hecho, las ECVs constituyen la principal causa de muerte en pacientes con ERC^{19,107,108}. Varios estudios han demostrado esta estrecha relación entre ambas enfermedades. En este sentido, los datos obtenidos en los estudios Framingham¹⁰⁹, Hoorn¹¹⁰ y otros¹⁰⁸, indicaron una relación inversa entre el IFG y el riesgo cardiovascular. Con el mismo objetivo, varios estudios han confirmado que, además del IFG, existe una relación directa e independiente de los niveles de albuminuria con el riesgo cardiovascular¹¹¹⁻¹¹³. Todos estos estudios muestran cómo la disminución de la función renal *per se*, representa un continuo riesgo cardiovascular. Además, este riesgo se ve aumentado en aquellos pacientes con enfermedad renal terminal o en hemodiálisis¹¹⁴. Es importante incidir en aquellos estudios que establecen una clara relación entre la enfermedad aterosclerótica y la patología renal. En este sentido, ya en la década de los años 70, se indicó un claro aumento del proceso aterosclerótico en pacientes en hemodiálisis¹¹⁵. Posteriormente, diferentes estudios prospectivos, indicaron una relación de la ERC con el proceso aterogénico independiente de los tratamientos de diálisis, demostrando una relación causal entre los diferentes estados urémicos presentes durante una ERC y la fisiopatología de la aterosclerosis^{116,117}. En este sentido, Rigatto *et al* mostraron una menor tasa de progresión aterosclerótica en pacientes con ERC avanzada ($\text{IFG} < 30\text{mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$) al compararlos con pacientes que presentaban una función renal más conservada ($30 < \text{IFG} < 60\text{mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$), sugiriendo la implicación de otros mecanismos, diferentes al progreso aterosclerótico, en la incidencia cardiovascular de pacientes con ERC¹¹⁸. Esta controversia puede ser explicada a través de los resultados obtenidos en el estudio NEFRONA, los cuales indican una diferencia en el desarrollo aterosclerótico dependiente de la presencia/ausencia de placa aterosclerótica basal y/o la presencia/ausencia de una ERC progresiva¹¹⁹. En cualquier caso, hay una relación muy estrecha entre la ERC y las diferentes manifestaciones cardiovasculares causadas por un proceso aterosclerótico¹²⁰. Debido a esta fuerte relación entre ambas enfermedades, existe una categorización que engloba y diferencia los distintos síndromes cardiorrenales (SCR) dependiendo del órgano causante del daño (riñón o corazón) y si la disfunción es crónica

o aguda. Dentro de esta categorización, cuando hablamos de una aterosclerosis inducida por ERC, hablamos de un SCR de tipo 4 (Anomalías crónicas de la función renal que conducen a enfermedades cardiovasculares)¹²¹.

La relación entre la ERC y la aterosclerosis se puede comprender, aparte de por la coexistencia de sus factores de riesgo tradicionales (hipertensión, edad, tabaquismo, dislipidemia, diabetes y obesidad), por la susceptibilidad aterosclerótica que otorgan algunas características propias de la ERC (estrés oxidativo, inflamación, toxinas urémicas, calcificación vascular, disfunción endotelial, metabolismo mineral, así como alteraciones lipídicas) (**Figura 7**). Estos factores de riesgo no tradicionales son los responsables del incremento de morbi-mortalidad cardiovascular en enfermos renales comparados con la población general¹²², ya que a medida que la enfermedad renal avanza, los factores de riesgo no tradicionales se vuelven más relevantes, de manera que los eventos cardiovasculares en este grupo de pacientes dejan de depender de los factores de riesgo tradicionales.

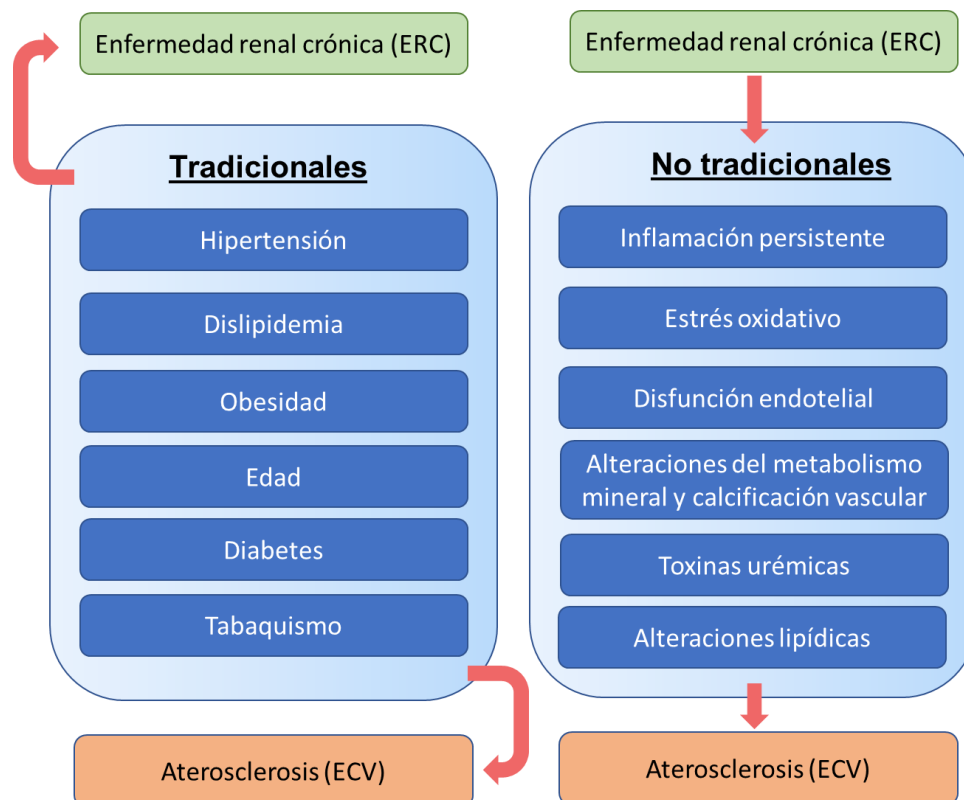


Figura 7. Factores de riesgo cardiovasculares tradicionales y no tradicionales en la ERC.

De esta manera, la relación entre la **disfunción endotelial** y la enfermedad renal en estadios terminales, que requieren tratamientos sustitutivos como la hemodiálisis o la diálisis peritoneal, fue descrita hace dos décadas, observándose una disminución de las propiedades vasodilatadoras de las células endoteliales en pacientes con tratamientos sustitutivos^{123,124}. Pocos años después, se describió una función endotelial alterada en pacientes en estados más precoces de la ERC^{125,126}. En este sentido, la disfunción endotelial que se produce en un ambiente de ERC aumenta la predisposición a la inflamación, vasoconstricción y al incremento de la permeabilidad vascular¹²⁷, favoreciendo el proceso aterosclerótico. Por otro lado, y como se ha comentado, la ERC también se ha relacionado con un aumento en el **estrés oxidativo**^{35,128-130}, proceso vinculado con el desarrollo aterosclerótico de forma directa o indirecta^{131,132}. El estrés oxidativo presente en la ERC está caracterizado por la disminución en la síntesis de enzimas antioxidantes (GSH Peroxidasa, SOD, catalasa) por parte del riñón dañado y el aumento de los radicales libres de oxígeno (H_2O_2 , OH^- , O_2^-) como consecuencia de la inflamación crónica^{35,129,133}. Además, varios estudios han relacionado la presencia de toxinas urémicas (ej. sulfato de p-Cresol, productos glicosilados) con el desarrollo de un ambiente oxidativo^{132,134,135}. NRF2, es un factor de transcripción clave en la respuesta al estrés oxidativo, mediante la regulación en la expresión de agentes antioxidantes, y se ha relacionado ampliamente con el daño renal y la patología cardiovascular derivada¹³⁶. En este sentido, CUL3, proteína responsable de la degradación de NRF2, se ha vinculado con el proceso aterogénico¹³⁷⁻¹³⁹ y su estudio en la aterosclerosis acelerada inducida por un daño renal es de gran interés. Por otro lado, las **alteraciones del metabolismo mineral** y la subsecuente **calcificación vascular** se relacionan estrechamente con el proceso aterosclerótico derivado de una enfermedad renal. El efecto causal de estas condiciones reside principalmente en la disminución de la elasticidad de los vasos sanguíneos y la elevación de la presión arterial, las cuales aumentan el riesgo de sufrir eventos cardiovasculares¹⁴⁰⁻¹⁴². Finalmente, las **alteraciones del metabolismo lipídico** se han relacionado con el proceso aterosclerótico en un ambiente de uremia. En este sentido, varios estudios epidemiológicos han mostrado una dislipidemia en ERC caracterizada por un aumento en los niveles de triglicéridos, colesterol y LDL, así como una disminución en los niveles de HDL¹⁴³. Además, la ERC no solo se ha relacionado con cambios en la cantidad de estas moléculas, sino también con cambios en la calidad de

algunas lipoproteínas como las LDL o HDL, algunos de estos cambios pueden ser la glucosilación, la oxidación y la carbamilación, los cuales son descritos como potentes factores aterogénicos¹⁴⁴.

En la **Figura 8** se presentan gráficamente los diferentes mecanismos no tradicionales mencionados, involucrados en la progresión ateroesclerótica en ERC.

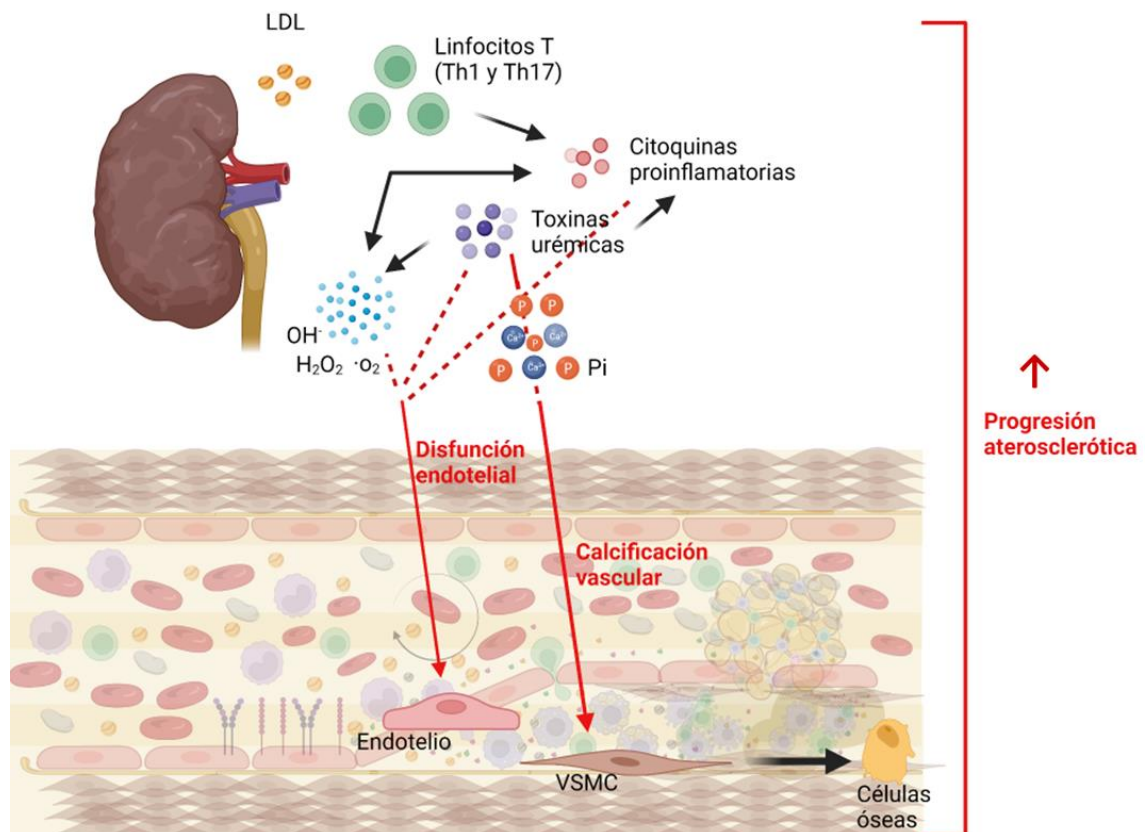


Figura 8. Esquema de los mecanismos no tradicionales involucrados en la progresión ateroesclerótica en la ERC. La dislipidemia y el ambiente inflamatorio caracterizado por la presencia de células y citoquinas proinflamatorias presentes en ERC, generan un aumento de las especies reactivas de oxígeno que, junto con el ambiente inflamatorio y las toxinas urémicas, benefician una disfunción endotelial que predispone al desarrollo ateroesclerótico. Además, la hiperfosfatemia característica de enfermos renales, promueve la calcificación vascular que se relaciona con el progreso ateroesclerótico.

En la actualidad, no existen terapias específicas para el tratamiento de la aterosclerosis derivada de un daño renal, todas ellas se basan en el abordaje de los diferentes factores de riesgo cardiovasculares no tradicionales presentes en estados de uremia. En este sentido, se utilizan tratamientos con vitamina D, vitamina K o quelantes de fósforo con el fin de evitar o restaurar las alteraciones en el metabolismo mineral y, por lo tanto, la subsecuente calcificación vascular¹⁴⁵. Otro tratamiento muy utilizado en

esta cohorte de pacientes son las estatinas que ayudan a mejorar el perfil lipídico de los pacientes con ERC evitando un futuro evento cardiovascular¹⁴⁶. Además, existen estudios prometedores sobre el uso de inhibidores específicos de PCSK9 para tratar las alteraciones lipídicas presentes en estados de uremia¹⁴⁷. Análogamente, se utilizan diferentes mecanismos para reducir la inflamación persistente en estados de uremia como son los anticuerpos frente a IL-6 e IL-1^{27,148}. Los tratamientos con diferentes vitaminas y minerales como la vitamina C, la vitamina E y el magnesio ayudan a disminuir la inflamación y potenciar la respuesta antioxidante¹⁴⁹⁻¹⁵¹. A pesar de la disponibilidad de varias terapias que han demostrado una reducción sustancial en el desarrollo aterosclerótico, hasta el momento no existen biomarcadores específicos que puedan predecir un evento cardiovascular en pacientes con ERC.

3.1. Papel de la inflamación crónica presente en la ERC sobre el desarrollo aterosclerótico

La aterosclerosis y la ERC constituyen dos enfermedades con una fuerte base inflamatoria. Como ya hemos descrito, la inflamación crónica presenta una relación inversa con el IFG y es un mecanismo muy activo en el desarrollo de placas de ateroma. Por lo tanto, no es de extrañar que la inflamación constituya una de las principales causas en el desarrollo aterosclerótico en pacientes con ERC.

En la ERC, existe una inflamación persistente que, a nivel molecular, se caracteriza por un aumento en los niveles de proteína C reactiva (PCR) y citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF- α ¹⁵². La producción de la IL-1 β está dirigida por el inflamasoma, un complejo proteico que actúa como sensor y productor de mediadores inflamatorios. En este sentido, niveles elevados del componente del inflamasoma NLRP3 se han relacionado con el daño renal y el proceso aterosclerótico^{153,154}. Además, el activador de NLRP3 recientemente descubierto, NEK7¹⁵⁵, también se ha vinculado con el proceso aterosclerótico¹⁵⁶, siendo su estudio de gran interés en la aterosclerosis derivada de una enfermedad renal.

En concordancia con el efecto de la inflamación en el desarrollo aterosclerótico en un ambiente urémico, un estudio llevado a cabo en una cohorte de pacientes en hemodiálisis, presentó un claro aumento de las citoquinas proinflamatorias

(IL-1, IL-6 y TNF α) a la vez que una disminución en los niveles de citoquinas antiinflamatorias como IL-2, IL-4, IL-5 e IL-12¹⁵⁷. Estos factores proinflamatorios que se presentan elevados en estados de uremia, son considerados biomarcadores para la mortalidad cardiovascular^{158,159}, y se han relacionado positivamente con el desarrollo aterosclerótico¹⁶⁰, lo que nos facilita el entendimiento de la elevada prevalencia aterosclerótica en pacientes con ERC. Además de lo detallado anteriormente, la inflamación presente en estados de uremia, agudiza otros factores de riesgo cardiovasculares como la disfunción endotelial, el estrés oxidativo o la calcificación vascular^{161,162}.

En estados de uremia y con el ambiente proinflamatorio descrito anteriormente, el aumento en los niveles de monocitos circulantes, la retroalimentación en la producción de citoquinas pro inflamatorias, así como la expresión de moléculas de adhesión (MCP-1, ICAM-1) por parte de las células endoteliales, estimulan la infiltración de monocitos a través del endotelio^{163,164} y la disfunción de las células dendríticas^{165,166}. Esta disfunción, disminuye la tolerancia y contribuye al reconocimiento y presentación de antígenos propios, como antígenos glomerulares, por parte de estas^{167,168}. Este proceso, culmina en el desarrollo de linfocitos T efectores (CD4⁺) o citotóxicos (CD8⁺) que reconocen el autoantígeno, infligiendo un daño renal y sosteniendo el estado inflamatorio¹⁶⁹. Entre otros, los principales linfocitos involucrados en este proceso son los linfocitos Th1 y Th17, que, junto a sus citoquinas derivadas, podría explicar la relación causal de la inflamación urémica en el desarrollo aterosclerótico, debido al papel pro aterogénico de estos subtipos celulares¹⁷⁰.

4. La respuesta inmune

La respuesta inmunitaria comprende una serie de complejos procesos y se puede diferenciar en dos tipos: la respuesta inmunitaria innata y la respuesta inmunitaria adaptativa. La respuesta inmunitaria innata, representa la primera línea de defensa de nuestro organismo frente a daños tisulares, traumas o patógenos, tratándose de una respuesta inespecífica y natural de nuestro organismo. Durante la misma, y entre otros mecanismos, las células involucradas como neutrófilos, basófilos, eosinófilos y macrófagos liberan una serie de citoquinas y, si el daño no puede ser resuelto, a través de las mismas son reclutadas células del sistema inmunológico adaptativo¹⁷¹. A

diferencia de la respuesta inmunitaria innata, la respuesta inmunitaria adaptativa ofrece a nuestro organismo una respuesta específica mediada por linfocitos T y B. Esta respuesta adaptativa de nuestro organismo, requiere de más tiempo puesto que las células progenitoras deben desarrollarse, dando lugar a células reguladoras y/o células efectoras¹⁷².

4.1 Activación de Linfocitos T efectores

La activación y consecuente diferenciación de linfocitos T hacia linfocitos T efectores [Linfocitos T CD4⁺ o *helpers* (Th)] se produce a través de la interacción de varios mecanismos, que comprenden: 1) presentación del antígeno por las células presentadoras de antígenos (CPAs), mediante el complejo mayor de histocompatibilidad II (MHCII, del inglés, *Major histocompatibility complex*) y el correspondiente reconocimiento del péptido antigénico por el receptor de linfocitos T (TCR, del inglés, *T cell receptor*), 2) la unión de la moléculas co-estimuladoras presentes en linfocitos T, como CD28, con sus ligandos correspondientes expresados en las CPAs, 3) la interacción de puntos de control inmunitario (*checkpoints*) entre ambos tipos celulares, que dirigirán la activación/inhibición de los linfocitos T y, 4) la estimulación a través de citoquinas específicas que dirigen la polarización de los linfocitos T hacia Th1, Th2, Th17 o Treg, con citoquinas y respuestas específicas (**Figura 9**). La activación de los linfocitos T CD4⁺ es responsable de la producción de citoquinas pro/anti-inflamatorias y la activación de la respuesta humoral mediada por linfocitos B¹⁷³. Sin embargo, en el caso de que la activación de linfocitos T esté mediada por antígenos propios, se estimula una respuesta inflamatoria desregulada y la síntesis de auto anticuerpos por parte de los linfocitos B que concluyen en el desarrollo de una enfermedad autoinmunitaria¹⁷⁴.

4.1.1. Respuesta Th1 y Th2

La heterogeneidad de las células Th, fue descrita por primera vez en 1986 por Robert Coffman y Tim Mosmann, los cuales caracterizaron y dividieron las células T CD4⁺ en dos subgrupos denominados Th1 y Th2. Esta diferenciación, se basó en el patrón diferencial de citoquinas producidas por cada uno de estos subgrupos de linfocitos Th¹⁷⁵. En este sentido, las células Th1 se caracterizan por la liberación de IL-2 e IFN- γ y son esenciales en la inmunidad celular, siendo responsables en la activación de

células fagocitarias contra infecciones causadas por bacterias, virus o parásitos. Por otro lado, las células Th2 se caracterizan por la producción de IL-4, IL-5 e IL-13 y están principalmente implicadas en la inmunidad humoral, relacionando este subtipo celular con enfermedades atópicas como asma y alergias¹⁷⁶. Las citoquinas clave en el proceso de diferenciación de estas células están bien definidas: IL-12 e IFN- γ en la diferenciación hacia Th1 e IL-4 en la diferenciación hacia Th2. Estas citoquinas actúan a través de la activación de factores de transcripción específicos como T-bet y GATA-3 que conducirán al desarrollo de células Th1 o Th2, respectivamente¹⁷⁷ (**Figura 9**).

4.1.2. Respuesta Treg

Con el fin de asegurar la tolerancia de las células, y por lo tanto conseguir que estas reaccionen únicamente frente a antígenos extraños, se produce un complicado proceso de diferenciación en el timo. Desafortunadamente, un número importante de células T escapan de este mecanismo de tolerancia, convirtiéndose en células T autorreactivas. En base a ello, son necesarios otros mecanismos de control adicionales con el fin de eliminar estas células T autorreactivas. Estos mecanismos adicionales, son llevados a cabo por parte de un subgrupo de células T conocidas como células T reguladoras (Treg)¹⁷⁸.

Esta capacidad reguladora de las células Treg fue descrita por primera vez en los años 70¹⁷⁹. Sin embargo, no fue hasta la década de los 90 que se descubrió el marcador específico para este linaje celular, CD25, al observar la reversión de una enfermedad autoinmune en ratones con ablación del timo tras la inyección de células CD4⁺CD25⁺ procedentes de un ratón normal¹⁸⁰. Mas tarde, se describió el papel fundamental de Foxp3 como factor de transcripción específico de este linaje celular, al comprobar que el principal desencadenante de una enfermedad linfo-proliferativa en ratones Foxp3^{-/-} es la falta de células Treg¹⁸¹. Otros estudios han confirmado la expresión de este factor de transcripción como elemento clave en la diferenciación hacia Treg^{182,183}. Otra característica específica de las células Treg es la síntesis de la citoquina antiinflamatoria IL-10¹⁸⁴ (**Figura 9**). Dentro de las células Treg, podemos encontrar dos subtipos que se diferencian en el lugar y los estímulos requeridos para su activación. De esta manera, nos encontramos con las células Treg derivadas del timo o células Treg

naturales (nTreg) que se desarrollan en el timo en presencia de IL-12 y la activación de STAT5. Por otro lado, nos encontramos las células Treg inducibles (iTreg) que se desarrollan en la periferia en presencia de TGF β y la activación de la vía Smad3/NFAT¹⁸⁵.

4.1.3. Respuesta Th17

Entre los diferentes tipos de linfocitos T efectores, nos encontramos los linfocitos proinflamatorios Th17¹⁸⁶. Este linaje de linfocitos T CD4⁺ desmontó el paradigma Th1/Th2 cuando dos modelos experimentales bien establecidos de enfermedades dependientes de una respuesta Th1, encefalomiелitis autoinmune (EAE) y artritis inducida por colágeno II, mostraron un estado inflamatorio a pesar de una deficiencia en IL-12 (respuesta Th1)¹⁸⁷⁻¹⁸⁹. Además, la IL-23, involucrada en el mantenimiento y proliferación de las células Th17¹⁹⁰, es la principal interleuquina responsable de la inflamación autoinmune que se produce a nivel cerebral en modelos de EAE^{187,191}. A partir de estos y otros estudios se identificó una nueva clase de linfocitos T CD4⁺ caracterizados por la producción de IL-17 y un papel principalmente proinflamatorio¹⁸⁶ (**figura 9**).

En particular, para la diferenciación de linfocitos T CD4⁺ hacia células Th17, se requieren de los factores de transcripción: ROR γ t, ROR α y STAT3, así como del estímulo de los linfocitos T CD4⁺ con citoquinas como TGF β 1, IL-21, IL-1 β , IL-6 e IL-23¹⁹²⁻¹⁹⁵ (**figura 9**). Los factores de transcripción, ROR γ t y ROR α son necesarios para la producción de IL-17 y estos están a su vez regulados por STAT3^{195,196}. Además, más allá de su efecto regulando ROR γ t y ROR α , STAT3 también ejerce un efecto directo mediante la unión a los promotores de los genes que sintetizan IL17 e IL21^{197,198}. Las principales citoquinas involucradas en la diferenciación de las células Th17 son TGF β , IL-6, IL-1 β e IL-21¹⁹⁹⁻²⁰⁴. Además, la acción de la IL-6 y la IL-21 en la generación de células Th17 está mediada en cooperación con TGF β ^{202,205}, el cual ha demostrado ser indispensable en la inducción de células Th17 *in vitro*^{192,193,206}. Por otro lado, IL-23 apareció como una citoquina clave en el mantenimiento, expansión y supervivencia de las células Th17, debido a que la expresión de su receptor (IL-23R) está restringido a los linfocitos proinflamatorios Th17^{187,207}. Tras su diferenciación, las células Th17 producen una gran variedad de citoquinas, entre las más estudiadas nos encontramos: IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-6, IL-22 y el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF, del

inglés, *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*). La producción de cada una de ellas dependerá de las citoquinas presentes en el momento de la diferenciación²⁰⁸. Además, este subtipo celular puede ser identificado a través de marcadores como CCR6 (ligando para CCL20) y CCR4²⁰⁹.

Por otro lado, de la misma forma que ocurre en todas las respuestas inmunológicas, existen reguladores negativos en la activación y expansión de las células Th17 que permiten mantener la homeostasis del cuerpo, evitando posibles respuestas inusuales por parte de estos linfocitos. Los principales reguladores negativos en la polarización hacia Th17 son las células Th1 y Th2, a través de sus principales citoquinas: IFN γ e IL-4²¹⁰. Otras citoquinas involucradas en esta regulación negativa son la IL-25, IL-27 e IL-2²¹¹⁻²¹³. Además, cabe mencionar que, durante el proceso de diferenciación, algunos factores de transcripción como T-bet (específico de Th1) y FOXP3 (específico de Treg) compiten con los factores de transcripción propios del linaje Th17, suprimiendo de esta manera el desarrollo de las mismas²¹⁴⁻²¹⁶.

Finalmente, una característica a mencionar de las células Th17 es su relación recíproca con las células Treg. Esta relación entre ambos tipos celulares, fue descubierta al observar que un estímulo a través de TCR en células T vírgenes en presencia de TGF β y ausencia de IL-6, conducía a una polarización hacia Treg, estimulando el factor de transcripción Foxp3, necesario para la inducción de las mismas^{205,217,218}, mientras que en presencia de, además de TGF β , IL-6 o IL-21 se producía una diferenciación hacia Th17^{202,205,216}. Esta relación recíproca se encuentra apoyada por los modelos *in vivo* con ratones IL-6^{-/-} que presentan, además de un defecto en la producción de Th17, un aumento en el número de Treg²⁰⁵. El mecanismo por el cual estas citoquinas están involucradas en este cambio fenotípico, reside en la regulación que estas ejercen sobre el balance de los factores de transcripción específicos para cada subtipo celular (Foxp3 y ROR γ t)²¹⁶. Por lo que, en presencia de TGF β , IL-6 e IL-21 se inhibiría la expresión de Foxp3 inducida por TGF β , por lo tanto, Foxp3 antagonizaría con la expresión de ROR γ t. De hecho, se ha observado que la ausencia de Foxp3 en células CD4⁺ *in vivo*, genera un aumento en la expresión de ROR γ t e IL-17²¹⁹.

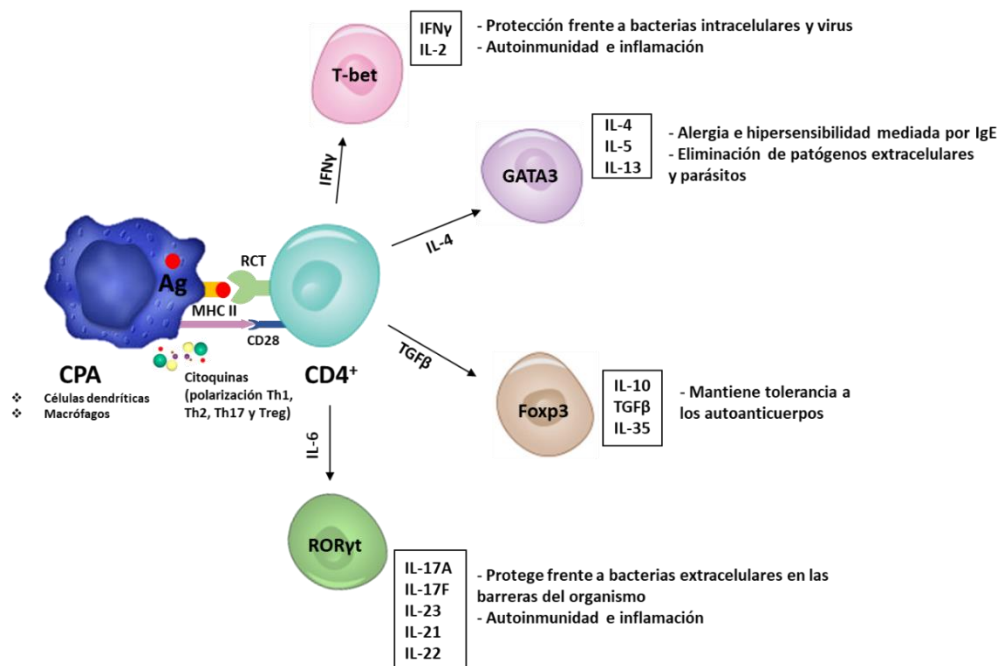


Figura 9. Esquema de diferenciación de las células CD4⁺. Modificado de *Brummelman et al*⁵¹⁸.

5. Interleuquina 17A (IL-17A)

5.1. Familia IL-17

Las citoquinas pertenecientes a la familia de la citoquina IL-17 juegan un papel muy importante en el control de infecciones causadas por patógenos extracelulares, y su activación desregulada contribuye a la patología de muchas condiciones autoinmunitarias o inflamaciones crónicas. Estas citoquinas son principalmente liberadas por células Th17, pero existen otras células capaces de producirlas, como las células T $\gamma\delta$ ²²⁰. La familia de la citoquina IL-17 está formada por 6 citoquinas (IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17-E o IL-25 e IL-17F) (**Figura 9**) y sus receptores correspondientes (IL17RA, IL17RB, IL17RC, IL17RD e IL17RE). La IL-17A, inicialmente conocida como antígeno citotóxico humano asociado a linfocitos T-8 (CTLA-8), fue la primera citoquina descubierta de esta familia²²¹, y su mayor porcentaje de homología lo comparte con la IL-17F (55%)²²². La IL17A fue aislada por primera vez en 1993 a partir de una hibridoma de células T²²¹ y es una glucoproteína de 155 aminoácidos con un peso molecular de 15KDa que se secreta en forma de homodímero de 35KDa²²³. Por otro lado, la IL-17F fue identificada en 2001 como una glucoproteína de 163 aminoácidos que, al igual que la IL-17A es secretada como homodímero²²². Estas

dos citoquinas señalizan a través del mismo receptor y pueden formar heterodímeros entre ellas²²⁰ (**Figura 10**). Sin embargo, su receptor posee una afinidad 100 veces mayor por IL-17A, una afinidad intermedia para el heterodímero IL17A/IL17F y una afinidad más baja por IL-17F²²⁴ que explicaría la diferencia funcional entre estas citoquinas.

Los receptores de esta familia de citoquinas (IL-17R) presentan tres dominios (extracelular, transmembrana y citoplasmático) con motivos conservados entre ellos²²⁰. De la misma forma que sus ligandos, estos receptores también pueden formar homo o heterodímeros entre sí. Así, IL-17RA se encuentra presente en la mayoría de dímeros formados. El heterodímero IL-17RA/IL-17RC, es el responsable del reconocimiento y señalización tanto por IL-17A como por IL-17F, con diferentes afinidades como se ha comentado anteriormente²²⁵ (**Figura 10**).

La unión de IL-17A a su receptor (IL-17RA/IL-17RC) induce la activación del factor de transcripción NF- κ B mediante el reclutamiento de Act1 y TRAF6 hacia el dominio SEFIR presente en IL-17RA^{220,226}(**Figura 10**). Además, a diferencia de las otras subunidades, IL-17RA posee otros dos dominios, denominados TILL y CBAD²²⁷. El dominio TILL y SEFIR han demostrado ser claves en la expresión de C/EBP δ , factor de

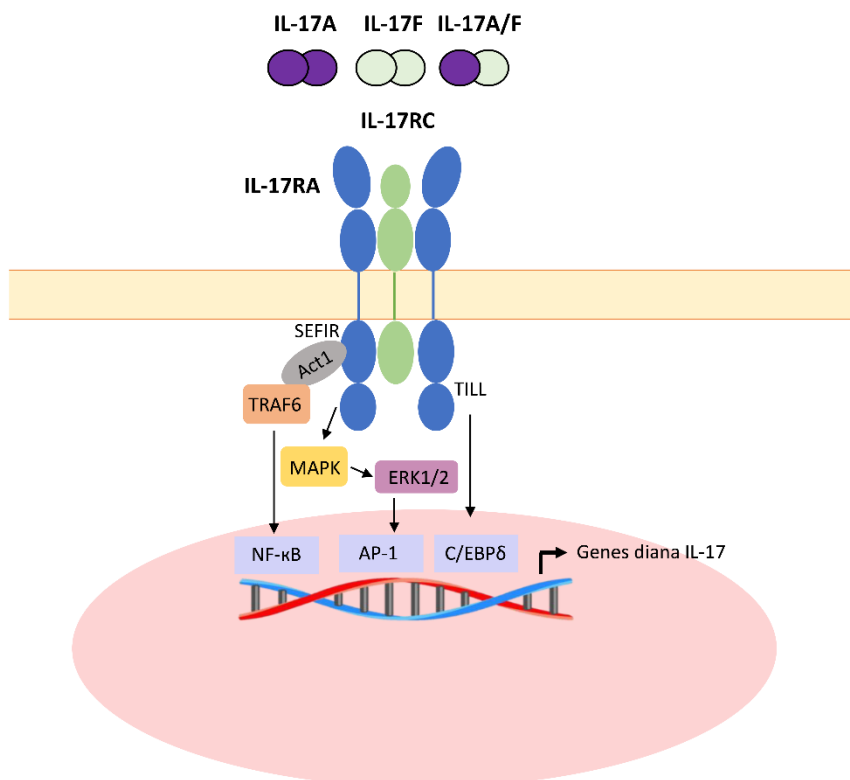


Figura 10. Vías de señalización de IL-17A/F a través de IL-17RA. Modificado de *Gaffen et al*²²⁰.

transcripción involucrado en procesos inflamatorios²²⁸ (**Figura 10**). Otra vía de señalización por la que IL-17 podría ejercer sus efectos, es la activación del factor de transcripción AP-1 a través de la vía de las MAPKs (**Figura 10**). El principal papel de este factor de transcripción parece estar dirigido a la estabilización de los ARNm inducidos por IL-17A, mediante la inhibición de proteínas desestabilizadoras como la tristetraprolina (TTP)²²⁹. Varios estudios han demostrado la activación de los tres subgrupos de MAPKs (ERK1/2, JNK y p38) en presencia de IL17A, siendo la activación de ERK1/2 la predominante²³⁰.

Tanto la IL-17A como la IL-17F pueden estimular la expresión de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias en una gran variedad de tipos celulares debido a la amplia distribución en la expresión de su receptor²³¹. Por lo tanto, el efecto de estas citoquinas dependerá de las células diana. El papel de la IL-17 se ha descrito en un amplio número de enfermedades de diferente etiología como cáncer, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias o enfermedades autoinmunitarias. En enfermedades infecciosas, la IL-17 se ha postulado claramente como una citoquina protectora²³²⁻²⁴⁰ mediante el reclutamiento de células granulocíticas como los neutrófilos hacia el sitio de infección^{232,241}. Además, la IL-17 es una interleuquina clave en las barreras de protección de nuestro organismo como la piel o mucosas, donde ejerce un papel protector y regenerador frente a patógenos²⁴². Por otro lado, varias revisiones han abordado el papel de la IL-17 en un ambiente tumoral donde el papel de esta interleuquina no está muy claro²⁴³⁻²⁴⁵. En cuanto a las enfermedades autoinmunitarias, la IL-17 ejerce un papel pro-inflamatorio²⁴⁶⁻²⁵¹. Este papel proinflamatorio de la IL-17 se ha observado en enfermedades inflamatorias intestinales, como pueden ser la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa²⁵²⁻²⁵⁴, de la piel, como puede ser la psoriasis²⁵⁵ y en enfermedades crónicas como el asma²⁵⁶.

5.2. IL-17 en ERC

Al tratarse de una enfermedad inflamatoria crónica, existen numerosas evidencias sobre el efecto de los linfocitos T en la enfermedad renal. Sin embargo, estos estudios recaen principalmente en el papel de los subtipos de linfocitos Th1 y Th2²⁵⁷⁻²⁵⁹. Aun así, el descubrimiento del linaje Th17 y el papel clave de la IL-17 en las

enfermedades inflamatorias y autoinmunes, explica el creciente interés de los investigadores en el estudio del papel de esta citoquina en patologías con etiologías similares.

Las primeras evidencias del papel de IL-17 en la respuesta inflamatoria renal se describieron en 1998²⁶⁰, al observar un aumento en la producción de factores proinflamatorios como IL-6, IL-8 o MCP-1 en células tubuloepiteliales humanas, tras la estimulación de estas con IL-17. En los últimos 5 años, varios investigadores han confirmado esta relación positiva entre la IL-17 y un peor pronóstico de la enfermedad renal²⁶¹⁻²⁶³. En este sentido, Rodríguez *et al*, mostraron esta relación positiva entre IL-17 y el proceso inflamatorio renal en pacientes con diálisis peritoneal, lo que confirmaron mediante la exposición repetida de ratones a IL-17A recombinante y/o fluidos de diálisis²⁶⁴. Análogamente, un estudio llevado a cabo en 2020, demuestra una mejora parcial del daño renal en un modelo experimental de obstrucción ureteral unilateral (UUO), tras el uso de un anticuerpo monoclonal frente a IL-17²⁶³. Sin embargo, y a diferencia de lo que cabría esperar, Rosendahl *et al*²⁶⁵ demostraron, en 2019 que, en un modelo experimental de ERC, llevado a cabo tras una nefrectomía subtotal en ratones knockout para IL-17A, no se observaba una mejora ni en el inicio, ni en la progresión de la ERC. Los mismos resultados fueron observados en un estudio en el que, ni la deficiencia génica de IL-17A, ni su bloqueo con anticuerpos específicos, mejoraban la progresión de una ERC provocada por una reperfusión isquémica renal²⁶⁶, indicando una posible limitación de estos modelos experimentales en el estudio de la señalización de IL-17. En otros modelos experimentales de daño renal, como modelos de glomerulonefritis o daño renal inducido por angiotensina II, se observó que la progresión y malignidad de la enfermedad era dependiente de Th17, puesto que la ausencia de IL-17 o ROR γ t confería protección frente a esta patología²⁶⁷⁻²⁷⁰. Además, la inyección de células Th17 en modelos experimentales de glomerulonefritis se relaciona con un aumento del infiltrado glomerular, un aumento en la expresión de CXCL1 (quimioquina atrayente de neutrófilos) y albuminuria²⁷¹.

Por otro lado, como se ha comentado en apartados anteriores, la plasticidad de las células Th17 es una característica que permite mantener una correcta homeóstasis inmunológica. En este sentido, pacientes urémicos y pacientes en etapa

final de la enfermedad renal, presentan un claro desbalance en la ratio Th17/Treg, con un aumento de las citoquinas relacionadas con la respuesta Th17 (IL-17, IL-6, IL-23) y de los niveles de expresión del principal factor de transcripción que dirige la diferenciación hacia Th17: ROR γ t^{272,273}.

Uno de los principales mecanismos de acción que se propone en la inflamación renal dependiente de IL-17, es la capacidad de esta citoquina de estimular la producción de otras citoquinas pro-inflamatorias y moléculas quimio-atractivas de macrófagos, neutrófilos y células T en células renales residentes como las células tubuloepiteliales y mesangiales^{274,275}. Además, se ha descrito la capacidad de la IL-17 de inducir TEM en células tubulares renales²⁷⁶ así como la activación de otras células inmunitarias como monocitos²⁷⁷ (**Figura 11**).

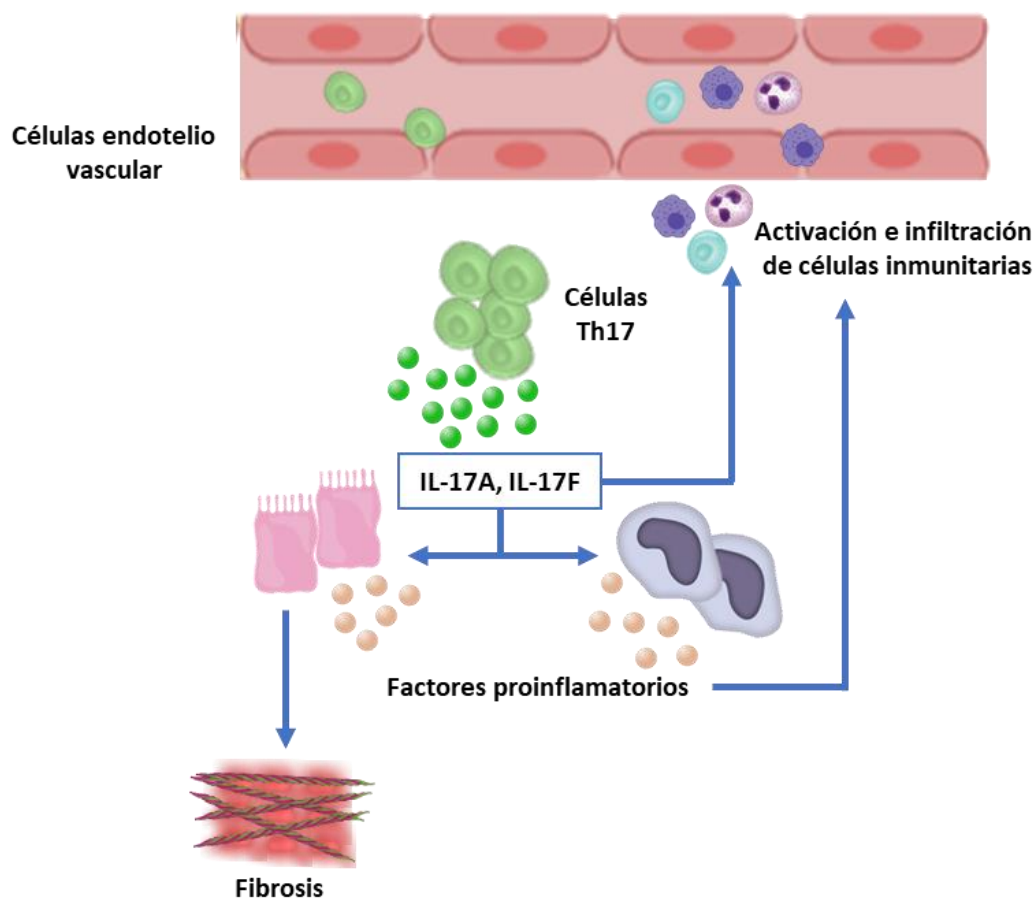


Figura 11. Efecto de IL-17A/F en las células renales.

5.3. IL-17 en enfermedades cardiovasculares

De la misma forma que ocurre con la enfermedad renal, el papel de las respuestas Th1 y Th2 se encuentra ampliamente estudiado en el proceso aterogénico, clasificando la respuesta Th1 como una respuesta principalmente pro-aterogénica y la respuesta Th2 como una respuesta mayormente atero-protectora⁹⁹. En los últimos años, se ha avanzado en el estudio de la respuesta Th17 en las enfermedades cardiovasculares. En 2012, Butcher *et al*²⁷⁸ describieron la presencia de células Th17 en placas ateroscleróticas de arterias coronarias. Estudios posteriores han mostrado niveles elevados de IL-17 en pacientes con infarto agudo de miocardio, angina inestable e insuficiencia cardíaca^{279,280}. Por otro lado, estos niveles de IL-17 se han asociado con un peor pronóstico en pacientes con infartos agudos de miocardio recurrentes²⁸¹. En modelos experimentales de hipertensión arterial, la ausencia de IL-17 se relaciona con una disminución de la hipertensión, disfunción endotelial e infiltración inflamatoria producida por Ang II²⁸², y el bloqueo de IL-17 mejora la lesión miocárdica inducida por una isquemia/reperfusión^{283,284}. Análogamente, se han detectado niveles elevados de IL-17 en etapas tempranas de desarrollo aterosclerótico en ratones ApoE^{-/-}²⁸⁵, y su bloqueo conduce a una reducción del tamaño de la lesión²⁸⁶. A nivel celular, se ha descrito la capacidad de IL-17 de estimular la producción y liberación de citoquinas y moléculas de adhesión por parte de las células endoteliales²⁸⁷. De la misma manera, IL-17 ha mostrado estar involucrada en la activación plaquetaria y la liberación de factores protrombóticos por parte de las células endoteliales^{287,288}. Por otro lado, la proliferación y migración de las CMLVs también se encuentra regulada por la IL-17^{280,286}.

A pesar de estas claras evidencias de la acción pro-aterogénica de la IL-17, otros estudios han demostrado un efecto atero-protector de esta citoquina que reside principalmente en la capacidad de la IL-17 de estabilizar las placas ateroscleróticas^{289,290}. Además, se ha observado que, dependiendo del ambiente inflamatorio, la citoquina IL-17 puede ejercer un efecto atero-protector mediante la inhibición del IFN- γ , una citoquina clave en el proceso aterosclerótico²⁹¹, y el aumento en la producción de citoquinas atero-protectoras como IL-5 y IL-10^{290,291} (**Figura 12**).

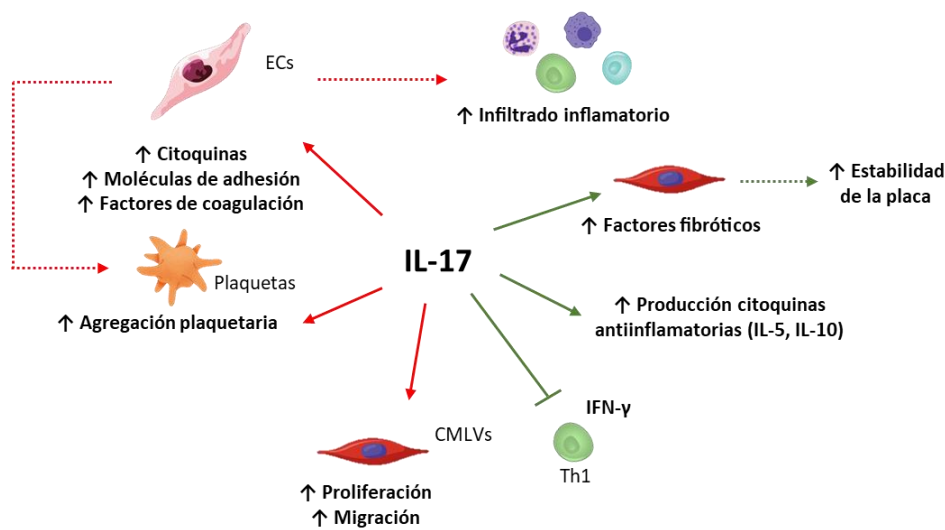


Figura 12. Esquema de los diferentes efectos pro y anti-aterogénicos descritos para IL-17.

6. BTLA (*B and T lymphocyte attenuator*)

Para que se lleve a cabo una correcta activación de los linfocitos T, además del reconocimiento del antígeno mediado por TCR, se requieren señales adicionales de co-estimulación que promoverán la proliferación de las células T efectoras. De forma contraria, también existen señales co-inhibitorias que generan una disminución en la respuesta de los linfocitos T promoviendo la tolerancia. Por lo tanto, el balance entre ambos tipos de señales será el encargado de mantener una homeostasis inmunológica en nuestro organismo²⁹². Las moléculas responsables de estas señales se clasifican en dos familias según su estructura. La primera corresponde a la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF) CD28 en la que se encontrarían CD28, CTLA-4 (del inglés, *Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*), ICOS (del inglés, *Inducible costimulatory molecule*), PD-1 (del inglés, *Programmed death-1*) y BTLA (del inglés, *B and T-lymphocyte attenuator*); y la segunda corresponde a la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFRSF) que incluye CD27, CD30, 4-1BB, HVEM (del inglés, *Herpes virus entry mediator*), CD40 y OX40^{293–295} (**Figura 13**).

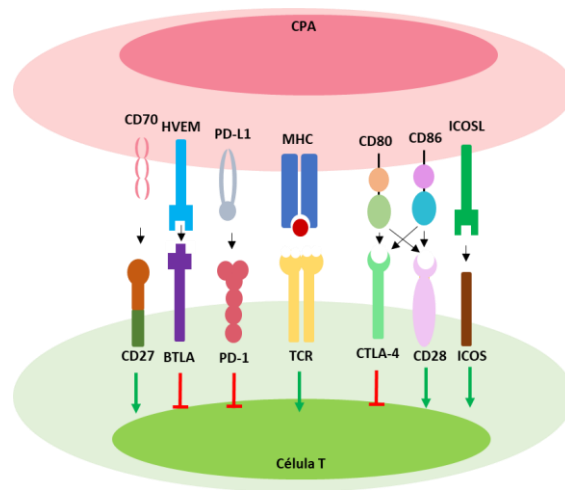


Figura 13. Imagen representativa de las moléculas co-estimuladoras y co-inhedoras más estudiadas.

BTLA (también conocido como CD272) es el último miembro de la familia CD28 descubierto hasta el momento. Consiste en una glicoproteína transmembrana de tipo I con 289 aminoácidos y una estructura similar a la de sus homólogos CTLA-4 y PD-1, pues todos ellos están formados por un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático²⁹⁶. En su dominio citoplasmático, BTLA posee tres motivos conservados: un motivo de reconocimiento para la proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento (Grb-2), un motivo ITSM y un motivo ITIM (Inmunoreceptor con motivos de cambio/inhibición basados en tirosinas, respectivamente)²⁹⁷. Por otro lado, y en relación a la expresión de BTLA, este se encuentra principalmente expresado en linfocitos maduros (células B y T), macrófagos y células dendríticas; lo que explica que los principales órganos productores de BTLA sean el timo, bazo y nódulos linfáticos, siendo su expresión muy baja en otros órganos como hígado, riñón, corazón y cerebro^{296,298}.

En 2005, fue descubierto HVEM (del inglés, *Herpes Virus Entry Mediator*) como el único ligando para BTLA²⁹⁹. Además, con este descubrimiento se cambió la idea de que estos receptores interactuaban únicamente con ligandos pertenecientes a la misma familia, ya que HVEM pertenece a la superfamilia TNFR. Más tarde se descubrió que BTLA no era el único ligando para HVEM, sino que competía con otros dos miembros de la superfamilia TNFR por la unión a HVEM (limphotoxin α y LIGHT) y con dos miembros de la superfamilia de las Ig (CD160 y HSV1 gD)³⁰⁰. Además, evidencias demuestran que no solo BTLA debe competir por la unión con su ligando HVEM, sino que este último

competiría también con una glicoproteína del citomegalovirus humano (HCMV), UL144, por la unión a BTLA, a pesar de que la unión UL144-BTLA tienen una afinidad 5 veces menor que la unión HVEM-BTLA³⁰¹. Por lo tanto, debido a una mayor afinidad de la unión y un mayor número de evidencias, HVEM se postula como el principal ligando para BTLA. Con respecto a la expresión de HVEM, esta se encuentra ampliamente distribuida ya que se ha observado expresión de este receptor en células T, células B, células NK, células dendríticas e incluso se ha estudiado la inducción de su expresión en tejidos somáticos²⁹⁷. La señal provocada tras la unión HVEM-BTLA fue descubierta en 2005 como una señal inhibitoria para la activación y proliferación de linfocitos T²⁹⁹, de hecho, se ha observado en linfocitos T vírgenes que el complejo HVEM-BTLA bloquea otras señales estimuladoras, como la unión HVEM-CD160 para mantener la tolerancia de los linfocitos T³⁰².

A nivel molecular, tras la unión HVEM-BTLA se produce la fosforilación de los motivos ITIM e ITSM, lo que resulta en el reclutamiento de las fosfatasas SHP-1 y SHP-2^{299,303}. Estas fosfatasas, defosforilan ITIM e ITSM, inhibiendo de esta manera la activación celular dependiente de la proteína tirosina quinasa (PTK)^{296,303}. Aunque el mecanismo “*downstream*” para SHP1/SHP2 no se conoce, se postula que estas tengan un papel en la regulación de intermediarios en las vías de señalización “*downstream*” de TCR, como podría ser la regulación directa de la vía PI3K/AKT como se ha propuesto para la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1, del inglés, *programmed death 1*)^{296,303–305} (Figura 14).

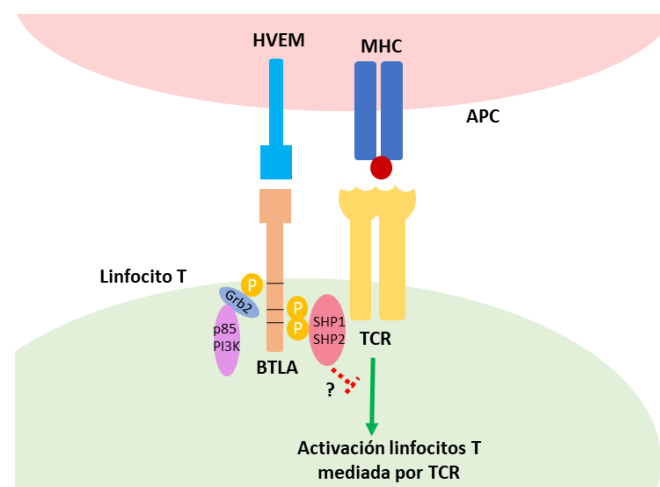


Figura 14. Vía de señalización propuesta para la unión HVEM-BTLA. Modificado de *Murphy et al*²⁹⁷

Por otro lado, BTLA podría tener efectos bidireccionales a pesar de haberse postulado claramente como una proteína inhibidora de la activación de linfocitos. Estos efectos los llevaría a cabo mediante la unión de Grb2 a su dominio citoplasmático, lo que generaría el reclutamiento de la subunidad p85 de PI3K, activando esta vía cuya función principal es la supervivencia celular³⁰⁶, a pesar de ello no hay evidencias de esta interacción *in vivo*. Aun así, la regulación de BTLA se presenta como un mecanismo más complejo que posiblemente dependa del contexto inmunológico y se requieren estudios que permitan elucidar los mecanismos moleculares de acción para BTLA.

La mayoría de estudios llevados a cabo hasta el momento sobre BTLA, se centran en el efecto de esta molécula en linfocitos T. Como se ha explicado anteriormente, la unión HVEM-BTLA reduce la activación y proliferación de linfocitos T tras un estímulo mediante TCR^{296,299} ya que la señal inhibitoria de BTLA ha demostrado ser más fuerte que la posible señal estimuladora del mismo³⁰⁷. De hecho, se ha observado un aumento en la proliferación de células T deficientes en BTLA en respuesta a anticuerpos específicos frente a CD3 y a la presentación de antígenos llevada a cabo por CPAs²⁹⁶. De esta manera, BTLA se ha descrito como una potente estrategia para mantener la tolerancia inmunológica de los linfocitos T^{302,308,309}. Consistente con el efecto inhibitorio de BTLA, se ha observado en modelos experimentales de EAE y modelos de hipersensibilidad de las vías respiratorias, que la ausencia de BTLA cursa con una mayor severidad y duración de la enfermedad^{296,310}, lo mismo se ha observado en modelos de EAE deficientes para HVEM³¹¹. Otro claro ejemplo de las acciones inhibitorias de BTLA se ha observado en trasplantes, donde ratones deficientes para BTLA generan un rápido rechazo del trasplante³¹², de hecho, la inhibición de la activación linfocitaria mediada por BTLA en un ámbito de trasplante, parece ser más eficiente que la señal mediada por PD-1³¹². Por otro lado, la deficiencia del ligando para BTLA, HVEM, da lugar a un aumento en la producción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , IFN- γ , IL-2 y IL-6³¹¹. Estos resultados obtenidos en ausencia de HVEM podrían explicarse por la actuación de HVEM a través de BTLA para inhibir la respuesta de las células T.

A pesar de las investigaciones llevadas a cabo sobre la acción de BTLA en enfermedades inflamatorias, el papel de BTLA en enfermedades cardiovasculares es poco conocido. Únicamente un estudio llevado a cabo en 2020³¹³ relaciona BTLA con el

proceso aterosclerótico en el que la estimulación de BTLA en ratones LDLR^{-/-} reduce el desarrollo inicial de la lesión aterosclerótica e induce la expresión de colágeno en placas ateroscleróticas establecidas. Por otro lado, no hay estudios sobre el posible papel de BTLA en un contexto de enfermedad renal. Esta escasa información sobre el papel de BTLA en la enfermedad cardiovascular y renal, así como la implicación de esta proteína en diferentes enfermedades inflamatorias, hacen de esta molécula un objetivo de estudio prometedor.

En los últimos años, varios investigadores se han centrado en el estudio de la posible relación entre BTLA e IL-17. En este sentido, la deficiencia o reducción en BTLA, muestra una exacerbación de la respuesta inflamatoria dependiente de IL-17 en diferentes enfermedades inflamatorias como la dermatitis³¹⁴, trastornos inflamatorios multisistémicos (síndrome de Behçet)³¹⁵, el lupus eritematoso sistémico³¹⁶ o la vasculitis asociada a ANCA³¹⁷. Además, otros estudios actuales han mostrado que el aumento de BTLA estimula un cambio fenotípico hacia Treg^{318,319} y que la unión HVEM-BTLA se relaciona con una disminución de la respuesta dependiente de IL-17³²⁰. Sin embargo, no existen evidencias sobre el eje BTLA-IL17 en la enfermedad aterosclerótica en un contexto renal, ni en la enfermedad renal *per se*.

7. micro-ARNs

Los micro-ARNs son pequeñas moléculas no codificantes de ARN (~19-24 nucleótidos de longitud), conservados evolutivamente que actúan como reguladores postranscripcionales de la expresión génica, gracias al apareamiento de bases con el ARNm complementario. Los micro-ARNs fueron descubiertos en 1993 por Lee et al³²¹ en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, donde se observó una bajada en la síntesis proteica de un gen necesario para su desarrollo embrionario de manera dependiente de pequeñas moléculas de ARN (micro-ARNs). Se estima que la expresión de un tercio de los genes humanos está regulada por mecanismos dependientes de micro-ARNs³²². Un solo micro-ARN es capaz de regular unos 200 ARNm involucrados en distintos procesos biológicos y, un transcrito de ARNm puede ser a su vez regulado por varios micro-ARNs³²³. Durante los últimos años, se ha relacionado los micro-ARNs con un gran número de procesos celulares como la regulación del ciclo celular, inflamación, estrés, invasión o apoptosis entre otros³²⁴. Además, se han relacionado ampliamente los micro-

ARNs con la comunicación celular mediante el transporte de estas moléculas en exosomas, microvesículas o incluso en moléculas de HDL³²⁵⁻³²⁷.

7.1. Biogénesis y regulación

La vía canónica de síntesis y procesamiento de los micro-ARNs (**Figura 15**), es la vía más ampliamente estudiada, aunque recientemente se han descubierto otras vías de síntesis y procesamiento para micro-ARNs³²².

La localización genómica de los micro-ARNs varía ampliamente. De esta manera, los micro-ARNs pueden encontrarse en intrones o exones y pueden compartir o no la maquinaria de transcripción con sus genes adyacentes³²⁸. La vía canónica de síntesis de micro-ARNs, se inicia con la transcripción del ADN genómico. La mayoría de los micro-ARNs son transcritos por la ARN polimerasa II en ARN de cadena larga conocidos como pri-miARNs, los cuales presentan una estructura característica en forma de bucle (**Figura 15**). Esta molécula de pri-miARN es reconocida en el núcleo por un complejo microprocesador, formado por una molécula de RNase II Droscha y el cofactor DGCR8. Este complejo Droscha es responsable del corte de la molécula de pri-miARN para obtener una molécula de pre-miARN^{329,330} (**Figura 15**). Posteriormente, esta molécula de pre-miARN es transportada hacia el citoplasma a través de la Exportina 5 y un mecanismo dependiente de Ran-GTP³³¹. Una vez en el citoplasma, se produce la eliminación del "loop" característico de la molécula de pre-miARN mediante el reconocimiento de esta por parte del complejo de procesamiento formado por Dicer, TRBP (del inglés, *TAR RNA-binding protein*) y la proteína quinasa activadora dependiente de ARN de cadena doble inducible por interferón, PRKRA. La eliminación del "loop" de esta molécula, generará un dúplex de micro-RNA maduro de unos 21-26 nucleótidos, formado por una cadena madura de micro-ARN y su cadena complementaria³³² (**Figura 15**). Posteriormente, el dúplex de micro-ARN formado, es cargado en la proteína argonauta (AGO) 2, la cual promueve la unión del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC)³³³ y la eliminación de una cadena del dúplex. Finalmente, la cadena guía de micro-ARN que permanece en el complejo proteico, se dirige hacia el extremo 3' de sus genes diana a los que se une mediante el emparejamiento de sus bases. Si esta unión micro-ARN-ARNm posee una complementariedad perfecta o casi perfecta, se produce

el corte y degradación de los ARNm diana, en el caso de que no sea así, se produce la desestabilización del ARNm y a la consecuente represión de la traducción³³⁴. Por otro lado, cabe mencionar el posible efecto de los micro-ARNs en la activación de sus ARNm diana³³⁵ (**Figura 15**).

El reconocimiento y unión de un micro-ARN con su ARNm, se produce principalmente a través del emparejamiento de la región de siembra del micro-ARN (nucleótidos 2 al 8) y la región 3'UTR del ARNm diana³³⁶, siendo estos nucleótidos los principales responsables de la mayor parte de la represión mediada por micro-ARNs.

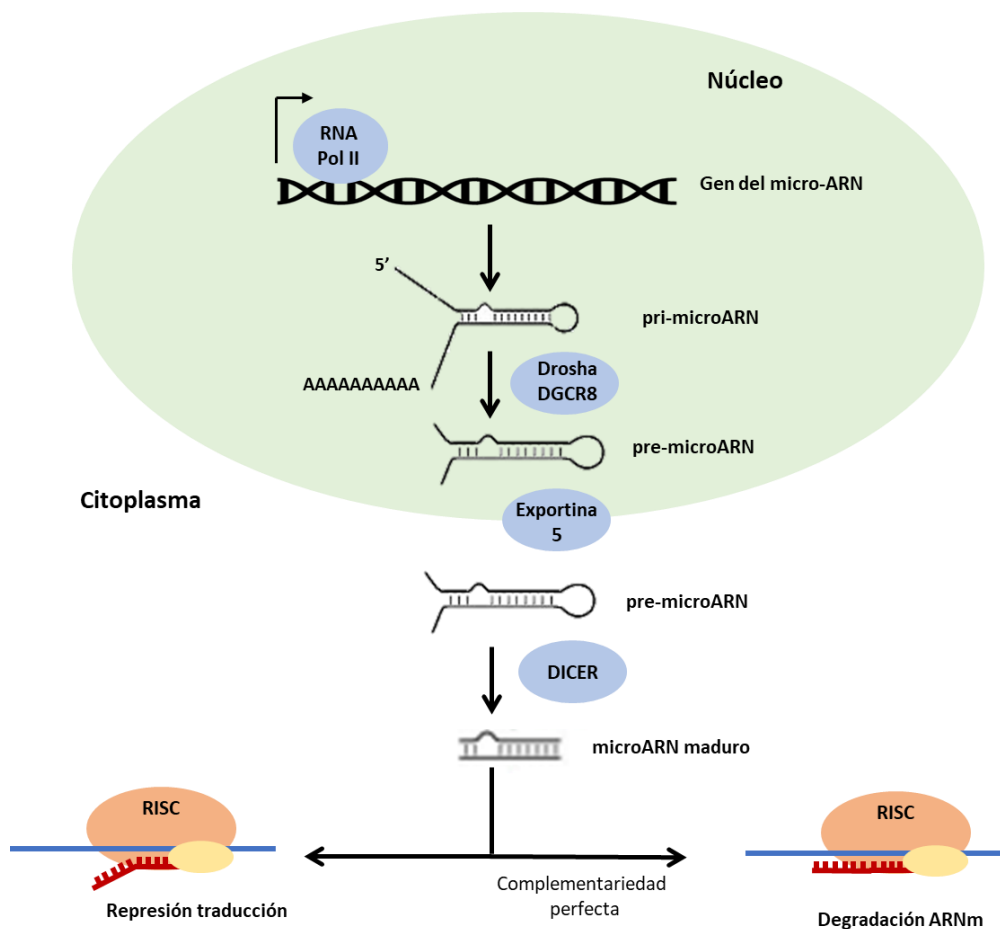


Figura 15. Proceso de biogénesis de micro-ARNs. Modificado de *Bushati et al*⁵¹⁹.

7.2. micro-ARNs en el eje cardio-renal

De la misma forma que ocurre con otras enfermedades, se han descrito un gran número de micro-ARNs como posibles dianas en la enfermedad cardiovascular en un contexto de daño renal. En este sentido, un estudio reciente, mostró una clara disminución en los niveles de dos micro-ARNs con una reconocida función protectora a nivel vascular, miR-126-3p y miR-130a-3p, en pacientes con enfermedad coronaria y ERC al compararlos con pacientes con enfermedad coronaria sin ERC y/o controles³³⁷. Análogamente, miR-92a, ampliamente relacionado con el proceso aterosclerótico³³⁸⁻³⁴⁰, aparece elevado en sangre de pacientes con ERC³⁴¹, y su inhibición ha mostrado una mejora en el desarrollo de una aterosclerosis asociada a un daño renal³⁴². Adicionalmente, miR-142-3p se ha correlacionado inversamente con la rigidez vascular, un marcador bien establecido de la enfermedad cardiovascular, y sus niveles se encuentran disminuidos en pacientes con enfermedad renal en estadios terminales³⁴³. De la misma manera, miR-126 se correlaciona con la disfunción endotelial en un modelo experimental de ERC^{344,345} y la disminución de miR-145 y miR-143 se relacionan con un aumento del fenotipo proliferativo de las CMLVs, en un modelo experimental de ERC en ratones ApoE^{-/-}³⁴⁵. Varios micro-ARNs han mostrado estar relacionados en la respuesta inflamatoria crónica presente en pacientes con ERC, tomando un papel relevante en el desarrollo de eventos cardiovasculares. En este sentido, un estudio llevado a cabo en pacientes con ERC, mostró una disminución en los niveles de miR-223-3p y miR-93-5p en pacientes con ERC, bajada que se relacionó con un aumento en los niveles de la IL-6, una citoquina vinculada con el desarrollo aterosclerótico en pacientes con ERC^{346,347}. Además, miR-223 se relacionó con una disminución de la polarización de macrófagos hacia su fenotipo inflamatorio (M1)³⁴⁸ y la activación del inflamasoma mediado por NLRP3 e IL-1 β ³⁴⁹. Sin embargo, existen resultados contradictorios del papel de miR-223 en un proceso inflamatorio, ya que miR-223 también se ha relacionado positivamente con el proceso inflamatorio mediante la capacidad de este micro-ARN de aumentar indirectamente los niveles de IL-17³⁵⁰, y los niveles de miR-223 se encuentran aumentados en un modelo experimental de ERC en ratones ApoE^{-/-}³⁴⁵. En cuanto a la vía de señalización de la IL-17, miR-21, miR-146 y miR-155 se relacionan positivamente con la regulación de esta vía inflamatoria³⁵¹⁻³⁵⁵, la cual se encuentra positivamente relacionada con la enfermedad renal y la aterosclerosis³⁵⁶⁻³⁶¹.

HIPÓTESIS Y OBJETIVO

HIPÓTESIS

La principal causa de muerte en pacientes renales crónicos son los eventos cardiovasculares, muchos de ellos causados por un proceso de aterosclerosis acelerada. Los micro-ARNs han emergido como potentes moléculas que pueden ser de gran utilidad como biomarcadores, por su alta estabilidad en fluidos corporales como la sangre. En este sentido, **nuestra primera hipótesis postula que, en la ERC, la expresión de micro-ARNs y ARNm en sangre está alterada, y esto puede identificar a algunos de ellos como posibles biomarcadores predictivos de la aparición de placa aterosclerótica o progresión de la misma en enfermedades renales.** Por otro lado, uno de los factores claramente implicados tanto en la aterosclerosis como en la enfermedad renal crónica es la inflamación. Debido a la elevada actividad de la IL-17A en enfermedad renal y aterosclerosis, y la estrecha relación de esta citoquina con BTLA, **nuestra segunda hipótesis es la implicación de la vía BTLA/IL-17A como nexo de unión en el desarrollo de la aterosclerosis como de la ERC, y su posible regulación a través de miRNAs alterados en esta patología.**

OBJETIVOS:

Objetivo general: Identificar diferentes micro-ARNs y/o ARNm como posibles biomarcadores en la predicción de un evento aterosclerótico en enfermedad renal, así como investigar las posibles vías de señalización implicadas.

Objetivos específicos:

1. Investigar la alteración en la expresión de micro-ARNs y ARNm en sangre total de pacientes renales crónicos relacionado con la aparición y desarrollo de una placa aterosclerótica.
2. Establecimiento de un modelo de aterosclerosis acelerada en enfermedad renal crónica, así como analizar la expresión de BTLA en el mismo.
3. Estudiar la expresión de BTLA y su posible micro-ARN regulador, miR-500a-3p, en pacientes renales crónicos.
4. Estudiar la expresión de BTLA en diferentes modelos experimentales de daño renal de componente inflamatorio e inmune.
5. Investigar el papel de BTLA y miR-500a-3p en estudios *in vitro* en linfocitos T.
6. Estudiar la activación de la vía de señalización de IL-17A en muestras de pacientes, modelos experimentales de daño renal y vascular, así como experimentos *in vitro* y estudiar la posible regulación de la misma por miR-500a-3p.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Sujetos de estudio.

Los estudios con muestras humanas se han realizado de acuerdo con la Declaración de Helsinki y las leyes nacionales y locales:

- Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica.
- Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y del tratamiento de las muestras biológicas de origen humano, y se regula el funcionamiento y organización del Registro Nacional de Biobancos para investigación biomédica.

El estudio fue aprobado por el comité de ética del Hospital Arnau de Vilanova y todos los participantes firmaron un consentimiento informado previo a su inclusión en el estudio, dando así permiso para el uso de forma anónima de sus datos médicos para investigación.

Las muestras de pacientes utilizadas en esta tesis proceden del estudio NEFRONA³⁶²; un estudio multicéntrico y prospectivo (4 años de seguimiento) formado por 2445 pacientes con ERC y 559 pacientes sin ERC. El objetivo de este estudio es la investigación de la progresión aterosclerótica y la calcificación vascular en la enfermedad renal. Con la finalidad de conocer las diferentes características vasculares de cada paciente a lo largo del estudio, estos fueron sometidos a una evaluación por ecografía de las arterias carótida, femoral y branquial, a una evaluación del índice tobillo-brazo (del inglés, *ABI*, *Ankle-brachial index*) y a una ecocardiografía.

Los criterios de inclusión para los participantes en el estudio NEFRONA fueron los siguientes (excepto para el grupo control cuyo criterio de inclusión fue la ausencia de ERC):

- (1) Tener ERC (Un índice de filtrado glomerular (IFG) $<60\text{ml}/\text{min por } 1.73\text{m}^2$). Se incluyeron pacientes con ERC en estadios 2 a 5, así como pacientes en hemodiálisis (HD) o diálisis peritoneal (DP).
- (2) Tener una edad de 18 a 74 años.

De la misma manera, los criterios de exclusión fueron los siguientes:

- (1) Haber sufrido una enfermedad cardiovascular anterior.
- (2) Haber recibido un trasplante de riñón.
- (3) Tener una enfermedad grave, como el cáncer.
- (4) Haber sido sometidos a una operación previa de la arteria carótida.
- (5) Tener un $ABI < 0,7$ y/o estenosis de la arteria carótida superior al 75% antes del inicio del estudio.

La estimación del IFG para la clasificación de los pacientes en los diferentes estadios de ERC se basó en las ecuaciones utilizadas en los estudios previos: “Modification of the diet in renal disease 4” (MDRD4)³⁶³.

Los diferentes datos antropométricos de los pacientes se obtuvieron mediante métodos estándar. El índice de masa corporal (IMC) se calculó como el peso (kg)/altura(m)². La presión arterial se midió por duplicado con un oscilómetro semiautomático validado (Omron HEM-705CP) mientras los pacientes estaban sentados y habían descansado durante 5 minutos. La hipertensión se definió como una presión arterial (PA) sistólica > 140 mmHg y una PA diastólica > 90 mmHg, el uso de medicación antihipertensiva o la existencia del diagnóstico en la historia clínica. La diabetes mellitus se definió con un nivel de glucosa en ayunas > 126 mg/dL, el tratamiento con agentes antidiabéticos o la existencia del diagnóstico en la historia clínica. El diagnóstico de dislipidemia se realizó por los tratamientos con agentes hipolipemiantes o el diagnóstico clínico. Finalmente, los valores analíticos se obtuvieron en ayunas a partir de las historias clínicas recientes (3 meses antes o después de la visita).

Como se ha mencionado anteriormente, los pacientes con ERC fueron monitorizados cada año durante 4 años o hasta la defunción, cancelación de la inscripción en el estudio o el trasplante de riñón. Los puntos finales primarios para enfermedades vasculares y aneurisma serán los eventos cardiovasculares como angina inestable, infarto de miocardio, ataque isquémico transitorio, accidente cerebrovascular, insuficiencia cardíaca congestiva, arritmia, enfermedad arterial periférica (del inglés, *PAD*, *peripheral arterial disease*) o amputación. Además, se registrará la mortalidad de los pacientes por causas cardiovasculares o cualquier otra causa. Por otro lado, los puntos finales secundarios serán un aumento del grosor de la capa intima media de la arteria carótida

(del inglés, *CIMT, Carotid intima media thickness*) y la presencia de placa (evaluada por ultrasonido).

Para la realización de esta tesis, se escogieron diferentes grupos de pacientes pertenecientes al estudio NEFRONA con características diferentes (se recogen los diferentes subgrupos que constituían cada grupo de pacientes) **(Figura 16)**:

(1) Pacientes con ERC, que no presentaban placa aterosclerótica al inicio del estudio.

1.1. Pacientes que no presentaron placa aterosclerótica a los dos años (controles).

1.2. Pacientes que presentaron placa aterosclerótica a los dos años (casos).

(2) Pacientes con ERC que si presentaban placa aterosclerótica al inicio del estudio.

2.1. Pacientes que no presentaron progresión aterosclerótica a los dos años (controles)

2.2. Pacientes que presentaron progresión aterosclerótica a los dos años (casos)

(3) Pacientes con ERC sin presencia de placa aterosclerótica en todo el seguimiento (2 años).

(4) Pacientes sin ERC (pacientes control).

El objetivo de nuestro estudio es el análisis de cambios en la expresión de diferentes micro-ARNs y ARNm al inicio del estudio que puedan estar involucrados en la aparición o progresión de la enfermedad cardiovascular, así como el estudio de ciertos genes involucrados en la ERC y también quizás en los efectos de la ERC sobre la aceleración de la enfermedad cardiovascular, en este caso la aterosclerosis. Debido a ello, se escogieron aquellos pacientes que presentaron seguimiento a los dos años (debido a la necesidad de conocer la ausencia/presencia de placa aterosclerótica a lo largo del tiempo) y se les extrajo una muestra de ARN de buena calidad.

En primer lugar, de todos los pacientes del estudio NEFRONA (2445), se eligió una subcohorte piloto de 20 pacientes (10 pacientes por grupo) emparejados por edad, sexo, diabetes y estadio de ERC. Estos pacientes debían presentar un seguimiento de dos años, no presentar placa basal en el momento de extracción de la muestra y disponer de muestra de ARN circulante de buena calidad. Los mismos parámetros se utilizaron

para la elección de la subcohorte de validación utilizada en este estudio (n=64) (Subcohorte 1) (Figura 16). Seguidamente, los criterios para la elección de la segunda subcohorte utilizada en este estudio (n=84) (Subcohorte 2) fueron similares a los descritos anteriormente con la diferencia que en esta cohorte requeríamos de pacientes que tuvieran presencia de placa basal al inicio del estudio (Figura 16).

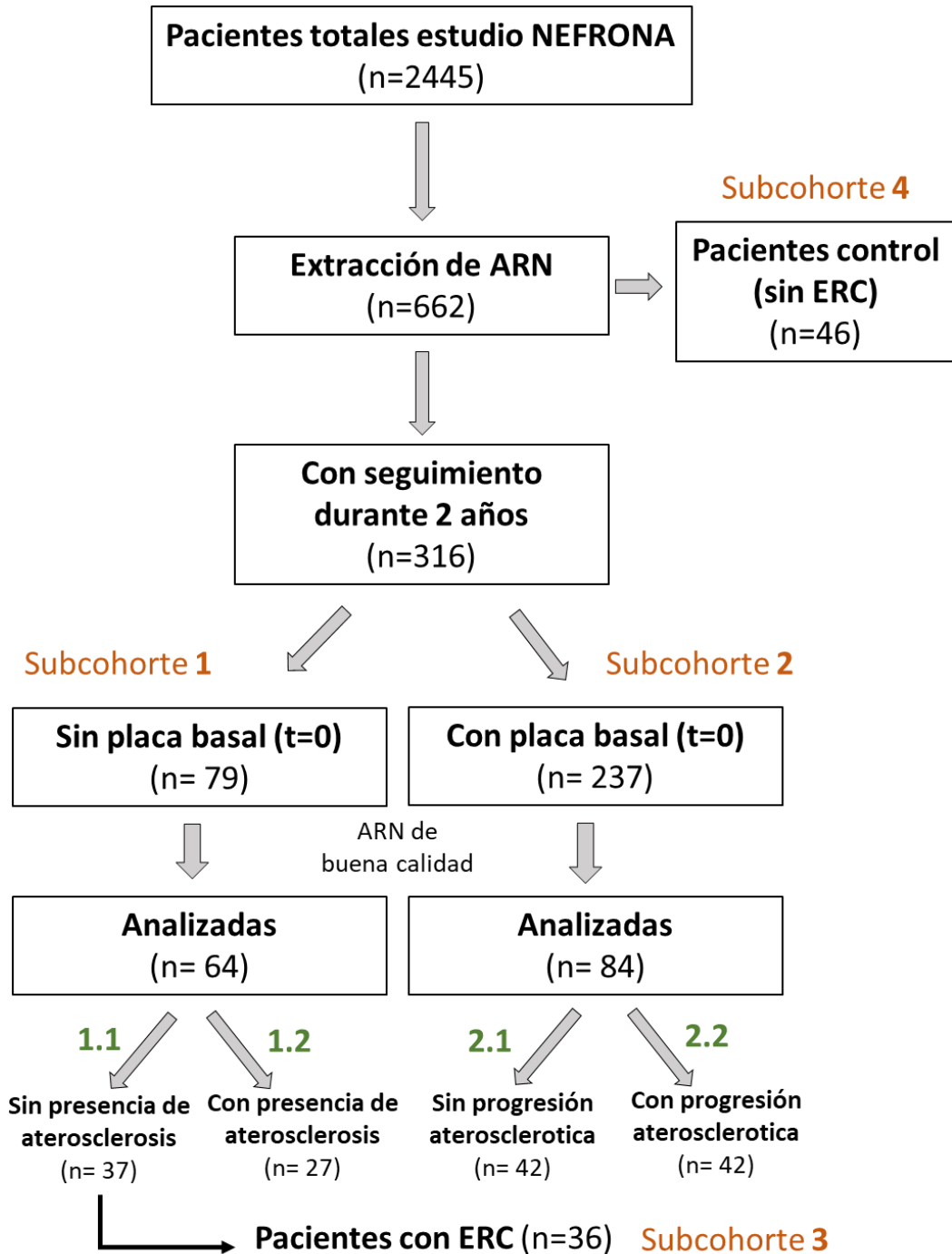


Figura 16. Evolución de las muestras elegidas para las diferentes cohortes.

Finalmente, las dos últimas subcohortes utilizadas en esta tesis [(subcohorta 3) y (subcohorta 4)] fueron emparejadas por edad y sexo. En el caso de los pacientes control (4), no se les realizó ningún seguimiento y el número total de estos (n=46) se obtuvo de los pacientes a los que se les extrajo muestra de ARN y esta era de buena calidad. Por otro lado, la subcohorta de pacientes con ERC (3) (n=36), se seleccionó a partir de la cohorte (1) como pacientes que no presentaron placa aterosclerótica en ningún momento del estudio (**Figura 16**).

2. Extracción de sangre en muestras humanas.

Las muestras de sangre de los pacientes se obtuvieron mediante la utilización de Vacutainers cargados con 10ml de anticoagulante EDTA. Esta técnica de extracción consiste en un sistema cerrado que permite la extracción de sangre al vacío garantizando la máxima seguridad de principio a fin. Además, en algunos pacientes aleatorizados (≈ 1 de cada 4) se les extrajo sangre en tubos PAXgene de ARN, utilizados para la estabilización inmediata del ARN. Las muestras se centrifugaron, se separó el suero/plasma y se transportaron a 4º C al biobanco de la REDinREN (Red Española de investigación renal). Una vez recibidas, se procesaron inmediatamente por un técnico de laboratorio siguiendo el protocolo del biobanco y las muestras procesadas fueron congeladas a -80ºC hasta su utilización.

3. Extracción de ARN en muestras humanas.

Para la extracción de ARN de sangre total de pacientes, partimos de una muestra de 2,5ml de sangre extraída con el método PAXgene. Antes de proceder a la extracción, las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante al menos 2 horas para garantizar una hemólisis completa. La extracción de ARN se realizó mediante el uso del kit PAXgene Blood RNA kit (QIAGEN, Hilden, Alemania) siguiendo el protocolo del fabricante. De manera resumida, una vez atemperadas las muestras, estas se centrifugaron durante 10 minutos a 5000xg y se descartó el sobrenadante. Seguidamente se disolvió el pellet (células) en H₂O libre de ARNasa y las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 5000xg. El sobrenadante se descartó nuevamente y se añadieron 350µl de tampón de resuspensión (presente en el kit). A partir de este paso, las muestras y los diferentes reactivos fueron insertadas en el QIAcube (QIAGEN) que permite la extracción de ácidos nucleicos de forma totalmente automatizada utilizando para ello el programa de ARN

PAXgene. Al finalizar el proceso, se incubó el eluido durante 5 minutos a 65°C para permitir la desnaturalización de las moléculas de ARN para su futura utilización. Una vez obtenido el ARN, se midió su concentración y su calidad mediante el uso del NanoDROP (Bionova, Madrid, España).

4. Extracción de PBMCs y células viables en muestras humanas.

Todos los procedimientos durante la extracción de PBMCs de pacientes se realizaron en condiciones de esterilidad en cabina de flujo laminar y a temperatura ambiente. El primer paso en este procedimiento fue el traspaso de la sangre a un Falcon de 50ml estéril y la adición de PBS1X en relación 1:1. Seguidamente, se añadieron cuidadosamente 20ml de la muestra diluida con PBS1X sobre 15ml de Ficoll para conseguir la separación de las diferentes poblaciones celulares. Seguidamente, las muestras se centrifugaron durante 20 minutos a 870xg. Tras la centrifugación se observaron tres fases: fase superior (plasma diluido), fase intermedia (PBMCs; amarillenta) y la fase de Ficoll (transparente). En el fondo del tubo quedan los eritrocitos (rojo). A continuación, se recogieron las PBMCs de la fase intermedia y se traspasaron a un Falcon de 50mL. Se centrifugó la muestra durante 10 minutos a 724xg, se desechó el sobrenadante, se añadieron 10ml de PBS1X estéril y se resuspendió el pellet celular. Posteriormente, se procedió al conteo celular y se realizó un test de viabilidad celular mediante el uso del reactivo Trypan Blue (1:1) (Sigma Aldrich, MO, EEUU). Finalmente, en el caso de que las muestras fueran utilizadas para extracción de proteína, estas fueron centrifugadas durante 5 minutos a 4000rpm, se les eliminó el sobrenadante y se guardaron a -80°C hasta su utilización. Sin embargo, en el caso de la obtención de células viables, las muestras fueron centrifugadas durante 5 minutos a 724xg, se les eliminó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en FBS (Sigma Aldrich) con 20%DMSO (Carl Roth, Karlsruhe, Alemania) (se almacenaron unas 8-10x10⁶ células en cada criotubo). Finalmente, estas fueron congeladas y mantenidas en tanques de nitrógeno líquido hasta su utilización.

5. Secuenciación de micro-ARNs y array de ARNm.

Tanto la secuenciación de micro-ARNs como el Array de ARNm se realizaron a través de la empresa Arraystar, Inc (Rockville, MD, EEUU). La cantidad y calidad de las muestras de ARN se evaluaron mediante técnicas de espectrofotometría con OD260 (NanoDrop spectrophotometer 1000, Thermo Fisher, MA, EEUU) y la integridad del ARN obtenido se analizó mediante técnicas estándar de electroforesis en gel de agarosa en condiciones desnaturizantes, donde se evaluó la presencia de bandas nítidas de los ARNr 28S y 18S. La relación de intensidad 28S:18S debe ser cercana a 2:1 para considerar que el ARN está intacto.

5.1. Secuenciación de micro-ARNs

El ARN total extraído se envió a la empresa Arraystar, Inc (Rockville, MD, EEUU) para la secuenciación de micro-ARN mediante técnicas de secuenciación de nueva generación (del inglés, *NGS, New Generation Sequence*) con Illumina HiSeq. En primer lugar, el ARN total de cada muestra fue utilizado para preparar bibliotecas génicas de alta calidad con los siguientes pasos: (1) Ligación de pequeños adaptadores de ARN en la sección 3' y 5' mediante enzimas ARN ligasas T4, (2) síntesis y amplificación de ADN complementario (ADNc) utilizando para ello los cebadores de retrotranscripción y amplificación patentados de Illumina, (3) selección de amplicones de PCR de \approx 130-150 pb y (4) cuantificación de las librerías completadas mediante el Bioanalizador 2100 (Agilent, CA, EEUU). Una vez cuantificadas estas librerías génicas, las muestras fueron desnaturizadas con 0.1M NaOH para la obtención de moléculas de ADN de cadena única y diluidas a una concentración final de 8pM y se generaron los grupos (*cluster*) de fragmentos en los canales (cBot) de Illumina mediante el uso de un kit específico TruSeq Rapid SR (Illumina, CA, EEUU), siguiendo el protocolo del fabricante. Posteriormente, los *clusters* fueron secuenciados mediante 51 ciclos en Illumina NextSeq 500 utilizando para ello el kit TruSeq Rapid SR cluster kit (Illumina), siguiendo el protocolo marcado por el fabricante. Las lecturas que pasaron el filtro de calidad, se procesaron con el fin de eliminar las secuencias correspondientes a los adaptadores y obtener las secuencias recortadas, "*trimmed reads*". Finalmente, estas "*trimmed reads*" (longitud > 15nt) fueron alineadas con los pre-miARN humanos obtenidos de bases de datos como miRBase 21, utilizando el software Novoalign (Novocraft, Selangor, Malasia). Los niveles

de expresión de micro-ARNs se midieron y normalizaron como transcripciones por millón de lecturas de micro-ARNs alineadas totales (del inglés, *TPM, Transcripts per million*). Los recuentos de lecturas de micro-ARNs se utilizaron para estimar el nivel de expresión para cada micro-ARN. Los micro-ARNs con un cambio $\geq 1,5$ y una significación estadística de $p < 0.05$ fueron considerados significativos de acuerdo con las especificaciones de Illumina.

5.2. Array de ARNm

El ARN total extraído se envió a la empresa Arraystar, Inc (Rockville, MD, EEUU) para el perfilado global de transcritos codificantes para proteínas a través de Human LncRNA Microarray v4.0. En dicho Microarray pueden ser detectados 20730 transcritos codificantes para proteínas. Cada transcrito se encuentra representado en la matriz por un exón específico o una sonda de empalme (*splicing*) para identificar con precisión un transcrito individual. Tanto las sondas para genes endógenos como las sondas negativas se imprimen también en la matriz para un buen control de calidad de la hibridación. El etiquetado de muestras y la hibridación se realizaron de acuerdo con el protocolo de análisis de expresión génica “*One-Color Microarray-Based*” (Agilent). Brevemente, el ARNm se purificó a partir del ARN total tras la eliminación del ARNr ribosomal mediante un kit de aislamiento de ARNm (mRNA-ONLY™ Eukaryotic mRNA Isolation Kit, Epicentre, Illumina). Posteriormente, cada muestra se amplificó y se transcribió en ARN complementario (ARNc) fluorescente utilizando un método de cebado aleatorio con un kit de marcaje de ARN (Arraystar Flash RNA Labeling Kit, Arraystar). Una vez marcados, se realizó la purificación de los ARNc marcados mediante RNeasy Mini Kit (QIAGEN). La concentración y la actividad específica de los ARNc marcados (pmol Cy3/ μg ARNc) se midió mediante espectrofotometría con NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher) y se fragmentó 1 μg de cada ARNc marcado mediante la adición de 5 μl de agente de bloqueo 10X y 1 μl de tampón de fragmentación 25X, posteriormente se calentó la mezcla a 60°C durante 30 min y se agregaron 25 μl de tampón de hibridación GE 2X para diluir el ARNc marcado. Finalmente, se dispensaron 50 μl de esta solución de hibridación en la matriz del array, se incubaron durante 17 horas a 65°C en un horno de hibridación (Agilent) y las matrices hibridadas se lavaron, fijaron y escanearon con el escáner de microarrays

de ARN (Agilent). El posterior procesamiento de datos se realizó utilizando el software GeneSpring GX v12.1 (Agilent). Los genes con un aumento de 1,5 y una significancia $p < 0.05$ fueron considerados significativos de acuerdo con las especificaciones de Illumina.

Por otro lado, se realizó un análisis funcional para asociar ARNm expresados diferencialmente con categorías GO (derivadas de Gene Ontology; <http://www.geneontology.org>), con el objetivo de describir las principales vías en las que los productos génicos estarían involucrados. El valor P indica la importancia del enriquecimiento del término GO en la lista de ARNm diferencialmente expresados. Cuanto menor sea el valor P, más significativo será el término GO (se recomienda un valor $p < 0.05$).

6. Estudio de validación de la expresión génica de micro-ARNs y ARNm en muestras humanas.

6.1. Síntesis simultánea de ADNc para micro-ARN y ARNm

La extracción de ARN de sangre total de estos pacientes se realizó según lo descrito en el apartado 3 de esta sección. La concentración del ARN extraído se evaluó mediante técnicas de espectrofotometría a OD260 y su pureza mediante la ratio OD260/OD280, utilizando para ello un espectrofotómetro NanoDrop (ND-1000, Thermo Fisher). Con el fin de realizar una síntesis de ADNc simultánea para micro-ARNs y ARNm, se realizó una adaptación del protocolo de síntesis de ADNc: *TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit* (Applied biosystems, Thermo Fisher) siguiendo el protocolo realizado por el Dr. Malte Buchholz: *Simultaneous detection of miRNA and mRNA on TaqMan® Array Cards using the TaqMan® advanced miRNA workflow*.

Antes de proceder a la síntesis de ADNc, las muestras de ARN se diluyeron a una concentración final de 5ng/ μ l y se les añadió 10pM de spike-in (cel-miR-39). Posteriormente, se realizaron los siguientes pasos, todos en el termociclador (Techne TC-412):

- (1) Extensión del extremo 3' del transcrito maduro mediante la adición de una cola poli(A) (*Poly(A) tailing*). Para ello, se utilizaron 2 μ l de la muestra diluida (10ng de

- ARN) a los que se les añadió 3µl del mix correspondiente y se puso en el termociclador siguiendo el protocolo establecido (45 minutos a 37°C para llevar a cabo la reacción de poliadenilación y 10 minutos a 65°C para parar la reacción).
- (2) Extensión del extremo 5' mediante la ligación de un adaptador (*Adapter ligation*). A los 5µl obtenidos de la reacción anterior se les añadió 10µl del mix correspondiente y se puso en el termociclador siguiendo el protocolo establecido (60 minutos a 16°C para llevar a cabo la reacción de ligación).
- (3) Transcripción reversa universal de ARN (*RT; retrotranscription*). En este paso, se añadieron 15µl del mix correspondiente sobre el producto de ligación obtenido. Este paso se encuentra modificado de *TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit* por la adición de 50µM de *random hexamers* que permitirá la síntesis de ADNc procedente de ARNm. Los ciclos del termociclador fueron los siguientes: 15 minutos a 42°C y 5 minutos a 85°C.
- (4) Pre-amplificación (*miR-Amp*). Se transfirieron 5µl del producto de retrotranscripción a un nuevo tubo con 45µl del mix correspondiente. Este paso se encuentra modificado de *TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit* por la adición de *custom 0.2X pooled TaqMan® Assays* que permitirá la pre-amplificación de nuestros ARNm de interés. Los ciclos del termociclador en este paso fueron: 5 minutos a 95°C para la activación enzimática, 14 ciclos de 3 segundos a 95°C seguido de 30 segundos a 60°C para la desnaturalización-alineación-extensión y finalmente 10 minutos a 99°C para detener la reacción.

6.2. Amplificación simultánea de micro-ARNs y ARNm mediante el uso de TLDAs

El análisis de la expresión de micro-ARNs y ARNm en pacientes se realizó simultáneamente mediante el uso de TLDAs (*TaqMan® low density array cards*; Thermo Fisher).

Las TLDAs permiten el estudio de hasta 8 muestras en paralelo y consisten en un mecanismo de array que tiene precargado en cada pocillo los cebadores para genes o micro-ARNs específicos. En este estudio, se diseñaron TLDAs personalizadas y precargadas con cebadores específicos para 13 micro-ARNs (*TaqMan® Advanced miRNA Assays*, Thermo Fisher), 10 ARNm (*TaqMan® mRNA assays*, Thermo Fisher) de interés y

un control interno (**tabla 1 y 2**). Realizamos una dilución 1:10 del producto obtenido en la *miR-Amp* y añadimos *TaqMan® Fast Advanced Master Mix* (Thermo Fisher) en una proporción 50:50 hasta un volumen total de 100µl. Posteriormente, cargamos estos 100µl del mix de reacción en cada reservorio de la TLDA siguiendo el protocolo *TaqMan® Advanced miRNA Assays User Guide-TaqMan Array Card* y centrifugamos para la correcta distribución de la muestra en cada pocillo. La reacción de PCR se realizó en el termociclador QuantStudio™ 7 (Thermo Fisher) con los siguientes ciclos: 20 segundos a 95°C para la activación enzimática, 40 ciclos de 3 segundos a 95°C y 30 segundos a 60°C para realizar los procesos de desnaturalización-alineación-extensión. Como controles endógenos, se utilizó fosfoglicerato quinasa 1 (del inglés, *PGK1*, *Phosphoglycerate Kinase 1*) para ARNm y miR-16-5p para micro-ARNs. La expresión de cel-miR-39 se utilizó para confirmar una correcta síntesis de ADNc.

Tabla 1. Sondas de expresión para micro-ARNs con la técnica *Advanced*; nombre e ID.

Nombre	ID (Thermo Fisher)
miR-1294	478693_mir
miR-185-5p	477939_mir
miR-629-5p	478183_mir
miR-4326	479789_mir
miR-500a-3p	478951_mir
miR-501-3p	478350_mir
miR-23a-3p	478532_mir
miR-362-5p	478059_mir
miR-93-3p	478209_mir
miR-652-3p	478189_mir
miR-130b-5p	477899_mir
hsa_miR-16-5p	477860_mir
cel-miR-39	478293_mir

Tabla 2. Sondas de expresión para ARNm; nombre e ID.

Nombre	ID (Thermo Fisher)
MS4A1	Hs00544819_m1
CCL5	Hs00982282_m1
BTLA	Hs00699198_m1
MRPL35	Hs00938632_g1
PLAC8	Hs00930964_g1
E2F7	Hs00987777_m1
SLC38A11	Hs01084890_m1
FER	Hs00245497_m1
TNFSF10	Hs00921974_m1
PGK1	Hs00943178_g1

Los cambios en los niveles de expresión de micro-ARNs y/o ARNm se calcularon basándonos en la fórmula estándar (método $\Delta\Delta Ct$) y fueron expresados como cambios relativos respecto al grupo de pacientes control.

7. Modelos experimentales.

Todos los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo con las directrices que regulan la investigación con animales de experimentación del Consejo Europeo de Investigación, con la aprobación previa del comité de ética de la universidad de Lleida y siguiendo las directrices legales estatales y autonómicas:

- Real Decreto 53/2013, 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.
- Ley 6/2013, 11 de junio, de modificación de la Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio.
- El Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

Todos los animales utilizados en los estudios fueron ratones de entre 8 y 10 semanas de edad, un peso aproximado de 25gr y de la cepa C57BL/6. En todo momento, los ratones fueron alojados en una habitación climatizada ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), con una humedad del 45-55% y un ciclo día/noche de 12h, con libre acceso a agua y comida. Todos los procedimientos realizados en estos ratones se llevaron a cabo bajo anestesia general mediante isoflurano inhalatorio y, durante 3 días tras los procedimientos, los ratones recibieron analgésicos para mitigar el dolor (buprenorfina, 0,05mg/kg/día mediante inyección subcutánea). El día de su sacrificio, todos los animales utilizados en esta tesis fueron anestesiados con 5mg/kg de xilacina (Rompun, Bayer, Leverkusen, Alemania) y 35mg/kg de ketamina (Ketolar, Pfizer, NY, EEUU). En todos los casos, la recolección de la sangre a punto final se realizó mediante punción cardíaca con jeringas heparinizadas y los órganos fueron perfundidos *in situ* mediante salino a través del ventrículo izquierdo. Los diferentes órganos utilizados fueron extraídos de la siguiente forma:

- Los riñones se extrajeron, dejando uno de ellos para su congelación en nitrógeno líquido y posterior estudio génico y proteico. El otro riñón se cortó longitudinalmente en dos secciones de manera que una sección se fijó en una solución salina de formaldehído al 4%, y posteriormente el tejido se incluyó en

parafina para el análisis inmunohistoquímico de la muestra, y la otra sección se incluyó en medio de crio-preservación (OCT: Tissue-Tek), para estudios de inmunofluorescencia. Además, en el caso del modelo de nefrectomía subtotal, debido a la disponibilidad de un único riñón, una de las mitades fue preservada en nitrógeno líquido para el posterior estudio génico y proteico, mientras que la otra mitad fue cortada transversalmente en dos subsecciones que se destinaron para el mantenimiento en parafina y/o en medio de crio-preservación.

- La arteria aorta se extrajo cuidadosamente y se le separaron los restos de grasa adyacentes. Posteriormente fue dividida en 3 partes mediante cortes transversales, la parte superior como arco aórtico, la parte media como aorta descendente y la parte inferior como aorta abdominal que se destinaron para diferentes técnicas experimentales:
 - Las muestras de arco aórtico y aorta descendente se congelaron en nitrógeno líquido para posteriores estudios génicos y proteicos.
 - Las muestras de aorta abdominal se fijaron en una solución salina de formaldehído al 4% y posteriormente el tejido se incluyó en parafina para el análisis inmunohistoquímico de la muestra.
- El corazón se extrajo, se orientó para la correcta visualización del seno aórtico y se incluyó en medio de crio-preservación (OCT: Tissue-Tek) para posteriores tinciones y/o inmunofluorescencias.

7.1. Modelo experimental de enfermedad renal crónica (ERC) mediante nefrectomía subtotal o nefrectomía 5/6

Para el desarrollo de este modelo, se utilizaron ratones ApoE^{-/-}, pertenecientes a la cepa C57BL/6 (Charles River, Barcelona, España). los cuáles fueron aclimatados durante una semana tras su llegada y posteriormente divididos en 4 grupos con 7-10 ratones/grupo a los que se les realizaron los procedimientos descritos a continuación con una duración de 10 semanas. Los 4 grupos formados fueron los siguientes:

- Ratones control (ApoE^{-/-})
- Grupo de ratones con ERC (ApoE^{-/-} + 5/6Nx)
- Grupo de ratones con aterosclerosis (ApoE^{-/-} + HFD)

- Grupo de ratones con aterosclerosis acelerada inducida por la ERC (ApoE^{-/-} + HFD + 5/6Nx)

Los grupos de ratones con ERC (ApoE^{-/-} + 5/6Nx) y aterosclerosis acelerada inducida por la ERC (ApoE^{-/-} + HFD + 5/6Nx) fueron sometidos a una nefrectomía subtotal (5/6 Nx), que consiste en la eliminación del 75% de la masa renal, como un modelo experimental de ERC. Antes de la operación, la región abdominal de los animales fue lavada para prevenir cualquier posible contaminación y facilitar el proceso quirúrgico. Esta intervención está dividida en dos fases. En primer lugar, se realiza un corte abdominal longitudinal en el lado izquierdo del animal, permitiendo el acceso al espacio peritoneal para la localización del riñón izquierdo, una vez localizado, se levantó suavemente la cavidad abdominal y se sujetó la arteria renal con una pinza microvascular (1–2.25 mm; S&T; Neuhausen; Switzerland) para prevenir cualquier posible desangramiento durante la operación y se realizó la extirpación de, aproximadamente, 2/3 del riñón izquierdo, correspondiente a ambos polos renales, el riñón remanente se prensó inmediatamente con una esponja hemostática de gelatina reabsorbible (gelita medical; Eberbach, Alemania) para evitar la pérdida de sangre en el momento del restablecimiento del flujo sanguíneo. Después de 7 días de recuperación de la primera operación, se realizó la segunda fase que consiste en la nefrectomía total del riñón derecho mediante el corte de los vasos renales y la extirpación total del riñón derecho tras realizar una ligadura de la arteria renal que asegure el corte del flujo sanguíneo. Los ratones controles, se sometieron a una simulación de la misma cirugía pero sin la extirpación del riñón, solo realizando un corte y cosiendo posteriormente, para así igualar el estrés quirúrgico entre los distintos grupos.

Finalmente, los ratones pertenecientes al grupo de ratones con aterosclerosis (ApoE^{-/-} + HFD) y al grupo de ratones con aterosclerosis acelerada por la ERC (ApoE^{-/-} + HFD + 5/6Nx) fueron alimentados con una dieta alta en grasa (del inglés, *HFD, High Fat Diet*) (SSNIF; D12108; 21% grasas y 1,25% colesterol) durante las 10 semanas de duración del modelo. Podemos observar un claro esquema de este modelo experimental en la **Figura 17**.

Para posteriores estudios con suero urémico, se realizó una nefrectomía subtotal, siguiendo el mismo procedimiento utilizado en ratones, en ratas Wistar macho

de 2 meses de edad. En este caso, el modelo experimental se mantuvo 12 semanas. Se utilizaron ratas Wistar macho de 5 meses de edad como controles, sometidas a una simulación de la misma cirugía, pero sin la extirpación del riñón. En el momento del sacrificio, la sangre se extrajo de la bifurcación aórtica para la futura obtención del suero.

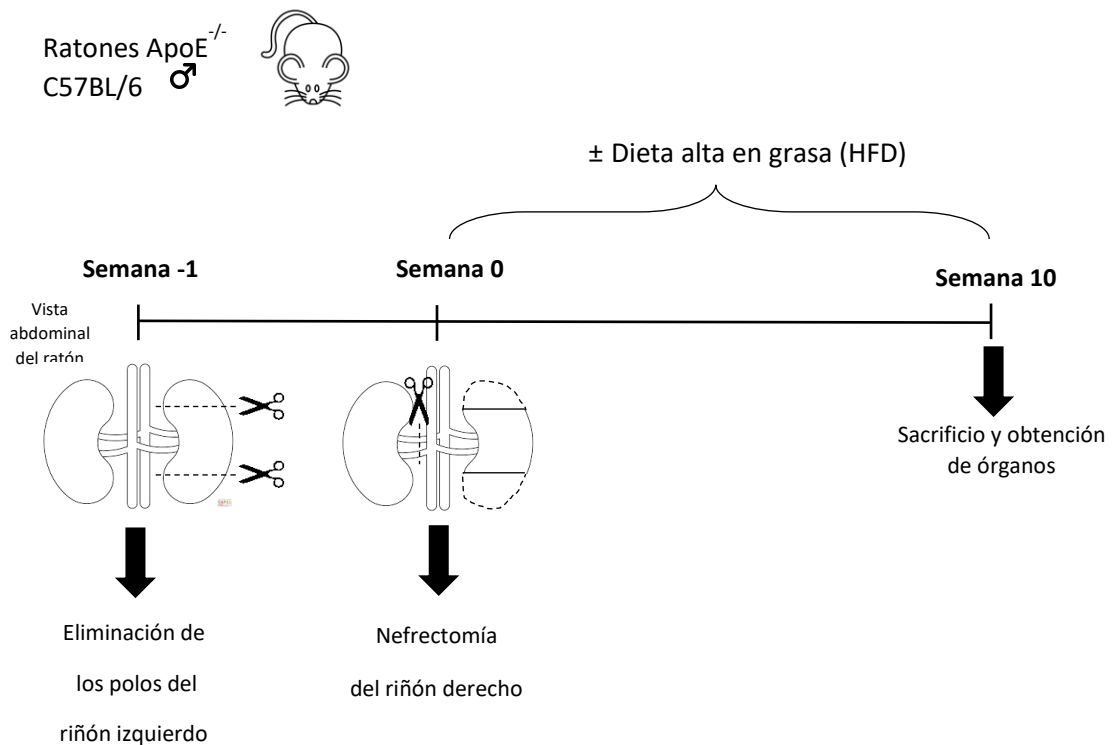


Figura 17. Representación esquemática de la línea temporal en el modelo de aterosclerosis acelerada en ERC

7.2. Modelo experimental de daño renal por infusión de Angiotensina II.

Los ratones utilizados para este modelo fueron divididos en dos grupos (Control y Angiotensina II) de 3-5 ratones/grupo. El modelo de infusión sistémica de Angiotensina II (Ang II) se realizó utilizando mini bombas osmóticas de infusión (ALZET micro-bombas osmóticas modelo 2001; Alza Corp., CA, EEUU) que fueron colocadas, mediante cirugía, de forma subcutánea en la espalda del animal. Estas mini bombas liberan una dosis de 1000ng/kg/min de Ang II durante 15 días. Como control, se utilizó un grupo de ratones en el que las bombas sólo infundían solución salina (**Figura 18**).

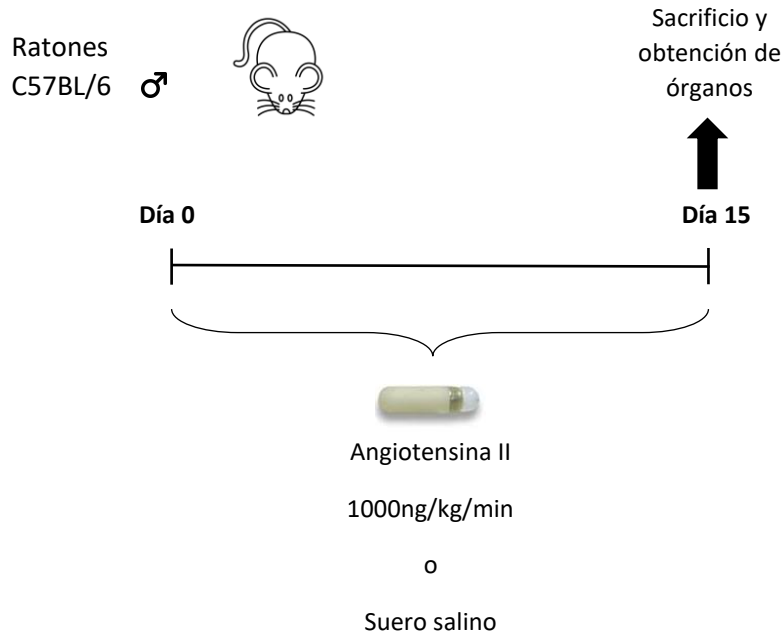


Figura 18. Representación esquemática de la línea temporal en el modelo de infusión de Angiotensina II.

7.3. Modelo de glomerulonefritis rápidamente progresiva (GNRP) o Nefritis inmune

Los ratones utilizados en este modelo fueron divididos en 2 grupos (control y NTS) de 5-7 ratones/grupo. La nefritis inmune se indujo en estos ratones mediante la administración de un suero nefrotóxico (del inglés, *NTS, nefrotoxic serum*) que contiene anticuerpos frente a un extracto proteico de la membrana basal del glomérulo del ratón. Para inducir esta enfermedad, se realiza un primer pinchazo de 50 μ l del suero NTS diluido 10 veces en el seno retro orbital del ojo del ratón. Posteriormente, se realizaron sendos pinchazos del suero NTS a una dosis sin diluir de 4 μ l/g de peso corporal. Tras los pinchazos, la nefritis se dejó progresar durante 10 días, momento en el cual los ratones fueron sacrificados (**Figura 19**).

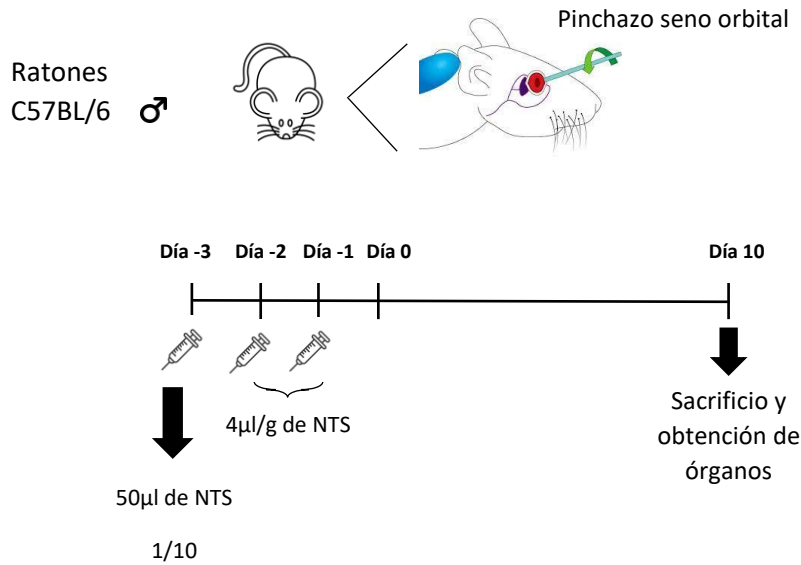


Figura 19. Representación esquemática de la línea temporal en el modelo de nefritis inmune producida por la inyección de un suero contra la membrana basal del glomérulo (NTS).

8. Análisis bioquímicos.

Los niveles de BUN (del inglés, *Blood Ureic Nitrogen*) y de los diferentes parámetros lipídicos (colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL y triglicéridos) en plasma de ratón, se analizaron mediante técnicas colorimétricas de acuerdo a los protocolos estandarizados con un analizador AU5800 (Beckman Coulter Inc, Fullerton, CA, EEUU) en el laboratorio de análisis clínicos del Hospital Universitario Arnau de Vilanova (HUAV) en Lérida, España.

9. Estudios in vitro.

9.1. Cultivos celulares

9.1.1. Línea celular murina de macrófagos (RAW 264.7)

La línea celular de macrófagos murinos RAW264.7 (ATCC TIB-71; MD, EEUU) se cultivó en medio DMEM (GIBCO, Thermo Fisher, MA, EEUU) con 10% de suero fetal bovino de complementado (FBS; GIBCO); 100U/mL de penicilina y 100µg/mL de estreptomina (GIBCO) a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Las células se cultivaron en placas de 10mm y el medio se cambió cada 2 días hasta que las células adquirieran el 80% de confluencia.

9.1.2. Líneas celulares humanas de linfocitos T (Jurkat) y linfocitos B (NALM6)

Las líneas celulares de linfocitos T (Jurkat) y linfocitos B (NALM6) fueron prestadas por el grupo de investigación en inmunología del Instituto de Investigación Biomédica de Lérida (IRBLleida). Ambas líneas celulares se cultivaron en medio RPMI 1640 (GIBCO) con 10% de suero fetal bovino de complementado (FBS; GIBCO); 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomina (GIBCO) y 2mM de L-Glutamina (GIBCO) a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Las células se cultivaron en placas de 10mm y el medio se cambió cada 2 días hasta que las células adquirieran el 80% de confluencia.

9.2. Tratamientos de los cultivos celulares

9.2.1. Tratamiento de macrófagos, linfocitos T y B con suero urémico

Una vez alcanzada la confluencia, todas las líneas celulares fueron sembradas en placas de 24 pocillos y deplecionadas de FBS durante las 24 horas previas al tratamiento. En el caso de las líneas celulares de linfocitos T (Jurkat) y linfocitos B (NALM6), al tratarse de células en suspensión, se sembraron a una densidad de $2 \cdot 10^6$ células/ml en 500µl medio libre de suero durante 24 horas. Transcurridas las 24 horas, la línea celular de macrófagos se cultivó con medio fresco (DMEM) complementado con 20% de suero de rata control/urémico durante 24 horas. En el caso de las células en suspensión, transcurridas las 24 horas de depleción, fueron extraídas, centrifugadas a 1200rpm durante 5 minutos y re-cultivadas en una nueva placa de 24 pocillos con medio fresco (RPMI 1640) complementado con 20% de suero de rata control/urémico durante 24 o 48horas.

9.2.2. Tratamiento de linfocitos T con antagomir para miR-500a-3p

La línea celular de linfocitos T (Jurkat) se cultivó a una densidad de $1 \cdot 10^6$ cells/ml en placas de 24 pocillos en 500µl de OptiMem (GIBCO) durante 24 horas. Posteriormente, se les añadió 1,25µl de 10pM del antagomir mirVana® miR-500a-3p/Control del inhibidor (Thermo Fisher) y 50nM de Lipofectamine™RNAiMAX (Thermo Fisher) durante 24 horas. Finalmente, las células fueron recogidas, centrifugadas a 1200rpm durante 5 minutos y re-cultivadas en una nueva placa de 24 pocillos con medio fresco (RPMI 1640) complementado con 20% de suero de rata control/urémico durante 48h.

10. Citometría de flujo de PBMCs humanas.

Las células se descongelaron suavemente introduciendo los criotubos en un baño de agua a 37°C. En condiciones estériles, la suspensión de células de los criotubos se transfirió a un Falcon con 3 mL de medio para células T (RPMI + 2mM GIBCO® GlutaMAX, 10% FBS, GIBCO® Pen Strep, piruvato de sodio 1mM y aminoácidos no esenciales). Las células fueron centrifugadas 10 minutos a 1650 rpm y el pellet fue resuspendido nuevamente en 1mL de medio para células T. A continuación, se calculó el número de células con un contador automático Scepter (Millipore) y se cultivó una suspensión de 5×10^5 células/pocillo en duplicados en placas de 96 pocillos de fondo en U. Finalmente, las células se incubaron durante toda la noche a 37°C y 5% CO₂. Al día siguiente, las células se resuspendieron en PBS para la tinción de citometría. Los duplicados se mezclaron con el fin de conseguir 1×10^6 células de cada muestra. En primer lugar, se añadió 1µL de Ghost Dye™ Violet 540 (TonboBio, CA, EEUU) por cada mililitro de suspensión celular, con el fin de teñir células vivas. Estas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y se lavaron con tampón de tinción (PBS + FBS) para eliminar cualquier resto de colorante que no haya reaccionado. Posteriormente, se agregaron 5µL de Fc Block (BD Bioscience, NJ, EEUU) por muestra (1:10) y se incubaron las muestras durante 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se diluyeron los diferentes anticuerpos a utilizar [anti-CD3 (Immunotech, PA, EEUU) (APC) (3µL/muestra), anti-CD4 (Miltenyibiotec, North Rhine-Westphalia, Alemania) (PERCP) (1µL/muestra) y anti-CD272 (BTLA) (BD Biosciences) (BV421) (1µL/muestra)] en tampón de tinción y se añadió a las muestras. Las células fueron incubadas durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Tras la incubación, se centrifugaron y se eliminó el sobrenadante. Las células sedimentadas se lavaron con tampón de tinción y luego se fijaron con tampón Cytofix (BD Biosciences). Finalmente, las células fueron analizadas con un citómetro de flujo FACS-Canto II (BD Bioscience). Para el análisis de los datos, se utilizó el software Flow Jo (versión X.0.7).

11. Estudios de histología e inmunohistoquímica.

11.1. Estudios en tejido fresco

Todas las muestras de los corazones previamente incluidas en medio de crio preservación (OCT) fueron cortadas con criostato en secciones de 5-10µm y montadas en portaobjetos. Con el fin de analizar la placa aterosclerótica presente en los ratones, se realizaron cortes seriados del seno aórtico desde la aorta proximal en dirección al vértice del corazón, según lo descrito previamente³⁶⁴. Los cortes fueron guardados a -80°C hasta su utilización.

11.1.1. Tinción Oil Red

El Oil Red, es un colorante histoquímico que tiñe lípidos neutros. Esta tinción, fue utilizada para evaluar la cantidad de lípidos neutros presente en las placas ateroscleróticas de los ratones. La tinción se realizó en 4 de cada 15 cortes seriados del seno aórtico por cada ratón hasta finalizar con los cortes realizados. Antes de empezar el protocolo de tinción, se preparó la solución de Oil Red (Sigma Aldrich) a 0,3% p/v en isopropanol 60%. Las muestras seleccionadas para la tinción fueron fijadas con formalina, lavadas con agua corriente y finalmente enjuagadas con isopropanol 60% antes de realizar la tinción con la solución de Oil Red durante 15 minutos. Posteriormente los cortes se lavaron con isopropanol 60%, se contrastaron con hematoxilina y se montaron en un medio de montaje acuoso (Dako Glycergel, DAKO). Los niveles de expresión de gotas lipídicas se analizaron mediante microscopio óptico invertido Nikon Eclipse TS100 (Nikon). El área de lesión se determinó a través de la ratio entre el área de lesión y el área total de las tres válvulas con el software ImageJ.

11.1.2. Tinción Rojo Sirio

La tinción rojo sirio es una técnica que se encarga de teñir las fibras de colágeno, con ella se examinó el nivel de fibrosis de las placas ateroscleróticas en los diferentes grupos experimentales. En primer lugar, esta tinción requiere de la preparación de la solución de rojo sirio 48 horas antes de ser utilizada, la solución de trabajo está compuesta por 1% p/v Direct Red F3B (Sigma Aldrich) en solución acuosa de ácido pícrico saturada. Las muestras deben ser mantenidas en etOH 70° los 5 días anteriores al inicio de la tinción. La tinción de rojo sirio se realiza mediante la inmersión

de las muestras en la solución de trabajo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavan y se montan en medio de montaje acuoso (Dako Glycergel, DAKO)

11.1.3. Inmunofluorescencia

Los cortes (10 μm) de seno aórtico congelados se fijaron en acetona 100% fría durante 15 minutos. Se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena mediante la incubación durante 30 minutos con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 3% y los cortes fueron bloqueados con 4% de BSA/6% suero de caballo en PBS 1X durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se incubaron con anticuerpos primarios contra CD3 (1:500; DAKO, CA, EEUU) y CD68 (1:500; Abd. Serotec, Bio Rad, CA, EEUU) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente los diferentes cortes fueron lavados e incubados durante 1 hora a temperatura ambiente con sus correspondientes anticuerpos secundarios: anti-rabbit AlexaFluor® 488 para CD3 (DAKO) y anti-rat AlexaFluor® 633 para CD68 (1:200; Invitrogen, MA, EEUU). Como control negativo, se realizó la incubación del anticuerpo secundario sin presencia de incubación previa con anticuerpo primario. Los núcleos se tiñeron con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole; Sigma-Aldrich) para controlar la densidad celular. Finalmente, las muestras fueron montadas con Prolong Gold (Thermo Fisher) y la fluorescencia fue detectada mediante microscopía confocal (Confocal System TCS SP5, Leica).

11.2. Estudios en tejido incluido en parafina

Todas las muestras murinas de aorta abdominal incluidas en parafina se cortaron con micrótopo en secciones de 3 μm , se desparafinaron y, finalmente se rehidrataron mediante un gradiente decreciente de alcohol etílico (100°, 95°, 70°) y agua destilada.

11.2.1. Tinción IL-17A

Tras la desparafinización e hidratación de los cortes de aorta abdominal (3 μm), se realizó la técnica de recuperación antigénica utilizando para ello el sistema PT Link (DAKO) con tampón citrato sódico 10mM a pH 6 o 9, según las condiciones del anticuerpo primario. El bloqueo de la peroxidasa endógena se realizó mediante la incubación durante 15 minutos con H_2O_2 al 3%, y se bloquearon las uniones inespecíficas con una solución en TBS de 4% de BSA y 8% de suero de la especie en la que se desarrolló

el anticuerpo secundario. Posteriormente, las muestras se incubaron con un anticuerpo frente a IL-17 (1:200; Abcam, Cambridge, UK) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, tras el lavado, las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente: anti-rabbit (1:5000; Millipore, MA, EEUU). Seguidamente, se realizó la incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (DAKO) y la incubación 10 minutos a temperatura ambiente con DAB como cromógeno (Vector Laboratories, CA, EEUU). Los núcleos fueron teñidos con Hematoxilina. Finalmente, se deshidrataron los cortes mediante agua destilada y un gradiente creciente de alcohol etílico (70°, 95°, 100°), se fijaron en xilol y se montaron en DPX (Thermo Fisher). Como control negativo, las muestras se incubaron sin el anticuerpo primario para conocer las posibles uniones inespecíficas del anticuerpo secundario.

12. Estudios génicos en ratón.

12.1. Extracción de ARN

Dependiendo de la muestra a procesar, se realizaron diferentes técnicas de extracción de ARN. De esta manera, la extracción de ARN y micro-ARNs circulante en el modelo de aterosclerosis acelerada en ERC se realizó mediante el uso de un kit de purificación de ARN leucocitario (*Leukocyte RNA purification kit*, NORGEN Biotek, ON, Canada) para la rápida extracción y purificación del ARN total presente en los leucocitos, siguiendo el protocolo del fabricante. En el caso de la extracción de ARN total de muestras de tejidos de los diferentes modelos experimentales y/o experimentos *in vitro*, se utilizó un kit que permitió la extracción de ARNs micro (micro-ARN) y grandes (ARNm), miRNeasy Micro kit (QIAGEN), siguiendo el protocolo del fabricante. La calidad y concentración del ARN purificado con cualquiera de los dos mecanismos, se evaluó mediante el uso del espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher).

12.2. Síntesis de ADN complementario (RT-PCR)

12.2.1. A partir de ARNm

La síntesis de ADNc a partir de ARNm se realizó mediante el kit *First strand cDNA synthesis kit for RT-PCR* (AMV) (Roche, Basel, Switzerland), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó 1µg de ARN para la reacción juntamente con la

mix y se puso en el termociclador (Techne TC-412) con los ciclos establecidos (10 minutos a 25°C, 1 hora a 42°C y 5 minutos a 99°C).

12.2.2. A partir de micro-ARN

La síntesis de ADNc para micro-ARNs se realizó mediante el kit *miRCURY LNA RT* (QIAGEN) siguiendo el protocolo del fabricante. Este kit nos permite realizar la poliadenilación y retrotranscripción de los micro-ARNs de forma rápida en un solo paso. De manera resumida, se utilizaron 5ng/ul de ARN total (incluyendo micro-ARNs) que fueron mezclados con la mix correspondiente e incubados en el termociclador (Techne TC-412) 60 minutos a 40°C y 5 minutos a 95°C para la inactivación de la enzima.

12.3. PCR en tiempo real

12.3.1. Para ARNm

La expresión relativa de diferentes genes se analizó siguiendo la tecnología *TaqMan*, la cual utiliza la actividad 5' nucleasa de la Taq polimerasa para generar una señal fluorescente sonda-específica durante la PCR. Para ello, se realizó una PCR *singleplex* para los diferentes genes a analizar mediante el uso de sondas TaqMan (**Tabla 3**) junto con agua y la TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG (Thermo Fisher) en el termociclador QuantStudio™ 7 (Thermo Fisher), con los siguientes ciclos: 10 minutos a 95°C para la activación de la polimerasa seguidos de 40 ciclos de desnaturalización-alineación-extensión de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. Como gen control, se utilizó la expresión de PPIA y GAPDH.

Tabla 3. Sondas de expresión para ARNm; nombre e ID.

Nombre	ID (Thermo Fisher)
BTLA	Mm00616981_m1
IL-6	Mm00446190_m1
Havcr1/kim1	Mm00506686_m1
Lcn2/N-Gal	Mm01324470_m1
NEK7	Mm00480722_m1
CUL3	Mm00516747_m1
PPIA	Mm02342430_g1
GAPDH	Mm99999915_g1

12.3.2. Para micro-ARNs

En este caso, la expresión relativa de diferentes micro-ARNs se analizó siguiendo la tecnología SYBR Green, la cual permite un control de calidad mediante el análisis de la curva de Melting. Con este propósito, se utilizó el kit de PCR *miRCURY LNA SYBR® Green* (QIAGEN) con sondas *miRCURY LNA™* miRNA específicas para miR-16-5p (YP00205702, QIAGEN), miR-500a-3p (YP00205982, QIAGEN), miR-23a-3p (YP00204772, QIAGEN) y miR-652-3p (YP00204387, QIAGEN). miR-16-5p se utilizó como gen endógeno por su expresión estable en nuestras muestras y debido a estudios anteriores³⁶⁵.

En todos los casos, los cambios en los niveles de expresión de micro-ARNs y/o ARNm se calcularon basándonos en la fórmula estándar (método $\Delta\Delta Ct$) y fueron expresados como cambios relativos respecto a muestras correspondientes de ratones control o células no estimuladas.

13. Estudios de la expresión proteica.

La extracción de proteína a partir de PBMCs de pacientes, estudios *in vitro* y tejido renal, se realizó mediante la utilización de un tampón de lisis (50 mmol/L Tris-HCl, 150 mol/L de NaCl, 2 mmol/L de EDTA, 2 mmol/L de EGTA, 0.2% de Triton X-100, 0.3% de IGEPAL, 10 μ l/ml de cocktail inhibidor de proteinasas, 0.2 mmol/L PMSF y 0.2 mmol/L de Ortovanadato). En todos los casos, tras la adición del tampón de lisis, las muestras fueron disgregadas y homogenizadas con 4-6 ciclos (50Hz, 1 minuto; Hielo, 1 minuto) utilizando el TissueLyser LT (QIAGEN). Posteriormente, las muestras se centrifugaron 20 minutos a 10000 rpm y 4°C, recogiendo el sobrenadante.

En el caso de la extracción de proteína en tejido de arco aórtico y en células tratadas, debido a la escasa cantidad de muestra en ambos casos, la proteína total se extrajo de la fase orgánica obtenida durante la extracción de ARN de estas muestras. Se añadieron 300 μ l de EtOH 100% a cada muestra y se centrifugaron durante 5 minutos a 2000xg y 4°C para conseguir la precipitación del ADN. Seguidamente, para la precipitación de las proteínas, se añadió acetona en una proporción de 3 volúmenes de acetona por cada volumen de sobrenadante y las muestras fueron centrifugadas 10 minutos a 12000xg y 4°C. Finalmente, se realizaron 3 lavados del pellet proteico obtenido con una solución de 0,3M de Clorhidrato de Guanidina y 2,5% de glicerol (v/v) en EtOH 95%. El último

lavado se realizó en una solución de glicerol 2,5% (v/v) en EtOH 95%. Una vez finalizados los pasos de lavado y cuando el pellet proteico estaba seco, se añadieron 50-100µl del buffer de lisis mencionado anteriormente.

En ambos casos, la concentración proteica se determinó mediante el DC protein assay kit (Bio-Rad, VA, EEUU). Una vez cuantificadas, se realizó la técnica de Western Blot, mediante la carga de 10-30µg de proteína por carril. Las proteínas extraídas fueron separadas en geles de SDS-poliacrilamida (8-15%) en condiciones reductoras y transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF; Bio-Rad). El paso siguiente fue el bloqueo de la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente utilizando 5% de leche desnatada en polvo diluida en TBS-T para evitar posibles uniones inespecíficas de los anticuerpos. Finalmente, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes (**Tabla 4**) toda la noche a 4°C en rotación constante.

Tabla 4. Anticuerpos utilizados en la detección de proteínas mediante la técnica de Western Blot.

Antígeno	Dilución	Referencia	Fabricante
BTLA (cd272)	1:400	Bs-0624R	Bioss antibodies
RORyt	1:500	14-6981-82	eBioscience
IL-17	1:2000	Ab79056	Abcam
GAPDH	1:10000	Ab8245	Abcam
α-Tubulina	1:5000	T5168	Sigma

Al siguiente día, las membranas se lavaron tres veces en ciclos de 10 minutos con TBS-T y fueron incubadas con una dilución 1/10.000 del anticuerpo secundario conjugado con HRP correspondiente (anti-mouse, Jackson Immuno Research; anti-rabbit, Cell signalling y anti-rat, Jackson Immuno Research) durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras la incubación con el anticuerpo secundario, las membranas fueron expuestas utilizando el sustrato quimioluminiscente *ECL kit* (GE Healthcare, IL, EEUU), las imágenes se adquirieron mediante el sistema de imagen ChemiDoc™ MP (Bio-Rad) y se analizaron con el software de análisis Quantity one 1-D (Bio-Rad). Los niveles proteicos de GAPDH y/o α-tubulina se utilizaron como controles endógenos para normalizar la cantidad de proteína. Los datos están indicados como aumentos relativos en los niveles de proteica respecto a muestras control.

14. Análisis estadístico

Los resultados han sido analizados con el software GraphPad Prism (CA, EEUU) y se expresan en todos los casos como la media \pm el error estándar de la media (EEM) o como n (%). En todos los casos (pacientes, modelos experimentales y cultivos celulares) se compararon las muestras control con las muestras tratadas o enfermas. Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante el estudio estadístico T-test, Chi cuadrado o ANOVA de dos factores, dependiendo del número de grupos a comparar. Los valores fueron considerados significativos con un p-valor <0.05 .

Los micro-ARN y ARNm expresados diferencialmente con significación estadística en muestras humanas se identificaron mediante el filtrado Volcano Plot entre dos grupos, siguiendo los criterios de cambio ≥ 1.5 y p-valor <0.05 . El agrupamiento jerárquico se realizó utilizando el software R. El análisis GO se realizó utilizando el paquete topGO en el entorno R para gráficos y cálculos estadísticos, y el análisis Pathway se calculó mediante la prueba exacta de Fisher.

RESULTADOS

1. Patrón de micro-ARNs y ARNm que participan en el proceso patológico de la aterosclerosis acelerada en pacientes con enfermedad renal crónica (ERC).

Estudios previos han descrito como los eventos cardiovasculares relacionados en gran medida con la formación de placa de ateroma podrían ser la principal causa de muerte en enfermos renales crónicos^{107,108}. En este sentido, el estudio NEFRONA (del inglés, *National Observatory of Atherosclerosis in Nephrology*) es un estudio multicéntrico y prospectivo (4 años de seguimiento) con pacientes con ERC, diseñado para profundizar en la investigación de la progresión aterosclerótica y la calcificación vascular en el contexto de la patología renal³⁶².

1.1. Estudio de la expresión de micro-ARNs y ARNm involucrados en estadio inicial de la formación de una placa aterosclerótica.

Con el fin de conocer los diferentes micro-ARNs y/o ARNm involucrados en la predisposición a desarrollar eventos cardiovasculares en pacientes con ERC, se realizó una secuenciación para micro-ARNs, así como un Array para la detección de varios ARNm en muestras de 20 pacientes con ERC (40% estadio 3; 60% estadio 4-5), que no presentaban aterosclerosis en el momento basal. De estos 20 pacientes, 10 presentaron aterosclerosis tras dos años de seguimiento (casos), mientras que los otros 10 no presentaron placa aterosclerótica a los dos años (controles). Los pacientes utilizados, tenían una edad de entre 50-54 años, con el mismo porcentaje de hombres y mujeres, no diabéticos, sin presencia de placa aterosclerótica basal y con un porcentaje de pacientes fumadores de 50-70% (**Tabla 5**). Para el análisis de expresión de micro-ARNs y ARNm, se les extrajo, a tiempo 0, una muestra de sangre que posteriormente fue utilizada para el estudio, con el objetivo de detectar posibles biomarcadores que puedan predecir y/o estar involucrados en la aparición de la enfermedad aterosclerótica en dichos pacientes. Los dos grupos de muestras a comparar en este estudio fueron: 1) Muestras Casos: Pacientes con ERC, sin placa basal, pero con presencia de placa aterosclerótica a los 2 años de seguimiento (pacientes con progresión de la enfermedad). 2) Muestras Control: Pacientes con ERC, sin placa basal y sin presencia de placa aterosclerótica a los 2 años (pacientes sin progresión de la enfermedad). La

progresión aterosclerótica se determinó por el aumento del número de zonas con placa aterosclerótica respecto a la primera visita (tiempo 0), mediante técnicas de ultrasonido³⁶² (Figura 20).

Tabla 5: Características basales de pacientes con ERC, sin placa basal, con/sin presencia de placa a los dos años. Pacientes utilizados en la secuenciación de micro ARN y el array de ARNm

Pacientes con ERC sin placa aterosclerótica basal (tiempo 0)		
	Sin progresión aterosclerótica	Con progresión aterosclerótica
n	10	10
	n (%)	
Sexo (masculino)	5 (50)	4 (40)
Fumador	5 (50)	7 (70)
Diabetes	0 (0)	0 (0)
Hipertensión	10 (100)	10 (100)
Dislipidemia	10 (100)	8 (80)
Placa basal	0 (0)	0 (0)
Proteinuria		
Normoalbuminuria	4 (40)	3 (30)
Microalbuminuria	3 (30)	1 (10)
Macroalbuminuria	3 (30)	6 (60)
ERC		
Estadio 3	3 (30)	5 (50)
Estadio 4-5	7 (70)	5 (50)
	Media [Desviación estándar]	
Edad (años)	50,8 [11,2]	53,7 [8,4]
IMC (Kg/m²)	30,4 [4,1]	30,9 [5,3]
Presión sistólica (mmHg)	136,4 [14,0]	144,5 [15,8]
Presión diastólica (mmHg)	83,3 [9,8]	86,7 [8,6]
Colesterol total (mg/dl)	177,8 [45,8]	184,8 [40,3]
Colesterol HDL (mg/dl)	48,4 [9,0]	54,02 [15,7]
Colesterol LDL(mg/dl)	99,3 [51,6]	112,8 [42,0]
Triglicéridos (mg/dl)	154,10 [77,7]	117,0 [28,9]
Glucosa (mg/dl)	98,4 [7,2]	96,0 [9,2]
Calcio total (mg/dl)	9,7 [0,51]	9,15 [0,40]
Fosfato (mg/dl)	3,8 [0,9]	3,4 [0,7]
Albumina (g/dl)	4,3 [0,4]	4,3 [0,3]
Sodio (mEq/l)	140,8 [2,6]	142,6 [1,9]
Potasio (mEq/l)	4,9 [0,5]	4,5 [0,6]
PCR	2,8 [3,1]	3,31 [2,9]

Los datos cuantitativos están expresados como la media [Desviación estándar] y las variables cualitativas están expresadas con la n (porcentaje). IMC, índice de masa corporal; ERC, enfermedad renal crónica; PCR, proteína C reactiva.

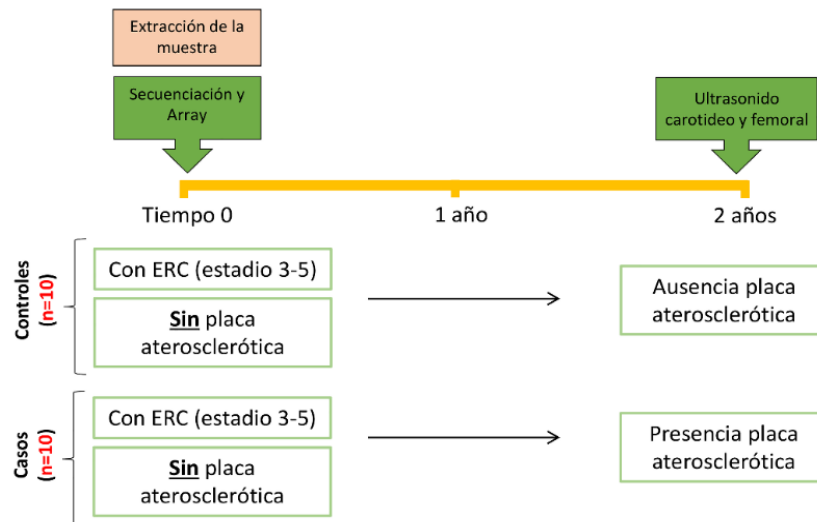


Figura 20. Esquema de los grupos de pacientes utilizados en la secuenciación de micro-ARNs/Array de ARNm y sus diferentes características.

En ambos análisis (expresión de micro-ARNs mediante secuenciación y de ARNm mediante Array), se consideró significativa la expresión de los micro-ARNs/ARNm que presentaron un P-valor<0.05 y una modificación n-veces>1.5 en la comparación de controles vs casos.

En este sentido, podemos observar mediante la gráfica del Volcano Plot (**Figura 21A**) un aumento significativo en la expresión de 16 micro-ARNs y 1100 micro-ARNs no regulados diferencialmente cuando comparamos casos vs controles. En la **tabla 6**, se observa la secuencia específica de estos 16 micro-ARNs significativamente aumentados en casos vs controles. Basándonos en los cambios cuantificados por el número de veces modificado (n-veces) con respecto a la muestra control, podemos destacar a miR-23a-3p (aumentado 2,13-veces), miR-23b-3p (aumentado 1,91-veces), miR-1294 (aumentado 1,80-veces) y miR-652-3p (aumentado 1,81-veces) como algunos de los micro-ARNs más aumentados en los pacientes con ERC y progresión aterosclerótica (**Tabla 6**).

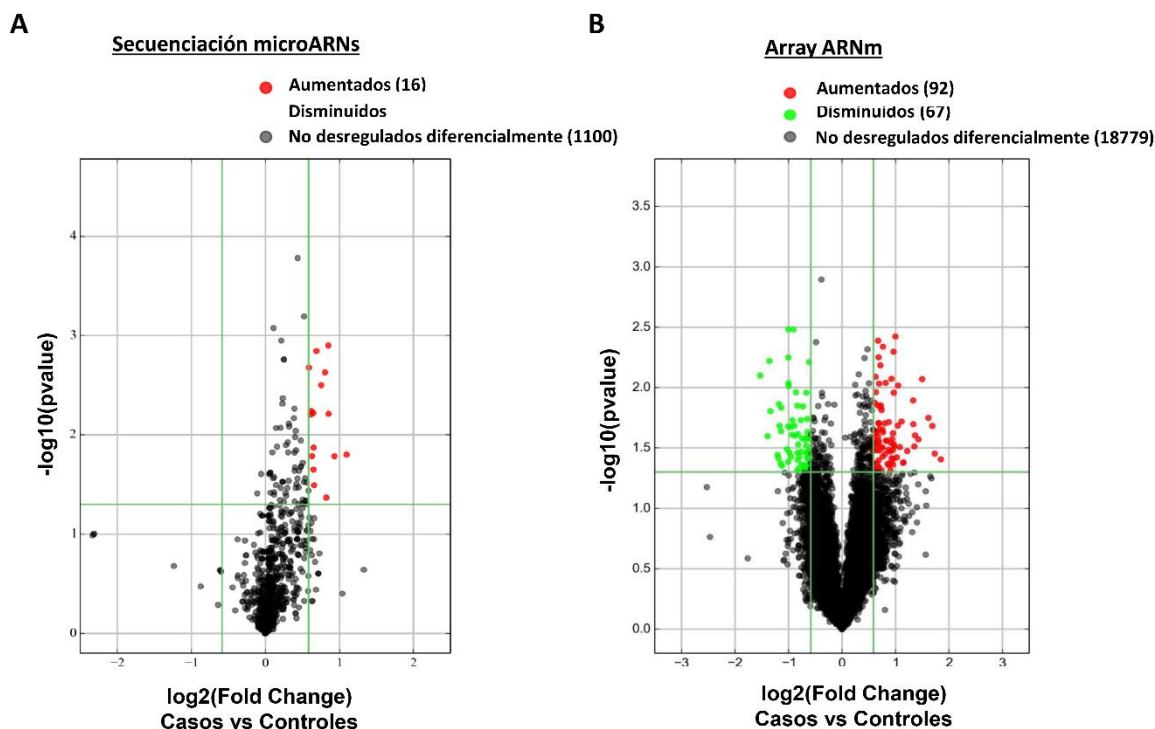


Figura 21. Patrón de ARNm y micro-ARNs en el estudio de la predisposición a desarrollar placas de ateroma en pacientes con ERC. (A) Representación gráfica mediante Volcano Plot de los micro-ARNs diferencialmente expresados en pacientes con ERC sin progresión aterosclerótica (n=10) vs pacientes con ERC y progresión aterosclerótica (n=10) obtenidos a partir de técnicas de secuenciación. (B) Representación gráfica mediante Volcano Plot de los ARNm diferencialmente expresados en pacientes con ERC sin progresión aterosclerótica (n=10) vs pacientes con ERC y progresión aterosclerótica (n=10) obtenidos a partir del Array de ARNm. Los resultados se consideran significativos con un P-valor <0.05 y cambio n-veces >1.5.

Tabla 6. Micro-ARNs significativamente aumentados en pacientes con ERC que desarrollaron placas ateroscleróticas 2 años tras la toma de muestra (n=10) vs pacientes con ERC que no presentaron placas ateroscleróticas 2 años tras la toma de muestra (n=10). Datos obtenidos mediante secuenciación

ID	Secuencia madura	Regulación	Cambios n-veces casos vs controles	P-valor casos vs controles
hsa-miR-23a-3p	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC	↑	2,139	0,0157
hsa-miR-23b-3p	AUCACAUUGCCAGGGAUUACC	↑	1,910	0,0164
hsa-miR-652-3p	AAUGGCGCCACUAGGGUUGUG	↑	1,807	0,0061
hsa-miR-1294	UGUGAGGUUGGCAUUGUUGUCU	↑	1,804	0,0012
hsa-miR-4326	UGUUCUCUGUCUCCAGAC	↑	1,769	0,0428
hsa-miR-502-3p	AAUGCACCUGGGCAAGGAUUCA	↑	1,750	0,0023
hsa-miR-500a-3p	AUGCACCUGGGCAAGGAUUCUG	↑	1,688	0,0031
hsa-miR-378a-3p	ACUGGACUUGGAGUCAGAAGGC	↑	1,613	0,0014
hsa-miR-324-5p	CGCAUCCCCUAGGGCAUUGGUGU	↑	1,579	0,0321
hsa-miR-130b-5p	ACUCUUUCCUGUUGCACUAC	↑	1,572	0,0134
hsa-miR-331-3p	GCCCCUGGGCCUAUCCUAGAA	↑	1,569	0,0224
hsa-miR-629-5p	UGGGUUUACGUUGGGAGAACU	↑	1,565	0,0060
hsa-miR-574-3p	CAGCUCAUGCACACCCACA	↑	1,548	0,0164
hsa-miR-362-5p	AAUCCUUGGAACCUAGGUGUGAGU	↑	1,537	0,0058
hsa-miR-185-5p	UGGAGAGAAAGGCAGUUCUGA	↑	1,530	0,0063
hsa-miR-93-3p	ACUGCUGAGCUAGCACUCCCCG	↑	1,504	0,0021

El símbolo ↑, indica un aumento significativo (P-valor<0,05 y una modificación n-veces>1,5) en la expresión de los diferentes micro-ARNs.

Por otro lado, y como se comentó anteriormente, se realizó un array de ARNm en las mismas muestras (**Figura 20**) para detectar posibles genes implicados en la aparición de placa aterosclerótica en estos pacientes. Este análisis nos mostró un aumento significativo en la expresión de 92 genes, así como una disminución significativa en la expresión de 67 genes al comparar muestras casos vs control. Además, 18779 genes no mostraron una desregulación significativa en la misma comparación (**Figura 21B**). En la **tabla 7**, se muestran algunos de los genes más significativamente desregulados (basándonos en los valores de cambios n-veces) de entre los diferentes genes cuya expresión apareció significativamente desregulada en pacientes con ERC que presentaron una progresión aterosclerótica a los 2 años tras la toma de muestra.

Tabla 7. ARNm más significativamente desregulados (según las modificaciones n-veces) en pacientes con ERC que desarrollaron placas ateroscleróticas 2 años tras la toma de muestra (n=10) vs pacientes con ERC que no presentaron placas ateroscleróticas 2 años tras la toma de muestra (n=10). Datos obtenidos mediante Array de ARNm.

Símbolo	Regulación	Fold change Casos vs Controles	P-valor Casos vs Controles
CT45A4	↑	3,599	0,0393
HDC	↑	3,324	0,0352
C9orf53	↑	3,221	0,0208
CTSG	↑	3,064	0,0178
RNASE3	↑	2,826	0,0085
DEFA1B	↑	2,692	0,0268
SRGAP3	↑	2,577	0,0249
NT5E	↑	2,553	0,0307
CPA3	↑	2,521	0,0201
CEACAM5	↑	2,513	0,0128
RNF182	↑	2,328	0,0336
TNFSF10	↓	-1,518	0,03392
CCL5	↓	-1,534	0,03898
PLAC8	↓	-1,557	0,04456
MRPL35	↓	-1,585	0,011
BTLA	↓	-1,772	0,02428
E2F7	↓	-1,907	0,02458
FER	↓	-1,937	0,02115
FCRL1	↓	-2,300	0,0361
HLA-DQB1	↓	-2,526	0,0157
KCNG1	↓	-2,561	0,0060
SLC38A11	↓	-2,620	0,0253
FLJ00382	↓	-2,885	0,0079

Los símbolos ↑/↓, indican un aumento/disminución significativa (P-valor<0,05 y una modificación n-veces>1,5), respectivamente, en la expresión de diferentes genes.

Una vez evaluados los diferentes micro-ARNs y ARNm diferencialmente expresados en pacientes con ERC que presentaban una progresión aterosclerótica, se realizó un análisis funcional, mediante técnicas de ontología génica ("*GO analysis*"; <http://www.geneontology.org>). Estos análisis *in silico* nos permitieron descubrir las principales vías de señalización en las que podían estar involucrados los diferentes genes significativamente desregulados. En este aspecto, pudimos observar que los principales procesos biológicos en los que podían estar involucrados los genes cuyo ARNm se encontró significativamente aumentado en casos vs controles corresponden a procesos biológicos de defensa del organismo (**Figura 22**), mientras que los genes cuyo ARNm se encontró significativamente disminuido, correspondían a procesos inmunológicos (**Figura 23**).

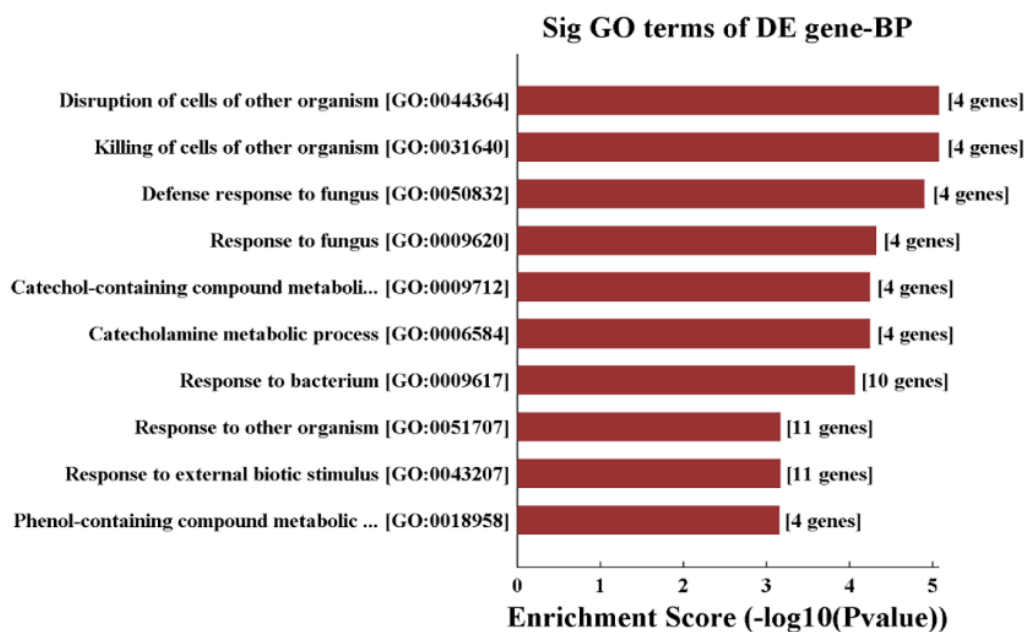


Figura 22. Categorías GO (*Gene Ontology*) asociadas a los ARNm significativamente aumentados en pacientes con ERC que presentan desarrollo aterosclerótico a los dos años. [GO:00XXXXX] nos indica el código específico de cada vía de señalización. Las diferentes vías han sido consideradas significativas con un P-valor < 0.05. Se indica el número de genes que están relacionados con cada vía específica.

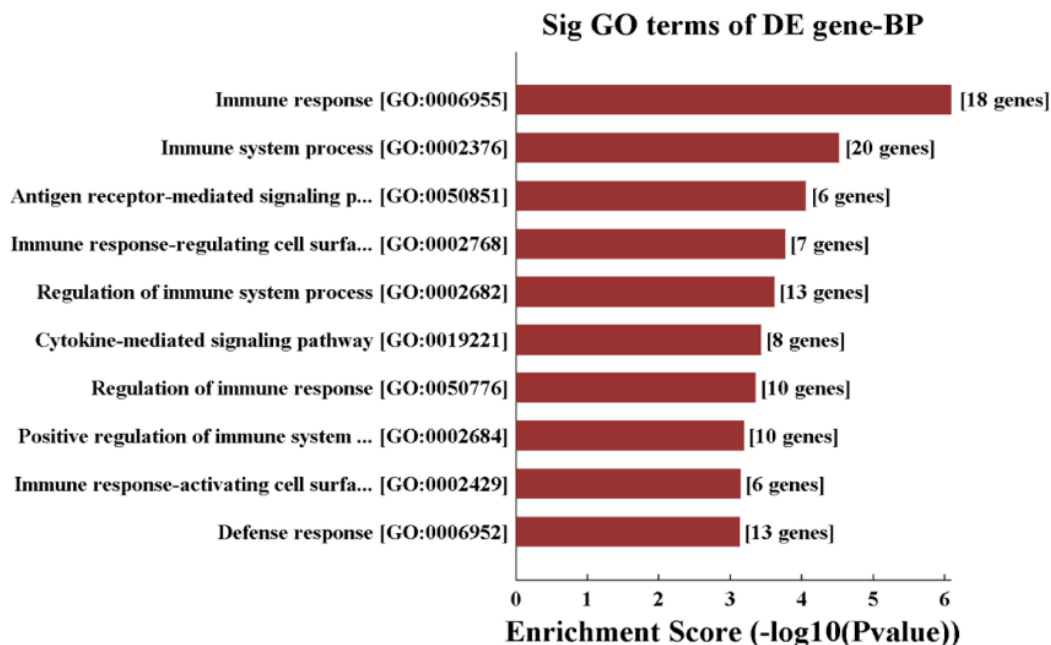


Figura 23. Categorías GO (*Gene Ontology*) asociadas a los ARNm significativamente disminuidos en pacientes con ERC que presentan desarrollo aterosclerótico a los dos años. [GO:00XXXXX] nos indica el código específico de cada vía de señalización. Las diferentes vías han sido consideradas significativas con un P-valor < 0.05. Se indica el número de genes que están relacionados con cada vía específica.

1.2. Validación intra-especie de los micro-ARNs y ARNm que se postulan como posibles reguladores en la aterosclerosis acelerada en pacientes renales crónicos.

Posteriormente, se realizó una validación intra-especie de los resultados obtenidos en la secuenciación de micro-ARN y en el array de ARNm, utilizando para ello una cohorte mayor de pacientes pertenecientes al estudio NEFRONA (n=64). Estos pacientes fueron divididos en dos grupos de igual manera que los primeros pacientes utilizados en este estudio: 1) Casos (n=27): Pacientes con ERC, sin placa basal, pero con presencia de placa aterosclerótica a los 2 años tras la toma de muestra. 2) Controles (n=37): Pacientes con ERC, sin placa basal y sin presencia de placa aterosclerótica a los 2 años (**Figura 24**). Las diferentes características clínicas de estos pacientes se recogen en la columna central de la **tabla 8**, donde podemos observar un porcentaje similar de pacientes en los diferentes estadios de ERC, masculinos y femeninos, diabéticos e hipertensos en esta comparación.

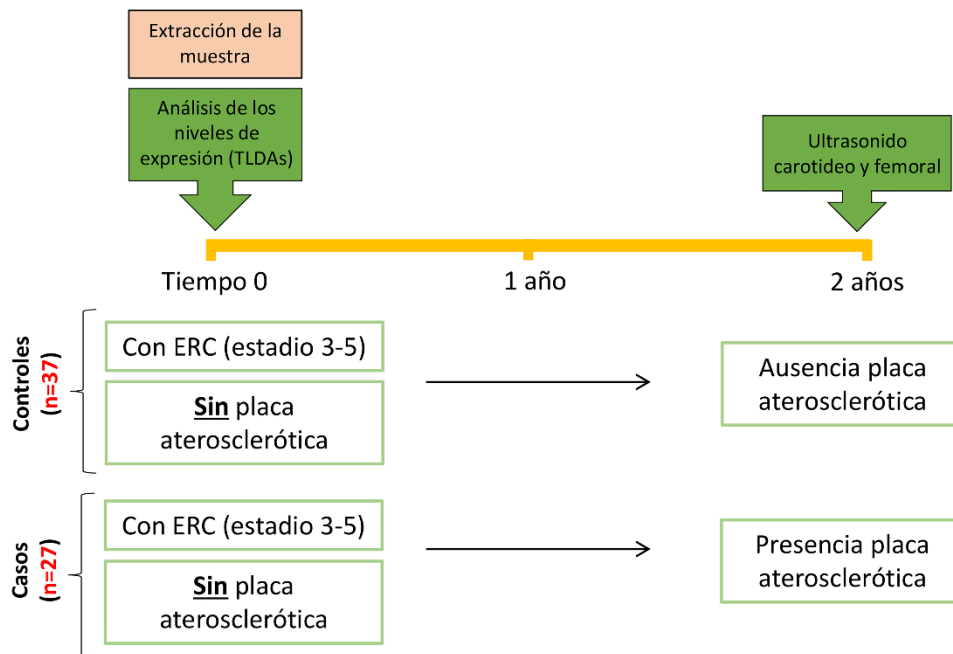


Figura 24. Esquema de los grupos de pacientes utilizados en la validación intra-especie y sus diferentes características

Los micro-ARNs y ARNm seleccionados para la validación fueron ARNm que se encontraran modificados significativamente en el array, que fueran posibles diana para uno o más micro-ARNs de los que aparecieron aumentados significativamente en la secuenciación y que pudieran estar involucrados, según bases bibliográficas, en el desarrollo de la placa de ateroma. Esta selección se basó en estudios *in silico* sobre posibles genes diana para los 16 micro-ARNs aumentados significativamente, utilizando para ello bases de datos como TargetScan 7.2 y miRDB. En la **tabla 9** se encuentran resumidos los diferentes micro-ARNs seleccionados, sus correspondientes genes diana y la implicación de estos últimos en el proceso aterosclerótico. Además, también se muestran los cambios n-veces y P-valores obtenidos en la secuenciación/Array para cada uno de los micro-ARNs/ARNm seleccionados.

Tabla 8. Características basales de pacientes con ERC, con/sin placa basal, con/sin presencia de placa a los dos años.

	Pacientes con ERC con/sin placa aterosclerótica basal (tiempo 0)			Pacientes con ERC sin placa aterosclerótica basal (tiempo 0)			Pacientes con ERC con placa aterosclerótica basal (tiempo 0)		
	Sin progresión aterosclerótica	Con progresión aterosclerótica	P-valor	Sin progresión aterosclerótica	Con progresión aterosclerótica	P-valor	Sin progresión aterosclerótica	Con progresión aterosclerótica	P-valor
n	78	70		37	27		42	42	
n (%)									
Sexo (masculino)	40 (51,3)	37 (52,9)	0,85	15 (40,5)	16 (59,3)	0,139	26 (61,9)	20 (47,6)	0,188
Fumador	30 (38,5)	34 (48,6)	0,22	11 (29,7)	14 (51,9)	0,073	20 (47,6)	19 (45,2)	0,827
Diabetes	23 (29,5)	18 (25,7)	0,61	11 (29,7)	8 (29,6)	0,993	12 (28,6)	10 (23,8)	0,62
Hipertensión	70 (89,7)	62 (88,6)	0,82	32 (86,5)	25 (92,6)	0,44	39 (92,9)	36 (85,7)	0,29
Dislipidemia	46 (59)	43 (61,4)	0,76	17 (45,9)	16 (59,3)	0,293	30 (71,4)	26 (61,9)	0,355
Placa basal	41 (52,6)	43 (61,4)	0,28	0 (0)	0 (0)	1	42 (100)	42 (100)	1
Proteinuria									
Normoalbuminuria	12 (33,3)	11 (33,3)	1	3 (21,4)	6 (46,2)	0,277	9 (40,9)	5 (25)	0,421
Microalbuminuria	13 (36,1)	12 (36,4)		7 (50%)	3 (23,1)		6 (27,3)	9 (45)	
Macroalbuminuria	11 (30,6)	10 (30,3)		4 (28,6)	4 (30,8)		7 (31,8)	6 (30)	
ERC									
Estadio 3	30 (38,5)	26 (37,1)	0,97	12 (32,4)	8 (29,6)	0,437	19 (45,2)	17 (40,5)	0,267
Estadio 4-5	28 (35,9)	25 (35,7)		11 (29,7)	12 (44,4)		17 (40,5)	13 (31)	
Diálisis	20 (25,6)	19 (27,1)		14 (37,8)	7 (25,9)		6 (14,3)	12 (28,6)	
Media [Desviación estándar]									
Edad (años)	52,4 [15,7]	60,6 [10,3]	< 0,01	41,8 [14,9]	56,7 [12,5]	<0,01	61,9 [8,6]	63,0 [7,9]	0,572
IMC (Kg/m²)	27,8 [5,6]	29,2 [6,1]	0,22	26,4 [6,1]	27,9[6,4]	0,341	29,4 [4,7]	29,9 [5,9]	0,653
Presión sistólica (mmHg)	135,4 [20,3]	140,2 [23,5]	0,18	129,6 [17,7]	142,3 [21,9]	0,016	141,1 [21,3]	138,2 [24,6]	0,562
Presión diastólica (mmHg)	80,6 [11,8]	78,0 [11,5]	0,17	79,5 [13,6]	80,2 [10,0]	0,838	81,8 [9,9]	76,3 [12,3]	0,029
Colesterol total (mg/dl)	177,3 [40,0]	174,9 [38,5]	0,71	175,8 [49,7]	174,4 [32,5]	0,887	180,8 [32,4]	173,0 [40,0]	0,331
Colesterol HDL (mg/dl)	48,9 [14,6]	51,0 [16,8]	0,45	50,4 [15,9]	51,1 [16,4]	0,881	47,9 [13,3]	50,7 [17,5]	0,429
Colesterol LDL (mg/dl)	101,8 [37,3]	96,8 [32,1]	0,42	102,6 [45,8]	102,4 [30,3]	0,985	103,2 [30,2]	90,9 [29,9]	0,087
Triglicéridos (mg/dl)	132,6 [60,5]	157,0 [96,5]	0,08	131,2 [65,3]	150,6 [101,9]	0,399	133,6 [55,9]	161,9 [94,9]	0,107
Glucosa (mg/dl)	106,6 [37,2]	103,6 [27,6]	0,58	106,2 [39,1]	99,4 [28,0]	0,421	106,9 [35,4]	106,3 [27,5]	0,929
Calcio total (mg/dl)	9,3 [0,57]	9,5 [0,51]	0,1	9,2 [0,6]	9,5 [0,4]	0,025	9,4 [0,5]	9,4 [0,5]	0,858
Fósforo (mg/dl)	3,9 [0,91]	4,0 [0,98]	0,76	4,0 [1,0]	3,9 [0,7]	0,734	3,8 [0,8]	4,0 [1,1]	0,419
Albumina (g/dl)	4,1 [0,42]	4,2 [0,6]	0,32	4,1 [0,5]	4,2 [0,7]	0,539	4,2 [0,3]	4,2 [0,5]	0,526
Sodio (mEq/l)	140,0 [3,0]	140,4 [3,1]	0,6	139,7 [2,9]	140,2 [4,1]	0,616	140,5 [3,1]	140,4 [2,3]	0,967
Potasio (mEq/l)	4,8 [0,63]	4,8 [0,57]	0,69	4,6 [0,6]	4,8 [0,5]	0,092	4,9 [0,6]	4,7 [0,6]	0,071
PCR	3,6 [4,1]	6,9 [19,9]	0,18	3,7 [3,9]	7,6 [20,2]	0,342	3,5 [4,3]	6,6 [20,1]	0,333

Los datos cuantitativos están expresados como la media [Desviación estándar] y las variables cualitativas están expresadas con la n (porcentaje). IMC, índice de masa corporal; ERC, enfermedad renal crónica; PCR, proteína C reactiva. Las diferencias son consideradas significativas con un P-valor <0,05.

Tabla 9. Micro-ARNs y sus genes asociados seleccionados para una validación intra-especie y futuros estudios.

micro-ARN	Fold Change micro-ARNs	P-Valor micro-ARNs	Símbolo del gen diana asociado	Fold Change ARNm	P-valor ARNm	Proteína asociada	Función en aterosclerosis
miR-1294	1,804	0,00125	MS4A1	2,01	0,02096	<i>B-lymphocyte antigen CD20</i>	Regulación linfocitos B2 ^{366,367}
miR-185-5p	1,53	0,00625					
miR-629-5p	1,565	0,00602					
miR-1294	1,804	0,00125	CCL5	1,534	0,03898	<i>C-C motif chemokine 5</i>	Reclutamiento de células inflamatorias ³⁶⁸
miR-4326	1,769	0,04286					
miR-185-5p	1,53	0,00625	BTLA	1,772	0,02428	<i>B and T lymphocyte attenuator</i>	Regulación del desarrollo de células B ateroprotectoras y linfocitos T reguladores ³¹³
miR-500a-3p	1,688	0,00315					
miR-501-3p	1,75	0,00235	MRPL35	1,585	0,011	<i>Mitochondrial ribosomal protein L35</i>	Producción de especies reactivas de oxígeno ³⁶⁹
miR-500a-3p	1,688	0,00315					
miR-23a-3p	2,139	0,01579					
miR-362-5p	1,537	0,00575	PLAC8	1,557	0,04456	<i>Placenta Specific 8</i>	Proliferación celular ³⁷⁰
miR-93-3p	1,504	0,0021					
miR-500a-3p	1,688	0,00315	E2F7	1,907	0,02458	<i>Transcription factor E2F7</i>	Proliferación celular ³⁷¹
miR-501-3p	1,75	0,00235					
miR-652-3p	1,807	0,00614					
miR-501-3p	1,75	0,00235	SLC38A11	2,62	0,02527	<i>Solute carrier family 38 member 11</i>	Almacenamiento de energía en forma de lípidos ³⁷²
miR-93-3p	1,504	0,0021					
miR-362-5p	1,537	0,00575					
miR-93-3p	1,504	0,0021	FER	1,937	0,02115	<i>Tyrosine kinase FER</i>	Activación de la vía NF-kappaB ³⁷³
miR-500a-3p	1,688	0,00315					
miR-130b-5p	1,572	0,01344	TNFSF10	1,518	0,03392	<i>Tumor necrosis factor superfamily member 10</i>	Síntesis de colesterol y triglicéridos ³⁷⁴ . Modulación del fenotipo y función de macrófagos ³⁷⁵

Referente a la validación intra-especie de la expresión de los micro-ARNs mencionados, se observó un aumento significativo en la expresión relativa de 3 micro-ARNs en pacientes con ERC que presentaron placa a los dos años al compararlos con aquellos pacientes con ERC que no la presentaron (**Figura 25A**). Estos micro-ARNs corresponden a miR-23a-3p (aumentado 2,14 veces en la secuenciación), miR-652-3p (aumentado 1,81 veces en la secuenciación) y miR-500a-3p (aumentado 1,70 veces en la secuenciación). Lamentablemente, varios micro-ARNs como miR-1294, miR-4326, miR-501-3p y miR-93-3p, presentes en la validación, no pudieron ser analizados por fallos en la amplificación de los mismos, mientras que los micro-ARNs restantes no presentaron diferencias significativas en su expresión (**Figura 25A**). De esta manera, la validación intra-especie, solo confirmó el aumento significativo de miR-23a-3p, miR-652-3p y miR-500a-3p relacionándolos con la aparición de placa aterosclerótica en pacientes con ERC.

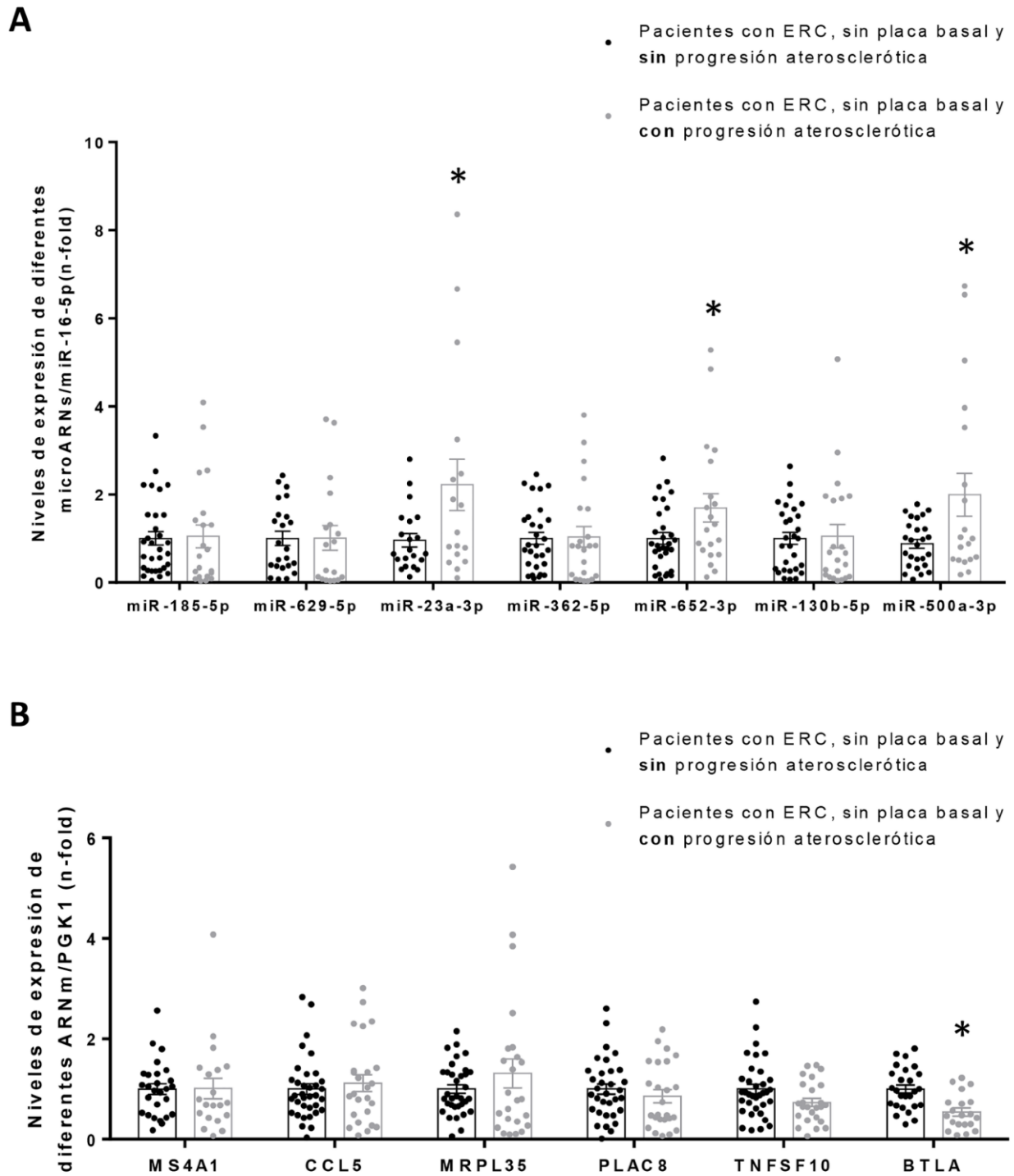


Figura 25. Validación intra-especie de micro-ARNs y ARNm seleccionados en una cohorte mayor de pacientes pertenecientes al estudio NEFRONA. (A) Niveles de expresión de los diferentes micro-ARNs seleccionados en pacientes con ERC, sin placa basal, comparando pacientes que mostraron presencia de placa aterosclerótica a los dos años (n=27) vs pacientes que no presentaron placa aterosclerótica a los dos años (n=37). (B) Niveles de ARNm de los diferentes genes seleccionados en pacientes con ERC, sin placa basal, comparando pacientes que mostraron presencia de placa aterosclerótica a los dos años (n=27) vs pacientes que no presentaron placa aterosclerótica a los dos años (n=37). Los datos están expresados como la media \pm SEM. Diferencias significativas expresadas como * $p < 0.05$.

De la misma manera, se realizó una validación intra-especie de la expresión de los genes seleccionados. Dicho análisis, únicamente confirmó la disminución significativa en los niveles de expresión de BTLA en esta cohorte mayor de pacientes. Además, la bajada en la expresión génica de TNFSF10 (del inglés, *Tumor necrosis factor superfamily member 10*) se situó cerca de la significancia con un P-valor de 0,054. Por el contrario, la expresión génica para E2F7, SLC38A11 y FER no pudo ser analizada por fallos en la amplificación de los mismos, mientras que el resto de genes analizados no mostraron diferencias significativas en sus niveles de expresión (**Figura 25B**).

En resumen, esta validación intra-especie postuló a miR-23a-3p, miR-652-5p, miR-500a-3p y BTLA como posibles dianas y potenciales biomarcadores en el desarrollo acelerado de placas ateroscleróticas en pacientes con ERC.

1.3. Estudio de la posible implicación de micro-ARNs/ARNm seleccionados en la progresión de la placa en pacientes con enfermedad aterosclerótica ya establecida.

Posteriormente, con el objetivo de continuar indagando en la posible implicación de estos micro-ARNs/ARNm en el desarrollo aterosclerótico en pacientes con ERC, se estudió la expresión de los diferentes micro-ARNs/ARNm de interés (**Tabla 9**) en otra cohorte diferente de pacientes con ERC pertenecientes al estudio NEFRONA (n=84). En este caso, los pacientes del estudio fueron pacientes con ERC, con/sin progresión aterosclerótica que, a diferencia de los pacientes utilizados en los estudios anteriores, ya presentaban placa aterosclerótica en el momento de extracción de la muestra (tiempo 0) (**Figura 26**). El objetivo de este estudio fue el análisis de la expresión de estos micro-ARNs/ARNm en pacientes con ERC que mantuvieron el mismo número de regiones con placa aterosclerótica dos años después de la toma de muestra, con aquellos que presentaron un mayor número de regiones con placa a los dos años tras la toma de muestra. Para llevar a cabo dicho objetivo, los pacientes fueron divididos en dos grupos de igual número (n=42): 1) Casos: Pacientes con ERC, con placa aterosclerótica basal, que presentaron un aumento de regiones con placa a los 2 años tras la toma de muestra. 2) Controles: Pacientes con ERC, con placa aterosclerótica basal que no avanzó tras los dos años desde la toma de muestra. Estos pacientes presentaban

una distribución homogénea en edad, sexo, estadio de ERC, diabetes e hipertensión (columnas derechas de **tabla 8**).

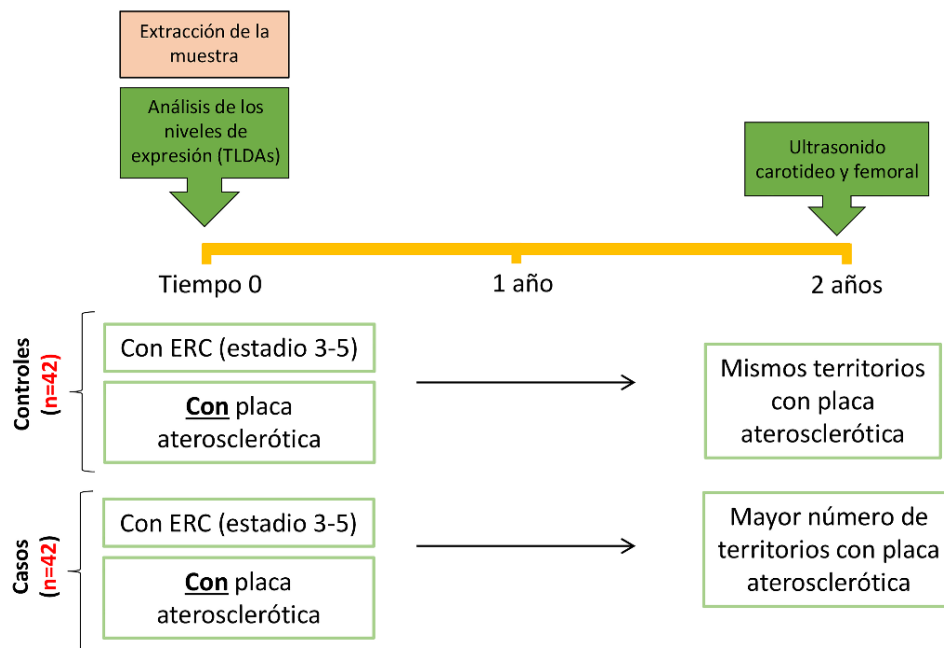
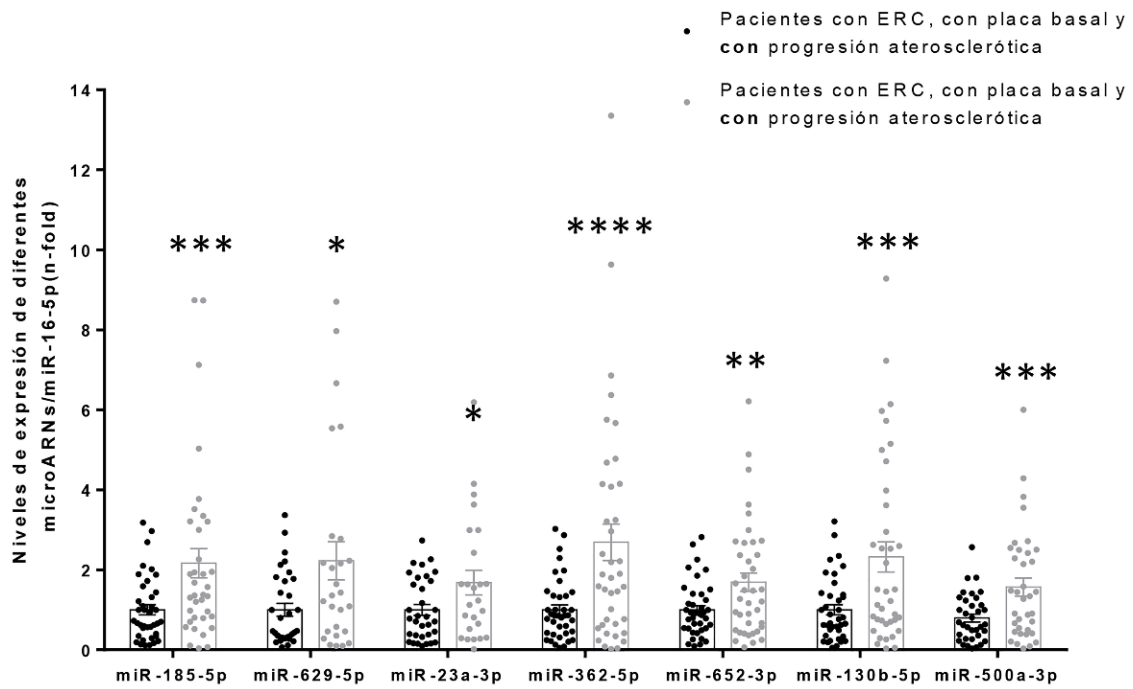


Figura 26. Esquema de los grupos de pacientes utilizados de la nueva cohorte (con placa basal) y sus diferentes características.

Este estudio nos mostró un aumento significativo en la expresión de todos los micro-ARNs analizados en pacientes con ERC y progresión de la placa a los dos años, al compararlos con pacientes con ERC que mantuvieron el mismo número de placas tras los dos años (**Figura 27A**). Sin embargo, este mismo análisis, no indicó una desregulación significativa en la expresión de ninguno de los genes a evaluar en pacientes con ERC y progresión aterosclerótica (**Figura 27B**). De manera que, una vez establecida la placa aterosclerótica en pacientes con ERC, miR-185-5p, miR-629-5p, miR-23a-3p, miR-362-5p, miR-652-3p, miR-130b-5p y miR-500a-3p podrían estar involucrados o podrían postularse como biomarcadores de progresión de una enfermedad aterosclerótica previamente establecida en pacientes con ERC.

A



B

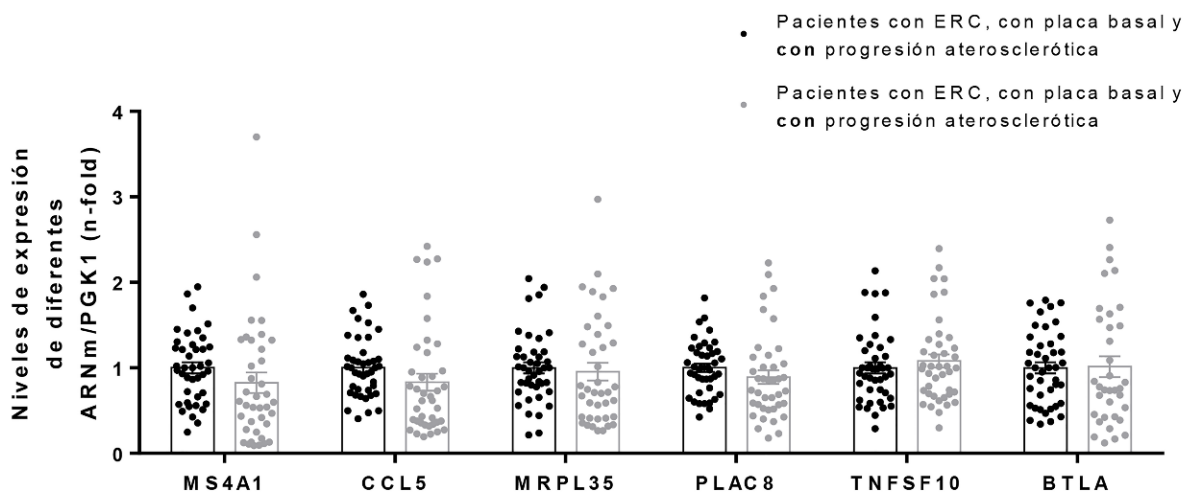


Figura 27. Análisis de los niveles de expresión de diferentes micro-ARNs/ARNm seleccionados en una cohorte de pacientes del estudio NEFRONA, con presencia de placa aterosclerótica basal, con/sin progresión. (A) Niveles de expresión de los diferentes micro-ARNs seleccionados en pacientes con ERC, con placa basal, comparando pacientes que mantuvieron la misma placa aterosclerótica a los dos años (n=42) vs pacientes que aumentaron el número de placas ateroscleróticas a los dos años (n=42). (B) Niveles de expresión de los diferentes ARNm seleccionados en pacientes con ERC, con placa basal, comparando pacientes que mantuvieron la misma placa aterosclerótica a los dos años (n=42) vs pacientes que aumentaron el número de placas ateroscleróticas a los dos años (n=42). Los datos están expresados como la media \pm SEM. Diferencias significativas expresadas como * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$.

1.4. Estudio de la expresión de micro-ARNs/ARNm seleccionados en la progresión aterosclerótica independiente de la presencia/ausencia de placa de ateroma en el momento de la toma de muestra.

Finalmente, con el objetivo de estudiar la implicación de los diferentes micro-ARNs/ARNm seleccionados (**Tabla 9**) en la progresión de la enfermedad aterosclerótica, **independientemente de la presencia o no de placa en el momento basal**, se realizó el análisis de la expresión de estos micro-ARNs/ARNm en los pacientes del estudio NEFRONA utilizados en los dos estudios anteriores. Con esta finalidad, los pacientes fueron reorganizados en: 1) Controles (n=78): pacientes con ERC, con/sin placa aterosclerótica en el momento de toma de muestra que no mostraron progresión o aparición de enfermedad aterosclerótica a los dos años y 2) Casos (n=70): pacientes con ERC, con/sin placa aterosclerótica en el momento de toma de muestra que mostraron una aparición de placa o progresión de una placa previamente establecida (**Figura 28**). En las columnas izquierdas de la **tabla 8** se resumen todas las características de ambos grupos de pacientes, donde observamos una distribución homogénea en sexo, diabetes, hipertensión y estadio de ERC entre grupos.

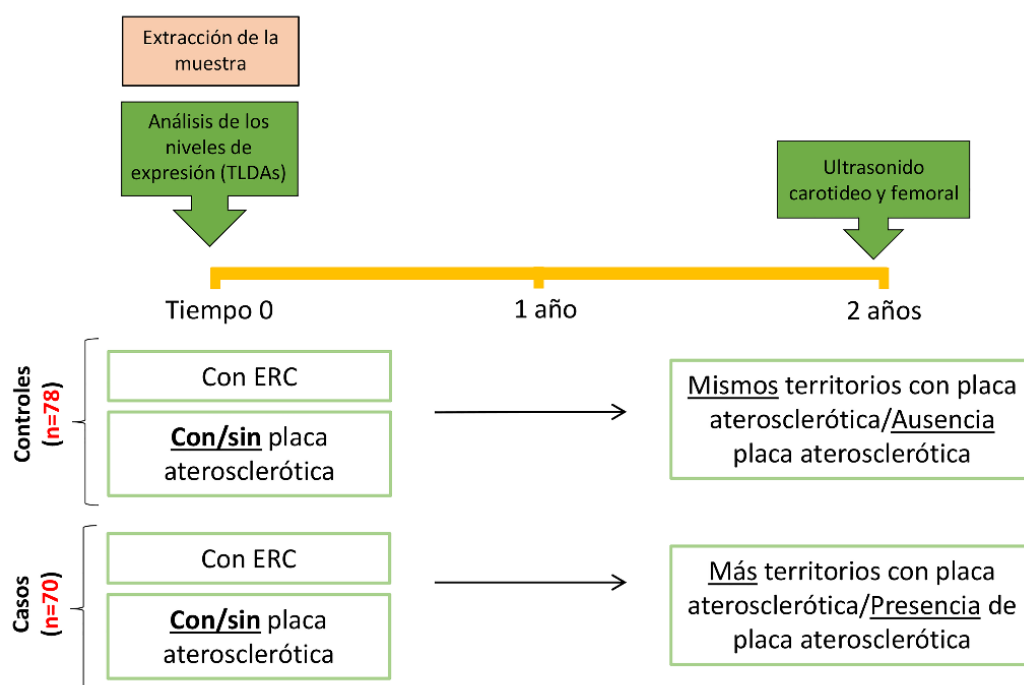


Figura 28. Esquema de los pacientes reorganizados y sus características.

Los resultados obtenidos en este último análisis, mostraron un aumento significativo en la expresión de miR-629-5p, miR-23a-3p, miR-652-5p y miR-500a-3p (Figura 29A).

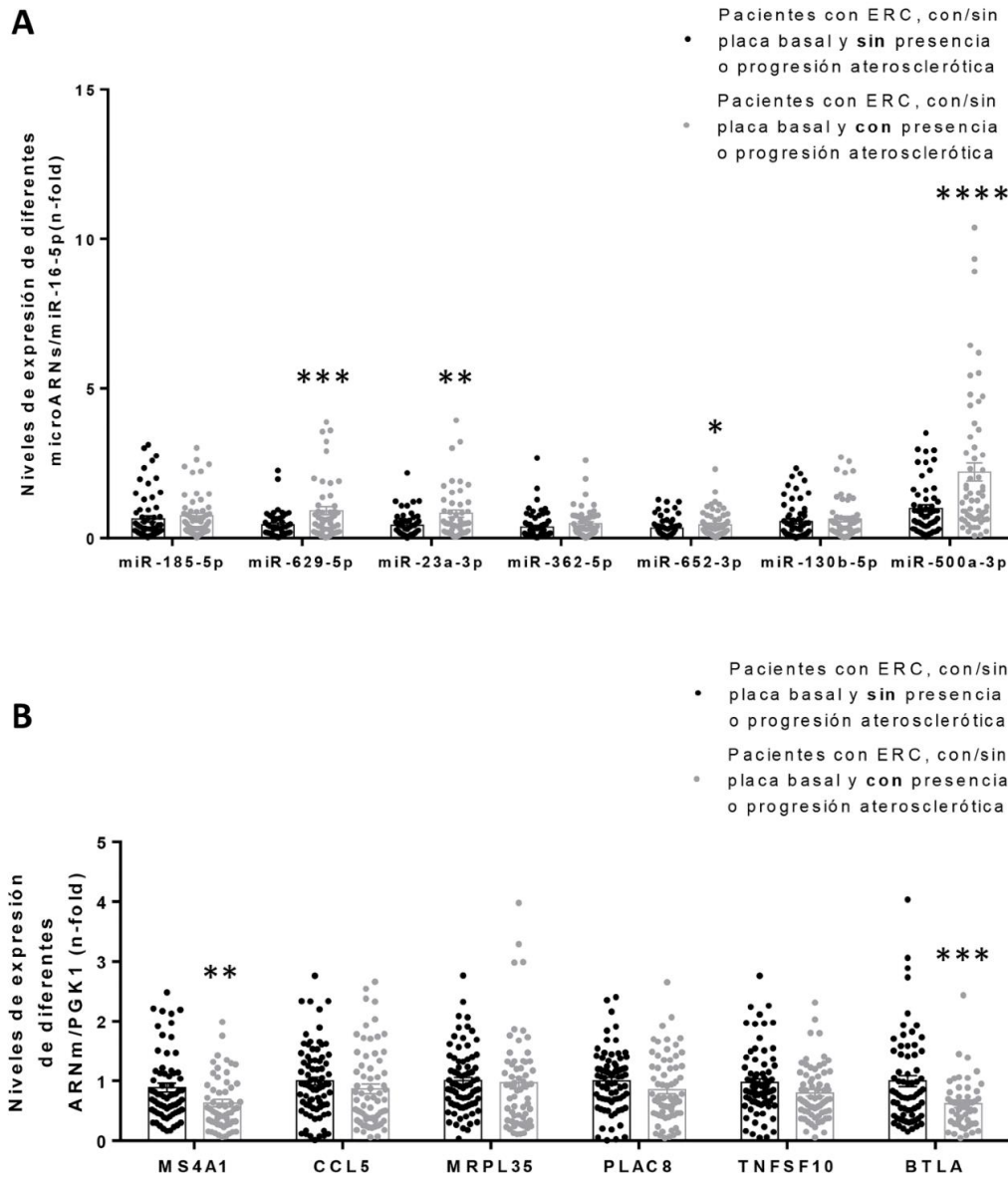


Figura 29. Análisis de los niveles de expresión de los diferentes micro-ARNs/ARNm seleccionados en pacientes con ERC, con/sin presencia de placa aterosclerótica basal, con/sin progresión. (A) Niveles de expresión de los diferentes micro-ARNs seleccionados en pacientes con ERC, con/sin placa basal, comparando pacientes que mantuvieron o no desarrollaron placa aterosclerótica a los dos años (n=78) vs pacientes que aumentaron o presentaron placas ateroscleróticas a los dos años (n=70). (B) Niveles de expresión de los diferentes genes seleccionados en pacientes con ERC, con/sin placa basal, comparando pacientes que mantuvieron o no desarrollaron placa aterosclerótica a los dos años (n=78) vs pacientes que aumentaron o presentaron placas ateroscleróticas a los dos años (n=70). Los datos están expresados como la media \pm SEM. Diferencias significativas expresadas como *p<0.05; **p<0,01; ***p<0,005; ****p<0,001.

De manera interesante, miR-23a-3p, miR-652-5p y miR-500a-3p también estuvieron desregulados significativamente en los dos estudios anteriores, indicando un fuerte papel de estos micro-ARNs en el desarrollo tanto inicial como de una placa aterosclerótica ya establecida en la aterosclerosis acelerada en pacientes con ERC. Sin embargo, miR-185-5p, miR-362-5p y miR-130b-5p perdieron la significación estadística que se observó al analizar sus niveles de expresión en pacientes con progresión aterosclerótica que partían de una placa ya establecida, indicando un posible papel de estos micro-ARNs en el desarrollo aterosclerótico de placas ya establecidas más que en el desarrollo inicial de estas.

Por otro lado, se observó una disminución significativa en la expresión de BTLA y MS4A1. Además, TNFSF10 se mostró rozando la significación estadística en pacientes con ERC y progresión a los dos años tanto de placas ateroscleróticas iniciales como placas ya establecidas (**Figura 29B**). En este caso, BTLA se postuló como un potente gen implicado en la progresión aterosclerótica, sobre todo en estadios iniciales y podría ser utilizado como potente biomarcador para predecir la aparición de placa aterosclerótica en pacientes con ERC.

1.5. BTLA como posible diana para miR-500a-3p

En los diversos análisis realizados en las diferentes cohortes sobre la posible regulación génica en la predisposición a desarrollar placas ateroscleróticas en pacientes con ERC; BTLA se postuló como la única posible diana y biomarcador en el inicio del desarrollo aterosclerótico en pacientes con ERC. Además, BTLA ha demostrado ser una importante molécula involucrada en la activación de linfocitos³⁷⁶ y por lo tanto en la respuesta inmunológica, relacionándolo de esta manera con las vías de señalización más significativamente desreguladas en pacientes con ERC con predisposición a desarrollar una placa aterosclerótica inicial. Adicionalmente, un único estudio relaciona BTLA con el proceso aterosclerótico³¹³ y ninguno relaciona a este gen con estados de uremia, haciéndolo un buen objetivo de estudio.

Partiendo del componente epigenético de este estudio, miR-185-5p y miR-500a-3p se relacionan mediante estudios *in silico* directamente con la regulación de la expresión génica de BTLA (**Tabla 9**). En este sentido, y dada la ausencia de un aumento

en la expresión de miR-185-5p a los dos años en pacientes con ERC que presentaban una placa aterosclerótica inicial (**Figura 25A**), miR-500a-3p fue seleccionado como posible regulador epigenético en la expresión de BTLA en un ambiente de daño renal y predisposición a desarrollar una placa aterosclerótica. En la **Tabla 10** se muestra detalladamente la interacción *in silico* prevista para la unión de miR-500a-3p a la sección 3'UTR del promotor de BTLA (www.targetscaan.org).

Tabla 10. Uniones específicas entre miR-500a-3p y BTLA.

Complementariedad prevista para la unión del micro-ARN (abajo) con su gen diana (arriba)	
Posición 557-563 en 3' UTR de BTLA hsa-miR-500a-3p	5' ...AUGAAAAUAAUAAU <u>GGUGCAA</u> ... 3' GUCUUAGGAACGGGU <u>CCACGUA</u>
Posición 1553-1559 en 3' UTR de BTLA hsa-miR-500a-3p	5' ...CUCCUUAGAUUUGGGGUGCAA... 3' GUCUUAGGAACGGGU----- <u>CCACGUA</u>
Posición 5716-5723 en 3' UTR de BTLA hsa-miR-500a-3p	5' ...UUCUGUUGUGGAGAU <u>AGGUGCAA</u> ... 3' GUCUUAGGAACGGGU <u>CCACGUA</u>

2. Establecimiento de un modelo experimental de aterosclerosis acelerada en ERC.

Para estudiar más profundamente el papel de ciertos micro-ARNs y ARNm en el desarrollo aterosclerótico en condiciones de uremia, se estableció un modelo experimental de aterosclerosis acelerada en ERC mediante una nefrectomía subtotal y dieta alta en grasas (HFD) en ratones ApoE^{-/-}. En primer lugar se confirmó el daño renal en los animales sometidos a nefrectomía subtotal (5/6Nx) mediante la medida de los niveles de nitrógeno ureico en sangre (*BUN*, del inglés, *Blood Urea Nitrogen*), los cuales aparecieron significativamente aumentados en los grupos de ratones sometidos a una nefrectomía subtotal (ApoE^{-/-} + 5/6Nx y ApoE^{-/-} + 5/6Nx + HFD) al compararlos con los ratones control (ApoE^{-/-}) (**Figura 30**). Posteriormente, procedimos al estudio de los ratones APOE^{-/-} sometidos a nefrectomía subtotal (5/6Nx) y alimentados con HFD como modelo experimental para una aterosclerosis acelerada inducida por ERC³⁷⁷. Durante el transcurso del modelo experimental (10 semanas), se evaluaron las fluctuaciones en el peso corporal de los cuatro grupos de animales, observando un aumento significativo en el peso corporal de los animales ApoE^{-/-} + HFD al compararlos con ratones control (ApoE^{-/-}) (**Tabla 11**). Este claro aumento no se encontró en el grupo ApoE^{-/-} + HFD + 5/6Nx, a pesar de estar sometidos a la misma dieta (HFD). Esta diferencia probablemente se puede explicar por la disminución en el peso corporal causada por la nefrectomía (5/6Nx), bajada que fue confirmada en los animales ApoE^{-/-} + 5/6Nx al cabo de las 10 semanas (**Tabla 11**).

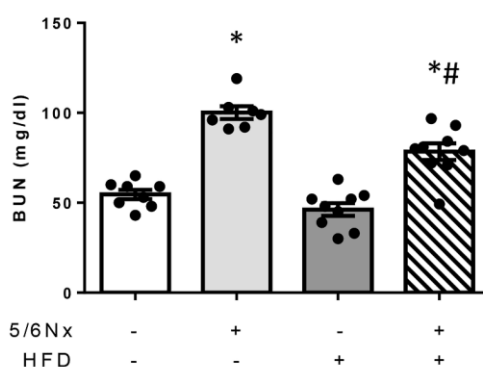


Figura 30. Niveles en sangre de nitrógeno ureico (*BUN*) en ratones sometidos a una nefrectomía subtotal con/sin dieta alta en grasas (HFD) durante 10 semanas. Los datos son expresados como la media \pm SEM de 7-10 ratones por grupo. * $p < 0.05$ vs. ApoE^{-/-}; # $p < 0.05$ vs ApoE^{-/-} + HFD.

Tabla 11. Fluctuaciones en el peso corporal de los ratones durante el procedimiento experimental.

	Basal	3 semanas	6 semanas	10 semanas
ApoE^{-/-}	28,11 (1,27)	29,56 (1,24)	30 (1,32)	28,44 (2,55)
ApoE^{-/-} + 5/6Nx	28 (1,16)	27,57 (1,81)	27,86 (1,57)	25 (1,41) *#@
ApoE^{-/-} + HFD	26,01 (1,96)	26,99 (1,66)	28,01 (1,94)	29,10 (1,70) *
ApoE^{-/-} + HFD + 5/6Nx	25,43 (1,69)	26,97 (1,73)	27,97 (1,96)	25,54 (8,73)

Los datos son expresados como la media (Desviación estándar) de 7-10 animales por grupo. Donde * p<0,05 vs peso basal; #p<0,05 vs 3 semanas; @p<0,05 vs 6 semanas.

Posteriormente, se evaluó el perfil lipídico (colesterol total, HDL, LDL y triglicéridos) en plasma de los ratones sometidos a nefrectomía subtotal y alimentados con dieta alta en grasa (ApoE^{-/-} + HFD + 5/6Nx) en comparación con ratones control (ApoE^{-/-}) y/o ratones solo con alimentación alta en grasa (ApoE^{-/-} + HFD) y/o solo con nefrectomía (ApoE^{-/-} + 5/6Nx). Los resultados mostraron un aumento significativo en los niveles totales de colesterol (**Figura 31A**), HDL (**Figura 31B**) y LDL (**Figura 31C**) en los animales ApoE^{-/-} + HFD + 5/6Nx respecto al resto de grupos. Sin embargo, no se observó ninguna diferencia significativa en los valores de triglicéridos en el plasma de estos ratones (**Figura 31D**).

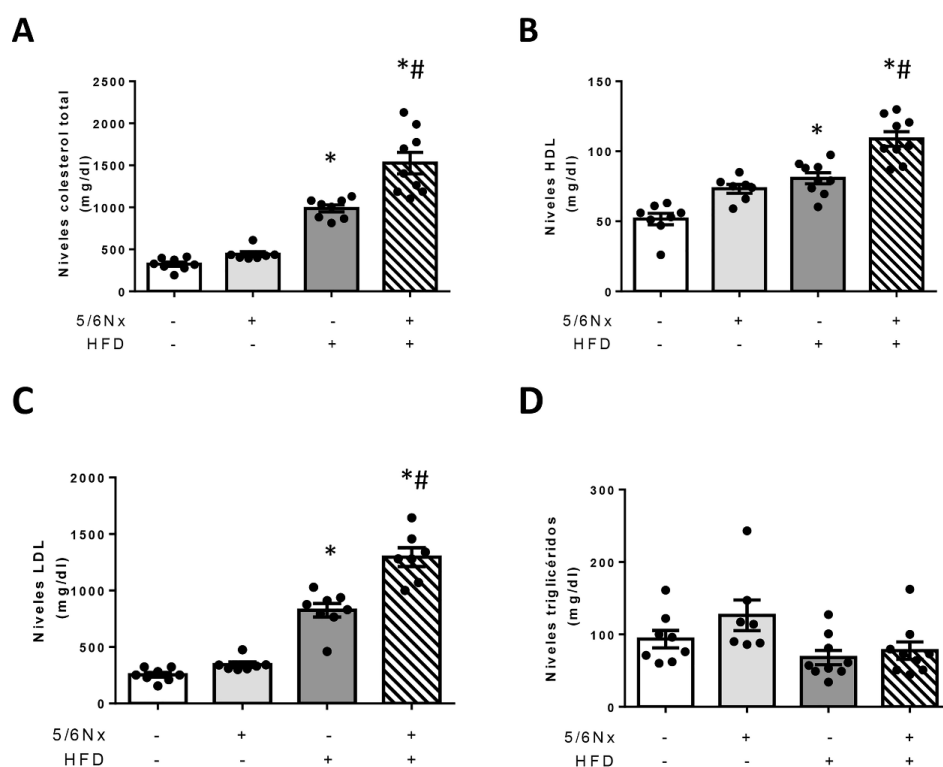


Figura 31. Análisis del perfil lipídico en plasma de ratones ApoE^{-/-} sometidos a una nefrectomía subtotal y una dieta alta en grasas (HFD) durante 10 semanas. (A) Niveles totales de colesterol en plasma. (B) Niveles de HDL en plasma. (C) Niveles de LDL en plasma. (D) Niveles de triglicéridos en plasma. Los datos están expresados como la media ± SEM de 7-10 ratones por grupo. *p<0.05 vs. ApoE^{-/-}; #p<0.05 vs ApoE^{-/-} + HFD.

A continuación, el estudio se centró en el análisis de la presencia de placa aterosclerótica en estos ratones. Para ello, se utilizó la técnica de tinción Oil Red, una técnica ampliamente utilizada para la detección de la presencia de lípidos en secciones de tejido congelando. Los resultados mostraron la presencia de placa aterosclerótica en los ratones ApoE^{-/-} + HFD, así como en los animales ApoE^{-/-} + HFD + 5/6Nx; pero no se observó placa aterosclerótica en el grupo control (ApoE^{-/-}) ni en los animales ApoE^{-/-} + 5/6Nx (**Figura 32A y B**). Asimismo, el tamaño de la placa aterosclerótica de los ratones que, además de ser alimentados con dieta alta en grasa, habían sufrido una nefrectomía experimental (ApoE^{-/-} + HFD + 5/6Nx), era significativamente mayor que las placas ateroscleróticas presentadas por los ratones con dieta alta en grasa y sin nefrectomía subtotal experimental (ApoE^{-/-} + HFD) (**Figura 32A y B**).

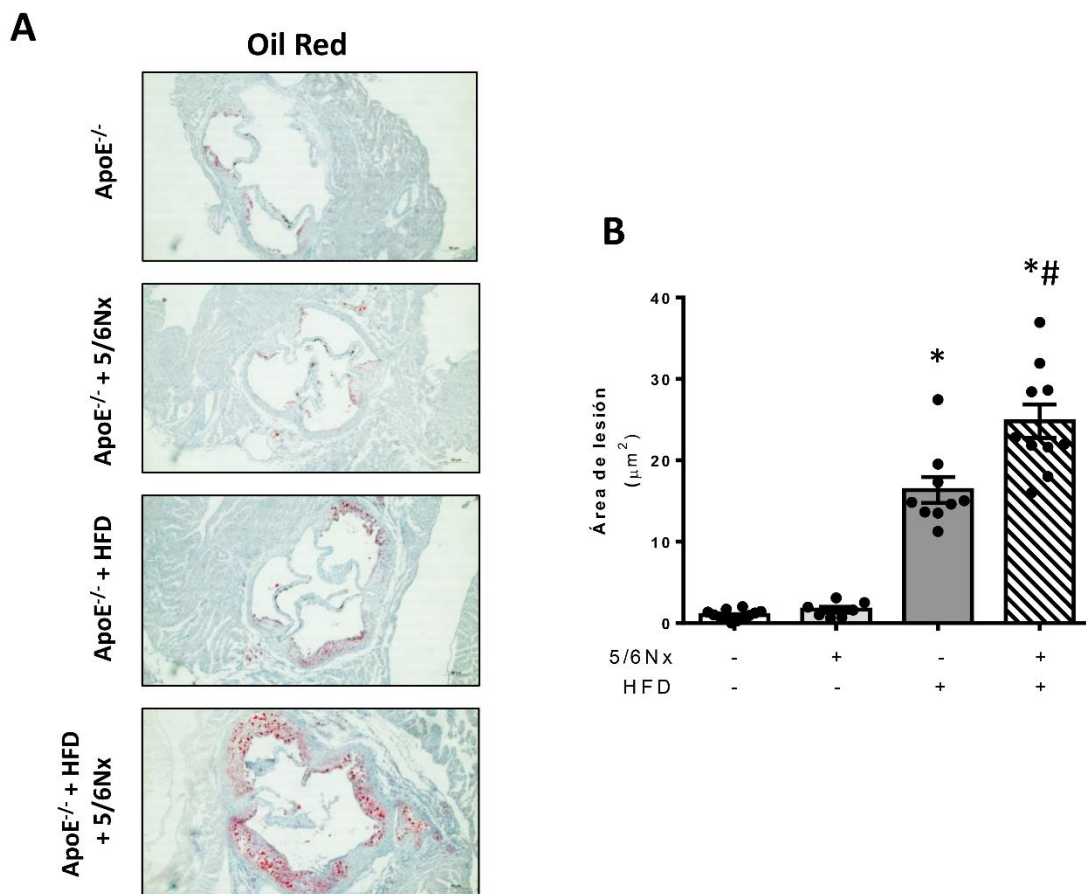


Figura 32. Análisis de la presencia de placa ateroscleróticas en ratones ApoE^{-/-} sometidos a una nefrectomía subtotal y dieta alta en grasas (HFD) durante 10 semanas. (A) Imágenes de las tinciones en senos aórticos con Oil Red en los diferentes grupos de animales. (B) Cuantificación de la tinción Oil Red. Los datos están expresados como la media ± SEM de 7-10 ratones por grupo. *p<0.05 vs. ApoE^{-/-}; #p<0.05 vs ApoE^{-/-} + HFD.

Una vez confirmado el efecto de la ERC experimental en el aumento del tamaño de la placa aterosclerótica, quisimos evaluar la composición de las mismas para poder establecer la estabilidad y peligro de ruptura de las placas. Para ello, se analizó el reclutamiento en la placa de células inflamatorias como linfocitos T (CD3⁺) y macrófagos (CD68⁺). En este sentido, los resultados mostraron una mayor presencia de infiltrado inflamatorio en las placas de los ratones ApoE^{-/-} + HFD + 5/6Nx al compararlas con las placas de los ratones ApoE^{-/-} + HFD (Figura 33A, B y C). Por otro lado, se analizó el componente fibrótico de dichas placas realizando una tinción con rojo sirio. Este último análisis mostró una tendencia a disminuir la presencia de componentes de matriz

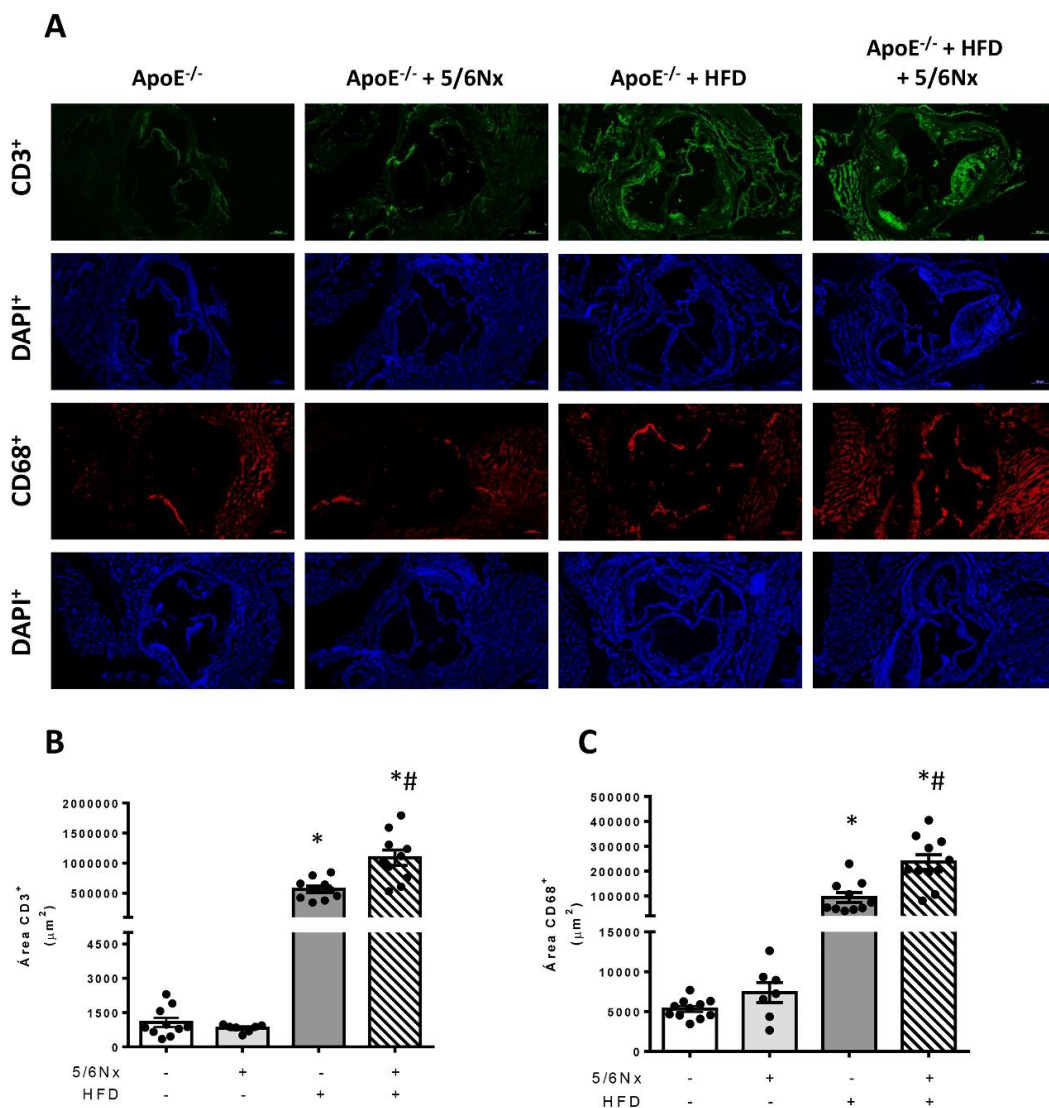


Figura 33. Análisis del componente inflamatorio de las placas ateroscleróticas de ratones ApoE^{-/-} sometidos a una nefrectomía subtotal y dieta alta en grasa (HFD) durante 10 semanas. (A) Imágenes de inmunofluorescencia en senos aórticos para la detección de infiltrado linfocítico (CD3⁺) (en verde) y de macrófagos (CD68⁺) (en rojo). (B) Cuantificación de células CD3⁺. (C) Cuantificación de células CD68⁺. Los datos están expresados como la media ± SEM de 7-10 ratones por grupo. *p<0.05 vs. ApoE^{-/-}; #p<0.05 vs ApoE^{-/-} + HFD.

extracelular, como el colágeno, en los ratones ApoE^{-/-} + HFD + 5/6Nx en comparación con los ratones ApoE^{-/-} + HFD (**Figura 34A y B**). Estos resultados mostraron que la composición de la placa aterosclerótica presente en ratones que habían sufrido una ERC experimental (ApoE^{-/-} + HFD + 5/6Nx) era más inflamatoria, menos fibrótica y por lo tanto más inestable y susceptible de una posible ruptura que la placa presente en ratones ApoE^{-/-} alimentados con dieta (ApoE^{-/-} + HFD).

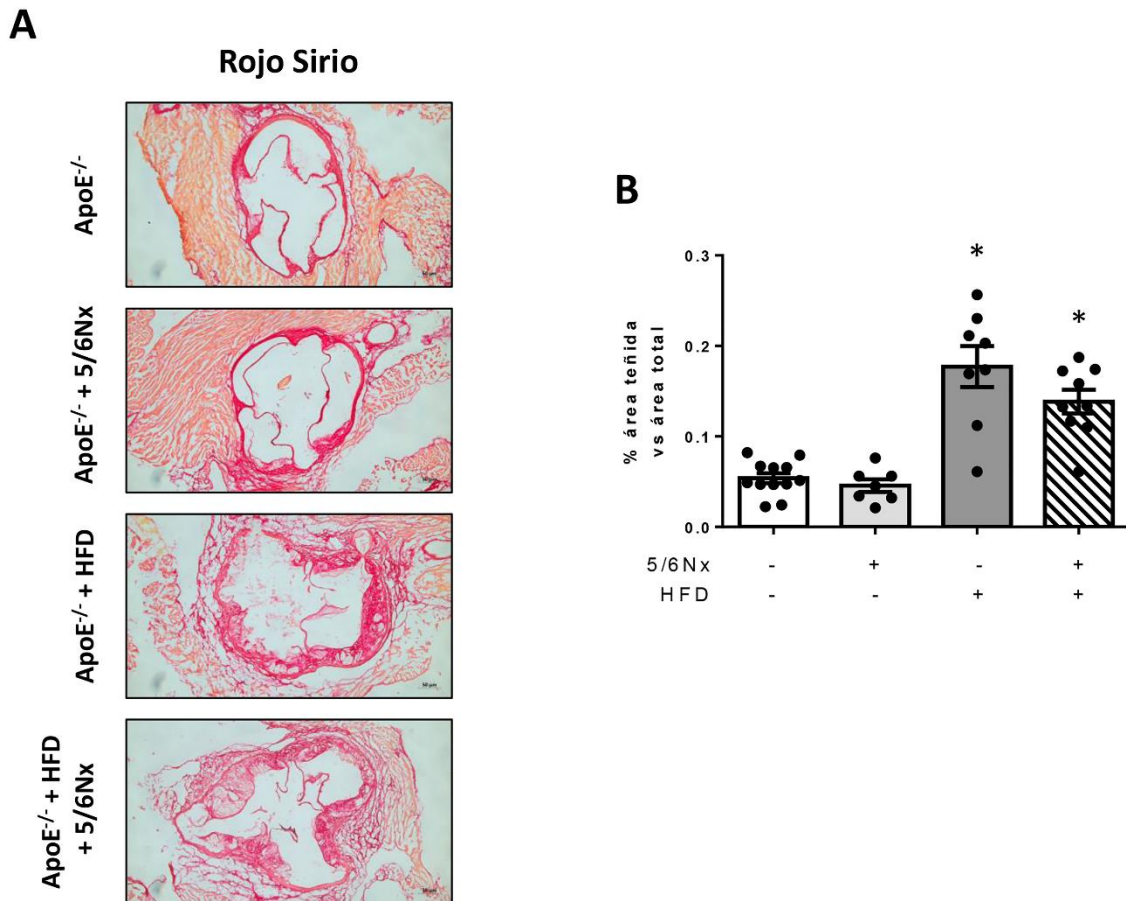


Figura 34. Análisis del componente fibrótico de las placas ateroscleróticas de ratones ApoE^{-/-} sometidos a una nefrectomía subtotal y dieta alta en grasa (HFD) durante 10 semanas. (A) Imágenes de la tinción rojo sirio en senos aórticos. (B) Cuantificación de la tinción con rojo sirio. Los datos están expresados como la media ± SEM de 7-10 ratones por grupo. *p<0.05 vs. ApoE^{-/-}.

3. Los niveles de BTLA se encuentran disminuidos en un modelo experimental de aterosclerosis acelerada por ERC.

Debido a la disminución significativa en la expresión génica de BTLA observada en muestras de sangre total de los pacientes con ERC previa al desarrollo de una placa aterosclerótica, se quiso evaluar si estos resultados se corroboraban en un modelo experimental de aterosclerosis acelerada por ERC. Los resultados mostraron una disminución significativa en los niveles de expresión de BTLA en sangre total en todos los grupos de ratones en comparación con los ratones control (ApoE^{-/-}) (**Figura 35A**). De manera interesante, la expresión de BTLA en sangre total apareció disminuida significativamente en los ratones sometidos únicamente a nefrectomía subtotal, indicando un efecto específico del daño renal sobre la regulación de la expresión génica de BTLA.

Debido a la formación de placa aterosclerótica en arco aórtico de ratones ApoE^{-/-} alimentados con HFD³⁷⁸, se evaluaron los niveles proteicos de BTLA en dicho tejido. En estos resultados se pudo observar una disminución significativa en los niveles proteicos de BTLA en los grupos de ratones que anteriormente mostraron desarrollo de placa aterosclerótica (ApoE^{-/-} + HFD y ApoE^{-/-} + HFD + 5/6Nx), sin observarse ningún cambio significativo en los niveles proteicos de BTLA en los grupos experimentales que no mostraron un desarrollo de placa (ApoE^{-/-} y ApoE^{-/-} + 5/6Nx) (**Figura 35B**). A pesar de la bajada observada tanto en la expresión como en los niveles proteicos de BTLA, en ningún caso se observaron diferencias significativas en los niveles de BTLA entre los ratones ApoE^{-/-} + HFD y los ratones ApoE^{-/-} + HFD + 5/6Nx.

Posteriormente, debido a la importancia de los macrófagos en la fisiopatología de la aterosclerosis, a la expresión ya descrita de BTLA en este tipo celular²⁹⁸ y a los resultados obtenidos en esta tesis sobre el efecto del daño renal sobre la regulación de BTLA, se analizaron los niveles de expresión génica de BTLA en una línea celular de macrófagos murinos (RAW 264.7) estimulados con suero urémico de rata durante 24 horas. Este experimento nos demostró una disminución significativa en los niveles de expresión de BTLA al estimular las células con suero urémico (**Figura 36**).

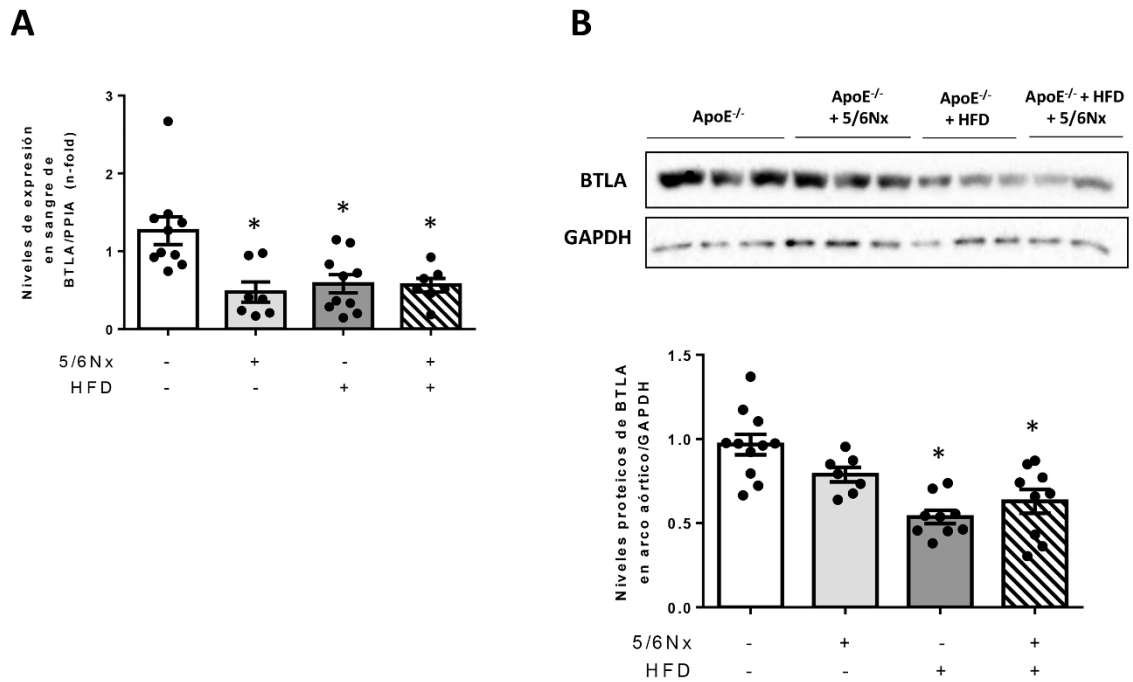


Figura 35. Niveles de expresión de BTLA en sangre total y niveles proteicos de BTLA en arco aórtico en ratones ApoE^{-/-} sometidos a una nefrectomía subtotal y dieta alta en grasa (HFD) durante 10 semanas. (A) Niveles de expresión de BTLA en sangre total de ratones control (ApoE^{-/-}), ApoE^{-/-} + 5/6Nx, ApoE^{-/-} + HFD y ApoE^{-/-} + 5/6Nx + HFD. (B) Niveles proteicos de BTLA en arco aórtico de ratones control (ApoE^{-/-}), ApoE^{-/-} + 5/6Nx, ApoE^{-/-} + HFD y ApoE^{-/-} + 5/6Nx + HFD. Los datos están expresados como la media ± SEM de 7-10 ratones por grupo. *p<0.05 vs. ApoE^{-/-}.

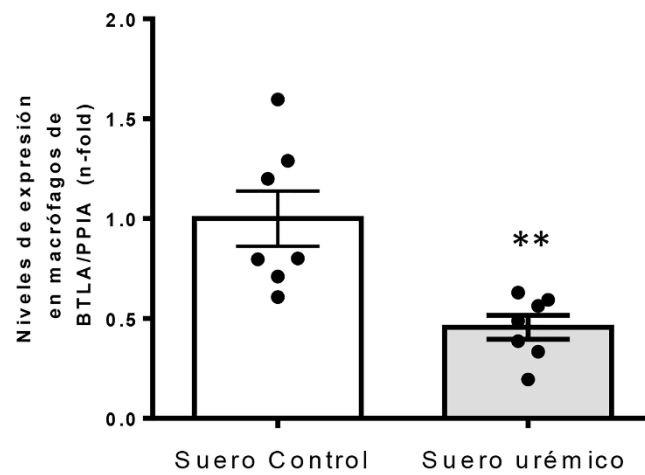


Figura 36. Niveles de expresión génica de BTLA en macrófagos murinos (RAW 264.7). Los datos están expresados como la media ± SEM de 7 experimentos celulares independientes. Diferencias significativas expresadas como **p<0.01.

Finalmente, debido al efecto de la uremia sobre la expresión de BTLA, analizamos los niveles génicos y proteicos de BTLA en los riñones de nuestro modelo experimental de ERC (ApoE^{-/-} + 5/6Nx) con el fin de conocer la posible modulación de BTLA en los riñones dañados, de la misma forma que la presentaba el componente inflamatorio circulante. Sorprendentemente, no se observó ninguna diferencia significativa en los niveles de expresión de BTLA (**Figura 37A**) ni en los niveles proteicos de BTLA (**Figura 37B**) en riñón de los ratones control (ApoE^{-/-}) vs los ratones sometidos a nefrectomía subtotal (ApoE^{-/-} + 5/6Nx).

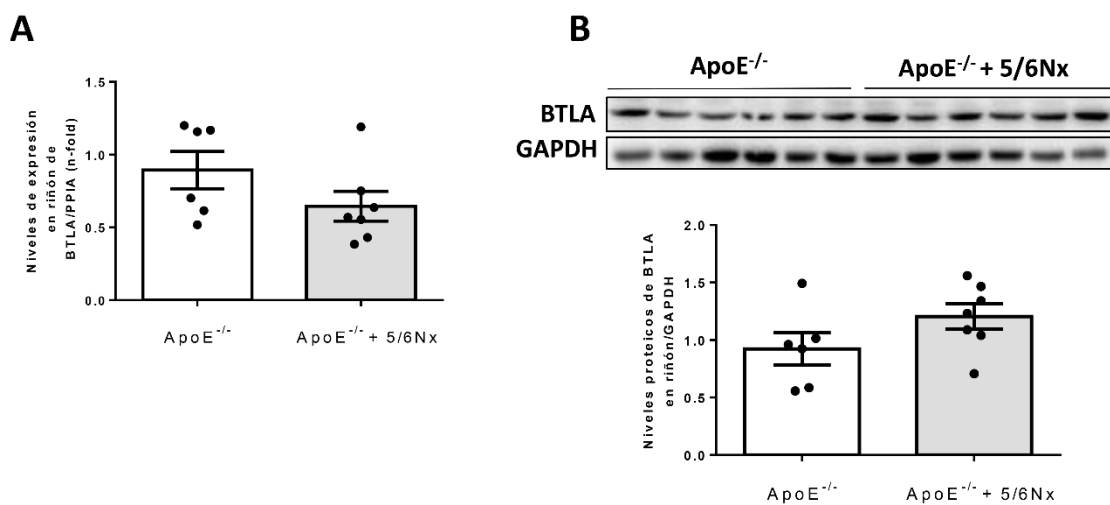


Figura 37. Niveles de expresión génica y proteica de BTLA en riñón de ratones ApoE^{-/-} sometidos a una nefrectomía subtotal y dieta alta en grasa (HFD) durante 10 semanas. (A) Niveles de expresión de BTLA en riñón de ratones control (ApoE^{-/-}) y ApoE^{-/-} + 5/6Nx. (B) Niveles proteicos de BTLA en riñón de ratones control (ApoE^{-/-}) y ApoE^{-/-} + 5/6Nx. Los datos están expresados como la media ± SEM de 7-10 ratones por grupo.

4. BTLA y miR-500a-3p están desregulados en pacientes con ERC.

Con el objetivo de estudiar más profundamente el posible papel de BTLA en la enfermedad renal, se analizaron los niveles de expresión génica y proteica de BTLA en pacientes controles y pacientes con ERC pertenecientes al estudio NEFRONA. Ambos grupos presentaban una distribución de sexos y edades sin diferencias significativas (**Tabla 12**). Sin embargo, cuando se compararon algunas de las características clínicas de estos dos grupos de pacientes, se observó una diferencia significativa en la proporción de pacientes fumadores, hipertensos, diabéticos y dislipidémicos entre los grupos,

siendo esta proporción mayor en los pacientes que presentaban una ERC. De la misma forma, se observaron diferencias significativas en algunas de las características clínicas cuantitativas tales como las diferentes presiones, niveles de triglicéridos, fósforo, colesterol total y colesterol LDL (**Tabla 12**). Las tres primeras variables (presiones, triglicéridos y fósforo) presentaron un aumento significativo en los pacientes enfermos, mientras que los niveles de las dos últimas (colesterol total y colesterol LDL) presentaron una disminución significativa en pacientes con ERC (**Tabla 12**). Estas variables se discutirán posteriormente.

El análisis de la expresión génica de BTLA en sangre total de pacientes, mostró una disminución significativa en los pacientes enfermos al compararlos con pacientes control (**Figura 38A**). Estos resultados fueron confirmados con una disminución significativa de los niveles proteicos de BTLA y, mediante citometría de flujo, con una disminución en la frecuencia de células CD4⁺BTLA⁺ en células mononucleares de sangre periférica (*PBMCs*, del inglés, *Periferic Blood Mononuclear Cells*) extraídas de pacientes con ERC (**Figura 38B y 40**). Además, el resultado de estos análisis se relacionó con el resultado obtenido en la expresión de BTLA en estados de uremia observada en macrófagos tratados con suero urémico y a nivel circulante en ratones con una nefrectomía experimental (ApoE^{-/-} + 5/6Nx) (**Figura 36 y 35A**).

Finalmente, miR-500a-3p se ha postulado como un posible micro-ARN para regular la expresión de BTLA (**Tabla 10**). A causa de esta posible regulación establecida *in silico*, se analizaron los niveles de expresión de miR-500a-3p en sangre total de los mismos pacientes, observando un aumento significativo en la expresión de este micro-ARN en pacientes con ERC (**Figura 39A**) y estableciendo una relación inversa entre la expresión de BTLA y miR-500a-3p (**Figura 39B**). Estos resultados son afines a la teoría de la regulación de BTLA por miR-500a-3p.

Tabla 12. Características basales de pacientes con/sin ERC.

	Pacientes control	Pacientes con ERC	P-valor
n	61	59	
	n (%)		
Sexo (masculino)	33 (54,1)	25 (42,4)	0,2
Fumadores	35 (57,4)	20 (33,9)	0,01
Diabetes	2 (3,3)	11 (18,6)	<0,01
Hipertension	14 (23)	52 (88)	<0,01
Dislipidemia	10 (16,4)	33 (55,9)	<0,01
Placa aterosclerótica	0 (0)	0 (0)	1
Proteinuria			
Normoalbuminuria	4 (36,4)	8 (27,6)	
Microalbuminuria	7 (63,6)	12 (41,4)	0,11
Macroalbuminuria	0 (0)	9 (31)	
ERC			
Estadio 3	0 (0)	26 (44,1)	
Estadio 4-5	0 (0)	19 (32,2)	<0,01
Diálisis	0 (0)	14 (23,7)	
Media [Desviación estándar]			
Edad (años)	48,4 [11,3]	44,6 [14,9]	0,1
IMC (Kg/m²)	26,9 [3,7]	26,2 [5,5]	0,44
Presión sistólica (mmHg)	124,5 [14,8]	129,9 [17,0]	0,06
Presión diastólica (mmHg)	75,4 [8,3]	79,1 [11,8]	0,05
Colesterol total	192,4 [27,0]	177,3 [43,2]	0,03
Colesterol HDL	55,4 [15,0]	54,0 [15,8]	0,63
Colesterol LDL	118,0 [25,0]	103,4 [38,8]	0,02
Triglicéridos (mg/dl)	96,3 [52,6]	118,9 [59,3]	0,03
Glucosa (mg/dl)	95,8 [13,8]	100,0 [32,3]	0,35
Calcio total (mg/dl)	9,4 [0,4]	9,3 [0,6]	0,46
Fósforo (mg/dl)	3,5 [0,5]	3,8 [1]	0,05
Albumina (g/dl)	4,2 [0,4]	4,1 [0,5]	0,23
Sodio (mEq/l)	140,9 [2,6]	140,1 [2,7]	0,14
Potasio (mEq/l)	4,4 [0,4]	4,6 [0,6]	0,1
PCR	2,6 [7,3]	2,6 [3,5]	0,98

Los datos cuantitativos están expresados como la media [Desviación estándar] y las variables cualitativas están expresadas con la n (porcentaje). IMC, índice de masa corporal; ERC, enfermedad renal crónica; PCR, proteína C reactiva. Las diferencias son consideradas significativas con un P-valor <0,05.

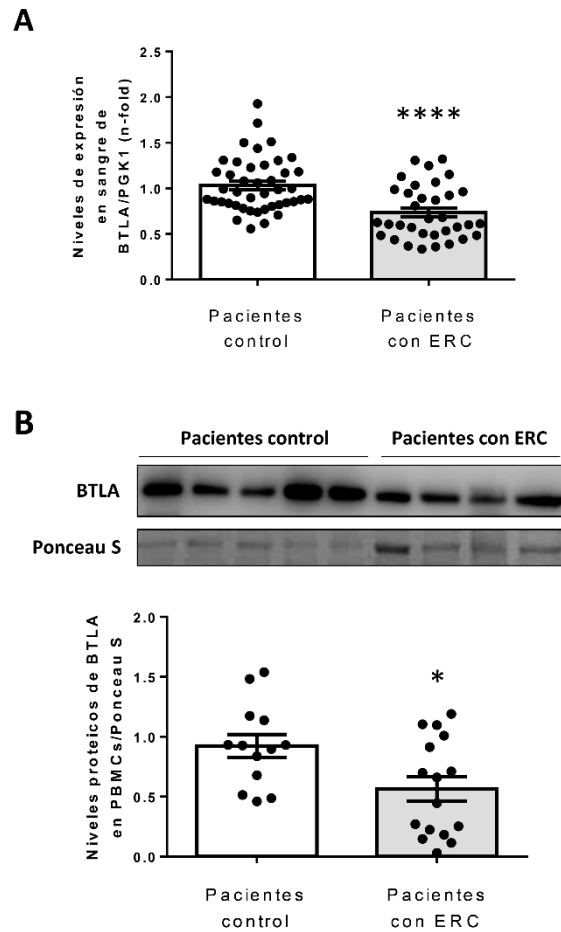


Figura 38. Niveles de expresión génica y proteica de BTLA en pacientes con ERC. (A) Niveles de expresión de BTLA en sangre total de individuos control (n=46) vs pacientes con ERC (n=36). (B) Niveles proteicos de BTLA en PBMCs de individuos control (n=20) vs pacientes con ERC (n=22). Los datos son expresados como la media \pm SEM de 20-50 pacientes. Las diferencias son consideradas significativas con * $p < 0,05$ y **** $p < 0,001$.

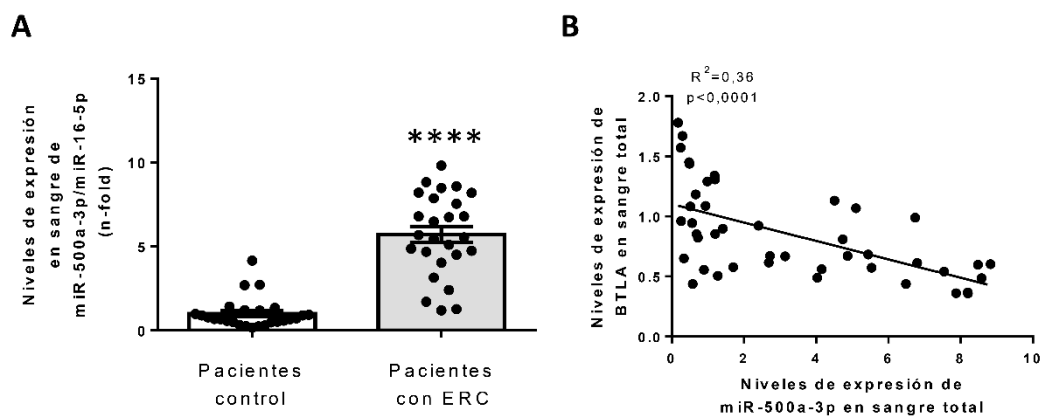


Figura 39. Niveles de expresión de miR-500a-3p en sangre total de pacientes con ERC; correlación de BTLA/miR-500a-3p. (A) Niveles de expresión de miR-500a-3p en sangre total de pacientes con ERC. (B) Correlación de los niveles de expresión de BTLA y miR-500a-3p en sangre total de pacientes con ERC. Los datos son expresados como la media \pm SEM de 22-30 pacientes. Los resultados son considerados significativos con **** $p < 0,001$ y $r^2 > 0,2$.

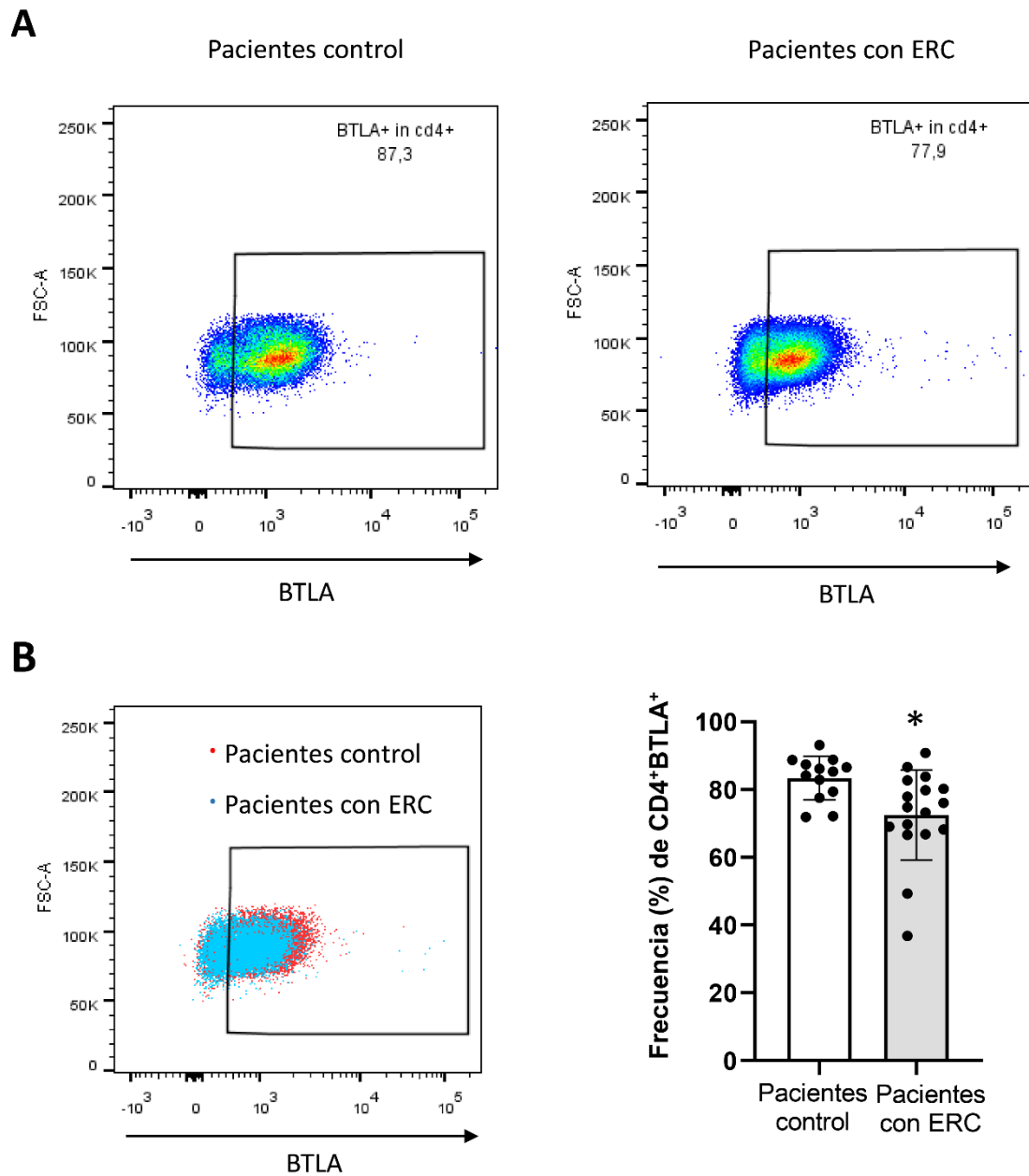


Figura 40. Niveles de células T CD4⁺BTLA⁺ en PBMCs de pacientes con ERC analizados mediante citometría de flujo. (A) Pseudocolor plots representativos de la frecuencia de células T CD4⁺BTLA⁺ en pacientes control y pacientes con ERC. (B) Unión de las gráficas pseudocolor plots de pacientes control y pacientes con ERC. (C) Cuantificación de la frecuencia de células T CD4⁺BTLA⁺ en pacientes control y ERC. Los datos son expresados como la media ± SEM de 20-22 pacientes. Las diferencias son consideradas significativas con *p<0,05.

5. BTLA está involucrado en el daño renal en diferentes modelos experimentales de daño renal.

Tras los resultados obtenidos, nos focalizamos en el estudio más profundo de BTLA en condiciones de daño renal. Con este propósito, se desarrollaron dos modelos experimentales de ERC con elevado carácter inmunitario e inflamatorio, dada la especificidad en la expresión de BTLA en los tipos celulares implicados en dicha respuesta³⁷⁶. Los diferentes modelos experimentales desarrollados fueron: 1) Modelo experimental de daño renal hipertensivo inducido por administración de Angiotensina II y 2) Modelo experimental de glomerulonefritis rápidamente progresiva (RPGN) o nefritis inmune.

5.1 BTLA está implicado en el daño renal causado por hipertensión.

El modelo de administración sistémica de Angiotensina II (Ang II) es un modelo de daño renal asociado a hipertensión con activación del sistema inmunitario³⁷⁹, de hecho, se trata de un modelo experimental ampliamente utilizado en el estudio de la inflamación renal³⁸⁰, sin cambios evidentes en los parámetros de función renal³⁸¹. Como parte de nuestros resultados, se confirmó el daño renal en este modelo experimental, mediante el análisis en la expresión de dos marcadores como Ngal y Kim1. De esta manera, la infusión de angiotensina II durante 15 días, mostró un claro aumento en los niveles renales de expresión génica de Ngal (**Figura 41A**) y Kim1 (**Figura 41B**), confirmando un daño renal en estos ratones.

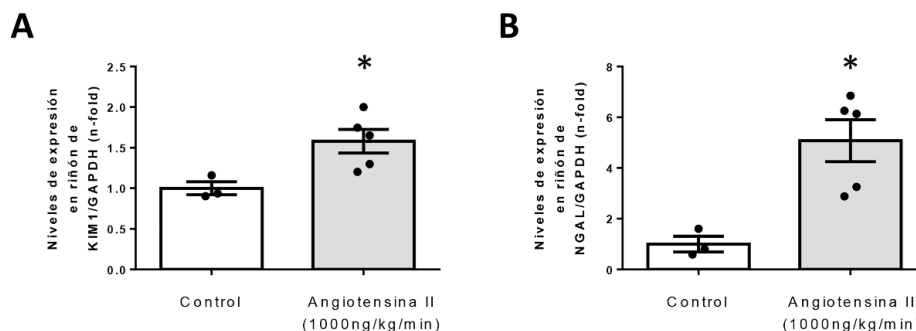


Figura 41. Marcadores de daño renal en un modelo de hipertensión inducida por Angiotensina II durante 15 días. (A) Niveles de expresión de KIM1 en riñón. (B) Niveles de expresión de NGAL en riñón. Los datos son expresados como la media \pm SEM de 3-5 animales por grupo. * $p < 0,05$ vs. control como resultados considerados significativos.

Una vez confirmado el daño renal, se analizaron los niveles de expresión génica y proteica de BTLA en riñón de los ratones infundidos con Ang II, observándose una disminución significativa tanto en la expresión génica (**Figura 42A**) como en los niveles proteicos (**Figura 42B**) de BTLA, apoyando el posible papel clave de BTLA en la enfermedad renal.

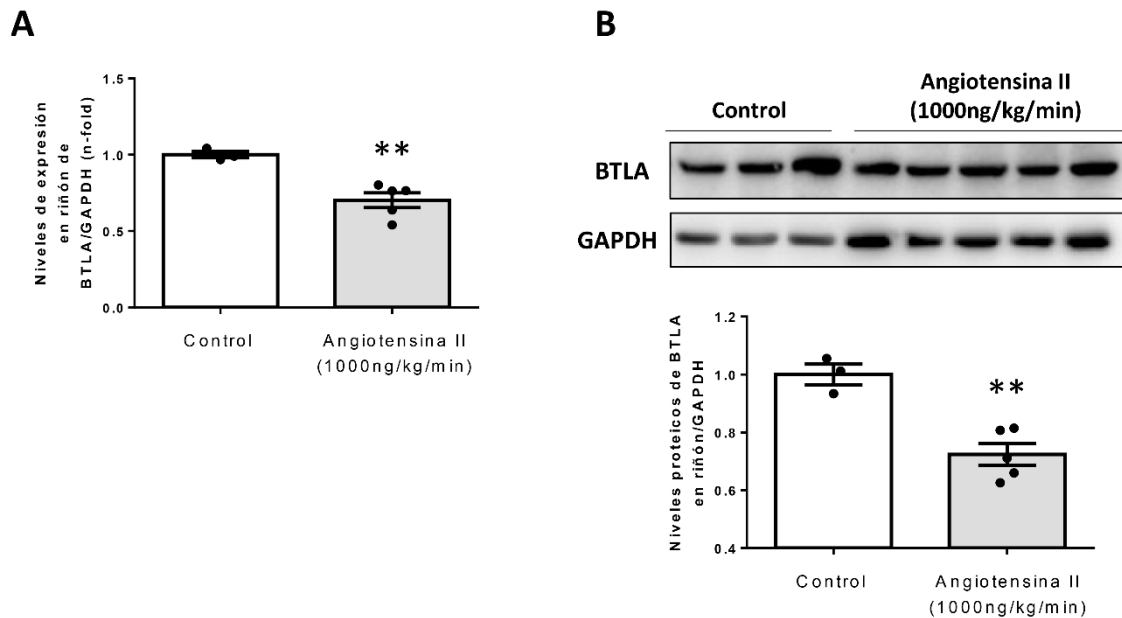


Figura 42. Niveles de expresión génica y proteica de BTLA en riñones de un modelo de hipertensión inducida por Angiotensina II durante 15 días. (A) Niveles de expresión génica de BTLA en riñón. (B) Niveles proteicos de BTLA en riñón. Los datos son expresados como la media \pm SEM de 3-5 animales por grupo. ** $p < 0,01$ vs. control como resultados considerados significativos.

5.2 BTLA está implicado en la glomerulonefritis rápidamente progresiva.

La administración mediante inyección retro-orbital de suero nefrotóxico (*NTS*, del inglés, *Nefrotoxic serum*) a los ratones, induce una nefritis inmune que se genera debido a la producción de anticuerpos contra la membrana basal del glomérulo. Este suero promueve la pérdida de la integridad glomerular y con ello un daño progresivo en la barrera de filtración glomerular muy similar a la desarrollada en glomerulonefritis humanas³⁸². Debido a la clara implicación inmunitaria, quisimos utilizar este modelo experimental para analizar el posible efecto de BTLA en condiciones de daño renal.

Estudios previos en este modelo de nefritis inmune han descrito el aumento significativo en la infiltración renal de células inflamatorias, la expresión renal de genes

proinflamatorios, el aumento de biomarcadores de lesión renal y una pérdida de la función renal en los ratones inyectados con el suero NTS³⁸¹.

El análisis en la expresión génica y proteica de BTLA en este modelo experimental, mostró una concordancia con los resultados obtenidos anteriormente en diferentes modelos experimentales de daño renal. Se observó una disminución significativa a nivel renal tanto de la expresión génica (**Figura 43A**) como de los niveles proteicos (**Figura 43B**) de BTLA en los animales que habían sido inyectados con NTS al compararlos con los ratones control, reafirmando una vez más el papel de BTLA en el daño renal.

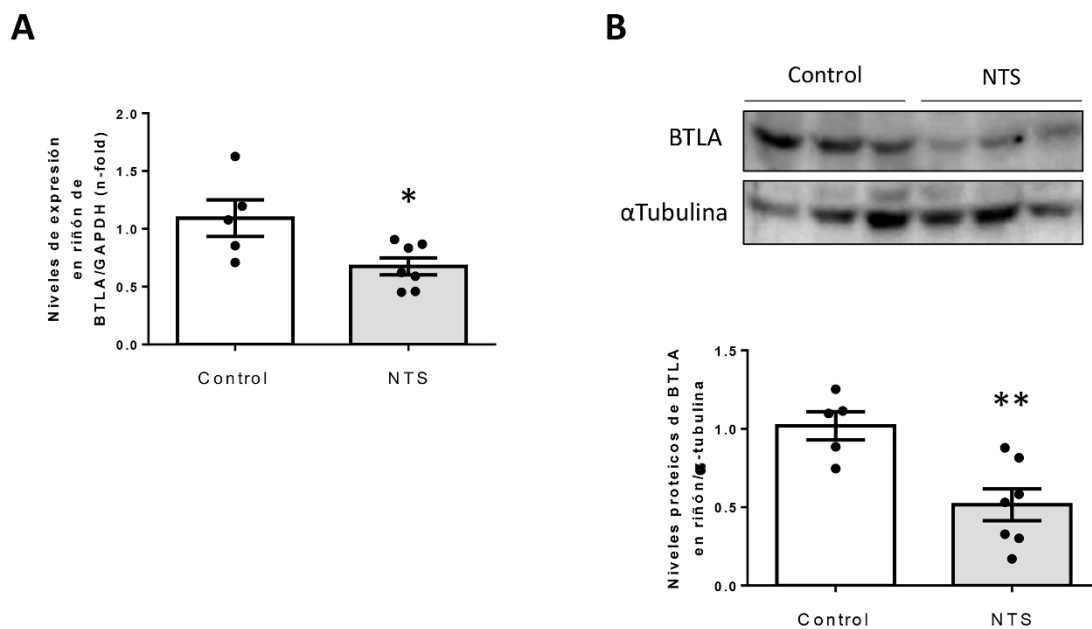


Figura 43. Niveles de expresión génica y proteica de BTLA en riñones de un modelo experimental de glomerulonefritis rápidamente progresiva. (A) Niveles de expresión génica de BTLA en riñón. (B) Niveles proteicos de BTLA en riñón. Los datos son expresados como la media \pm SEM de 5-7 animales por grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs. control como resultados considerados significativos.

6. El papel de BTLA en el daño renal es mediado principalmente por linfocitos T

Debido a la principal expresión de BTLA en linfocitos T y B^{296,376}, se analizaron los niveles de expresión génica y proteica de BTLA en una línea celular de linfocitos T (Jurkat) y una línea celular de linfocitos B (NALM6). Estas células fueron estimuladas con 20% de suero urémico de rata durante 24 o 48 horas. Los resultados mostraron una disminución significativa en los niveles de expresión génica de BTLA tras el tratamiento de ambos tipos celulares (linfocitos T y B) con suero urémico después de 48 horas (**Figura 44B y D**). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de BTLA tras 24 horas de estimulación, aunque la expresión de BTLA en linfocitos T tras 24 horas de estimulación, se situó cerca de la significancia ($p=0,052$) (**Figura 44A y C**). En linfocitos T, la bajada de BTLA tanto a las 24 horas como a las 48 horas presentaba menos variaciones y, por lo tanto, un nivel de significación estadística mayor que el observado en linfocitos B, probablemente debido al claro papel de los linfocitos T en condiciones de uremia^{257,383–385}. Estos resultados fueron confirmados mediante el análisis proteico de BTLA en ambos tipos celulares, donde se observó una clara disminución en los niveles

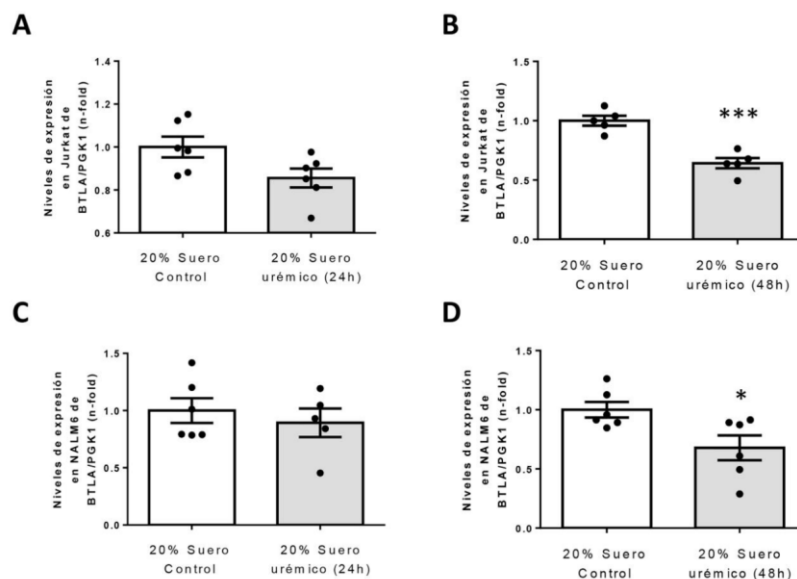


Figura 44. Niveles de expresión génica de BTLA en linfocitos T y B estimulados con suero urémico. (A) Niveles de expresión génica de BTLA en células Jurkat (linfocitos T) estimuladas con 20% suero urémico/control durante 24 horas o (B) 48 horas. (C) Niveles de expresión génica de BTLA en células NALM6 (linfocitos B) estimuladas con 20% suero urémico/control durante 24 horas o (D) 48 horas. Los datos están expresados como la media \pm SEM de 3-6 experimentos por grupo. Los resultados son considerados significativos con * $p<0,05$; *** $p<0,005$ vs células control.

proteicos de BTLA únicamente en linfocitos T (**Figura 45A y B**). Estos resultados confirmaron el papel de BTLA en el daño renal mediado principalmente por linfocitos T.

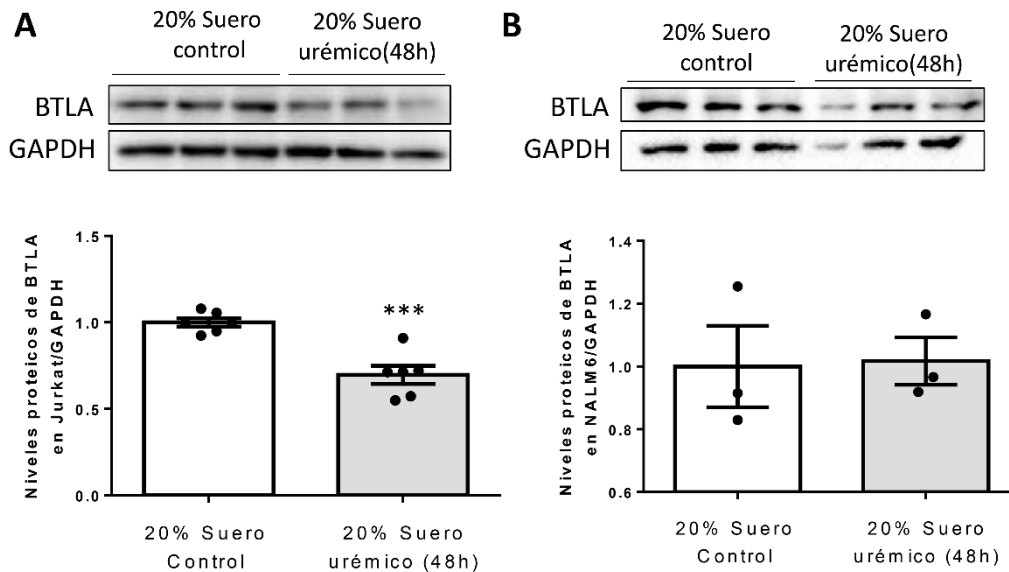


Figura 45. Niveles proteicos de BTLA en linfocitos T y B estimulados con suero urémico. (A) Niveles proteicos de BTLA en linfocitos T estimulados con 20% de suero urémico de rata durante 48 horas. (B) Niveles proteicos de BTLA en linfocitos B estimulados con 20% de suero urémico de rata durante 48 horas. Los datos están expresados como la media \pm SEM de 3-6 experimentos por grupo. Los resultados son considerados significativos con *** $p < 0,005$ vs células control.

7. miR-500a-3p regula los niveles de expresión de BTLA en linfocitos T.

Tras observar la bajada en la expresión de BTLA en experimentos *in vitro*, quisimos confirmar la expresión desregulada de miR-500a-3p observada previamente en pacientes con ERC (**Figura 39**) y su posible relación inversa con los niveles de expresión de BTLA. Por consiguiente, se evaluaron los niveles de expresión de miR-500a-3p en linfocitos T (Jurkat) y linfocitos B (NALM6) estimulados con 20% de suero urémico durante 48 horas. Los resultados obtenidos presentaron la misma tendencia observada en pacientes con ERC, ya que se produjo un aumento significativo en los niveles de expresión de miR-500a-3p en linfocitos T estimulados con suero urémico (**Figura 46A**).

Además, estos resultados confirmaron la mayor implicación de los linfocitos T en condiciones de uremia debido a la ausencia de diferencias significativas en la expresión de miR-500a-3p en linfocitos B (**Figura 46B**). Posteriormente, se analizó la posible

correlación entre la expresión génica de BTLA y los niveles de expresión de miR-500a-3p en linfocitos T mediante un análisis de regresión lineal, donde se pudo observar una clara correlación inversa entre ambos componentes (**Figura 46C**).

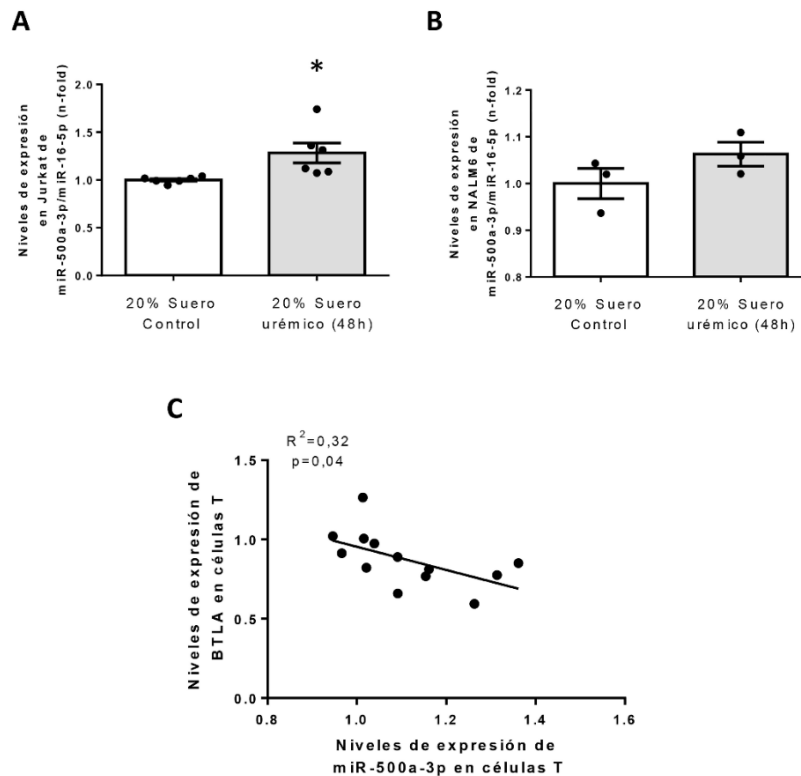


Figura 46. Niveles de expresión de miR-500a-3p en linfocitos T y B estimados con Suero urémico; correlación de BTLA/miR-500a-3p. (A) Niveles de expresión de miR-500a-3p en linfocitos T estimados con 20% suero urémico de rata durante 48 horas. (B) Niveles de expresión de miR-500a-3p en linfocitos B estimados con 20% suero urémico de rata durante 48 horas. (C) Correlación de los niveles de expresión de BTLA y miR-500a-3p en linfocitos T estimados con suero urémico durante 48 horas. Los datos son expresados como la media \pm SEM de 3-6 experimentos por grupo. Los resultados son considerados significativos con $*p<0,05$ y $r^2>0,2$.

Para investigar más a fondo la posible regulación epigenética de la expresión de BTLA por miR-500a-3p, se desarrollaron experimentos *in vitro* con linfocitos T (Jurkat) transfectados con un antagomir específico contra miR-500a-3p. Los resultados de estos experimentos mostraron una disminución en los niveles de expresión de miR-500a-3p con un aumento significativo de la expresión de BTLA en las células transfectadas con el antagomir contra miR-500a-3p tratadas con suero control (**Figura 47A y B**), confirmando un efecto de miR-500a-3p en la regulación de la expresión de BTLA. Además, las células tratadas conjuntamente con el antagomir contra miR-500a-3p y suero urémico,

mostraron un restablecimiento de los niveles de expresión de BTLA, asemejándose a los niveles de expresión observados en las células tratadas con suero control y sin inhibidor (**Figura 47B**). Estos resultados aclaran un posible mecanismo para la desregulación observada en la expresión de BTLA en uremia.

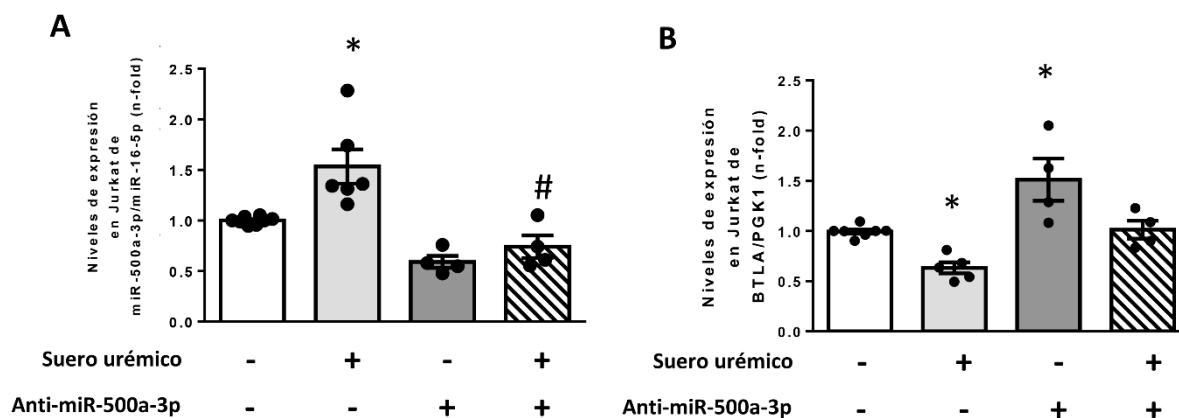


Figura 47. Niveles de expresión de miR-500a-3p y BTLA en linfocitos T estimulados con/sin suero urémico con/sin antagomir contra miR-500a-3p. (A) Niveles de expresión de miR-500a-3p en linfocitos T (Jurkat) estimulados con 20% suero urémico o control durante 48h con/sin antagomir contra miR-500a-3p. (B) Niveles de expresión de BTLA en linfocitos T (Jurkat) estimulados con 20% suero urémico o control durante 48 horas con/sin antagomir contra miR-500a-3p. Los datos son expresados como la media \pm SEM de 4-7 experimentos por grupo. Los resultados son considerados significativos con * $p < 0,05$ vs suero control; # $p < 0,05$ vs suero urémico.

8. BTLA podría estar implicado en la ERC, así como en la progresión acelerada de la aterosclerosis inducida por la ERC mediante la activación de la vía de señalización de la IL-17A.

Existen evidencias que sugieren que la respuesta inmune Th17, y su citoquina efectora IL-17A, contribuyen a la patogénesis de la enfermedad renal^{386,387}. Estudios previos, han relacionado la disminución de BTLA en enfermedades inflamatorias con una respuesta Th17 anormal, llevada a cabo por células Th17 y/o células $\gamma\delta$ ^{314,315}. Por todo esto, se quiso estudiar el papel de BTLA en la modulación de la vía de señalización de IL-17A durante la ERC y/o uremia, así como en la aterosclerosis acelerada en ERC.

8.1. Activación de la vía de señalización de la IL-17A en un modelo experimental de aterosclerosis acelerada por ERC.

En concordancia con estudios previos^{286,388}, se observó un aumento significativo en los niveles proteicos de IL-17A en arco aórtico de los animales ApoE^{-/-} + HFD y ApoE^{-/-} + HFD + 5/6Nx al compararlo con los ratones control (ApoE^{-/-}) (**Figura 48A y C**). Este aumento en los niveles de IL-17A se relaciona con la bajada en los niveles proteicos de BTLA observada en arco aórtico de los mismos ratones (**Figura 35B**). Además, se evaluaron los niveles proteicos de ROR γ t, factor de transcripción necesario en la diferenciación hacia Th17, observándose unos resultados similares a los observados en los niveles de IL-17A, con un aumento significativo de sus niveles en ratones ApoE^{-/-} + HFD + 5/6Nx al compararlos con el grupo ApoE^{-/-} + HFD (**Figura 48A y B**). Finalmente, los niveles de IL-17A fueron también evaluados mediante inmunohistoquímica en las placas ateroscleróticas de la aorta abdominal de los ratones, corroborando los resultados obtenidos a nivel de proteína total para IL-17A (**Figura 48D**). También se evaluaron en sangre total y arco aórtico los niveles de expresión de IL-6, como indicador de la activación de la vía de señalización mediada por IL-17A. En sangre total, se observó un aumento significativo de la expresión de la citoquina IL-6 en los ratones ApoE^{-/-} + 5/6Nx, relacionándose con la bajada en la expresión de BTLA en sangre total de este mismo grupo (**Figura 35A**), así como una tendencia a aumentar la expresión de IL-6 en los dos grupos de ratones alimentados con dieta alta en grasa (ApoE^{-/-} + HFD y ApoE^{-/-} + 5/6Nx + HFD) (**Figura 48E**). Los resultados de expresión de IL-6 en arco aórtico, se mostraron en concordancia con los resultados obtenidos en los niveles proteicos de IL-17A (**Figura 48C**) y BTLA (**Figura 35B**) en arco aórtico, observando un aumento significativo de sus niveles de expresión génica en aquellos grupos de ratones que presentaron placa aterosclerótica (ApoE^{-/-} + HFD y ApoE^{-/-} + 5/6Nx + HFD) al compararlos con los ratones control (ApoE^{-/-}) (**Figura 48F**). Además, no se observa ninguna diferencia en los niveles proteicos de IL-17A, así como en los niveles de expresión de IL-6 en arco aórtico entre los ratones ApoE^{-/-} + 5/6Nx + HFD y los ratones ApoE^{-/-} + HFD, correspondiéndose con la ausencia de diferencias en los niveles proteicos de BTLA obtenidos en los mismos animales (**Figura 35B**). Todos estos resultados indican una posible sobreexpresión de IL-17A en aterosclerosis y aterosclerosis acelerada por la ERC que podría estar asociada a

la disminución de BTLA y sugieren un nuevo mecanismo de acción en la susceptibilidad de los pacientes con ERC a desarrollar una patología cardiovascular.

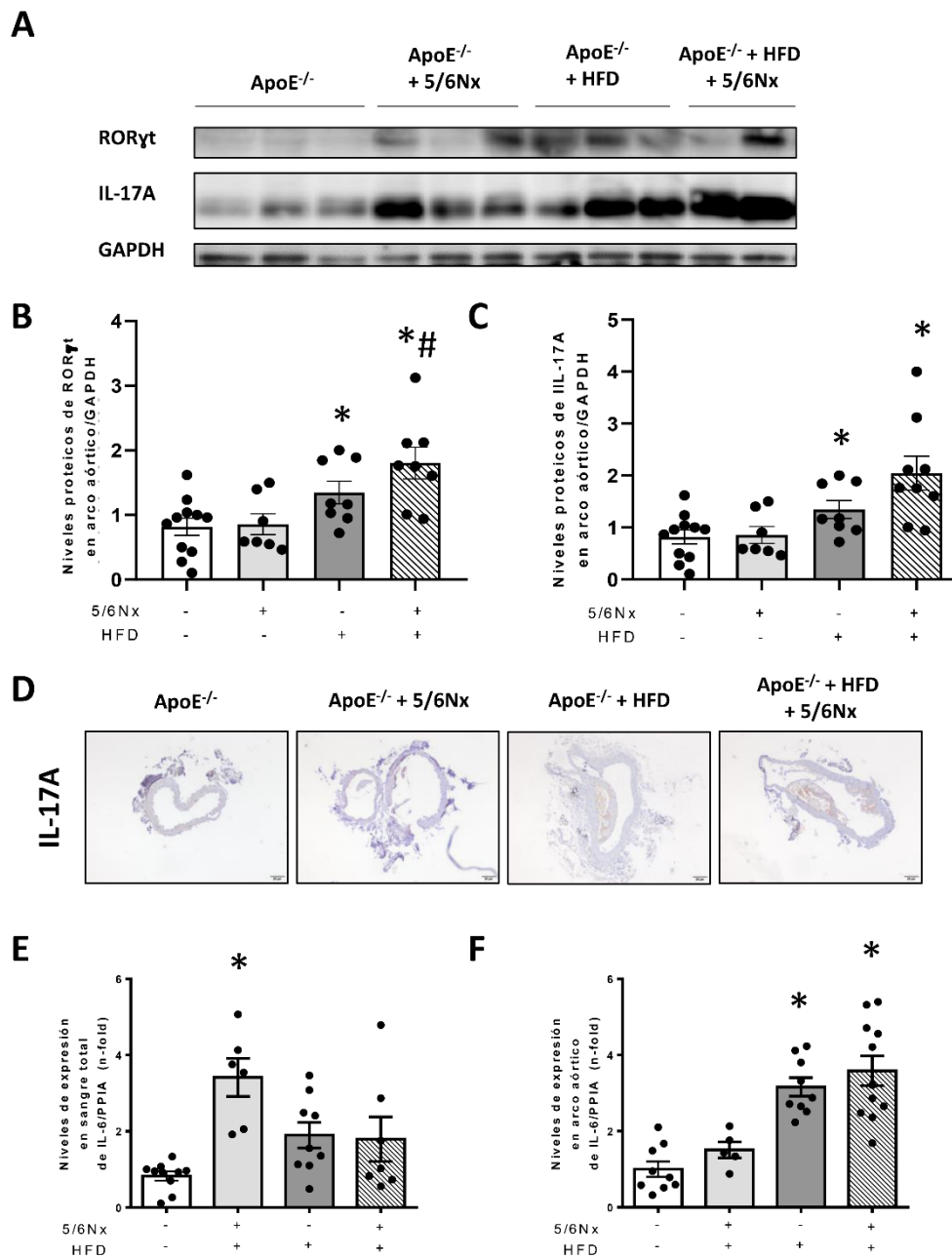


Figura 48. Modulación de la vía de señalización de IL-17A en arco aórtico de ratones APOE^{-/-} sometidos a una nefrectomía subtotal y alimentados con dieta alta en grasa (HFD) durante 10 semanas. (A) Niveles proteicos en arco aórtico de diferentes componentes de la vía de señalización de IL-17A (IL17A; RORyt). (B) Cuantificación de los niveles proteicos de RORyt en arco aórtico. (C) Cuantificación de los niveles proteicos de IL-17A en arco aórtico. (D) Inmunohistoquímica de IL-17A en placas ateroscleróticas de aorta abdominal. Expresión génica de la citoquina proinflamatoria IL-6 en (E) sangre total y (F) arco aórtico. Los datos están expresados como la media ± SEM de 7-10 ratones por grupo. *p<0.05 vs. ApoE^{-/-}; #p<0.05 vs. ApoE^{-/-} + HFD.

Posteriormente, se evaluaron los niveles proteicos de ROR γ t e IL-17A en el riñón de los animales ApoE $^{-/-}$ + 5/6Nx, en los que no se observó una bajada en los niveles de BTLA en comparación con los ratones control (ApoE $^{-/-}$) (**Figura 36**). En concordancia con lo anterior, tampoco se observó ninguna diferencia significativa en los niveles de ROR γ t e IL-17A en riñones de ratones sometidos a una nefrectomía subtotal (ApoE $^{-/-}$ + 5/6Nx) cuando los comparáramos con ratones control (ApoE $^{-/-}$) (**Figura 49**).

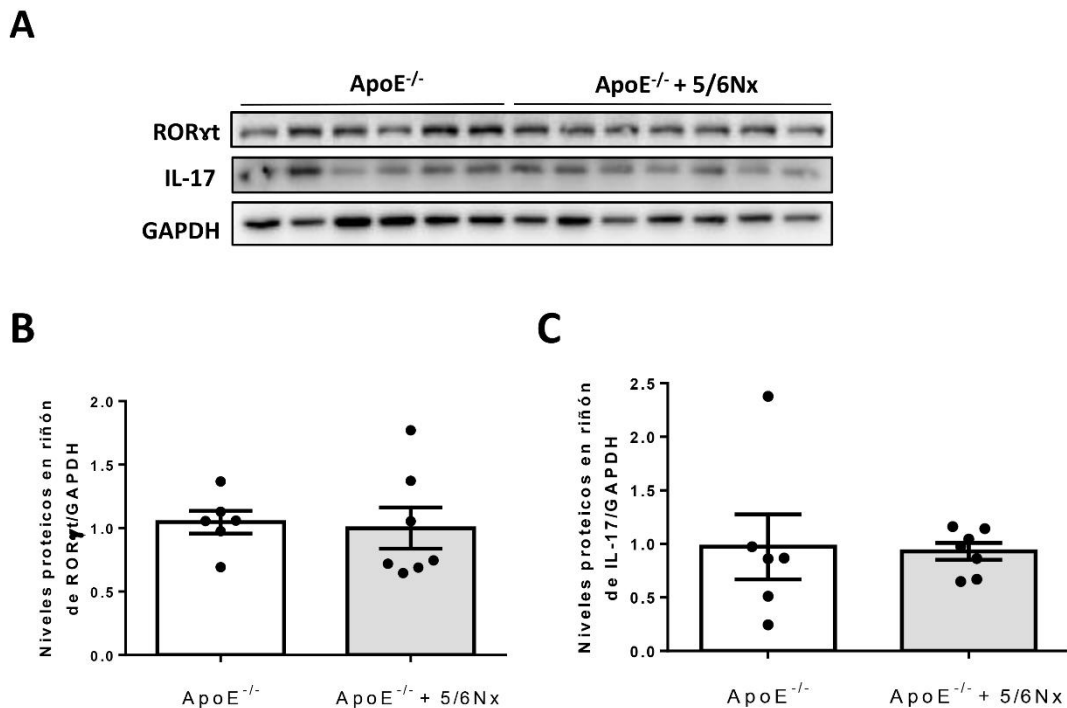


Figura 49. Modulación de la vía de señalización de IL-17A en riñón de ratones APOE $^{-/-}$ sometidos a una nefrectomía subtotal y alimentados con dieta alta en grasa (HFD) durante 10 semanas. (A) Niveles proteicos en riñón de diferentes componentes de la vía de señalización de IL-17A (IL17A; ROR γ t). (B) Cuantificación de los niveles proteicos de ROR γ t en riñón. (C) Cuantificación de los niveles proteicos de IL-17A en riñón. Los datos están expresados como la media \pm SEM de 7-10 ratones por grupo.

8.2. Activación de la vía de señalización de IL-17A en pacientes con ERC

Debido a la posible correlación encontrada entre BTLA e IL-17A en el modelo experimental de aterosclerosis acelerada en ERC, quisimos evaluar si en PBMCs de pacientes renales, esta vía de señalización se encuentra aumentada en condiciones de uremia independientemente de la enfermedad cardiovascular, debido a la bajada significativa de los niveles de expresión génica y proteica de BTLA observada en dichos pacientes (**Figura 38**). En este sentido, los resultados mostraron un aumento

significativo en los niveles proteicos de ROR γ t e IL-17A en pacientes con ERC (**Tabla 12**) al compararlos con pacientes control (**Figura 50**). Además, de la misma forma que ocurría en el modelo experimental de aterosclerosis acelerada en ERC, estos resultados se correlacionarían inversamente con la bajada de BTLA en estos mismos pacientes, confirmando el papel de esta vía de señalización en enfermedad renal y su posible vinculación con BTLA.

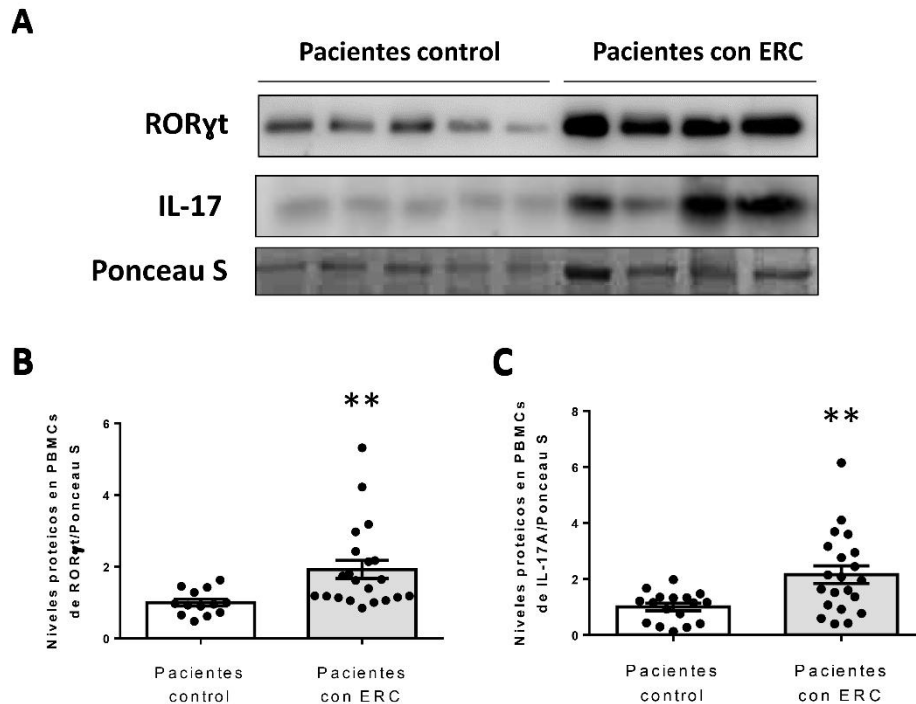


Figura 50. Modulación de la vía de señalización de IL-17A en pacientes con ERC. (A) Niveles proteicos en PBMCs de diferentes componentes de la vía de señalización de IL-17A (IL17A; ROR γ t). (B) Cuantificación de los niveles proteicos de ROR γ t en PBMCs de pacientes. (C) Cuantificación de los niveles proteicos de IL-17A en PBMCs de pacientes. Los datos son expresados como la media \pm SEM de 20 pacientes por grupo. Los resultados son considerados significativos con ** $p < 0,01$.

8.3 Activación de la vía de señalización de IL-17A en modelos de daño renal crónico.

Se analizaron los niveles de ROR γ t e IL-17A en los modelos experimentales de daño renal crónico utilizados anteriormente para el estudio de los niveles de BTLA (**Figura 42 y 43**). Estudios previos han demostrado un papel de IL-17A en el mantenimiento del daño renal inducido por la Ang II^{270,282,389}, así como en la respuesta inmunitaria presente en la glomerulonefritis humana y experimental^{386,390-392}. En concordancia con estos estudios, los resultados mostraron un aumento significativo en los niveles de proteína

total de ROR γ t e IL-17A, tanto en el modelo de daño renal inducido por Ang II (**Figura 51A, B y C**) como en el modelo experimental de glomerulonefritis rápidamente progresiva (**Figura 51D, E y F**), validando la implicación de IL-17A en estos modelos, así como la posible relación entre BTLA e IL-17A.

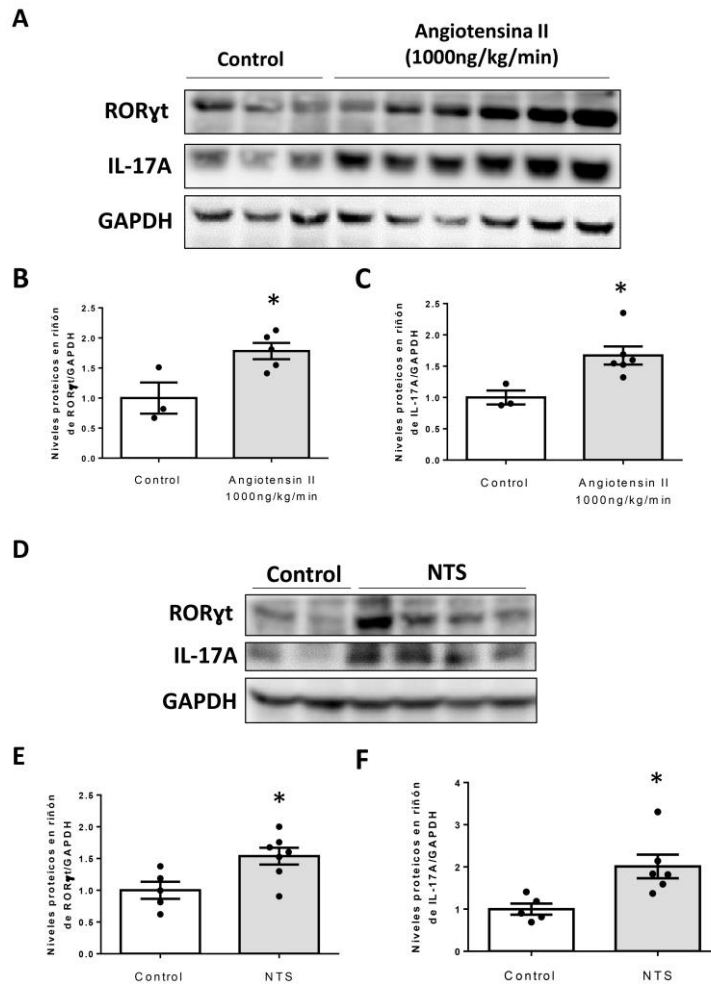


Figura 51. Modulación de la vía de señalización de IL-17A en un modelo de daño renal inducido por Ang II y un modelo experimental de glomerulonefritis rápidamente progresiva inducida por la inyección de suero nefrotóxico (NTS). (A) Niveles proteicos en riñón de diferentes componentes de la vía de señalización de IL-17A (IL17A; ROR γ t) en un modelo experimental de daño renal inducido por Ang II. (B) Cuantificación de los niveles proteicos de ROR γ t en riñón de un modelo experimental de daño renal inducido por Ang II. (C) Cuantificación de los niveles proteicos de IL-17A en riñón de un modelo experimental de daño renal inducido por Ang II. (D) Niveles proteicos en riñón de diferentes componentes de la vía de señalización de IL-17A (IL17A; ROR γ t) en un modelo experimental de glomerulonefritis Crescente. (E) Cuantificación de los niveles proteicos de ROR γ t en riñón de un modelo experimental glomerulonefritis Crescente. (F) Cuantificación de los niveles proteicos de IL-17A en riñón de un modelo experimental de glomerulonefritis Crescente. Los datos son expresados como la media \pm SEM de 3-7 animales por grupo. Los resultados son considerados significativos con * $p < 0,05$.

8.4. Activación de la vía de señalización de IL-17A en condiciones de uremia en linfocitos T.

Se analizaron los niveles proteicos de ROR γ t e IL-17A en los experimentos en linfocitos T (Jurkat) estimulados con 20% de suero de rata control o urémico durante 48 horas. En este caso, también se observó un aumento significativo en los niveles proteicos de ROR γ t y una clara tendencia a aumentar los niveles de IL-17A en presencia de uremia (**Figura 52**). Estos resultados, demuestran un papel de la respuesta mediada por IL-17A en uremia y postulan la posible relación entre IL-17A y BTLA.

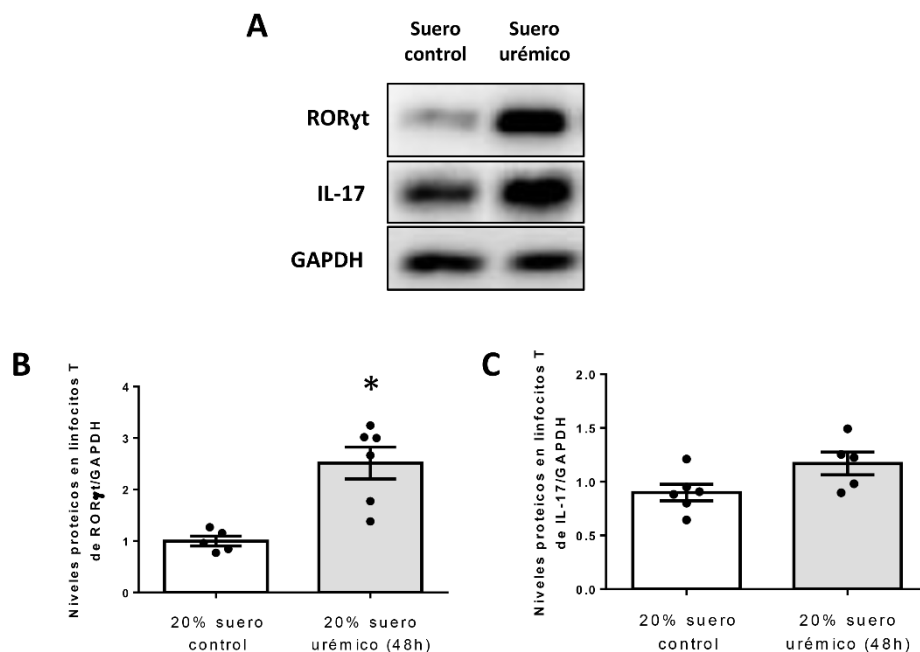


Figura 52. Modulación de la vía de señalización de IL-17A en linfocitos T estimulados con suero urémico. (A) Niveles proteicos en linfocitos T de diferentes componentes de la vía de señalización de IL-17A (IL17A; ROR γ t). (B) Cuantificación de los niveles proteicos de ROR γ t en linfocitos T. (C) Cuantificación de los niveles proteicos de IL-17A en linfocitos T. Los datos son expresados como la media \pm SEM de 6 experimentos por grupo. Los resultados son considerados significativos con * $p < 0,05$.

8.5. miR-500a-3p regula la activación de la vía de señalización de IL-17A en condiciones de uremia en linfocitos T.

Con el fin de conocer la posible regulación directa de la vía de señalización de IL-17A por miR-500a-3p, se evaluaron los niveles proteicos de IL-17A y ROR γ t en linfocitos T tratados con suero urémico y transfectados con un antagomir específico contra miR-500a-3p. Los resultados de estos experimentos mostraron una disminución en los niveles proteicos de IL-17A (**Figura 53A**) y ROR γ t (**Figura 53B**) inducidos por el suero

urémico tras ser transfectados con un antagomir específico para miR-500a-3p. Estos resultados indican una regulación de la vía de señalización de IL-17A por miR-500a-3p.

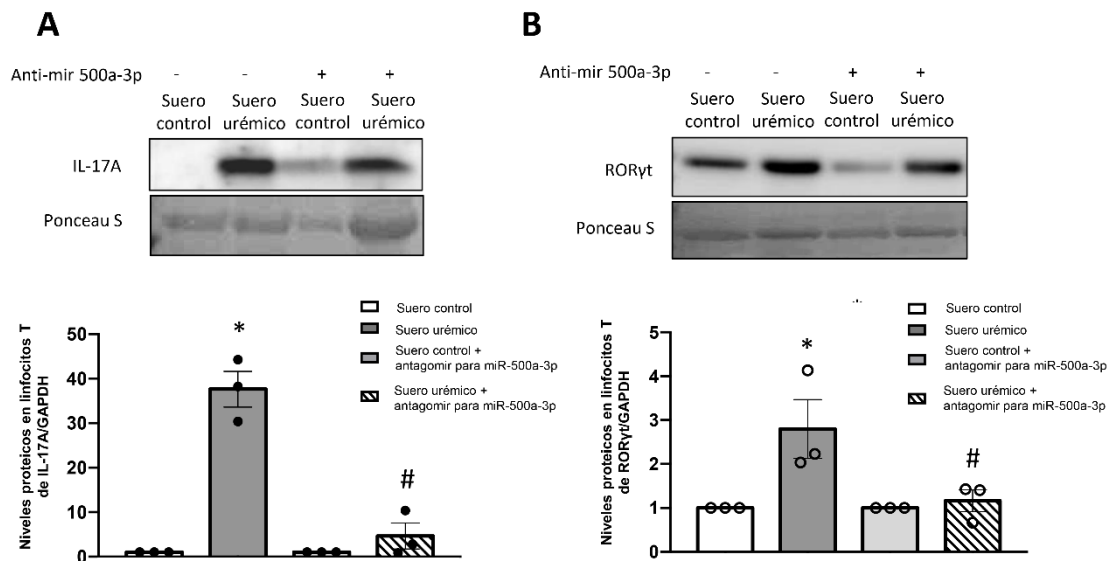


Figura 53. Modulación de la vía de señalización de IL-17A en linfocitos T estimulados con/sin suero urémico y con/sin antagomir contra anti-miR-500a-3p. Niveles proteicos de (A) IL-17 y (B) RORyt en linfocitos T estimulados con suero urémico/control y con/sin antagomir contra miR-500a-3p. Los datos son expresados como la media \pm SEM de 3 experimentos por grupo. Los resultados son considerados significativos con * $p < 0,05$ vs suero control; # $p < 0,05$ vs suero urémico.

9. Regulación epigenética en un modelo experimental de aterosclerosis acelerada por ERC

A pesar de la incapacidad de analizar el papel de miR-500a-3p sobre la regulación de BTLA *in vivo*, debido a la ausencia de secuencia murina para miR-500a-3p, se analizaron los niveles de expresión de miR-23a-3p y miR-652-3p en el modelo de aterosclerosis acelerada por ERC, los cuales aparecieron desregulados en todas las comparaciones de pacientes realizadas (**Figura 25, 27 y 29**).

Sorprendentemente, el aumento significativo en pacientes de la expresión de estos micro-ARNs no se confirmó en el modelo experimental de aterosclerosis acelerada en ERC. De esta manera, en el caso de miR-23a-3p, se observó una tendencia a disminuir sus niveles de expresión, tanto a nivel circulante como en tejido aórtico, cuando comparábamos los ratones ApoE^{-/-} + HFD + 5/6Nx, así como los ratones ApoE^{-/-} + HFD con el grupo control (ApoE^{-/-}) (**Figura 54A y B**). Curiosamente, el único grupo que mostró un aumento significativo en los niveles de expresión de miR-23a-3p, a nivel circulante y

tisular, fue el grupo de ratones ApoE^{-/-} + 5/6Nx (**Figura 54A y B**). Por otro lado, en sangre total, el comportamiento de miR-652-3p fue similar al observado en miR-23a-3p, con una tendencia a disminuir su expresión en los grupos de animales alimentados con HFD y un aumento significativo en el grupo de ratones ApoE^{-/-} + 5/6Nx en comparación con el grupo control (ApoE^{-/-}) (**Figura 54C**). Sin embargo, los niveles de expresión de miR-652-3p no mostraron ninguna diferencia significativa al analizarse en arco aórtico (**Figura 54D**).

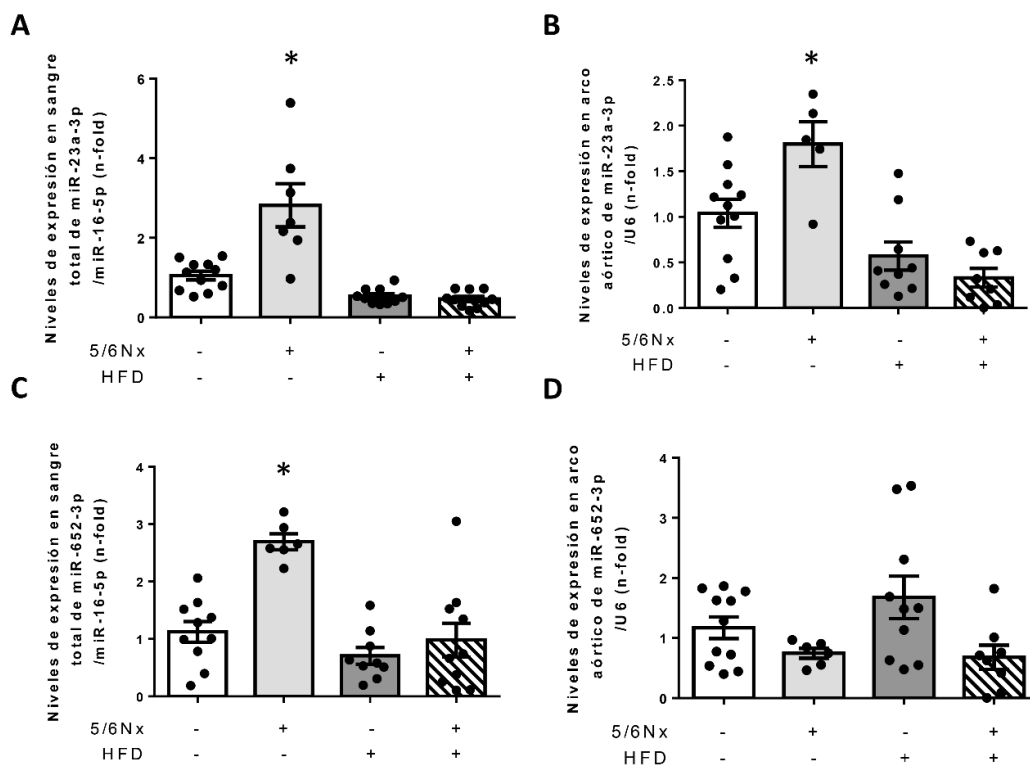


Figura 54. Niveles de expresión de miR-23a-3p y miR-652-3p en sangre total y tejido aórtico de ratones APOE^{-/-} sometidos a una nefrectomía subtotal y alimentados con dieta alta en grasa (HFD) durante 10 semanas. (A) Niveles de expresión de miR-23a-3p en sangre total. (B) Niveles de expresión de miR-23a-3p en arco aórtico. (C) Niveles de expresión de miR-652-3p en sangre total. (D) Niveles de expresión de miR-652-3p en arco aórtico. Los datos son expresados como la media \pm SEM de 6-10 animales por grupo. * $p < 0.05$ vs. ApoE^{-/-}.

Debido a los resultados observados en los niveles de expresión de miR-23a-3p y a la ausencia de un gen diana para miR-23a-3p cuya expresión estuviera desregulada en los pacientes con ERC (**Figura 25, 27 y 29**), se buscaron otros genes diana para este micro-ARN. En este sentido, NEK7³⁹³ y CUL3^{394,395} aparecieron como posibles genes diana para miR-23a-3p a través de búsquedas bibliográficas y análisis *in silico* mediante el software TargetScan 7.2 (**Figura 55**). La evaluación de estos posibles genes diana para miR-23a-3p en este modelo experimental, mostró un claro aumento de la expresión de

NEK7 en arco aórtico en los ratones ApoE^{-/-} + HFD y una tendencia a aumentar y disminuir su expresión, en los ratones ApoE^{-/-} + HFD + 5/6Nx y ApoE^{-/-} + 5/6Nx respectivamente comparándolos con el grupo control (ApoE^{-/-}) (**Figura 56B**). Además, la expresión de NEK7 en arco aórtico presentó una tendencia a disminuir en ratones ApoE^{-/-} + 5/6Nx (**Figura 56B**). Estos resultados observados fueron opuestos a los obtenidos en miR-23a-3p, mostrando una buena correlación a nivel tisular entre ambos (**Figura 57B**). En el caso de los niveles de expresión en sangre total de NEK7 y CUL3, solo se observó una buena correlación inversa entre estos genes y miR-23a-3p en el grupo de ratones ApoE^{-/-} + 5/6Nx (**Figura 56A, C y figura 57**). En cambio, los niveles de expresión de CUL3 en arco aórtico solo mostraron una correlación inversa con los niveles de expresión de miR-23a-3p en los grupos de animales alimentados con HFD (ApoE^{-/-} + HFD y ApoE^{-/-} + HFD + 5/6Nx) (**Figura 56D y 57**).

NEK7 3' UTR	5'	...AAAUGUAACUUAUAAAUGUGAA...
hsa-miR-23a-3p	3'	CCUUUAGGGACCGUACACUA
<hr/>		
CUL3 3' UTR	5'	...ACAGUCCUCGGGAAAAUGUGAA...
hsa-miR-23a-3p	3'	CCUUUAGGGACCG ---UUACACUA

Figura 55. Lugares de unión para miR-23a-3p, NEK7 y CUL3 según el software TargetScan 7.2.

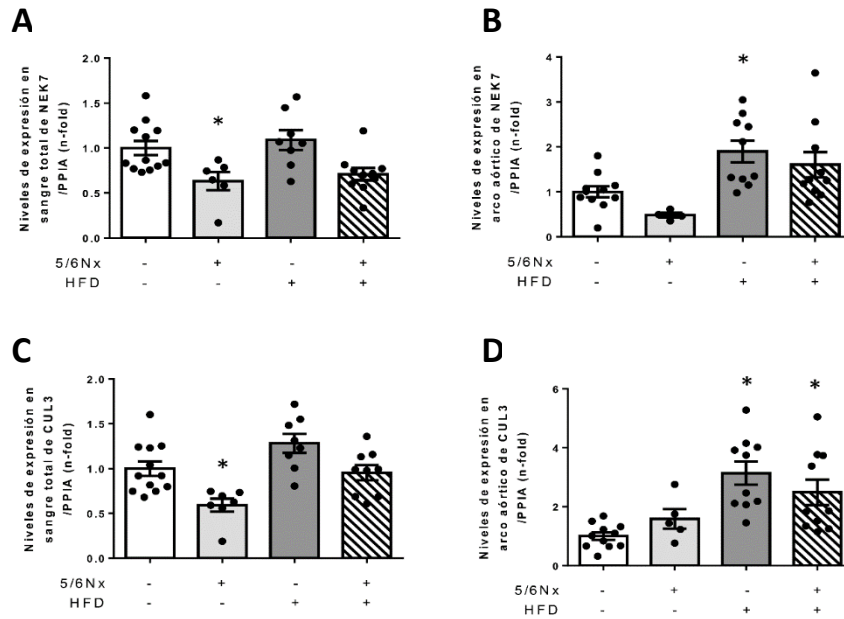


Figura 56. Niveles de expresión de NEK7 y CUL3, genes diana para miR-23a-3p, en sangre total y arco aórtico de ratones *APOE*^{-/-} sometidos a una nefrectomía subtotal y alimentados con dieta alta en grasa (HFD) durante 10 semanas. (A) Niveles de expresión de NEK7 en sangre total. (B) Niveles de expresión de NEK7 en arco aórtico. (C) Niveles de expresión de CUL3 en sangre total. (D) Niveles de expresión de CUL3 en arco aórtico. Los datos son expresados como la media ± SEM de 6-10 animales por grupo. *p<0.05 vs. ApoE^{-/-}.

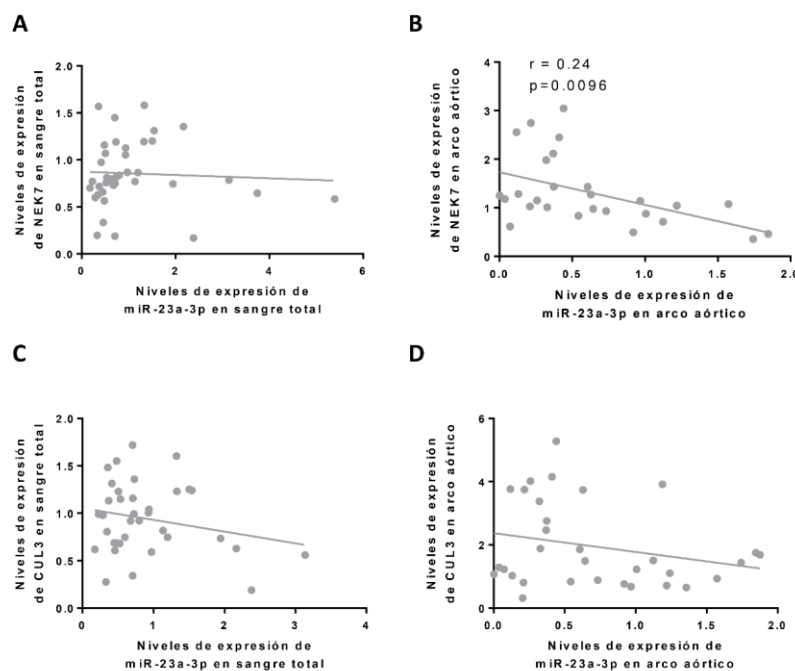


Figura 57. Correlación entre los niveles de expresión de miR-23a-3p y sus genes diana (NEK7 y CUL3) en sangre total y arco aórtico de ratones *ApoE*^{-/-} sometidos a una nefrectomía subtotal y alimentados con dieta alta en grasa (HFD) durante 10 semanas. (A y B) Correlación de los niveles de expresión de NEK7 en sangre total y arco aórtico, respectivamente, (C y D) Correlación de los niveles de expresión de CUL3 en sangre total y arco aórtico, respectivamente. Los datos son considerados significativos con p<0.05 y una r²>0,2.

DISCUSIÓN

El alto impacto cardiovascular que presenta la ERC^{19,108} requiere un esfuerzo científico que nos permita elucidar los diferentes mecanismos involucrados en la mayor predisposición a desarrollar eventos cardiovasculares en pacientes renales, con el fin de utilizar estos mecanismos como herramientas terapéuticas y/o preventivas. Como se ha comentado anteriormente, los factores de riesgo cardiovasculares en la población con ERC difieren de los factores de riesgo cardiovasculares presentes en la población general¹²², destacando la inflamación persistente como un importante predictor de eventos cardiovasculares en pacientes con ERC^{396,397}. De hecho, se ha asociado un estado de inflamación crónica e hiperactivación del sistema inmunitario con varias complicaciones de la ERC como una degeneración vascular, una aterosclerosis acelerada y una disfunción cardíaca³⁹⁶. Por lo tanto, el desarrollo de nuevas estrategias que se centren en la regulación de la respuesta inmunitaria podrían representar una herramienta importante para disminuir la mortalidad en pacientes renales³⁹⁶. El array de ARNm realizado en esta tesis en el que se compararon pacientes con ERC con/sin aparición de placa aterosclerótica a los 2 años, mostró 159 ARNm significativamente desregulados al alza y a la baja en pacientes que desarrollaban aterosclerosis *de novo* al compararlos con pacientes que se mantenían libres de la enfermedad arterial. El post-análisis de los datos con el *software gene ontology* (GO), nos indicó los procesos biológicos y funcionales asociados a estos genes diferencialmente expresados, procesos que se relacionaron con la defensa del organismo en el caso de los genes “*upregulados*”, y con procesos implicados en la respuesta inmunológica en los genes “*downregulados*”, identificándolos como procesos clave en el desarrollo aterosclerótico en un contexto renal. Estos resultados corroboraron estudios previos que describen el papel clave de la respuesta inmunitaria y el proceso inflamatorio en el daño cardiovascular en pacientes renales, en los que se muestra una relación directa e independiente entre los niveles de algunos marcadores de daño renal como la proteína C reactiva (PCR) y algunas citoquinas como IL-6, IL-10 y TNF- α con eventos cardiovasculares en enfermos renales³⁹⁸⁻⁴⁰². De hecho, varias de estas moléculas inflamatorias se han propuesto como biomarcadores de una mortalidad de origen vascular en enfermos renales^{158,159}. De esta manera, algunos de los genes que aparecieron más significativamente desregulados en el array de ARNm se han relacionado con procesos inmunológicos e inflamatorios tales como la producción de histamina por parte de la histidina descarboxilasa (HDC, del

inglés, *histidine decarboxylase*) en células dendríticas, macrófagos y neutrófilos; la escisión de proteínas estructurales y/o citoquinas (IL-1, IL-33 e IL-36) por parte de la Catepsina G (CTSG, del inglés, *cathepsin G*), la cual se ha relacionado previamente con una disminución de los niveles plasmáticos de LDL en pacientes con aterosclerosis; la activación de eosinófilos mediada por RNASE3 (del inglés, *RNA A family member 3*), cuyo aumento se ha vinculado con eventos cardiovasculares; la liberación de quimiocinas, inducción de especies reactivas de oxígeno y la atracción de linfocitos al sitio de la inflamación llevada a cabo por DEFA1B (del inglés, *defensin Alpha 1B*); la activación de linfocitos B guiada por FCLR1 (del inglés, *Fc receptor-like protein 1*) y la activación de linfocitos T mediada por BTLA^{299,403-409}. Además, estas moléculas se han relacionado con enfermedades cardiovasculares y/o renales. Observándose un aumento de histamina y RNASE3 en pacientes con infarto agudo de miocardio^{410,411}, una disminución en la acumulación de células apoptóticas en ratones ApoE^{-/-} deficientes en CTSG⁴¹² y una pérdida de la integridad endotelial mediada por un aumento de la actividad enzimática de CTSG⁴¹³.

Sin embargo, la validación intra-especie de los resultados obtenidos en el array de ARNm en una cohorte mayor de pacientes solo mostró la disminución significativa en la expresión génica de una de las moléculas responsables de la activación y proliferación de linfocitos, conocida como BTLA²⁹⁹. Un estudio previo describió que la inducción de BTLA en ratones Ldlr^{-/-} está implicada en el proceso aterosclerótico regulando el balance entre linfocitos B aterogénicos/ateroprotectores y, dirigiendo las células T CD4⁺ hacia un fenotipo regulador³¹³. Sin embargo, no hay estudios sobre el papel perjudicial de BTLA en la progresión acelerada de la enfermedad aterosclerótica inducida por la ERC, ni en el daño renal *per se*. Como se ha comentado previamente, los resultados obtenidos en pacientes con ERC en esta tesis mostraron una bajada en la expresión de BTLA previa a la aparición de la placa aterosclerótica, indicando que BTLA podría ser identificado como un biomarcador de eventos cardiovasculares en enfermos renales. No obstante, estos resultados no se corroboraron en pacientes con ERC y progresión de placa aterosclerótica ya establecida, sugiriendo que el efecto inductor de BTLA afecta a la formación *de novo* de la placa aterosclerótica, es decir, al inicio de la enfermedad, y no a la progresión de la misma.

Por otro lado, la secuenciación de micro-ARNs mostró un aumento significativo en la expresión de 16 micro-ARNs asociados a la aparición de placa aterosclerótica. Sin embargo, la posterior validación intra-especie en una cohorte mayor de pacientes con las mismas características (pacientes con ERC con/sin desarrollo de placa aterosclerótica *de novo*), únicamente confirmó un aumento significativo en la expresión de miR-23a-3p, miR-652-3p y miR-500a-3p. Además, el aumento significativo en la expresión de estos micro-ARNs, también se observó durante el desarrollo aterosclerótico de pacientes que ya presentaban una placa aterosclerótica al inicio del estudio, indicando un posible papel de estos micro-ARNs como potenciales biomarcadores para la predicción tanto de la formación de la placa aterosclerótica *de novo*, como de la progresión de la aterosclerosis en pacientes con ERC. De hecho, varios estudios han relacionado a miR-23a-3p con el proceso aterosclerótico regulando la respuesta inflamatoria^{414,415} y promoviendo hipertrofia cardíaca^{416,417}. Además, miR-23a-5p se ha relacionado con la formación de las “células espumosas” presentes en la placa de ateroma⁴¹⁸ y miR-23b-3p con la toxicidad de las partículas de LDL⁴¹⁹. Otras evidencias sugieren un papel ateroprotector para miR-23a-3p mediante la promoción de la angiogénesis en isquemia cardíaca tras un infarto de miocardio^{420,421}. Por otro lado, miR-652-3p se ha identificado como un micro-ARN aterogénico a través de la inhibición en la proliferación de las CEs⁴²² y se ha establecido como un posible biomarcador para predecir la enfermedad renal en pacientes tras un fallo cardíaco⁴²³. No existen evidencias previas del papel de miR-500a-3p en el proceso aterosclerótico, sin embargo, miR-500a-3p se ha establecido como un micro-ARN protector en el desarrollo de fracaso renal agudo mediante el control de la fosforilación de MLKL (del inglés, *mixed lineage kinase domain*), la consecuente necroptosis y la respuesta inflamatoria en células túbulo epiteliales humanas⁴²⁴.

La expresión génica de miR-185-5p, miR-629-5p, miR-362-5p y miR-130b-5p no fue validada en la cohorte mayor de pacientes con ERC y con/sin presencia aterosclerótica inicial. En este sentido, cabe destacar la homogeneidad en las características clínicas de los pacientes utilizados en la secuenciación de micro-ARNs. En cambio, en la cohorte de validación, el grado de homogeneidad se vio disminuido, sugiriendo la posible dependencia de alguna de las características clínicas que mostraron mayor diferencia entre grupos (edad, presión sistólica y/o calcio total), en la

regulación de la expresión de estos micro-ARNs. Sin embargo, ningún estudio previo ha relacionado estos micro-ARNs con alguna de estas características clínicas. No obstante, estudios previos han relacionado alguno de estos micro-ARNs con el proceso aterosclerótico. En este sentido, miR-185-5p se ha postulado como un micro-ARN con papel atero-protector regulando la síntesis de colesterol, reduciendo la proliferación y migración de CMLVs y disminuyendo la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias por parte de las CEs⁴²⁵⁻⁴²⁷. Por otro lado, miR-629-5p y miR-130b-5p se han relacionado con el desarrollo de trombosis y enfermedad coronaria respectivamente^{428,429}. Sin embargo, ninguno de estos micro-ARNs se han relacionado previamente con el proceso aterosclerótico exacerbado por la enfermedad renal. Por otro lado, y contrariamente a lo sucedido en la cohorte de validación, el estudio de la expresión génica de estos micro-ARNs (miR-185-5p, miR-629-5p, miR-362-5p y miR-130b-5p) en la progresión aterosclerótica de placas ya establecidas en pacientes renales, mostró un aumento significativo en la expresión de todos ellos, indicando un posible papel de estos micro-ARNs en la progresión de la enfermedad aterosclerótica, más que en el inicio de la misma, en pacientes con ERC.

Estudios previos han descrito la elevada prevalencia de eventos cardiovasculares en enfermos renales^{122,430} ligado a las características propias de un ambiente urémico^{122,397,431}. Los ratones ApoE^{-/-} alimentados con una dieta alta en grasa (HFD) son un modelo bien establecido de aterosclerosis experimental en ratones³⁷⁷ y, algunos autores han identificado la nefrectomía subtotal en un fondo susceptible (ratones ApoE^{-/-} o Ldlr^{-/-}) en combinación con una HFD, como un buen modelo experimental de aterosclerosis acelerada por ERC en ratones⁴³²⁻⁴³⁷. En el presente estudio, utilizamos un modelo experimental de aterosclerosis acelerada (ApoE^{-/-} + HFD) por ERC (nefrectomía subtotal o 5/6) para el estudio del papel de la ERC en la respuesta inmunitaria y su contribución en el establecimiento de la aterosclerosis, centrándonos en el papel de BTLA.

Con el fin de evaluar el deterioro en la función renal de los ratones sometidos a una nefrectomía subtotal, se evaluaron los niveles en sangre de BUN como un indicador de la función renal⁴³⁸. Así, el aumento observado en los niveles de BUN en los grupos de ratones sometidos a una nefrectomía subtotal (ApoE^{-/-} + 5/6Nx y ApoE^{-/-} + 5/6Nx + HFD)

al compararlos con los valores control, indicó una reducción efectiva de la masa renal. En otros estudios similares, esta pérdida de funcionalidad renal se relacionó con la alteración de parámetros renales como el IFG y los niveles de creatinina plasmática, y se relacionó con la progresión aterosclerótica mediante la reducción de los niveles de óxido nítrico (ON), aumento de los niveles de colesterol y el tamaño de la lesión^{108,439,440}. Posteriormente se evaluó el perfil lipídico en plasma para determinar si nuestro modelo experimental era representativo de la dislipidemia acentuada presente en enfermos renales⁴⁴¹. En este sentido, el aumento significativo en los niveles de colesterol total y LDL en ratones ApoE^{-/-} + 5/6Nx + HFD al compararlos con los valores de estas partículas en ratones ApoE^{-/-} + HFD se correlacionó con la dislipidemia presente en pacientes con ERC y el elevado riesgo cardiovascular⁴⁴²⁻⁴⁴⁴. Sin embargo, la ausencia de diferencias significativas en los niveles plasmáticos de triglicéridos y el aumento significativo de HDL en ratones ApoE^{-/-} + 5/6Nx + HFD al compararlos con ratones ApoE^{-/-} + HFD no se correlacionaban con las características lipídicas observadas en pacientes con ERC⁴⁴³. En este sentido, estudios previos han descrito una ausencia en el aumento de los niveles de triglicéridos en ratones ApoE^{-/-} sometidos a una nefrectomía subtotal o uninefrectomía, identificando esta característica como una posible limitación del propio modelo experimental^{432,445-447}. Por otro lado, la presencia de niveles elevados de HDL en ratones ApoE^{-/-} + 5/6Nx + HFD al compararlos con ratones ApoE^{-/-} + HFD puede relacionarse con la alteración presente del transporte reverso del colesterol o por el aumento de los niveles totales de colesterol observados en un ambiente urémico^{448,449}.

Varios estudios han demostrado un efecto promotor de la uremia en el engrosamiento de las válvulas aórticas y en el aumento de la placa aterosclerótica en ratones ApoE^{-/-}^{445,450-452}, demostrando el efecto nocivo de la ERC en la progresión aterosclerótica. En nuestro estudio, comparamos el tamaño de la placa aterosclerótica entre ratones ApoE^{-/-} + 5/6Nx + HFD y ratones ApoE^{-/-} + HFD, observando un aumento significativo en el tamaño de la placa aterosclerótica en ratones ApoE^{-/-} + 5/6Nx + HFD al compararlos con ratones ApoE^{-/-} + HFD, lo que nos confirmó el efecto aditivo de la uremia en la progresión aterosclerótica. En el contexto aterosclerótico, el balance entre los procesos inflamatorios y fibróticos es un factor de riesgo cardiovascular clave. En este sentido, los procesos inflamatorios influyen de manera negativa la estabilidad

de la placa aterosclerótica, mientras que la formación de matriz extracelular mantiene una estructura estable⁴⁵³⁻⁴⁵⁶. De hecho, pacientes con ERC presentan una placa aterosclerótica con una composición más inflamatoria que las placas desarrolladas en la población general, con un aumento de la infiltración de mastocitos, macrófagos M1, linfocitos T y B, así como niveles elevados de PCR e IL-6⁴⁵⁷⁻⁴⁶¹. Además, estudios desarrollados en modelos experimentales de aterosclerosis acelerada por nefrectomía subtotal, han mostrado un aumento de la inflamación vascular caracterizada por un aumento de moléculas de adhesión tales como ICAM-1 y VCAM-1, quimiocinas como MCP-1 y/o citoquinas como TNF- α ^{433,439,462-464} y una ligera disminución en los niveles de expresión de pro-colágeno 1 en tejido cardíaco⁴⁶⁵. En el presente estudio, se mostró por primera vez un aumento significativo en los marcadores de macrófagos y linfocitos T (CD68⁺ y CD3⁺) en tejido aórtico de ratones ApoE^{-/-} + 5/6Nx + HFD al compararlos con ratones ApoE^{-/-} + HFD. Además, también se analizó el componente fibrótico de las placas, observando una placa ligeramente menos fibrótica en ratones ApoE^{-/-} + 5/6Nx + HFD al compararlos con ratones ApoE^{-/-} + HFD. Estos resultados se correlacionan con estudios anteriores en los que se observa una disminución del contenido de colágeno I inducido por toxinas urémicas en ratones ApoE^{-/-}⁴⁶⁴ dependiente de TGF- β ^{466,467} y catepsina K, una proteasa muy involucrada en el proceso aterosclerótico⁴⁶⁸. Esta disminución del componente fibrótico es indicativa de una placa aterosclerótica más inestable y susceptible a la ruptura⁴⁶⁹, otorgando una mayor susceptibilidad a generar un trombo como se observa en pacientes renales⁴⁷⁰. Por lo tanto, nuestros resultados, mostraron una placa más inestable en un ambiente urémico debido a un aumento del componente inflamatorio, así como una disminución del componente fibrótico.

Por otro lado, se analizaron los niveles de miR-23a-3p y miR-652-3p, dos micro-ARNs aumentados significativamente en pacientes con ERC y progresión aterosclerótica, en nuestro modelo experimental de aterosclerosis acelerada inducida por ERC. En este sentido, los niveles de expresión de miR-23a-3p en nuestro modelo experimental mostraron una tendencia a disminuir en sangre y arco aórtico de ratones ApoE^{-/-} + HFD y ApoE^{-/-} + 5/6Nx + HFD al compararlos con ratones control (ApoE^{-/-}), indicando un posible papel anti-aterogénico de miR-23a-3p como se ha descrito anteriormente^{420,471}. Considerando esto, miR-23a-3p podría actuar como un micro-ARN pro-aterogénico en

el desarrollo inicial de la placa aterosclerótica, como se observó en pacientes con ERC, pero como un micro ARN anti aterogénico una vez se ha establecido la misma. De hecho, la expresión de miR-23a-3p se encontraba significativamente aumentada a nivel circulante y tisular de ratones sometidos a una nefrectomía subtotal (ApoE^{-/-} + 5/6Nx) al compararlos con ratones control (ApoE^{-/-}), indicando un papel pro-aterogénico de miR-23a-3p en uremia, que se relacionó con los resultados obtenidos en muestras humanas, mostrando una mayor predisposición a eventos cardiovasculares en enfermos renales. Sin embargo, sería necesario el estudio de la expresión de este micro-ARN durante las diferentes etapas del progreso aterosclerótico en un contexto de enfermedad renal. Por otro lado, el comportamiento de miR-652-3p en sangre total de nuestro modelo experimental fue similar al observado para miR-23a-3p, indicando un papel pro-aterogénico en presencia de uremia y un papel anti-aterogénico una vez la placa se ha establecido. Sin embargo, la expresión en arco aórtico de miR-652-3p no siguió la misma tendencia y no mostró diferencias significativas. Pese a estos resultados contradictorios, miR-652-3p ha mostrado ejercer un papel pro-aterogénico sobre la proliferación de las CEs⁴²². Debido a la consistencia de los resultados observados en la expresión de miR-23a-3p en sangre total y arco aórtico, así como los estudios previos que relacionan miR-23a-3p con el proceso aterosclerótico⁴¹⁴⁻⁴²¹, se investigaron posibles genes diana para miR-23a-3p que explicaran los niveles bajos de este micro-ARN en el desarrollo aterosclerótico en el modelo experimental. En este sentido, bibliografía previa ha descrito a NEK7³⁹³ y CUL3^{394,395} como posibles genes diana para miR-23a-3p. Nuestros resultados mostraron una clara correlación inversa entre los niveles de expresión de NEK7, una quinasa mitótica necesaria para la activación del inflammasoma NLRP3⁴⁷², y miR-23a-3p en arco aórtico de nuestro modelo experimental. El aumento en los niveles de expresión de NEK7 puede estar relacionado con su papel pro-aterogénico descrito previamente¹⁵⁶, mostrando por primera vez una posible vía de señalización a través de la disminución de miR-23a-3p en la sobreexpresión de NEK7 en el desarrollo aterosclerótico. Por otro lado, la expresión de CUL3 no mostró ninguna correlación con miR-23a-3p ni a nivel circulante ni a nivel tisular, rechazando la hipótesis de CUL3 como posible gen diana para miR-23a-3p en un proceso aterosclerótico.

Asociado al posible papel inflamatorio de la ERC en la progresión de la aterosclerosis, evaluamos la función de BTLA en nuestro modelo experimental. Como se mencionó anteriormente, BTLA es una molécula inhibidora de la activación y proliferación de linfocitos⁴⁷³. En el estudio realizado en muestras de sangre de pacientes con ERC en esta tesis, se observó una disminución significativa en los niveles de expresión de BTLA previa a la formación de placa aterosclerótica. Un único estudio anterior ha relacionado BTLA con la progresión aterosclerótica en ratones *Ldlr*^{-/-} a través de su papel en el desarrollo de la lesión inicial y en el aumento del contenido de colágeno en placas establecidas³¹³. Sin embargo, no hay datos previos sobre la asociación de BTLA con la aterosclerosis en un contexto de uremia. En este sentido, nuestros resultados mostraron una disminución drástica en los niveles de expresión de BTLA en muestras de sangre total de todos los grupos de ratones experimentales (*ApoE*^{-/-} + 5/6Nx, *ApoE*^{-/-} + HFD y *ApoE*^{-/-} + 5/6Nx + HFD), independientemente de la dieta y la cirugía, al compararlos con el grupo de ratones control (*ApoE*^{-/-}). Análogamente, los niveles proteicos de BTLA en arco aórtico se encontraban disminuidos significativamente en los grupos de ratones *ApoE*^{-/-} + HFD y *ApoE*^{-/-} + 5/6Nx + HFD. Estos resultados respaldan los obtenidos por Douna *et al*³¹³, y son la primera evidencia de la participación de BTLA en el proceso urémico.

Por otro lado, con el fin de confirmar el efecto directo de la uremia en la expresión de BTLA, se realizó la estimulación *in vitro* de macrófagos, uno de los tipos celulares principales en el proceso aterosclerótico que expresan BTLA⁴⁷⁴, con suero urémico de ratas. Los resultados mostraron una disminución significativa en la expresión de BTLA inducida por el suero urémico. Esta disminución puede relacionarse con una falta de inhibición en la activación de linfocitos T observada en un estado de inflamación crónica^{310,316,376}, que aumentaría la susceptibilidad en el desarrollo aterosclerótico⁴⁷⁵. A pesar de la clara disminución observada en los niveles de expresión de BTLA en ratones *ApoE*^{-/-} + 5/6Nx, los niveles de expresión de BTLA no disminuyeron significativamente ni en sangre ni en arco aórtico de ratones *ApoE*^{-/-} + 5/6Nx + HFD en comparación con los niveles observados en ratones *ApoE*^{-/-} + HFD, indicando un efecto no aditivo por parte de la ERC sobre la expresión de BTLA en nuestro modelo experimental. Estos resultados confirmarían el posible papel de BTLA en el inicio de la placa aterosclerótica, más que

en la progresión de la misma. Posteriormente, debido a la drástica bajada de la expresión de BTLA en sangre total de ratones sometidos a una nefrectomía subtotal, quisimos evaluar cual sería la situación o el papel de BTLA en daño renal, para lo cual se evaluaron los niveles de expresión de BTLA en riñones de los ratones ApoE^{-/-} + 5/6Nx. Sin embargo, a diferencia de lo observado a nivel sistémico, a nivel renal no se produjo una bajada en los niveles de expresión de BTLA. En este sentido y debido a la ausencia de estudios previos sobre el papel de BTLA en uremia, podemos sugerir una baja implicación del sistema inmunitario adaptativo en el curso de la lesión renal en este modelo experimental en concreto. De hecho, estudios anteriores muestran un efecto nulo del bloqueo del sistema adaptativo en la mejora de una ERC experimental en ratones sometidos a una nefrectomía subtotal²⁶⁵.

Debido a la bajada en los niveles de expresión sistémicos de BTLA en ratones sometidos a una nefrectomía subtotal (ApoE^{-/-} + 5/6Nx), se evaluó el efecto de la disfunción renal *per se* en los niveles de BTLA. Varios estudios han mostrado una alteración en el estado de diferenciación y activación de las células T en uremia, indicando un aumento de la activación de estas células en pacientes con enfermedad renal terminal y/o hemodiálisis⁴⁷⁶ y en modelos experimentales de ERC⁴⁷⁷⁻⁴⁸⁰. Esta activación estimula el estado inflamatorio y el rechazo durante los trasplantes renales⁴⁸¹. En esta tesis, se evaluaron los niveles de BTLA en enfermos renales. Al comparar los pacientes con ERC y los pacientes control utilizados en esta tesis, se observó un aumento significativo en el número de enfermos renales con diabetes, hipertensión y dislipidemia al compararlos con el grupo control, características propias de pacientes con ERC⁴⁸²⁻⁴⁸⁴. Los resultados obtenidos a partir de esta cohorte de pacientes, mostraron por primera vez una bajada significativa a nivel circulante de los niveles de expresión de BTLA, así como una bajada en sus niveles proteicos y en la cantidad de células CD4⁺BTLA⁺ en pacientes con ERC al compararlos con pacientes controles. Estos resultados indicaron una posible ausencia del efecto inhibitorio de BTLA sobre la activación de linfocitos en enfermedad renal, que explicaría la sobre activación linfocitaria en un ambiente urémico⁴⁷⁶⁻⁴⁸⁰. Posteriormente, se desarrollaron dos modelos experimentales murinos de daño renal, uno de ellos corresponde a un daño renal de origen no inmune (inducido por Angiotensina II) aunque con un gran

componente inflamatorio en su progresión del daño, mientras que el otro modelo corresponde a un daño renal de origen inmunitario inducido por un suero nefrotóxico que desencadena el desarrollo de autoanticuerpos contra la membrana basal del glomérulo, de manera muy similar a lo que ocurre en humanos (nefritis anti-membrana basal glomerular o glomerulonefritis rápidamente progresiva). En el modelo experimental de Angiotensina II se observó un aumento significativo en la expresión de dos marcadores de daño renal, *Ngal* y *Kim1*⁴⁸⁵, en ratones inyectados con angiotensina II al compararlos con ratones control, indicando la presencia de daño renal en respuesta a angiotensina II. En el caso del modelo experimental de nefritis anti-membrana basal glomerular, Suarez-Alvarez *et al* describieron un aumento significativo en el infiltrado inflamatorio renal como macrófagos, la expresión renal de genes proinflamatorios (*Ccl2*, *Ccl5* e *Il6*), el aumento de biomarcadores de lesión renal (*Ngal* y *Kim1*) y una pérdida de la función renal en los ratones inyectados con el suero NTS³⁸¹. El estudio de los niveles génicos y proteicos de BTLA en los modelos experimentales mencionados, mostraron una clara disminución en los niveles renales de BTLA tanto a nivel de expresión génica como a nivel proteico. Estos resultados confirmaron los resultados previos obtenidos en pacientes con ERC e indicaron una clara implicación del sistema inmunitario en el progreso de estas enfermedades renales. A pesar de la ausencia de estudios sobre BTLA en estos modelos experimentales, se ha relacionado el proceso inflamatorio con el daño renal inducido por Angiotensina II^{486,487}. Nataraj *et al* describieron un aumento en la proliferación de linfocitos esplénicos derivada de la administración de Angiotensina II⁴⁸⁸. Por otro lado, el modelo experimental de glomerulonefritis rápidamente progresiva se ha vinculado estrechamente con una respuesta inmunitaria dependiente de linfocitos T⁴⁸⁹⁻⁴⁹¹. El aumento de la proliferación de linfocitos T tras un tratamiento con AgII y/o NTS, así como el aumento de la severidad de estas enfermedades dependiente de la activación de linfocitos T^{492,493} se relacionarían con la bajada observada en el presente trabajo en los niveles de BTLA en ambas enfermedades y con el estudio llevado a cabo por Amin Hilman *et al*⁴⁹⁴ sobre el efecto beneficioso en la sobreexpresión de CTLA-4 (del inglés, *Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen-4*), proteína co-inhibidora de la activación y proliferación de linfocitos T similar a BTLA, en un modelo de daño renal inducido por AgII. Además, estos resultados se corresponderían con la bajada de BTLA observada en otras enfermedades inflamatorias con un fuerte papel del sistema

inmunitario adaptativo como la EAE^{296,311}. En este sentido, modelos experimentales de ERC como la enfermedad renal inducida por Angiotensina II y la glomerulonefritis rápidamente progresiva, presentarían una activación del sistema inmunitario adaptativo que podría deberse, en parte, a la falta de la señalización inhibitoria mediada por BTLA.

Con el fin de conocer los principales tipos celulares responsables de la bajada de BTLA en un ambiente urémico, se estimularon linfocitos T y B con suero urémico de ratas sometidas a una nefrectomía subtotal, durante 24 y 48 horas. Nuestros resultados mostraron una clara bajada de BTLA en linfocitos T en condiciones de uremia, que se relacionó con el fuerte papel inmunitario de estos linfocitos en enfermedades renales mediante la liberación de moléculas inflamatorias como IFN- γ , IL-17, IL-1, CCL5 y TNF- α ^{385,495-498}.

Estudios *in silico* a través de la base de datos *Targetscan*, mostraron a miR-500a-3p como un posible micro-ARN regulador de la expresión génica de BTLA mediante su unión a la región 3'UTR de BTLA. Esta unión es diferente a los micro-ARNs descritos previamente como reguladores de BTLA, tales como miR-32, miR-149-3p, miR-155 o miR-150⁴⁹⁹⁻⁵⁰². En nuestro estudio se observó un aumento significativo en los niveles de expresión de miR-500a-3p previo al desarrollo de una placa aterosclerótica en pacientes con ERC. De la misma forma, se observó una bajada en los niveles de expresión génica de BTLA en los mismos pacientes, lo que indicó una posible regulación de BTLA por parte de miR-500a-3p. Sin embargo, no está claro el aumento significativo en los niveles de expresión de miR-500a-3p en progresión de placas ateroscleróticas ya establecidas debido a la ausencia de diferencias significativas en la expresión de BTLA en los mismos pacientes. En este sentido, miR-500a-3p regula otras vías moleculares implicadas en el proceso aterosclerótico, diferentes a su posible regulación de BTLA. Estudios previos, han mostrado un papel de miR-500a-3p en la expresión de otros genes como FBW7, STAT3 y CDK6⁵⁰³⁻⁵⁰⁵, los cuales se han relacionado con diferentes procesos ateroscleróticos como la proliferación de CMLVs, producción de citoquinas (IL-6, IL-17, IL-10), disfunción endotelial y polarización de macrófagos⁵⁰⁶⁻⁵⁰⁸. Sin embargo, miR-500a-3p si parece estar involucrado en la regulación de BTLA en condiciones de uremia debido al aumento significativo de este micro-ARN en pacientes con ERC al compararlos con pacientes control, así como a la correlación inversa con la expresión de BTLA observada

en estos pacientes. Estos resultados se vieron confirmados en cultivos *in vitro* de linfocitos T y B tratados con suero urémico. Además, nuestros resultados mostraron un aumento significativo en la expresión de BTLA tras el tratamiento de linfocitos T con un antagomir específico para miR-500a-3p. Por otro lado, y a pesar de no ser tan exacerbado, la expresión de BTLA en linfocitos T tratados con un antagomir específico para miR-500a-3p en condiciones de uremia, alcanzó los valores observados en células control. Estos resultados confirman por primera vez una regulación de BTLA por parte de miR-500a-3p. A pesar del claro papel deletéreo de miR-500a-3p en condiciones de uremia a través de la regulación de BTLA, estudios recientes han relacionado miR-500a-3p con un papel protector en el fracaso renal agudo (FRA) mediante la supresión de la fosforilación y subsecuente translocación a la membrana de MLKL (del inglés, *mixed lineage kinase domain*), un mediador clave del proceso de necroptosis^{424,509}. Estos resultados contradictorios sobre los efectos de miR-500a-3p en uremia, pueden ser explicados por la diferencia en el estímulo efector del daño, así como el tipo celular diana del mismo. De esta manera, el citotóxico cisplatino utilizado en estudios previos, desencadena un daño agudo en el túbulo renal^{424,509}, mientras que el suero urémico utilizado en el presente estudio es representativo del ambiente urémico presente en ERC y su papel en linfocitos T, indicando una posible diferencia en el papel de miR-500a-3p dependiente del estadio de enfermedad renal y el tipo celular.

BTLA se ha relacionado previamente con la producción de IL-17 y la diferenciación de las células Th17, mediante la inhibición de la síntesis de IL-17 por parte de BTLA, así como la inhibición de BTLA por parte de ROR γ t^{314,318}. Además, la disminución de BTLA se ha relacionado con una respuesta aberrante de las células Th17 en enfermedades inflamatorias como la enfermedad de Behcet's, el lupus eritematoso sistémico y la vasculitis asociada a ANCA (anticuerpos contra el citoplasma de neutrófilos)³¹⁵⁻³¹⁷. Por otro lado, la IL-17 se ha relacionado con la progresión aterosclerótica y la enfermedad renal mediante la inducción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-6 e IL-23, el reclutamiento de células del sistema inmunitario como macrófagos al sitio del daño y la producción y deposición de autoanticuerpos^{280,510-512}. En esta tesis se sugiere una posible relación entre la disminución de los niveles de BTLA y el aumento de los niveles de IL-17. En este sentido,

se observa un aumento en los niveles proteicos en arco aórtico de IL-17 en animales alimentados con HFD (ApoE^{-/-} + HFD y ApoE^{-/-} + HFD + 5/6Nx) al compararlos con ratones control (ApoE^{-/-}). Además, se observaron resultados similares en los niveles proteicos en arco aórtico de ROR γ t. Sin embargo, en el caso de ROR γ t, se observó un aumento significativo en sus niveles proteicos en ratones ApoE^{-/-} + HFD + 5/6Nx al compararlos con ratones ApoE^{-/-} + HFD, indicando un papel clave de esta vía de señalización en los efectos perjudiciales de la ERC en el proceso inflamatorio presente en la enfermedad aterosclerótica. Por otro lado, los resultados observados en los niveles de IL-17 en arco aórtico, fueron confirmados mediante la tinción inmunohistoquímica de IL-17 en aorta abdominal y la expresión de IL-6 en arco aórtico, una citoquina clave en la diferenciación hacia Th17²⁰⁵. A nivel renal y análogamente a lo que ocurría en los niveles de BTLA, no se observaron diferencias en los niveles proteicos de IL-17 y ROR γ t en ratones sometidos a una nefrectomía subtotal (ApoE^{-/-} + 5/6Nx) al compararlos con ratones control (ApoE^{-/-}). En este sentido, estudios previos han demostrado que la deficiencia génica o el bloqueo de IL-17 no presentan efectos beneficiosos en el desarrollo de la ERC a nivel preclínico^{265,266}, indicando una posible limitación de estos modelos experimentales en el estudio de la señalización por IL-17. Sin embargo, estudios previos han demostrado un papel de la respuesta mediada por IL-17 en otros modelos experimentales de daño renal como modelos de glomerulonefritis o daño renal inducido por angiotensina II²⁶⁷⁻²⁷¹. Nuestros resultados mostraron un aumento renal de los niveles proteicos de IL-17 y ROR γ t en un modelo experimental de daño renal inducido por angiotensina II y un modelo experimental de glomerulonefritis rápidamente progresiva. Además, nuestros resultados obtenidos en linfocitos T tratados con suero urémico durante 48 horas, mostraron una clara regulación de IL-17 y ROR γ t dependiente de la uremia. Todos estos resultados sugieren por primera vez que, de la misma forma que ocurre en otras enfermedades inflamatorias previamente mencionadas, la bajada de BTLA se relacionaría con un aumento en la producción de IL-17 en aterosclerosis y enfermedad renal. Sin embargo, se requieren futuros estudios para corroborar dicha hipótesis.

Varios estudios han descrito un papel importante de los micro-ARNs en la regulación de la respuesta mediada por células Th17. En esta tesis se demuestra como el bloqueo de miR-500a-3p, con un antagomir específico, en linfocitos T estimulados con

suero urémico, disminuye el aumento proteico de IL-17A y ROR γ t inducido por la uremia. Estos resultados demuestran, por primera vez, la posible modulación de la vía de señalización de IL-17A por miR-500a-3p. En este sentido, estudios previos han descrito algunos micro-ARNs como miR-20b o miR-30a como reguladores negativos en la diferenciación de las células Th17 en enfermedades autoinmunitarias, regulando genes clave en el proceso de diferenciación de las células Th17 como ROR γ t, IL-21R y STAT3^{513,514}. Además, la expresión de miR-34a en nefropatía diabética aumenta la presencia de citoquinas proinflamatorias como IL-17 mediante la modulación de la vía de señalización SIRT1/NF- κ B⁵¹⁵. En el contexto renal, pocos estudios relacionan la participación de micro-ARNs en la diferenciación hacia Th17⁵¹⁶. En un modelo experimental de glomerulonefritis rápidamente progresiva, el bloqueo de miR-155 modula la respuesta inmunitaria mediada por linfocitos Th17 así como algunas características histológicas de daño renal, incluida la formación de las medias lunas características de esta enfermedad⁵¹⁷. En esta tesis, se postula una regulación en la respuesta Th17 dependiente de miR-500a-3p, el cuál podría estar controlando dicha regulación a través de BTLA como intermediario, aunque se requieren más estudios para testar dicha hipótesis. A pesar de nuestros datos identificando miR-500a-3p como una potente diana terapéutica, la falta de secuencia murina para este micro-ARN impide el estudio preclínico en modelos murinos de terapias contra miR-500a-3p.

CONCLUSIONES

1. BTLA puede ser usado como un posible biomarcador predictivo en el inicio del proceso aterosclerótico en pacientes renales.
2. miR-23a-3p, miR-652-3p y miR-500a-3p pueden ser identificados como biomarcadores de la aparición de placa aterosclerótica, así como de la progresión de la misma en pacientes con ERC.
3. miR-185-5p, miR-629-5p, miR-362-5p y miR-130b-5p, podrían ser utilizados como biomarcadores para predecir la progresión de placa aterosclerótica ya establecida en pacientes con ERC.
4. A nivel experimental, la enfermedad renal crónica acelera el proceso aterosclerótico debido a una desregulación del perfil lipídico, el tamaño y el componente inflamatorio y fibrótico de la placa aterosclerótica.
5. La expresión de miR-23a-3p en arco aórtico de un modelo experimental de aterosclerosis acelerada por ERC, se correlaciona inversamente con la expresión de NEK7 y no presenta correlación con los niveles de CUL3.
6. BTLA se encuentra desregulado durante el proceso aterosclerótico en un modelo experimental de aterosclerosis acelerada por ERC, así como en diferentes modelos de daño renal experimental y en muestras de pacientes con ERC.
7. Los linfocitos T son los principales tipos celulares involucrados en la desregulación de BTLA en condiciones de uremia.
8. miR-500a-3p regula los niveles de expresión de BTLA en condiciones de uremia en linfocitos T.
9. La vía de señalización de IL-17 se encuentra exacerbada en un modelo experimental de aterosclerosis acelerada por ERC, así como en diferentes modelos de daño renal experimental y en muestras de pacientes con ERC.
10. La vía de señalización de IL-17 se encuentra regulada por miR-500a-3p en condiciones de uremia en linfocitos T.

BIBLIOGRAFÍA

1. Jager KJ, Kovesdy C, Langham R, Rosenberg M, Jha V, Zoccali C. A single number for advocacy and communication-worldwide more than 850 million individuals have kidney diseases. *Kidney Int.* 2019;96(5):1048-1050. doi:10.1016/J.KINT.2019.07.012
2. Foreman KJ, Marquez N, Dolgert A, et al. Forecasting life expectancy, years of life lost, and all-cause and cause-specific mortality for 250 causes of death: reference and alternative scenarios for 2016-40 for 195 countries and territories. *Lancet (London, England).* 2018;392(10159):2052-2090. doi:10.1016/S0140-6736(18)31694-5
3. Brück K, Stel VS, Gambaro G, et al. CKD prevalence varies across the European general population. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(7):2135-2147. doi:10.1681/ASN.2015050542/-/DCSUPPLEMENTAL
4. Gorostidi M, Sánchez-Martínez M, Ruilope LM, et al. Chronic kidney disease in Spain: Prevalence and impact of accumulation of cardiovascular risk factors. *Nefrología.* 2018;38(6):606-615. doi:10.1016/J.NEFRO.2018.04.004
5. González AO, de Francisco A, Gayoso P, García F. Prevalence of chronic renal disease in Spain: results of the EPIRCE study. *Nefrología.* 2010;30(1):78-86. doi:10.3265/NEFROLOGIA.PRE2009.DIC.5732
6. Sociedad Española de nefrología. La enfermedad renal crónica en España 2020. <https://seden.org/documentos/la-enfermedad-renal-cronica-erc-en-espana-2022>. Published 2020.
7. Levin A, Stevens PE. Summary of KDIGO 2012 CKD Guideline: behind the scenes, need for guidance, and a framework for moving forward. *Kidney Int.* 2014;85(1):49-61. doi:10.1038/KI.2013.444
8. Gansevoort RT, De Jong PE. The case for using albuminuria in staging chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(3):465-468. doi:10.1681/ASN.2008111212
9. Xie Y, Bowe B, Mokdad AH, et al. Analysis of the Global Burden of Disease study highlights the global, regional, and national trends of chronic kidney disease epidemiology from 1990 to 2016. *Kidney Int.* 2018;94(3):567-581. doi:10.1016/J.KINT.2018.04.011
10. Kovesdy CP, Furth SL, Zoccali C. Obesity and Kidney Disease: Hidden Consequences of the Epidemic. *Can J kidney Heal Dis.* 2017;4. doi:10.1177/2054358117698669
11. Bolognani D, Mattace-Raso F, Sijbrands EJG, Zoccali C. The aging kidney revisited: a systematic review. *Ageing Res Rev.* 2014;14(1):65-80. doi:10.1016/J.ARR.2014.02.003
12. Sykes L, Asar O, Ritchie J, et al. The influence of multiple episodes of acute kidney injury on survival and progression to end stage kidney disease in patients with chronic kidney disease. *PLoS One.* 2019;14(7). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0219828
13. Pannu N, Nadim MK. An overview of drug-induced acute kidney injury. *Crit Care Med.* 2008;36(4 Suppl). doi:10.1097/CCM.0B013E318168E375
14. Rosenberg AZ, Naicker S, Winkler CA, Kopp JB. HIV-associated nephropathies: epidemiology, pathology, mechanisms and treatment. *Nat Rev Nephrol.* 2015;11(3):150-160. doi:10.1038/NRNEPH.2015.9
15. Azmi AN, Tan SS, Mohamed R. Hepatitis C and kidney disease: An overview and approach to management. *World J Hepatol.* 2015;7(1):78-92. doi:10.4254/WJH.V7.I1.78
16. Babitt JL, Lin HY. Mechanisms of anemia in CKD. *Am Soc Nephrol.* 2012;23(10):1631-1634. doi:10.1681/ASN.2011111078
17. Melamed ML, Raphael KL. Metabolic Acidosis in CKD: A Review of Recent Findings. *Kidney Med.* 2021;3(2):267-277. doi:10.1016/J.XKME.2020.12.006
18. Moe S, Drüeke T, Cunningham J, et al. Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* 2006;69(11):1945-1953. doi:10.1038/SJ.KI.5000414
19. M Liu , X-C Li, L Lu, Y Cao, R-R Sun, S Chen P-YZ. Cardiovascular disease and its relationship with chronic kidney disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014;18(19):2918-2926.
20. Etehad D, Emdin CA, Kiran A, et al. Blood pressure lowering for prevention of cardiovascular disease and death: a systematic review and meta-analysis. *Lancet (London, England).* 2016;387(10022):957-967. doi:10.1016/S0140-6736(15)01225-8
21. R Alcázar , M I Egocheaga, L Orte, J M Lobos, E González Parra, F Alvarez Guisasola, J L Górriz, J F Navarro

- ALM de F. SEN-SEMFYC consensus document on chronic kidney disease. *Nefrología*. 2008;28(3):273-282.
22. Goovaerts T, Bagnis Isnard C, Crepaldi C, et al. Continuing education: preparing patients to choose a renal replacement therapy. *J Ren Care*. 2015;41(1):62-75. doi:10.1111/JORC.12106
 23. Rayego-Mateos S, Goldschmeding R, Ruiz-Ortega M. Inflammatory and Fibrotic Mediators in Renal Diseases. *Mediators Inflamm*. 2019;2019. doi:10.1155/2019/7025251
 24. Rayego-Mateos S, Marquez-Expósito L, Rodrigues-Diez R, et al. Molecular Mechanisms of Kidney Injury and Repair. *Int J Mol Sci*. 2022;23(3). doi:10.3390/IJMS23031542
 25. Tampe D, Zeisberg M. Potential approaches to reverse or repair renal fibrosis. *Nat Rev Nephrol*. 2014;10(4):226-237. doi:10.1038/NRNEPH.2014.14
 26. Jones SA, Fraser DJ, Fielding CA, Jones GW. Interleukin-6 in renal disease and therapy. *Nephrol Dial Transplant*. 2015;30(4):564-574. doi:10.1093/NDT/GFU233
 27. Afsar B, Covic A, Ortiz A, Afsar RE, Kanbay M. The Future of IL-1 Targeting in Kidney Disease. *Drugs*. 2018;78(11):1073-1083. doi:10.1007/S40265-018-0942-2
 28. Hernandez T, Mayadas T. Immunoregulatory role of TNFalpha in inflammatory kidney diseases. *Kidney Int*. 2009;76(3):262-276. doi:10.1038/KI.2009.142
 29. Shappell SB, Mendoza LH, Gurpinar T, Smith CW, Suki WN, Truong LD. Expression of adhesion molecules in kidney with experimental chronic obstructive uropathy: the pathogenic role of ICAM-1 and VCAM-1. *Nephron*. 2000;85(2):156-166. doi:10.1159/000045649
 30. Zoja C, Garcia PB, Remuzzi G. The role of chemokines in progressive renal disease. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009;14(5):1815-1822. doi:10.2741/3343
 31. Ong ACM, von Websky K, Hoher B. Endothelin and tubulointerstitial renal disease. *Semin Nephrol*. 2015;35(2):197-207. doi:10.1016/J.SEMNEPHROL.2015.03.004
 32. Navar LG, Inscho EW, Majid DSA, Imig JD, Harrison-Bernard LM, Mitchell KD. Paracrine regulation of the renal microcirculation. *Physiol Rev*. 1996;76(2):425-536. doi:10.1152/PHYSREV.1996.76.2.425
 33. Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Lorenzo O, et al. Angiotensin II regulates the synthesis of proinflammatory cytokines and chemokines in the kidney. *Kidney Int Suppl*. 2002;62(82):S12-S22. doi:10.1046/J.1523-1755.62.S82.4.X
 34. Boor P, Floege J. Chronic kidney disease growth factors in renal fibrosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2011;38(7):441-450. doi:10.1111/J.1440-1681.2011.05487.X
 35. Daenen K, Andries A, Mekahli D, Van Schepdael A, Jouret F, Bammens B. Oxidative stress in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*. 2019;34(6):975-991. doi:10.1007/S00467-018-4005-4
 36. Medzhitov R. The spectrum of inflammatory responses. *Science*. 2021;374(6571):1070-1075. doi:10.1126/SCIENCE.ABI5200
 37. Zhang H, Sun SC. NF-κB in inflammation and renal diseases. *Cell Biosci*. 2015;5(1). doi:10.1186/S13578-015-0056-4
 38. Han J, Pang X, Zhang Y, Peng Z, Shi X, Xing Y. Hirudin Protects Against Kidney Damage in Streptozotocin-Induced Diabetic Nephropathy Rats by Inhibiting Inflammation via P38 MAPK/NF-κB Pathway. *Drug Des Devel Ther*. 2020;14:3223-3234. doi:10.2147/DDDT.S257613
 39. Panizo S, Martínez-Arias L, Alonso-Montes C, et al. Fibrosis in Chronic Kidney Disease: Pathogenesis and Consequences. *Int J Mol Sci*. 2021;22(1):1-19. doi:10.3390/IJMS22010408
 40. Genovese F, Manresa AA, Leeming DJ, Karsdal MA, Boor P. The extracellular matrix in the kidney: a source of novel non-invasive biomarkers of kidney fibrosis? *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2014;7(1). doi:10.1186/1755-1536-7-4
 41. Yuan Q, Tan RJ, Liu Y. Myofibroblast in Kidney Fibrosis: Origin, Activation, and Regulation. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1165:253-283. doi:10.1007/978-981-13-8871-2_12
 42. Sato Y, Yanagita M. Resident fibroblasts in the kidney: a major driver of fibrosis and inflammation. *Inflamm Regen*. 2017;37(1). doi:10.1186/S41232-017-0048-3

43. Lovisa S, LeBleu VS, Tampe B, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis. *Nat Med*. 2015;21(9):998-1009. doi:10.1038/NM.3902
44. Li J, Qu X, Bertram JF. Endothelial-myofibroblast transition contributes to the early development of diabetic renal interstitial fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mice. *Am J Pathol*. 2009;175(4):1380-1388. doi:10.2353/AJPATH.2009.090096
45. Li J, Deane JA, Campanale N V., Bertram JF, Ricardo SD. The contribution of bone marrow-derived cells to the development of renal interstitial fibrosis. *Stem Cells*. 2007;25(3):697-706. doi:10.1634/STEMCELLS.2006-0133
46. Lebleu VS, Taduri G, O'Connell J, et al. Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nat Med*. 2013;19(8):1047-1053. doi:10.1038/NM.3218
47. Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol*. 2016;12(6):325-338. doi:10.1038/NRNEPH.2016.48
48. Toda N, Mukoyama M, Yanagita M, Yokoi H. CTGF in kidney fibrosis and glomerulonephritis. *Inflamm Regen*. 2018;38(1). doi:10.1186/S41232-018-0070-0
49. Aguilar A. Renal fibrosis: PDGF-D in renal fibrosis. *Nat Rev Nephrol*. 2016;12(5):257. doi:10.1038/NRNEPH.2016.31
50. Frostegård J. Immunity, atherosclerosis and cardiovascular disease. *BMC Med*. 2013;11(1). doi:10.1186/1741-7015-11-117
51. Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res*. 2014;114(12):1852-1866. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.302721
52. World health organization. Cardiovascular diseases (CVDs). [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)). Published 2021.
53. Timmis A, Townsend N, Gale CP, et al. European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2019. *Eur Heart J*. 2020;41(1):12-85. doi:10.1093/EURHEARTJ/EHZ859
54. Estadística I nacional de Defunciones según la Causa de Muerte. https://www.ine.es/prensa/edcm_2020.pdf. Published 2021.
55. Anguita Sánchez M, Lambert Rodríguez JL, Bover Freire R, et al. Classification and Quality Standards of Heart Failure Units: Scientific Consensus of the Spanish Society of Cardiology. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2016;69(10):940-950. doi:10.1016/J.REC.2016.06.006
56. Fernández-Friera L, Peñalvo JL, Fernández-Ortiz A, et al. Prevalence, Vascular Distribution, and Multiterritorial Extent of Subclinical Atherosclerosis in a Middle-Aged Cohort: The PESA (Progression of Early Subclinical Atherosclerosis) Study. *Circulation*. 2015;131(24):2104-2113. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.014310
57. Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, et al. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study. *J Am Coll Cardiol*. 2020;76(25):2982-3021. doi:10.1016/J.JACC.2020.11.010
58. Borén J, John Chapman M, Krauss RM, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease: pathophysiological, genetic, and therapeutic insights: a consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J*. 2020;41(24):2313-2330. doi:10.1093/EURHEARTJ/EHZ962
59. Nordestgaard BG, Varbo A. Triglycerides and cardiovascular disease. *Lancet (London, England)*. 2014;384(9943):626-635. doi:10.1016/S0140-6736(14)61177-6
60. Tsimikas S, Hall JL. Lipoprotein(a) as a potential causal genetic risk factor of cardiovascular disease: a rationale for increased efforts to understand its pathophysiology and develop targeted therapies. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60(8):716-721. doi:10.1016/J.JACC.2012.04.038
61. Pan WH, Bai CH, Chen JR, Chiu HC. Associations between carotid atherosclerosis and high factor VIII activity, dyslipidemia, and hypertension. *Stroke*. 1997;28(1):88-94. doi:10.1161/01.STR.28.1.88
62. Attar A, Sayadi M, Jannati M. Effect of intensive blood pressure lowering on cardiovascular outcomes based on cardiovascular risk: A secondary analysis of the SPRINT trial. *Eur J Prev Cardiol*. 2019;26(3):238-245.

- doi:10.1177/2047487318800741
63. Pedro-Botet J, Climent E, Benaiges D. Atherosclerosis and inflammation. New therapeutic approaches. *Med Clin (Barc)*. 2020;155(6):256-262. doi:10.1016/J.MEDCLI.2020.04.024
 64. Lavie CJ, Laddu D, Arena R, Ortega FB, Alpert MA, Kushner RF. Healthy Weight and Obesity Prevention: JACC Health Promotion Series. *J Am Coll Cardiol*. 2018;72(13):1506-1531. doi:10.1016/J.JACC.2018.08.1037
 65. Libby P. The changing landscape of atherosclerosis. *Nature*. 2021;592(7855):524-533. doi:10.1038/S41586-021-03392-8
 66. Gómez-Pardo E, Fernández-Alvira JM, Vilanova M, et al. A Comprehensive Lifestyle Peer Group-Based Intervention on Cardiovascular Risk Factors: The Randomized Controlled Fifty-Fifty Program. *J Am Coll Cardiol*. 2016;67(5):476-485. doi:10.1016/J.JACC.2015.10.033
 67. Masana LS, Ros E, Sudano I, et al. Is there a role for lifestyle changes in cardiovascular prevention? What, when and how? *Atheroscler Suppl*. 2017;26:2-15. doi:10.1016/S1567-5688(17)30020-X
 68. Baigent C, Blackwell L, Emberson J, et al. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. *Lancet (London, England)*. 2010;376(9753):1670-1681. doi:10.1016/S0140-6736(10)61350-5
 69. Robillard R, Fontaine C, Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Fibrates. *Handb Exp Pharmacol*. 2005;170(170):389-406. doi:10.1007/3-540-27661-0_14
 70. Perkins WJ. Combination lipid therapy in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2010;363(7):694; author reply 694-5. doi:10.1056/NEJMc1006407
 71. Sabatine MS, Giugliano RP, Wiviott SD, et al. Efficacy and safety of evolocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2015;372(16):1500-1509. doi:10.1056/NEJMOA1500858
 72. Robinson JG, Farnier M, Krempf M, et al. Efficacy and safety of alirocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2015;372(16):1489-1499. doi:10.1056/NEJMOA1501031
 73. Oparil S, Acelajado MC, Bakris GL, et al. Hypertension. *Nat Rev Dis Prim*. 2018;4. doi:10.1038/NRDP.2018.14
 74. Wang Y, Kuang ZM, Feng SJ, et al. Combined antihypertensive and statin therapy for the prevention of cardiovascular events in patients with hypertension without complications: protocol for a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*. 2018;8(5). doi:10.1136/BMJOPEN-2017-019719
 75. Zheng SL, Roddick AJ. Association of Aspirin Use for Primary Prevention With Cardiovascular Events and Bleeding Events: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA*. 2019;321(3):277-287. doi:10.1001/JAMA.2018.20578
 76. Connolly SJ, Eikelboom JW, Bosch J, et al. Rivaroxaban with or without aspirin in patients with stable coronary artery disease: an international, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet (London, England)*. 2018;391(10117):205-218. doi:10.1016/S0140-6736(17)32458-3
 77. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, et al. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med*. 2017;377(12):1119-1131. doi:10.1056/NEJMOA1707914
 78. Berman JP, Farkouh ME, Rosenson RS. Emerging anti-inflammatory drugs for atherosclerosis. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2013;18(2):193-205. doi:10.1517/14728214.2013.801453
 79. Rhodin JAG. Ultrastructure of mammalian venous capillaries, venules, and small collecting veins. *J Ultrastruct Res*. 1968;25(5):452-500. doi:10.1016/S0022-5320(68)80098-X
 80. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*. 2001;104(4):503-516. doi:10.1016/S0092-8674(01)00238-0
 81. Silva T, Jäger W, Neuss-Radu M, Sequeira A. Modeling of the early stage of atherosclerosis with emphasis on the regulation of the endothelial permeability. *J Theor Biol*. 2020;496:110229. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32259543/>. Accessed April 15, 2020.
 82. Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev Y V. Effects of shear stress on endothelial cells: go with the flow. *Acta Physiol (Oxf)*. 2017;219(2):382-408. doi:10.1111/APHA.12725
 83. Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial dysfunction in hypercholesterolemia: mechanisms, pathophysiological importance, and therapeutic interventions. *Semin Thromb Hemost*. 2000;26(5):529-537.

- doi:10.1055/S-2000-13209
84. Hsiai TK, Cho SK, Wong PK, et al. Monocyte recruitment to endothelial cells in response to oscillatory shear stress. *FASEB J*. 2003;17(12):1648-1657. doi:10.1096/FJ.02-1064COM
 85. Malek AM, Gibbons GH, Dzau VJ, Izumo S. Fluid shear stress differentially modulates expression of genes encoding basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor B chain in vascular endothelium. *J Clin Invest*. 1993;92(4):2013-2021. doi:10.1172/JCI116796
 86. Esper RJ, Nordaby RA, Vilariño JO, Paragano A, Cacharrón JL, Machado RA. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovasc Diabetol*. 2006;5. doi:10.1186/1475-2840-5-4
 87. Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol*. 2003;91(3A):7-11. doi:10.1016/S0002-9149(02)03144-2
 88. Takahashi Y, Zhu H, Yoshimoto T. Essential roles of lipoxygenases in LDL oxidation and development of atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal*. 2005;7(3-4):425-431. doi:10.1089/ARS.2005.7.425
 89. Rosenson RS, Stafforini DM. Modulation of oxidative stress, inflammation, and atherosclerosis by lipoprotein-associated phospholipase A2. *J Lipid Res*. 2012;53(9):1767-1782. doi:10.1194/JLR.R024190
 90. Malekmohammad K, Sewell RDE, Rafieian-Kopaei M. Antioxidants and Atherosclerosis: Mechanistic Aspects. *Biomolecules*. 2019;9(8). doi:10.3390/BIOM9080301
 91. H Esterbauer, G Jürgens, O Quehenberger EK. Autoxidation of human low density lipoprotein: loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes. *J Lipid Res*. 1987;28(5):495-509.
 92. Hansson GK, Robertson AKL, Söderberg-Nauclér C. Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol*. 2006;1:297-329. doi:10.1146/ANNUREV.PATHOL.1.110304.100100
 93. Gerhardt T, Ley K. Monocyte trafficking across the vessel wall. *Cardiovasc Res*. 2015;107(3):321-330. doi:10.1093/CVR/CVV147
 94. Colin S, Chinetti-Gbaguidi G, Staels B. Macrophage phenotypes in atherosclerosis. *Immunol Rev*. 2014;262(1):153-166. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25319333/>. Accessed April 16, 2020.
 95. Moore KJ, Freeman MW. Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(8):1702-1711. doi:10.1161/01.ATV.0000229218.97976.43
 96. Bobryshev Y V. Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis. *Micron*. 2006;37(3):208-222. doi:10.1016/J.MICRON.2005.10.007
 97. Chinetti-Gbaguidi G, Baron M, Bouhlef MA, et al. Human atherosclerotic plaque alternative macrophages display low cholesterol handling but high phagocytosis because of distinct activities of the PPAR γ and LXR α pathways. *Circ Res*. 2011;108(8):985-995. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.233775
 98. Allahverdian S, Chehroudi AC, McManus BM, Abraham T, Francis GA. Contribution of intimal smooth muscle cells to cholesterol accumulation and macrophage-like cells in human atherosclerosis. *Circulation*. 2014;129(15):1551-1559. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.005015
 99. Saigusa R, Winkels H, Ley K. T cell subsets and functions in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*. 2020;17(7):387-401. doi:10.1038/S41569-020-0352-5
 100. Jinnouchi H, Sato Y, Sakamoto A, et al. Calcium deposition within coronary atherosclerotic lesion: Implications for plaque stability. *Atherosclerosis*. 2020;306:85-95. doi:10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2020.05.017
 101. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420(6917):868-874. doi:10.1038/NATURE01323
 102. Stefanadis C, Antoniou CK, Tsiachris D, Pietri P. Coronary Atherosclerotic Vulnerable Plaque: Current Perspectives. *J Am Heart Assoc*. 2017;6(3). doi:10.1161/JAHA.117.005543
 103. Slager CJ, Wentzel JJ, Gijsen FJH, et al. The role of shear stress in the generation of rupture-prone vulnerable plaques. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2005;2(8):401-407. doi:10.1038/NCPCARDIO0274
 104. Vergallo R, Crea F. Atherosclerotic Plaque Healing. *N Engl J Med*. 2020;383(9):846-857. doi:10.1056/NEJMRA2000317
 105. Thanvi B, Robinson T. Complete occlusion of extracranial internal carotid artery: clinical features,

- pathophysiology, diagnosis and management. *Postgrad Med J*. 2007;83(976):95-99. doi:10.1136/PGMJ.2006.048041
106. MR L, DB T, GT D, RH P, TJ P. Arterial embolism. *Int J Crit Illn Inj Sci*. 2013;3(1):449-462. doi:10.4103/2229-5151.109429
 107. Vanholder R, Massy Z, Argiles A, et al. Chronic kidney disease as cause of cardiovascular morbidity and mortality. *Nephrol Dial Transplant*. 2005;20(6):1048-1056. doi:10.1093/NDT/GFH813
 108. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu C. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med*. 2004;351(13):1296-1305. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15385656/>. Accessed April 22, 2020.
 109. Culeton BF, Larson MG, Wilson PWF, Evans JC, Parfrey PS, Levy D. Cardiovascular disease and mortality in a community-based cohort with mild renal insufficiency. *Kidney Int*. 1999;56(6):2214-2219. doi:10.1046/J.1523-1755.1999.00773.X
 110. Henry RMA, Kostense PJ, Bos G, et al. Mild renal insufficiency is associated with increased cardiovascular mortality: The Hoorn Study. *Kidney Int*. 2002;62(4):1402-1407. doi:10.1111/J.1523-1755.2002.KID571.X
 111. Astor BC, Hallan SI, Miller ER, Yeung E, Coresh J. Glomerular filtration rate, albuminuria, and risk of cardiovascular and all-cause mortality in the US population. *Am J Epidemiol*. 2008;167(10):1226-1234. doi:10.1093/AJE/KWN033
 112. Matsushita K, van der Velde M, Astor BC, et al. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *Lancet (London, England)*. 2010;375(9731):2073-2081. doi:10.1016/S0140-6736(10)60674-5
 113. Van Der Velde M, Matsushita K, Coresh J, et al. Lower estimated glomerular filtration rate and higher albuminuria are associated with all-cause and cardiovascular mortality. A collaborative meta-analysis of high-risk population cohorts. *Kidney Int*. 2011;79(12):1341-1352. doi:10.1038/KI.2010.536
 114. Cozzolino M, Galassi A, Pivari F, Ciceri P, Conte F. The Cardiovascular Burden in End-Stage Renal Disease. *Contrib Nephrol*. 2017;191:44-57. doi:10.1159/000479250
 115. Lindner A, Charra B, Sherrard DJ, Scribner BH. Accelerated atherosclerosis in prolonged maintenance hemodialysis. *N Engl J Med*. 1974;290(13):697-701. doi:10.1056/NEJM197403282901301
 116. Jungers P, Massy ZA, Nguyen Khoa T, et al. Incidence and risk factors of atherosclerotic cardiovascular accidents in predialysis chronic renal failure patients: a prospective study. *Nephrol Dial Transplant*. 1997;12(12):2597-2602. doi:10.1093/NDT/12.12.2597
 117. Manjunath G, Tighiouart H, Ibrahim H, et al. Level of kidney function as a risk factor for atherosclerotic cardiovascular outcomes in the community. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41(1):47-55. doi:10.1016/S0735-1097(02)02663-3
 118. Rigatto C, Levin A, House AA, Barrett B, Carlisle E, Fine A. Atheroma progression in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4(2):291-298. doi:10.2215/CJN.01840408
 119. Gracia M, Betriu À, Martínez-Alonso M, et al. Predictors of Subclinical Atheromatosis Progression over 2 Years in Patients with Different Stages of CKD. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2016;11(2):287-296. doi:10.2215/CJN.01240215
 120. Kamouchi M. Stroke features and management in patients with chronic kidney disease. *Contrib Nephrol*. 2013;179:92-99. doi:10.1159/000346727
 121. Alprecht-Quiroz P, Zúñiga-Pineda B, Lara-Terán JJ, Cáceres-Vinueza S V., Duarte-Vera YC. [Cardiorenal syndrome: Clinical and echocardiographic aspects]. *Arch Cardiol Mex*. 2020;90(4):503-510. doi:10.24875/ACM.20000087
 122. Valdivielso JM, Rodríguez-Puyol D, Pascual J, et al. Atherosclerosis in Chronic Kidney Disease: More, Less, or Just Different? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019;39(10):1938-1966. doi:10.1161/ATVBAHA.119.312705
 123. C van Guldener, J Lambert, M J Janssen, A J Donker CDS. Endothelium-dependent vasodilatation and distensibility of large arteries in chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 1997;12(suppl 2):14-18.
 124. Van Guldener C, Janssen MJFM, Lambert J, Steyn M, Donker AJM, Stehouwer CDA. Endothelium-dependent

- vasodilatation is impaired in peritoneal dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 1998;13(7):1782-1786. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9681728/>. Accessed September 15, 2022.
125. Thambyrajah J, Landray MJ, McGlynn FJ, Jones HJ, Wheeler DC, Townend JN. Abnormalities of endothelial function in patients with predialysis renal failure. *Heart*. 2000;83(2):205-209. doi:10.1136/HEART.83.2.205
 126. Bolton CH, Downs LG, Victory JGG, et al. Endothelial dysfunction in chronic renal failure: roles of lipoprotein oxidation and pro-inflammatory cytokines. *Nephrol Dial Transplant*. 2001;16(6):1189-1197. doi:10.1093/NDT/16.6.1189
 127. Schiffrin EL, Lipman ML, Mann JFE. Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system. *Circulation*. 2007;116(1):85-97. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.678342
 128. Ceballos-Picot I, Witko-Sarsat V, Merad-Boudia M, et al. Glutathione antioxidant system as a marker of oxidative stress in chronic renal failure. *Free Radic Biol Med*. 1996;21(6):845-853. doi:10.1016/0891-5849(96)00233-X
 129. Kamisha L Johnson-Davis, Colby Fernelius, Nathan B Eliason, Andrew Wilson, Srinivasan Beddhu WLR. Blood enzymes and oxidative stress in chronic kidney disease: a cross sectional study. *Ann Clin Lab Sci*. 2011;41(4):331-339.
 130. Liakopoulos V, Roumeliotis S, Gorny X, Dounousi E, Mertens PR. Oxidative Stress in Hemodialysis Patients: A Review of the Literature. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017. doi:10.1155/2017/3081856
 131. Kattoor AJ, Pothineni NVK, Palagiri D, Mehta JL. Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2017;19(11):42. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28921056/>. Accessed May 12, 2020.
 132. Modaresi A, Nafar M, Sahraei Z, Atieh Modaresi, Mohsen Nafar ZS. Oxidative stress in chronic kidney disease. *Iran J Kidney Dis*. 2015;9(3):165-179. doi:10.1186/s41100-018-0195-2
 133. Imig JD, Ryan MJ. Immune and inflammatory role in renal disease. *Compr Physiol*. 2013;3(2):957-976. doi:10.1002/CPHY.C120028
 134. Watanabe H, Miyamoto Y, Enoki Y, et al. p-Cresyl sulfate, a uremic toxin, causes vascular endothelial and smooth muscle cell damages by inducing oxidative stress. *Pharmacol Res Perspect*. 2015;3(1):1-12. doi:10.1002/PRP2.92
 135. Wautier MP, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM, Wautier JL. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001;280(5). doi:10.1152/AJPENDO.2001.280.5.E685
 136. Sakashita M, Tanaka T, Inagi R. Metabolic Changes and Oxidative Stress in Diabetic Kidney Disease. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. 2021;10(7). doi:10.3390/ANTIOX10071143
 137. Raghavan S, Singh NK, Mani AM, Rao GN. Protease-activated receptor 1 inhibits cholesterol efflux and promotes atherogenesis via cullin 3-mediated degradation of the ABCA1 transporter. *J Biol Chem*. 2018;293(27):10574-10589. doi:10.1074/JBC.RA118.003491
 138. Ferdaus MZ, McCormick JA. The CUL3/KLHL3-WNK-SPAK/OSR1 pathway as a target for antihypertensive therapy. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016;310(11):F1389-F1396. doi:10.1152/AJPRENAL.00132.2016
 139. Agbor LN, Ibeawuchi SRC, Hu C, et al. Cullin-3 mutation causes arterial stiffness and hypertension through a vascular smooth muscle mechanism. *JCI insight*. 2016;1(19). doi:10.1172/JCI.INSIGHT.91015
 140. Schwarz U, Buzello M, Ritz E, et al. Morphology of coronary atherosclerotic lesions in patients with end-stage renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 2000;15(2):218-223. doi:10.1093/NDT/15.2.218
 141. Sigrist M, Bungay P, Taal MW, McIntyre CW. Vascular calcification and cardiovascular function in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(3):707-714. doi:10.1093/NDT/GFI236
 142. Fox CS, Larson MG, Vasan RS, et al. Cross-sectional association of kidney function with valvular and annular calcification: the Framingham heart study. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(2):521-527. doi:10.1681/ASN.2005060627
 143. Bermudez-Lopez M, Forne C, Amigo N, et al. An in-depth analysis shows a hidden atherogenic lipoprotein profile in non-diabetic chronic kidney disease patients. *Expert Opin Ther Targets*. 2019;23(7):619-630. doi:10.1080/14728222.2019.1620206
 144. Bermúdez-López M, Arroyo D, Betriu À, Masana L, Fernández E, Valdivielso JM. New perspectives on CKD-

- induced dyslipidemia. *Expert Opin Ther Targets*. 2017;21(10):967-976. doi:10.1080/14728222.2017.1369961
145. Singh A, Tandon S, Tandon C. An update on vascular calcification and potential therapeutics. *Mol Biol Rep*. 2021;48(1):887-896. doi:10.1007/S11033-020-06086-Y
 146. Wanner C, Tonelli M. KDIGO Clinical Practice Guideline for Lipid Management in CKD: summary of recommendation statements and clinical approach to the patient. *Kidney Int*. 2014;85(6):1303-1309. doi:10.1038/KI.2014.31
 147. Zheng-Lin B Bin, Ortiz A. Lipid Management in Chronic Kidney Disease: Systematic Review of PCSK9 Targeting. *Drugs*. 2018;78(2):215-229. doi:10.1007/S40265-017-0858-2
 148. Ridker PM, Rane M. Interleukin-6 Signaling and Anti-Interleukin-6 Therapeutics in Cardiovascular Disease. *Circ Res*. 2021;128(11):1728-1746. doi:10.1161/CIRCRESAHA.121.319077
 149. Wang S, Eide TC, Sogn EM, Berg KJ, Sund RB. Plasma ascorbic acid in patients undergoing chronic haemodialysis. *Eur J Clin Pharmacol*. 1999;55(7):527-532. doi:10.1007/S002280050668
 150. Singh U, Devaraj S, Jialal I. Vitamin E, oxidative stress, and inflammation. *Annu Rev Nutr*. 2005;25:151-174. doi:10.1146/ANNUREV.NUTR.24.012003.132446
 151. Liu F, Zhang X, Qi H, et al. Correlation of serum magnesium with cardiovascular risk factors in maintenance hemodialysis patients--a cross-sectional study. *Magnes Res*. 2013;26(3):100-108. doi:10.1684/MRH.2013.0344
 152. Gupta J, Mitra N, Kanetsky PA, et al. Association between albuminuria, kidney function, and inflammatory biomarker profile in CKD in CRIC. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012;7(12):1938-1946. doi:10.2215/CJN.03500412
 153. Zheng F, Xing S, Gong Z, Xing Q. NLRP3 inflammasomes show high expression in aorta of patients with atherosclerosis. *Heart Lung Circ*. 2013;22(9):746-750. doi:10.1016/J.HLC.2013.01.012
 154. Buelvas-Jiménez N, Suárez-Useche RJ, Vielma-Guevara JR. NLRP3 inflammasome: A therapeutic option for kidney disease? *Rev Salud Publica (Bogota)*. 2017;19(1):191-200. doi:10.15446/RSAP.V19N1.54415
 155. Schmid-Burgk JL, Chauhan D, Schmidt T, et al. A Genome-wide CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) Screen Identifies NEK7 as an Essential Component of NLRP3 Inflammasome Activation. *J Biol Chem*. 2016;291(1):103-109. doi:10.1074/JBC.C115.700492
 156. Cai H, Wang P, Zhang B, Dong X. Expression of the NEK7/NLRP3 inflammasome pathway in patients with diabetic lower extremity arterial disease. *BMJ open diabetes Res care*. 2020;8(2). doi:10.1136/BMJDR-2020-001808
 157. Cohen SD, Phillips TM, Khetpal P, Kimmel PL. Cytokine patterns and survival in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25(4):1239-1243. doi:10.1093/NDT/GFP625
 158. Honda H, Qureshi AR, Heimbürger O, et al. Serum albumin, C-reactive protein, interleukin 6, and fetuin a as predictors of malnutrition, cardiovascular disease, and mortality in patients with ESRD. *Am J Kidney Dis*. 2006;47(1):139-148. doi:10.1053/J.AJKD.2005.09.014
 159. Sun J, Axelsson J, Machowska A, et al. Biomarkers of Cardiovascular Disease and Mortality Risk in Patients with Advanced CKD. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2016;11(7):1163-1172. doi:10.2215/CJN.10441015
 160. Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev*. 2006;86(2):515-581. doi:10.1152/PHYSREV.00024.2005
 161. Viegas C, Araújo N, Marreiros C, Simes D. The interplay between mineral metabolism, vascular calcification and inflammation in Chronic Kidney Disease (CKD): challenging old concepts with new facts. *Aging (Albany NY)*. 2019;11(12):4274-4299. doi:10.18632/AGING.102046
 162. Düsing P, Zietzer A, Goody PR, et al. Vascular pathologies in chronic kidney disease: pathophysiological mechanisms and novel therapeutic approaches. *J Mol Med (Berl)*. 2021;99(3):335-348. doi:10.1007/S00109-021-02037-7
 163. Moradi H, Ganji S, Kamanna V, Pahl M V., Vaziri ND. Increased monocyte adhesion-promoting capacity of plasma in end-stage renal disease - response to antioxidant therapy. *Clin Nephrol*. 2010;74(4):273-281. doi:10.5414/CNP74273
 164. Tumor Z, Shimizu H, Enomoto A, Miyazaki H, Niwa T. Indoxyl sulfate upregulates expression of ICAM-1 and MCP-1 by oxidative stress-induced NF-kappaB activation. *Am J Nephrol*. 2010;31(5):435-441.

- doi:10.1159/000299798
165. Agrawal S, Gollapudi P, Elahimehr R, Pahl M V., Vaziri ND. Effects of end-stage renal disease and haemodialysis on dendritic cell subsets and basal and LPS-stimulated cytokine production. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25(3):737-746. doi:10.1093/NDT/GFP580
 166. Hesselink DA, Betjes MGH, Verkade MA, Athanassopoulos P, Baan CC, Weimar W. The effects of chronic kidney disease and renal replacement therapy on circulating dendritic cells. *Nephrol Dial Transplant*. 2005;20(9):1868-1873. doi:10.1093/NDT/GFH897
 167. Kitching AR. Dendritic cells in progressive renal disease: some answers, many questions. *Nephrol Dial Transplant*. 2014;29(12):2185-2193. doi:10.1093/NDT/GFU076
 168. Dong X, Swaminathan S, Bachman LA, Croatt AJ, Nath KA, Griffin MD. Antigen presentation by dendritic cells in renal lymph nodes is linked to systemic and local injury to the kidney. *Kidney Int*. 2005;68(3):1096-1108. doi:10.1111/J.1523-1755.2005.00502.X
 169. Panzer U, Kurts C. T cell cross-talk with kidney dendritic cells in glomerulonephritis. *J Mol Med (Berl)*. 2010;88(1):19-26. doi:10.1007/S00109-009-0541-5
 170. Gisterå A, Hansson GK. The immunology of atherosclerosis. *Nat Rev Nephrol*. 2017;13(6):368-380. doi:10.1038/NRNEPH.2017.51
 171. Riera Romo M, Pérez-Martínez D, Castillo Ferrer C. Innate immunity in vertebrates: an overview. *Immunology*. 2016;148(2):125-139. doi:10.1111/IMM.12597
 172. Chaplin DD. 1. Overview of the human immune response. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(2 Suppl Mini-Primer). doi:10.1016/J.JACI.2005.09.034
 173. Sun L, Wang X, Saredy J, Yuan Z, Yang X, Wang H. Innate-adaptive immunity interplay and redox regulation in immune response. *Redox Biol*. 2020;37. doi:10.1016/J.REDOX.2020.101759
 174. Xing Y, Hogquist KA. T-cell tolerance: central and peripheral. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(6):1-15. doi:10.1101/CSHPERSPECT.A006957
 175. T R Mosmann, H Cherwinski, M W Bond, M A Giedlin RLC. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 1986;136(7):2348-2357.
 176. Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2000;85(1):9-18. doi:10.1016/S1081-1206(10)62426-X
 177. L H Glimcher KMM. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev*. 2000;14(14):1693-1711.
 178. Rudensky AY. Regulatory T cells and Foxp3. *Immunol Rev*. 2011;241(1):260-268. doi:10.1111/J.1600-065X.2011.01018.X
 179. R K Gershon KK. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*. 1970;18(5):723-737.
 180. S Sakaguchi , N Sakaguchi, M Asano, M Itoh MT. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995;155(3):1151-1164.
 181. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet*. 2001;27(1):68-73. doi:10.1038/83784
 182. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003;4(4):986-992. doi:10.1038/NI904
 183. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003;299(5609):981-985. doi:10.1126/SCIENCE.1079490
 184. Rubtsov YP, Rasmussen JP, Chi EY, et al. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity*. 2008;28(4):546-558. doi:10.1016/J.IMMUNI.2008.02.017
 185. Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:531-564. doi:10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.25.022106.141623

186. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* 2005;6(11):1123-1132. doi:10.1038/NI1254
187. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature.* 2003;421(6924):744-748. doi:10.1038/NATURE01355
188. Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, et al. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2003;198(12):1951-1957. doi:10.1084/JEM.20030896
189. Gran B, Zhang G-X, Yu S, et al. IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination. *J Immunol.* 2002;169(12):7104-7110. doi:10.4049/JIMMUNOL.169.12.7104
190. Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, De Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem.* 2003;278(3):1910-1914. doi:10.1074/JBC.M207577200
191. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2005;201(2):233-240. doi:10.1084/JEM.20041257
192. Volpe E, Servant N, Zollinger R, et al. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol.* 2008;9(6):650-657. doi:10.1038/NI.1613
193. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nat Immunol.* 2008;9(6):641-649. doi:10.1038/NI.1610
194. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, et al. The orphan nuclear receptor RORgamma directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell.* 2006;126(6):1121-1133. doi:10.1016/J.CELL.2006.07.035
195. Yang XO, Panopoulos AD, Nurieva R, et al. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem.* 2007;282(13):9358-9363. doi:10.1074/JBC.C600321200
196. Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, et al. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity.* 2008;28(1):29-39. doi:10.1016/J.IMMUNI.2007.11.016
197. Wei L, Laurence A, Elias KM, O'Shea JJ. IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner. *J Biol Chem.* 2007;282(48):34605-34610. doi:10.1074/JBC.M705100200
198. Chen Z, Laurence A, Kanno Y, et al. Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(21):8137-8142. doi:10.1073/PNAS.0600666103
199. De Simone V, Franzè E, Ronchetti G, et al. Th17-type cytokines, IL-6 and TNF- α synergistically activate STAT3 and NF- κ B to promote colorectal cancer cell growth. *Oncogene.* 2015;34(27):3493-3503. doi:10.1038/ONC.2014.286
200. Wu B, Wan Y. Molecular control of pathogenic Th17 cells in autoimmune diseases. *Int Immunopharmacol.* 2020;80. doi:10.1016/J.INTIMP.2020.106187
201. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity.* 2006;24(2):179-189. doi:10.1016/J.IMMUNI.2006.01.001
202. Korn T, Bettelli E, Gao W, et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature.* 2007;448(7152):484-487. doi:10.1038/NATURE05970
203. Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, et al. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF- β signalling. *Nature.* 2010;467(7318):967-971. doi:10.1038/NATURE09447
204. Zielinski CE, Mele F, Aschenbrenner D, et al. Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN- γ or IL-10 and are regulated by IL-1 β . *Nature.* 2012;484(7395):514-518. doi:10.1038/NATURE10957
205. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature.* 2006;441(7090):235-238. doi:10.1038/NATURE04753
206. Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, et al. IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human

- T(H)17 cells. *Nature*. 2008;454(7202):350-352. doi:10.1038/NATURE07021
207. Gooderham MJ, Papp KA, Lynde CW. Shifting the focus - the primary role of IL-23 in psoriasis and other inflammatory disorders. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2018;32(7):1111-1119. doi:10.1111/JDV.14868
208. Marwaha AK, Leung NJ, McMurchy AN, Levings MK. TH17 Cells in Autoimmunity and Immunodeficiency: Protective or Pathogenic? *Front Immunol*. 2012;3(JUN). doi:10.3389/FIMMU.2012.00129
209. Acosta-Rodriguez E V., Rivino L, Geginat J, et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol*. 2007;8(6):639-646. doi:10.1038/NI1467
210. Park H, Li Z, Yang XO, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*. 2005;6(11):1133-1141. doi:10.1038/NI1261
211. Laurence A, Tato CM, Davidson TS, et al. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity*. 2007;26(3):371-381. doi:10.1016/J.IMMUNI.2007.02.009
212. Kleinschek MA, Owyang AM, Joyce-Shaikh B, et al. IL-25 regulates Th17 function in autoimmune inflammation. *J Exp Med*. 2007;204(1):161-170. doi:10.1084/JEM.20061738
213. Batten M, Li J, Yi S, et al. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol*. 2006;7(9):929-936. doi:10.1038/NI1375
214. Gökmen MR, Dong R, Kanhere A, et al. Genome-wide regulatory analysis reveals that T-bet controls Th17 lineage differentiation through direct suppression of IRF4. *J Immunol*. 2013;191(12):5925-5932. doi:10.4049/JIMMUNOL.1202254
215. Lazarevic V, Chen X, Shim JH, et al. T-bet represses T(H)17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the gene encoding ROR γ t. *Nat Immunol*. 2011;12(1):96-104. doi:10.1038/NI.1969
216. Zhou L, Lopes JE, Chong MMW, et al. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing ROR γ function. *Nature*. 2008;453(7192):236-240. doi:10.1038/NATURE06878
217. Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol*. 2004;172(9):5149-5153. doi:10.4049/JIMMUNOL.172.9.5149
218. Chen WJ, Jin W, Hardegen N, et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*. 2003;198(12):1875-1886. doi:10.1084/JEM.20030152
219. Li MO, Wan YY, Flavell RA. T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity*. 2007;26(5):579-591. doi:10.1016/J.IMMUNI.2007.03.014
220. Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(8):556-567. doi:10.1038/NRI2586
221. E Rouvier, M F Luciani, M G Mattéi, F Denizot PG. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J Immunol*. 1993;150(12):5445-5456.
222. Hymowitz SG, Filvaroff EH, Yin JP, et al. IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding. *EMBO J*. 2001;20(19):5332-5341. doi:10.1093/EMBOJ/20.19.5332
223. Liu S, Song X, Chrnyk BA, et al. Crystal structures of interleukin 17A and its complex with IL-17 receptor A. *Nat Commun*. 2013;4. doi:10.1038/NCOMMS2880
224. Monin L, Gaffen SL. Interleukin 17 Family Cytokines: Signaling Mechanisms, Biological Activities, and Therapeutic Implications. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018;10(4). doi:10.1101/CSHPERSPECT.A028522
225. Toy D, Kugler D, Wolfson M, et al. Cutting edge: interleukin 17 signals through a heteromeric receptor complex. *J Immunol*. 2006;177(1):36-39. doi:10.4049/JIMMUNOL.177.1.36
226. Lindén A. A role for the cytoplasmic adaptor protein Act1 in mediating IL-17 signaling. *Sci STKE*. 2007;2007(398). doi:10.1126/STKE.3982007RE4
227. Shen F, Li N, Gade P, et al. IL-17 receptor signaling inhibits C/EBPbeta by sequential phosphorylation of the

- regulatory 2 domain. *Sci Signal*. 2009;2(59). doi:10.1126/SCISIGNAL.2000066
228. Maitra A, Shen F, Hanel W, et al. Distinct functional motifs within the IL-17 receptor regulate signal transduction and target gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(18):7506-7511. doi:10.1073/PNAS.0611589104
229. Shen F, Gaffen SL. Structure-function relationships in the IL-17 receptor: implications for signal transduction and therapy. *Cytokine*. 2008;41(2):92-104. doi:10.1016/J.CYTO.2007.11.013
230. Laan M, Lötvall J, Chung KF, Lindén A. IL-17-induced cytokine release in human bronchial epithelial cells in vitro: role of mitogen-activated protein (MAP) kinases. *Br J Pharmacol*. 2001;133(1):200-206. doi:10.1038/SJ.BJP.0704063
231. Onishi RM, Gaffen SL. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology*. 2010;129(3):311-321. doi:10.1111/J.1365-2567.2009.03240.X
232. Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, et al. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med*. 2001;194(4):519-527. doi:10.1084/JEM.194.4.519
233. Wu Q, Martin RJ, Rino JG, Breed R, Torres RM, Chu HW. IL-23-dependent IL-17 production is essential in neutrophil recruitment and activity in mouse lung defense against respiratory Mycoplasma pneumoniae infection. *Microbes Infect*. 2007;9(1):78-86. doi:10.1016/J.MICINF.2006.10.012
234. Higgins SC, Jarnicki AG, Lavelle EC, Mills KHG. TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to Bordetella pertussis: role of IL-17-producing T cells. *J Immunol*. 2006;177(11):7980-7989. doi:10.4049/JIMMUNOL.177.11.7980
235. Huang W, Na L, Fidel PL, Schwarzenberger P. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice. *J Infect Dis*. 2004;190(3):624-631. doi:10.1086/422329
236. Conti HR, Shen F, Nayyar N, et al. Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J Exp Med*. 2009;206(2):299-311. doi:10.1084/JEM.20081463
237. Puel A, Cypowyj S, Bustamante J, et al. Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science*. 2011;332(6025):65-68. doi:10.1126/SCIENCE.1200439
238. Rudner XL, Happel KI, Young EA, Shellito JE. Interleukin-23 (IL-23)-IL-17 cytokine axis in murine Pneumocystis carinii infection. *Infect Immun*. 2007;75(6):3055-3061. doi:10.1128/IAI.01329-06
239. Lin Y, Ritchea S, Logar A, et al. Interleukin-17 is required for T helper 1 cell immunity and host resistance to the intracellular pathogen Francisella tularensis. *Immunity*. 2009;31(5):799-810. doi:10.1016/J.IMMUNI.2009.08.025
240. Cho JS, Pietras EM, Garcia NC, et al. IL-17 is essential for host defense against cutaneous Staphylococcus aureus infection in mice. *J Clin Invest*. 2010;120(5):1762-1773. doi:10.1172/JCI40891
241. P Schwarzenberger , V La Russa, A Miller, P Ye, W Huang, A Zieske, S Nelson, G J Bagby, D Stoltz, R L Mynatt, M Spriggs JKK. IL-17 stimulates granulopoiesis in mice: use of an alternate, novel gene therapy-derived method for in vivo evaluation of cytokines. *J Immunol*. 1998;161(11):6383-6389.
242. Veldhoen M. Interleukin 17 is a chief orchestrator of immunity. *Nat Immunol*. 2017;18(6):612-621. doi:10.1038/NI.3742
243. Chang SH. T helper 17 (Th17) cells and interleukin-17 (IL-17) in cancer. *Arch Pharm Res*. 2019;42(7). doi:10.1007/S12272-019-01146-9
244. Punt S, Langenhoff JM, Putter H, Fleuren GJ, Gorter A, Jordanova ES. The correlations between IL-17 vs. Th17 cells and cancer patient survival: a systematic review. *Oncoimmunology*. 2015;4(2):1-10. doi:10.4161/2162402X.2014.984547
245. Wilke CM, Kryczek I, Wei S, et al. Th17 cells in cancer: help or hindrance? *Carcinogenesis*. 2011;32(5):643-649. doi:10.1093/CARCIN/BGR019
246. M Chabaud , J M Durand, N Buchs, F Fossiez, G Page, L Frappart PM. Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheumatol*. 1999;42(5):963-970.
247. Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, et al. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest*. 1999;103(9):1345-1352. doi:10.1172/JCI5703

248. Ziolkowska M, Koc A, Luszczkiewicz G, et al. High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism. *J Immunol.* 2000;164(5):2832-2838. doi:10.4049/JIMMUNOL.164.5.2832
249. Matusevicius D, Kivisäkk P, He B, et al. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 1999;5(2):101-104. doi:10.1177/135245859900500206
250. Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol.* 2008;172(1):146-155. doi:10.2353/AJPATH.2008.070690
251. Nalbandian A, Crispín JC, Tsokos GC. Interleukin-17 and systemic lupus erythematosus: current concepts. *Clin Exp Immunol.* 2009;157(2):209-215. doi:10.1111/J.1365-2249.2009.03944.X
252. Zhang Z, Zheng M, Bindas J, Schwarzenberger P, Kolls JK. Critical role of IL-17 receptor signaling in acute TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2006;12(5):382-388. doi:10.1097/01.MIB.0000218764.06959.91
253. Mudter J, Yu J, Zufferey C, et al. IRF4 regulates IL-17A promoter activity and controls ROR γ t-dependent Th17 colitis in vivo. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17(6):1343-1358. doi:10.1002/IBD.21476
254. Yen D, Cheung J, Scheerens H, et al. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest.* 2006;116(5):1310-1316. doi:10.1172/JCI21404
255. Pène J, Chevalier S, Preisser L, et al. Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes. *J Immunol.* 2008;180(11):7423-7430. doi:10.4049/JIMMUNOL.180.11.7423
256. Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Th17 cells: new players in asthma pathogenesis. *Allergy.* 2011;66(8):989-998. doi:10.1111/J.1398-9995.2011.02576.X
257. Girndt M, Sester M, Sester U, Kaul H, Köhler H. Molecular aspects of T- and B-cell function in uremia. *Kidney Int Suppl.* 2001;78(78). doi:10.1046/J.1523-1755.2001.59780206.X
258. C Libetta , T Rampino ADC. Polarization of T-helper lymphocytes toward the Th2 phenotype in uremic patients. *Am J Kidney Dis.* 2001;38(2):286-295.
259. Alvarez-Lara MA, Carracedo J, Ramírez R, et al. The imbalance in the ratio of Th1 and Th2 helper lymphocytes in uraemia is mediated by an increased apoptosis of Th1 subset. *Nephrol Dial Transplant.* 2004;19(12):3084-3090. doi:10.1093/NDT/GFH382
260. Van Kooten C, Boonstra JG, Paape ME, et al. Interleukin-17 activates human renal epithelial cells in vitro and is expressed during renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol.* 1998;9(8):1526-1534. doi:10.1681/ASN.V981526
261. Zhu X, Li S, Zhang Q, et al. Correlation of increased Th17/Treg cell ratio with endoplasmic reticulum stress in chronic kidney disease. *Medicine (Baltimore).* 2018;97(20). doi:10.1097/MD.00000000000010748
262. Romanova Y, Laikov A, Markelova M, et al. Proteomic Analysis of Human Serum from Patients with Chronic Kidney Disease. *Biomolecules.* 2020;10(2). doi:10.3390/BIOM10020257
263. Coppock GM, Aronson LR, Park JJ, et al. Loss of IL-27R α Results in Enhanced Tubulointerstitial Fibrosis Associated with Elevated Th17 Responses. *J Immunol.* 2020;205(2):377-386. doi:10.4049/JIMMUNOL.1901463
264. Rodrigues-Díez R, Aroeira LS, Orejudo M, et al. IL-17A is a novel player in dialysis-induced peritoneal damage. *Kidney Int.* 2014;86(2):303-315. doi:10.1038/KI.2014.33
265. Rosendahl A, Kabiri R, Bode M, et al. Adaptive immunity and IL-17A are not involved in the progression of chronic kidney disease after 5/6 nephrectomy in mice. *Br J Pharmacol.* 2019;176(12):2002-2014. doi:10.1111/BPH.14509
266. Thorenz A, Völker N, Bräsen JH, et al. IL-17A blockade or deficiency does not affect progressive renal fibrosis following renal ischaemia reperfusion injury in mice. *J Pharm Pharmacol.* 2017;69(9):1125-1135. doi:10.1111/JPHP.12747
267. Gan PY, Steinmetz OM, Tan DSY, et al. Th17 cells promote autoimmune anti-myeloperoxidase glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(6):925-931. doi:10.1681/ASN.2009070763
268. Odobasic D, Gan PY, Summers SA, et al. Interleukin-17A promotes early but attenuates established disease in crescentic glomerulonephritis in mice. *Am J Pathol.* 2011;179(3):1188-1198.

- doi:10.1016/J.AJPAT.2011.05.039
269. Steinmetz OM, Summers SA, Gan PY, Semple T, Holdsworth SR, Kitching AR. The Th17-defining transcription factor ROR γ t promotes glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(3):472-483. doi:10.1681/ASN.2010040435
 270. Norlander AE, Saleh MA, Kamat N V., et al. Interleukin-17A Regulates Renal Sodium Transporters and Renal Injury in Angiotensin II-Induced Hypertension. *Hypertens (Dallas, Tex 1979).* 2016;68(1):167-174. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07493
 271. Summers SA, Steinmetz OM, Li M, et al. Th1 and Th17 cells induce proliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(12):2518-2524. doi:10.1681/ASN.2009030337
 272. Zhang J, Hua G, Zhang X, Tong R, Du X, Li Z. Regulatory T cells/T-helper cell 17 functional imbalance in uraemic patients on maintenance haemodialysis: a pivotal link between microinflammation and adverse cardiovascular events. *Nephrology (Carlton).* 2010;15(1):33-41. doi:10.1111/J.1440-1797.2009.01172.X
 273. Hendriks TK, Van Gurp EAFJ, Mol WM, et al. End-stage renal failure and regulatory activities of CD4+CD25bright+FoxP3+ T-cells. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24(6):1969-1978. doi:10.1093/NDT/GFP005
 274. Paust HJ, Turner JE, Steinmetz OM, et al. The IL-23/Th17 axis contributes to renal injury in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(5):969-979. doi:10.1681/ASN.2008050556
 275. Iyoda M, Shibata T, Kawaguchi M, et al. IL-17A and IL-17F stimulate chemokines via MAPK pathways (ERK1/2 and p38 but not JNK) in mouse cultured mesangial cells: synergy with TNF-alpha and IL-1beta. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010;298(3). doi:10.1152/AJPRENAL.00198.2009
 276. Dudas PL, Sague SL, Elloso MM, Farrell FX. Proinflammatory/profibrotic effects of interleukin-17A on human proximal tubule epithelium. *Nephron Exp Nephrol.* 2011;117(4). doi:10.1159/000320177
 277. Sergejeva S, Linden A. Impact of IL-17 on cells of the monocyte lineage in health and disease. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2009;9(2):178-186. doi:10.2174/187153009788452444
 278. Butcher MJ, Gjurich BN, Phillips T, Galkina E V. The IL-17A/IL-17RA axis plays a proatherogenic role via the regulation of aortic myeloid cell recruitment. *Circ Res.* 2012;110(5):675-687. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.261784
 279. Hashmi S, Zeng QT. Role of interleukin-17 and interleukin-17-induced cytokines interleukin-6 and interleukin-8 in unstable coronary artery disease. *Coron Artery Dis.* 2006;17(8):699-706. doi:10.1097/01.MCA.0000236288.94553.B4
 280. Eid RE, Rao DA, Zhou J, et al. Interleukin-17 and interferon-gamma are produced concomitantly by human coronary artery-infiltrating T cells and act synergistically on vascular smooth muscle cells. *Circulation.* 2009;119(10):1424-1432. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.827618
 281. Simon T, Taleb S, Danchin N, et al. Circulating levels of interleukin-17 and cardiovascular outcomes in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2013;34(8):570-577. doi:10.1093/EURHEARTJ/EHS263
 282. Madhur MS, Lob HE, McCann LA, et al. Interleukin 17 promotes angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. *Hypertens (Dallas, Tex 1979).* 2010;55(2):500-507. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.145094
 283. Chen M, Yu L, Liu Q, Jiang H, Zhou S. Interleukin-17 inhibition: An important target for attenuating myocardial ischemia and reperfusion injury. *Int J Cardiol.* 2015;198:89-90. doi:10.1016/J.IJCARD.2015.06.152
 284. Liao YH, Xia N, Zhou SF, et al. Interleukin-17A contributes to myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating cardiomyocyte apoptosis and neutrophil infiltration. *J Am Coll Cardiol.* 2012;59(4):420-429. doi:10.1016/J.JACC.2011.10.863
 285. Jeon US, Choi JP, Kim YS, Ryu SH, Kim YK. The enhanced expression of IL-17-secreting T cells during the early progression of atherosclerosis in ApoE-deficient mice fed on a western-type diet. *Exp Mol Med.* 2015;47(5). doi:10.1038/EMM.2015.19
 286. Erbel C, Chen L, Bea F, et al. Inhibition of IL-17A attenuates atherosclerotic lesion development in apoE-deficient mice. *J Immunol.* 2009;183(12):8167-8175. doi:10.4049/JIMMUNOL.0901126
 287. Hot A, Lenief V, Miossec P. Combination of IL-17 and TNF α induces a pro-inflammatory, pro-coagulant and pro-thrombotic phenotype in human endothelial cells. *Ann Rheum Dis.* 2012;71(5):768-776.

- doi:10.1136/ANNRHEUMDIS-2011-200468
288. Maione F, Cicala C, Liverani E, Mascolo N, Perretti M, D'Acquisto F. IL-17A increases ADP-induced platelet aggregation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;408(4):658-662. doi:10.1016/j.bbrc.2011.04.080
 289. Gisterå A, Robertson AKL, Andersson J, et al. Transforming growth factor- β signaling in T cells promotes stabilization of atherosclerotic plaques through an interleukin-17-dependent pathway. *Sci Transl Med*. 2013;5(196). doi:10.1126/SCITRANSLMED.3006133
 290. Danzaki K, Matsui Y, Ikesue M, et al. Interleukin-17A deficiency accelerates unstable atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(2):273-280. doi:10.1161/ATVBAHA.111.229997
 291. Taleb S, Romain M, Ramkhalawon B, et al. Loss of SOCS3 expression in T cells reveals a regulatory role for interleukin-17 in atherosclerosis. *J Exp Med*. 2009;206(10):2067-2077. doi:10.1084/JEM.20090545
 292. McGrath MM, Najafian N. The role of coinhibitory signaling pathways in transplantation and tolerance. *Front Immunol*. 2012;3(MAR). doi:10.3389/FIMMU.2012.00047
 293. Carreno BM, Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:29-53. doi:10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.20.091101.091806
 294. Riley JL, June CH. The CD28 family: a T-cell rheostat for therapeutic control of T-cell activation. *Blood*. 2005;105(1):13-21. doi:10.1182/BLOOD-2004-04-1596
 295. Adams AB, Larsen CP, Pearson TC, Newell KA. The role of TNF receptor and TNF superfamily molecules in organ transplantation. *Am J Transplant*. 2002;2(1):12-18. doi:10.1034/J.1600-6143.2002.020104.X
 296. Watanabe N, Gavrieli M, Sedy JR, et al. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nat Immunol*. 2003;4(7):670-679. doi:10.1038/NI944
 297. Murphy KM, Nelson CA, Šedý JR. Balancing co-stimulation and inhibition with BTLA and HVEM. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(9):671-681. doi:10.1038/NRI1917
 298. Han P, Goularte OD, Rufner K, Wilkinson B, Kaye J. An inhibitory Ig superfamily protein expressed by lymphocytes and APCs is also an early marker of thymocyte positive selection. *J Immunol*. 2004;172(10):5931-5939. doi:10.4049/JIMMUNOL.172.10.5931
 299. Sedy JR, Gavrieli M, Potter KG, et al. B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nat Immunol*. 2005;6(1):90-98. doi:10.1038/NI1144
 300. Cai G, Freeman GJ. The CD160, BTLA, LIGHT/HVEM pathway: a bidirectional switch regulating T-cell activation. *Immunol Rev*. 2009;229(1):244-258. doi:10.1111/J.1600-065X.2009.00783.X
 301. Cheung TC, Humphreys IR, Potter KG, et al. Evolutionarily divergent herpesviruses modulate T cell activation by targeting the herpesvirus entry mediator cosignaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(37):13218-13223. doi:10.1073/PNAS.0506172102
 302. Cheung TC, Osborne LM, Steinberg MW, et al. T cell intrinsic heterodimeric complexes between HVEM and BTLA determine receptivity to the surrounding microenvironment. *J Immunol*. 2009;183(11):7286-7296. doi:10.4049/JIMMUNOL.0902490
 303. Gavrieli M, Watanabe N, Loftin SK, Murphy TL, Murphy KM. Characterization of phosphotyrosine binding motifs in the cytoplasmic domain of B and T lymphocyte attenuator required for association with protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;312(4):1236-1243. doi:10.1016/j.bbrc.2003.11.070
 304. Okazaki T, Maeda A, Nishimura H, Kurosaki T, Honjo T. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(24):13866-13871. doi:10.1073/PNAS.231486598
 305. Parry R V., Chemnitz JM, Frauwirth KA, et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol*. 2005;25(21):9543-9553. doi:10.1128/MCB.25.21.9543-9553.2005
 306. Gavrieli M, Murphy KM. Association of Grb-2 and PI3K p85 with phosphotyrosine peptides derived from BTLA. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;345(4):1440-1445. doi:10.1016/j.bbrc.2006.05.036
 307. Tao R, Wang L, Murphy KM, Fraser CC, Hancock WW. Regulatory T cell expression of herpesvirus entry

- mediator suppresses the function of B and T lymphocyte attenuator-positive effector T cells. *J Immunol.* 2008;180(10):6649-6655. doi:10.4049/JIMMUNOL.180.10.6649
308. Oya Y, Watanabe N, Kobayashi Y, et al. Lack of B and T lymphocyte attenuator exacerbates autoimmune disorders and induces Fas-independent liver injury in MRL-lpr/lpr mice. *Int Immunol.* 2011;23(5):335-344. doi:10.1093/INTIMM/DXR017
309. Liu X, Alexiou M, Martin-Orozco N, et al. Cutting edge: A critical role of B and T lymphocyte attenuator in peripheral T cell tolerance induction. *J Immunol.* 2009;182(8):4516-4520. doi:10.4049/JIMMUNOL.0803161
310. Deppong C, Juehne TI, Hurchla M, et al. Cutting edge: B and T lymphocyte attenuator and programmed death receptor-1 inhibitory receptors are required for termination of acute allergic airway inflammation. *J Immunol.* 2006;176(7):3909-3913. doi:10.4049/JIMMUNOL.176.7.3909
311. Wang YY, Subudhi SK, Anders RA, et al. The role of herpesvirus entry mediator as a negative regulator of T cell-mediated responses. *J Clin Invest.* 2005;115(3):711-717. doi:10.1172/JCI22982
312. Tao R, Wang L, Han R, et al. Differential effects of B and T lymphocyte attenuator and programmed death-1 on acceptance of partially versus fully MHC-mismatched cardiac allografts. *J Immunol.* 2005;175(9):5774-5782. doi:10.4049/JIMMUNOL.175.9.5774
313. Douna H, Amersfoort J, Schaftenaar FH, et al. B- and T-lymphocyte attenuator stimulation protects against atherosclerosis by regulating follicular B cells. *Cardiovasc Res.* 2020;116(2):295-305. doi:10.1093/CVR/CVZ129
314. Bekiaris V, Šedý JR, Macauley MG, Rhode-Kurnow A, Ware CF. The inhibitory receptor BTLA controls $\gamma\delta$ T cell homeostasis and inflammatory responses. *Immunity.* 2013;39(6):1082-1094. doi:10.1016/J.IMMUNI.2013.10.017
315. Ye Z, Deng B, Wang C, Zhang D, Kijlstra A, Yang P. Decreased B and T lymphocyte attenuator in Behcet's disease may trigger abnormal Th17 and Th1 immune responses. *Sci Rep.* 2016;6. doi:10.1038/SREP20401
316. Oster C, Wilde B, Specker C, et al. BTLA Expression on Th1, Th2 and Th17 Effector T-Cells of Patients with Systemic Lupus Erythematosus Is Associated with Active Disease. *Int J Mol Sci.* 2019;20(18). doi:10.3390/IJMS20184505
317. Werner K, Dolff S, Dai Y, et al. The Co-inhibitor BTLA Is Functional in ANCA-Associated Vasculitis and Suppresses Th17 Cells. *Front Immunol.* 2019;10. doi:10.3389/FIMMU.2019.02843
318. Xin H, Zhu J, Miao H, et al. Adenovirus-Mediated CCR7 and BTLA Overexpression Enhances Immune Tolerance and Migration in Immature Dendritic Cells. *Biomed Res Int.* 2017;2017. doi:10.1155/2017/3519745
319. Han-Xian Zhang , Bin Zhu , Xiao-Xia Fu , Jin-Cheng Zeng , Jun-Ai Zhang , Wan-Dang Wang , Bin Kong , Wen-Yu Xiang , Jixin Zhong , Cong-Yi Wang , Xue-Bao Zheng J-FX. BTLA associates with increased Foxp3 expression in CD4(+) T cells in dextran sulfate sodium-induced colitis. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(2):1259-1269.
320. He L, Xiao J, Song L, et al. HVEM Promotes the Osteogenesis of allo-MSCs by Inhibiting the Secretion of IL-17 and IFN- γ in V γ 4T Cells. *Front Immunol.* 2021;12. doi:10.3389/FIMMU.2021.689269
321. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75(5):843-854. doi:10.1016/0092-8674(93)90529-Y
322. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell.* 2004;116(2):281-297. doi:10.1016/S0092-8674(04)00045-5
323. Krek A, Grün D, Poy MN, et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet.* 2005;37(5):495-500. doi:10.1038/NG1536
324. Bhaskaran M, Mohan M. MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease. *Vet Pathol.* 2014;51(4):759-774. doi:10.1177/0300985813502820
325. Fabbri M. MicroRNAs and miReceptors: a new mechanism of action for intercellular communication. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2018;373(1737). doi:10.1098/RSTB.2016.0486
326. Bayraktar R, Van Roosbroeck K, Calin GA. Cell-to-cell communication: microRNAs as hormones. *Mol Oncol.* 2017;11(12):1673-1686. doi:10.1002/1878-0261.12144
327. Maia J, Caja S, Strano Moraes MC, Couto N, Costa-Silva B. Exosome-Based Cell-Cell Communication in the Tumor Microenvironment. *Front cell Dev Biol.* 2018;6(FEB). doi:10.3389/FCELL.2018.00018

328. Oszolák F, Poling LL, Wang Z, et al. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev.* 2008;22(22):3172-3183. doi:10.1101/GAD.1706508
329. Denli AM, Tops BBJ, Plasterk RHA, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature.* 2004;432(7014):231-235. doi:10.1038/NATURE03049
330. Han J, Lee Y, Yeom KH, et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell.* 2006;125(5):887-901. doi:10.1016/J.CELL.2006.03.043
331. Bohnsack MT, Czaplinski K, Görlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA.* 2004;10(2):185-191. doi:10.1261/RNA.5167604
332. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature.* 2005;436(7051):740-744. doi:10.1038/NATURE03868
333. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell.* 2005;123(4):631-640. doi:10.1016/J.CELL.2005.10.022
334. Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science.* 2002;297(5589):2056-2060. doi:10.1126/SCIENCE.1073827
335. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science.* 2007;318(5858):1931-1934. doi:10.1126/SCIENCE.1149460
336. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* 2009;136(2):215-233. doi:10.1016/J.CELL.2009.01.002
337. Zietzer A, Steffen E, Niepmann S, et al. MicroRNA-mediated vascular intercellular communication is altered in chronic kidney disease. *Cardiovasc Res.* 2022;118(1):316-333. doi:10.1093/CVR/CVAA322
338. Huang Y, Tang S, Ji-Yan C, et al. Circulating miR-92a expression level in patients with essential hypertension: a potential marker of atherosclerosis. *J Hum Hypertens.* 2017;31(3):200-205. doi:10.1038/JHH.2016.66
339. Yang L, Li T. LncRNA TUG1 regulates ApoM to promote atherosclerosis progression through miR-92a/FXR1 axis. *J Cell Mol Med.* 2020;24(15):8836-8848. doi:10.1111/JCMM.15521
340. Wang Z, Zhang J, Zhang S, et al. MiR-30e and miR-92a are related to atherosclerosis by targeting ABCA1. *Mol Med Rep.* 2019;19(4):3298-3304. doi:10.3892/MMR.2019.9983
341. Shang F, Wang SC, Hsu CY, et al. MicroRNA-92a Mediates Endothelial Dysfunction in CKD. *Am Soc Nephrol.* 2017;28(11):3251-3261. doi:10.1681/ASN.2016111215
342. Wiese CB, Zhong J, Xu ZQ, et al. Dual inhibition of endothelial miR-92a-3p and miR-489-3p reduces renal injury-associated atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2019;282:121-131. doi:10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2019.01.023
343. Kétszeri M, Kirsch A, Frauscher B, et al. MicroRNA-142-3p improves vascular relaxation in uremia. *Atherosclerosis.* 2019;280:28-36. doi:10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2018.11.024
344. Massy ZA, Metzinger-Le Meuth V, Metzinger L. MicroRNAs Are Associated with Uremic Toxicity, Cardiovascular Calcification, and Disease. *Contrib Nephrol.* 2017;189:160-168. doi:10.1159/000450774
345. Taïbi F, Metzinger-Le Meuth V, M'Baya-Moutoula E, et al. Possible involvement of microRNAs in vascular damage in experimental chronic kidney disease. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1842(1):88-98. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24140891/>. Accessed May 4, 2020.
346. Ulbing M, Kirsch AHH, Leber B, et al. MicroRNAs 223-3p and 93-5p in patients with chronic kidney disease before and after renal transplantation. *Bone.* 2017;95:115-123. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S8756328216303490>. Accessed May 7, 2020.
347. Hassan MO, Duarte R, Dickens C, et al. Interleukin-6 gene polymorphisms and interleukin-6 levels are associated with atherosclerosis in CKD patients. *Clin Nephrol.* 2020;93(1):S82-S86. doi:10.5414/CNP925114
348. Zhuang G, Meng C, Guo X, et al. A novel regulator of macrophage activation: miR-223 in obesity-associated adipose tissue inflammation. *Circulation.* 2012;125(23):2892-2903. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.087817
349. Haneklaus M, Gerlic M, Kurowska-Stolarska M, et al. Cutting Edge: miR-223 and EBV miR-BART15 Regulate the NLRP3 Inflammasome and IL-1 β Production. *J Immunol.* 2012;189(8):3795-3799.

- doi:10.4049/jimmunol.1200312
350. Schaefer JS, Montufar-Solis D, Vigneswaran N, Klein JR. Selective upregulation of microRNA expression in peripheral blood leukocytes in IL-10^{-/-} mice precedes expression in the colon. *J Immunol.* 2011;187(11):5834-5841. doi:10.4049/JIMMUNOL.1100922
 351. Dong L, Wang X, Tan J, et al. Decreased expression of microRNA-21 correlates with the imbalance of Th17 and Treg cells in patients with rheumatoid arthritis. *J Cell Mol Med.* 2014;18(11):2213-2224. doi:10.1111/JCMM.12353
 352. Murugaiyan G, Da Cunha AP, Ajay AK, et al. MicroRNA-21 promotes Th17 differentiation and mediates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest.* 2015;125(3):1069-1080. doi:10.1172/JCI74347
 353. Liu YL, Wu WF, Xue Y, et al. MicroRNA-21 and -146b are involved in the pathogenesis of murine viral myocarditis by regulating TH-17 differentiation. *Arch Virol.* 2013;158(9):1953-1963. doi:10.1007/S00705-013-1695-6
 354. Oertli M, Engler DB, Kohler E, Koch M, Meyer TF, Müller A. MicroRNA-155 is essential for the T cell-mediated control of *Helicobacter pylori* infection and for the induction of chronic Gastritis and Colitis. *J Immunol.* 2011;187(7):3578-3586. doi:10.4049/JIMMUNOL.1101772
 355. Yao R, Ma Y, Du Y, et al. The altered expression of inflammation-related microRNAs with microRNA-155 expression correlates with Th17 differentiation in patients with acute coronary syndrome. *Cell Mol Immunol.* 2011;8(6):486-495. doi:10.1038/CMI.2011.22
 356. Kuang Q, Wu S, Xue N, Wang X, Ding X, Fang Y. Selective Wnt/ β -Catenin Pathway Activation Concomitant With Sustained Overexpression of miR-21 is Responsible for Aristolochic Acid-Induced AKI-to-CKD Transition. *Front Pharmacol.* 2021;12. doi:10.3389/FPHAR.2021.667282
 357. Telkoparan-Akillilar P, Cevik D. Identification of miR-17, miR-21, miR-27a, miR-106b and miR-222 as endoplasmic reticulum stress-related potential biomarkers in circulation of patients with atherosclerosis. *Mol Biol Rep.* 2021;48(4):3503-3513. doi:10.1007/S11033-021-06352-7
 358. Grimes JA, Lourenço BN, Coleman AE, Rissi DR, Schmiedt CW. MicroRNAs are differentially expressed in the serum and renal tissues of cats with experimentally induced chronic kidney disease: a preliminary study. *Am J Vet Res.* 2022;83(5):426-433. doi:10.2460/AJVR.21.08.0136
 359. Pereira-Da-silva T, Napoleão P, Costa MC, et al. Circulating miRNAs Are Associated with the Systemic Extent of Atherosclerosis: Novel Observations for miR-27b and miR-146. *Diagnostics (Basel, Switzerland).* 2021;11(2). doi:10.3390/DIAGNOSTICS11020318
 360. Franczyk B, Gluba-Brzózka A, Olszewski R, Parolczyk M, Rysz-Górczyńska M, Rysz J. miRNA biomarkers in renal disease. *Int Urol Nephrol.* 2022;54(3):575-588. doi:10.1007/S11255-021-02922-7
 361. Zheng B, Yin W na, Suzuki T, et al. Exosome-Mediated miR-155 Transfer from Smooth Muscle Cells to Endothelial Cells Induces Endothelial Injury and Promotes Atherosclerosis. *Mol Ther.* 2017;25(6):1279-1294. doi:10.1016/J.YMTHE.2017.03.031
 362. Junyent M, Martínez M, Borrs M, et al. Predicting cardiovascular disease morbidity and mortality in chronic kidney disease in Spain. The rationale and design of NEFRONA: a prospective, multicenter, observational cohort study. *BMC Nephrol.* 2010;11(1). doi:10.1186/1471-2369-11-14
 363. A S Levey, J P Bosch, J B Lewis, T Greene, N Rogers DR, Levey AS, Bosch JP, et al. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med.* 1999;130(6):461-470. doi:10.7326/0003-4819-130-6-199903160-00002
 364. Venegas-Pino DE, Banko N, Khan MI, Shi Y, Werstuck GH. Quantitative analysis and characterization of atherosclerotic lesions in the murine aortic sinus. *J Vis Exp.* 2013;(82):50933. doi:10.3791/50933
 365. Rinnerthaler G, Hackl H, Gampenrieder SP, et al. miR-16-5p Is a Stably-Expressed Housekeeping MicroRNA in Breast Cancer Tissues from Primary Tumors and from Metastatic Sites. *Int J Mol Sci.* 2016;17(2). doi:10.3390/IJMS17020156
 366. Kyaw T, Tipping P, Bobik A, Toh BH. Opposing roles of B lymphocyte subsets in atherosclerosis. *Autoimmunity.* 2017;50(1):52-56. doi:10.1080/08916934.2017.1280669
 367. Kyaw T, Loveland P, Kanellakis P, et al. Alarmin-activated B cells accelerate murine atherosclerosis after

- myocardial infarction via plasma cell-immunoglobulin-dependent mechanisms. *Eur Heart J*. 2021;42(9):938-947. doi:10.1093/EURHEARTJ/EHAA995
368. Bakogiannis C, Sachse M, Stamatelopoulos K, Stellos K. Platelet-derived chemokines in inflammation and atherosclerosis. *Cytokine*. 2019;122. doi:10.1016/J.CYTO.2017.09.013
369. Zhang L, Lu P, Yan L, et al. MRPL35 Is Up-Regulated in Colorectal Cancer and Regulates Colorectal Cancer Cell Growth and Apoptosis. *Am J Pathol*. 2019;189(5):1105-1120. doi:10.1016/J.AJPATH.2019.02.003
370. Mao M, Cheng Y, Yang J, et al. Multifaced roles of PLAC8 in cancer. *Biomark Res*. 2021;9(1). doi:10.1186/S40364-021-00329-1
371. Liu B, Shats I, Angus SP, Gatza ML, Nevins JR. Interaction of E2F7 transcription factor with E2F1 and C-terminal-binding protein (CtBP) provides a mechanism for E2F7-dependent transcription repression. *J Biol Chem*. 2013;288(34):24581-24589. doi:10.1074/JBC.M113.467506
372. Aggarwal T, Patil S, Ceder M, Hayder M, Fredriksson R. Knockdown of SLC38 Transporter Ortholog - CG13743 Reveals a Metabolic Relevance in Drosophila. *Front Physiol*. 2020;10. doi:10.3389/FPHYS.2019.01592
373. Guo C, Stark GR. FER tyrosine kinase (FER) overexpression mediates resistance to quinacrine through EGF-dependent activation of NF-kappaB. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(19):7968-7973. doi:10.1073/PNAS.1105369108
374. Di Bartolo BA, Chan J, Bennett MR, et al. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) protects against diabetes and atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice. *Diabetologia*. 2011;54(12):3157-3167. doi:10.1007/S00125-011-2308-0
375. Cartland SP, Genner SW, Martínez GJ, et al. TRAIL-Expressing Monocyte/Macrophages Are Critical for Reducing Inflammation and Atherosclerosis. *iScience*. 2019;12:41-52. doi:10.1016/J.ISCI.2018.12.037
376. Ning Z, Liu K, Xiong H. Roles of BTLA in Immunity and Immune Disorders. *Front Immunol*. 2021;12. doi:10.3389/FIMMU.2021.654960
377. J Jawień , P Nastalek RK. Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol*. 2004;55(3):503-517.
378. Ming Tang , Liang Hong , Haibin Li , Wanshi Chen , Leon Tai , Richard Minshall , Wei Huang JC. Stiffness of aortic arch and carotid arteries increases in ApoE-knockout mice with high-fat diet: evidence from echocardiography. *Am J Transl Res*. 2021;13(3):1352-1364.
379. Esteban V, Ruperez M, Vita JR, et al. Effect of simultaneous blockade of AT1 and AT2 receptors on the NFkappaB pathway and renal inflammatory response. *Kidney Int Suppl*. 2003;64(86). doi:10.1046/J.1523-1755.64.S86.7.X
380. Cantero-Navarro E, Fernández-Fernández B, Ramos AM, et al. Renin-angiotensin system and inflammation update. *Mol Cell Endocrinol*. 2021;529. doi:10.1016/J.MCE.2021.111254
381. Suarez-Alvarez B, Morgado-Pascual JL, Rayego-Mateos S, et al. Inhibition of Bromodomain and Extraterminal Domain Family Proteins Ameliorates Experimental Renal Damage. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(2):504-519. doi:10.1681/ASN.2015080910
382. Bollée G, Flamant M, Schordan S, et al. Epidermal growth factor receptor promotes glomerular injury and renal failure in rapidly progressive crescentic glomerulonephritis. *Nat Med*. 2011;17(10):1242-1250. doi:10.1038/NM.2491
383. Martina MN, Noel S, Bandapalle S, Hamad ARA, Rabb H. T lymphocytes and acute kidney injury: update. *Nephron Clin Pract*. 2014;127(1-4):51-55. doi:10.1159/000363719
384. Wen Y, Crowley SD. Renal Effects of Cytokines in Hypertension. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1165:443-454. doi:10.1007/978-981-13-8871-2_21
385. Ascon DB, Lopez-Briones S, Liu M, et al. Phenotypic and functional characterization of kidney-infiltrating lymphocytes in renal ischemia reperfusion injury. *J Immunol*. 2006;177(5):3380-3387. doi:10.4049/JIMMUNOL.177.5.3380
386. Kitching AR, Holdsworth SR. The emergence of TH17 cells as effectors of renal injury. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(2):235-238. doi:10.1681/ASN.2010050536
387. Paquissí FC, Abensur H. The Th17/IL-17 Axis and Kidney Diseases, With Focus on Lupus Nephritis. *Front Med*.

- 2021;8. doi:10.3389/FMED.2021.654912
388. Shi L, Ji Q, Liu L, et al. IL-22 produced by Th22 cells aggravates atherosclerosis development in ApoE ^{-/-} mice by enhancing DC-induced Th17 cell proliferation. *J Cell Mol Med.* 2020;24(5):3064-3078. doi:10.1111/JCMM.14967
389. Saleh MA, Norlander AE, Madhur MS. Inhibition of Interleukin 17-A but not Interleukin-17F Signaling Lowers Blood Pressure and Reduces End-organ Inflammation in Angiotensin II-induced Hypertension. *JACC Basic to Transl Sci.* 2016;1(7):606-616. doi:10.1016/J.JACBTS.2016.07.009
390. Schmidt T, Luebke J, Kilian C, et al. IL-17 Receptor C Signaling Controls CD4 + T H 17 Immune Responses and Tissue Injury in Immune-Mediated Kidney Diseases. *J Am Soc Nephrol.* 2021;32(12):3081-3098. doi:10.1681/ASN.2021030426
391. Krebs CF, Schmidt T, Riedel JH, Panzer U. T helper type 17 cells in immune-mediated glomerular disease. *Nat Rev Nephrol.* 2017;13(10):647-659. doi:10.1038/NRNEPH.2017.112
392. Suárez-Fueyo A, Bradley SJ, Klatzmann D, Tsokos GC. T cells and autoimmune kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2017;13(6):329-343. doi:10.1038/NRNEPH.2017.34
393. Chang H, Chang H, Cheng T, Lee GD, Chen X, Qi K. Micro-ribonucleic acid-23a-3p prevents the onset of type 2 diabetes mellitus by suppressing the activation of nucleotide-binding oligomerization-like receptor family pyrin domain containing 3 inflammatory bodies-caused pyroptosis through negatively regulating NIMA-related kinase 7. *J Diabetes Investig.* 2021;12(3):334-345. doi:10.1111/JDI.13396
394. Wang G, Xie X, Yuan lingli, et al. Resveratrol ameliorates rheumatoid arthritis via activation of SIRT1-Nrf2 signaling pathway. *Biofactors.* 2020;46(3):441-453. doi:10.1002/BIOF.1599
395. Huang K, Chen G, Fan W, Hu L. miR-23a-3p increases endometrial receptivity via CUL3 during embryo implantation. *J Mol Endocrinol.* 2020;65(2):35-44. doi:10.1530/JME-20-0053
396. Stinghen AEM, Buchares S, Riella MC, Pecoits-Filho R. Immune mechanisms involved in cardiovascular complications of chronic kidney disease. *Blood Purif.* 2010;29(2):114-120. doi:10.1159/000245636
397. Swaminathan S, Shah S V. Novel inflammatory mechanisms of accelerated atherosclerosis in kidney disease. *Kidney Int.* 2011;80(5):453-463. doi:10.1038/KI.2011.178
398. Menon V, Greene T, Wang X, et al. C-reactive protein and albumin as predictors of all-cause and cardiovascular mortality in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2005;68(2):766-772. doi:10.1111/J.1523-1755.2005.00455.X
399. Knight EL, Rimm EB, Pai JK, et al. Kidney dysfunction, inflammation, and coronary events: a prospective study. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(7):1897-1903. doi:10.1097/01.ASN.0000128966.55133.69
400. Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, Metzger T, Wanner C. Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 1999;55(2):648-658. doi:10.1046/J.1523-1755.1999.00273.X
401. Pecoits-Filho R, Heimbürger O, Bárány P, et al. Associations between circulating inflammatory markers and residual renal function in CRF patients. *Am J Kidney Dis.* 2003;41(6):1212-1218. doi:10.1016/S0272-6386(03)00353-6
402. Pugliese NR, Fabiani I, Conte L, et al. Persistent congestion, renal dysfunction and inflammatory cytokines in acute heart failure: a prognosis study. *J Cardiovasc Med (Hagerstown).* 2020;21(7):494-502. doi:10.2459/JCM.0000000000000974
403. Moriguchi T, Takai J. Histamine and histidine decarboxylase: Immunomodulatory functions and regulatory mechanisms. *Genes Cells.* 2020;25(7):443-449. doi:10.1111/GTC.12774
404. Clancy DM, Sullivan GP, Moran HBT, et al. Extracellular Neutrophil Proteases Are Efficient Regulators of IL-1, IL-33, and IL-36 Cytokine Activity but Poor Effectors of Microbial Killing. *Cell Rep.* 2018;22(11):2937-2950. doi:10.1016/J.CELREP.2018.02.062
405. Wang J, Sjöberg S, Tang TT, et al. Cathepsin G activity lowers plasma LDL and reduces atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1842(11):2174-2183. doi:10.1016/J.BBADIS.2014.07.026
406. Venge P, Byström J, Carlson M, et al. Eosinophil cationic protein (ECP): molecular and biological properties and the use of ECP as a marker of eosinophil activation in disease. *Clin Exp Allergy.* 1999;29(9):1172-1186. doi:10.1046/J.1365-2222.1999.00542.X

407. Sundström J, Söderholm M, Borné Y, et al. Eosinophil Cationic Protein, Carotid Plaque, and Incidence of Stroke. *Stroke*. 2017;48(10):2686-2692. doi:10.1161/STROKEAHA.117.018450
408. Zhao L, Lu W. Defensins in innate immunity. *Curr Opin Hematol*. 2014;21(1):37-42. doi:10.1097/MOH.0000000000000005
409. DeLuca JM, Murphy MK, Wang X, Wilson TJ. FCRL1 Regulates B Cell Receptor-Induced ERK Activation through GRB2. *J Immunol*. 2021;207(11):2688-2698. doi:10.4049/JIMMUNOL.2100218
410. Clejan S, Japa S, Clemetson C, Hasabnis SS, David O, Talano J V. Blood histamine is associated with coronary artery disease, cardiac events and severity of inflammation and atherosclerosis. *J Cell Mol Med*. 2002;6(4):583-592. doi:10.1111/J.1582-4934.2002.TB00456.X
411. Martínez PJ, Baldán-Martín M, López JA, et al. Identification of six cardiovascular risk biomarkers in the young population: A promising tool for early prevention. *Atherosclerosis*. 2019;282:67-74. doi:10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2019.01.003
412. Rafatian N, Karunakaran D, Rayner KJ, Leenen FHH, Milne RW, Whitman SC. Cathepsin G deficiency decreases complexity of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013;305(8). doi:10.1152/AJPHEART.00618.2012
413. Cohen-Mazor M, Mazor R, Kristal B, Sela S. Elastase and cathepsin G from primed leukocytes cleave vascular endothelial cadherin in hemodialysis patients. *Biomed Res Int*. 2014;2014. doi:10.1155/2014/459640
414. Guo J, Mei H, Sheng Z, Meng Q, Véniant MM, Yin H. Hsa-miRNA-23a-3p promotes atherogenesis in a novel mouse model of atherosclerosis. *J Lipid Res*. 2020;61(12):1764-1775. doi:10.1194/JLR.RA120001121
415. Peng M, Sun R, Hong Y, et al. Extracellular vesicles carrying proinflammatory factors may spread atherosclerosis to remote locations. *Cell Mol Life Sci*. 2022;79(8). doi:10.1007/S00018-022-04464-2
416. Lin Z, Murtaza I, Wang K, Jiao J, Gao J, Lia PF. miR-23a functions downstream of NFATc3 to regulate cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(29):12103-12108. doi:10.1073/PNAS.0811371106
417. Wang K, Lin ZQ, Long B, Li JH, Zhou J, Li PF. Cardiac hypertrophy is positively regulated by MicroRNA miR-23a. *J Biol Chem*. 2012;287(1):589-599. doi:10.1074/JBC.M111.266940
418. Yang S, Ye Z ming, Chen SS li, et al. MicroRNA-23a-5p promotes atherosclerotic plaque progression and vulnerability by repressing ATP-binding cassette transporter A1/G1 in macrophages. *J Mol Cell Cardiol*. 2018;123:139-149. doi:10.1016/J.YJMCC.2018.09.004
419. Zeng JF, Zeng ZL, Zhang K, et al. miR-23b-3p and miR-125b-5p downregulate apo(a) expression by targeting Ets1 in HepG2 cells. *Cell Biol Int*. 2018;42(3):313-323. doi:10.1002/CBIN.10896
420. Moghaddam AS, Afshari JT, Esmaeili SA, Saburi E, Joneidi Z, Momtazi-Borojeni AA. Cardioprotective microRNAs: Lessons from stem cell-derived exosomal microRNAs to treat cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 2019;285:1-9. doi:10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2019.03.016
421. Moghiman T, Barghchi B, Esmaeili SA, Shabestari MM, Tabae SS, Momtazi-Borojeni AA. Therapeutic angiogenesis with exosomal microRNAs: an effectual approach for the treatment of myocardial ischemia. *Heart Fail Rev*. 2021;26(1):205-213. doi:10.1007/S10741-020-10001-9
422. Huang R, Hu Z, Cao Y, et al. MiR-652-3p inhibition enhances endothelial repair and reduces atherosclerosis by promoting Cyclin D2 expression. *EBioMedicine*. 2019;40:685-694. doi:10.1016/J.EBIOM.2019.01.032
423. Liu J, Zhang H, Li X, et al. Diagnostic and prognostic significance of aberrant miR-652-3p levels in patients with acute decompensated heart failure and acute kidney injury. *J Int Med Res*. 2020;48(11). doi:10.1177/0300060520967829
424. Jiang L, Liu XQ, Ma Q, et al. hsa-miR-500a-3P alleviates kidney injury by targeting MLKL-mediated necroptosis in renal epithelial cells. *FASEB J*. 2019;33(3):3523-3535. doi:10.1096/FJ.201801711R
425. Tan W, Wang G, Liu G, et al. The elevation of miR-185-5p alleviates high-fat diet-induced atherosclerosis and lipid accumulation in vivo and in vitro via SREBP2 activation. *Aging (Albany NY)*. 2022;14(4):1729-1742. doi:10.18632/AGING.203896
426. Sun C, Li J, Li Y, Li L, Huang G. Circular RNA circUBR4 regulates ox-LDL-induced proliferation and migration of vascular smooth muscle cells through miR-185-5p/FRS2 axis. *Mol Cell Biochem*. 2021;476(11):3899-3910. doi:10.1007/S11010-021-04207-0

427. Hong Q, Ling L, Huang W, et al. LncRNA RNCRC3 promotes endothelial cell proliferation and inflammatory cytokine secretion via regulating miR-185-5p/cyclin D2 axis. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2021;28(21):27025-27032. doi:10.1007/S11356-020-12117-9
428. Kim JM, Byun JS, Kim J, et al. Analysis of microRNA signatures in ischemic stroke thrombus. *J Neurointerv Surg*. 2022;14(5):469-474. doi:10.1136/NEURINTSURG-2021-017597
429. Coban N, Ozuynuk AS, Erkan AF, Guclu-Geyik F, Ekici B. Levels of miR-130b-5p in peripheral blood are associated with severity of coronary artery disease. *Mol Biol Rep*. 2021;48(12):7719-7732. doi:10.1007/S11033-021-06780-5
430. Betriu A, Martinez-Alonso M, Arcidiacono MV, et al. Prevalence of subclinical atheromatosis and associated risk factors in chronic kidney disease: the NEFRONA study. *Nephrol Dial Transplant*. 2014;29(7):1415-1422. doi:10.1093/NDT/GFU038
431. Castillo-Rodríguez E, Pizarro-Sánchez S, Sanz AB, et al. *Inflammatory Cytokines as Uremic Toxins: "Ni Son Todos Los Que Estan, Ni Estan Todos Los Que Son."* Vol 9. Toxins (Basel); 2017. doi:10.3390/TOXINS9040114
432. Bro S, Bentzon JF, Falk E, Andersen CB, Olgaard K, Nielsen LB. Chronic renal failure accelerates atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(10):2466-2474. doi:10.1097/01.ASN.0000088024.72216.2E
433. Bro S, Binder CJ, Witztum JL, Olgaard K, Nielsen LB. Inhibition of the renin-angiotensin system abolishes the proatherogenic effect of uremia in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(5):1080-1086. doi:10.1161/ATVBAHA.107.139634
434. Buzello M, Törnig J, Faulhaber J, Ehmke H, Ritz E, Amann K. The apolipoprotein e knockout mouse: a model documenting accelerated atherogenesis in uremia. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(2):311-316. doi:10.1097/01.ASN.0000045048.71975.FC
435. Bi X, Du C, Wang X, et al. Mitochondrial Damage-Induced Innate Immune Activation in Vascular Smooth Muscle Cells Promotes Chronic Kidney Disease-Associated Plaque Vulnerability. *Adv Sci (Weinheim, Baden-Wuerttemberg, Ger)*. 2021;8(5). doi:10.1002/ADVS.202002738
436. Massy ZA, Ivanovski O, Nguyen-Khoa T, et al. Uremia accelerates both atherosclerosis and arterial calcification in apolipoprotein E knockout mice. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(1):109-116. doi:10.1681/ASN.2004060495
437. AV M, L Z, J B, S P. Metabolomic Profiling of Arginine Metabolome Links Altered Methylation to Chronic Kidney Disease Accelerated Atherosclerosis. *J Proteomics Bioinform*. 2015;Suppl 14. doi:10.4172/JPB.S14-001
438. Dossetor JB. Creatininemia versus uremia. The relative significance of blood urea nitrogen and serum creatinine concentrations in azotemia. *Ann Intern Med*. 1966;65(6):1287-1299. doi:10.7326/0003-4819-65-6-1287
439. Yamamoto S, Zuo Y, Ma J, et al. Oral activated charcoal adsorbent (AST-120) ameliorates extent and instability of atherosclerosis accelerated by kidney disease in apolipoprotein E-deficient mice. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26(8):2491-2497. doi:10.1093/NDT/GFQ759
440. Balarini CM, Oliveira MZT, Pereira TMC, et al. Hypercholesterolemia promotes early renal dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice. *Lipids Health Dis*. 2011;10. doi:10.1186/1476-511X-10-220
441. V T, Z M, M E. Dyslipidemia associated with chronic kidney disease. *Open Cardiovasc Med J*. 2011;5(1):41-48. doi:10.2174/1874192401105010041
442. Ikewaki K, Schaefer JR, Frischmann ME, et al. Delayed in vivo catabolism of intermediate-density lipoprotein and low-density lipoprotein in hemodialysis patients as potential cause of premature atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(12):2615-2622. doi:10.1161/01.ATV.0000188555.60475.C2
443. Wilson PWF, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation*. 1998;97(18):1837-1847. doi:10.1161/01.CIR.97.18.1837
444. Samuelsson O, Mulec H, Knight-Gibson C, et al. Lipoprotein abnormalities are associated with increased rate of progression of human chronic renal insufficiency. *Nephrol Dial Transplant*. 1997;12(9):1908-1915. doi:10.1093/NDT/12.9.1908
445. Simolin MA, Pedersen TX, Bro S, et al. ACE inhibition attenuates uremia-induced aortic valve thickening in a

- novel mouse model. *BMC Cardiovasc Disord.* 2009;9. doi:10.1186/1471-2261-9-10
446. Becker LE, Koleganova N, Piecha G, et al. Effect of paricalcitol and calcitriol on aortic wall remodeling in uninephrectomized ApoE knockout mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2011;300(3). doi:10.1152/AJPRENAL.00042.2010
447. Lu X, Wang S, Feng S, Li H. CSE/H 2 S system alleviates uremic accelerated atherosclerosis by regulating TGF- β /Smad3 pathway in 5/6 nephrectomy ApoE $-/-$ mice. *BMC Nephrol.* 2020;21(1). doi:10.1186/S12882-020-02183-Z
448. De Boer IH, Brunzell JD. HDL in CKD: how good is the “good cholesterol?” *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(5):871-874. doi:10.1681/ASN.2014010062
449. Reiss AB, Voloshyna I, De Leon J, Miyawaki N, Mattana J. Cholesterol Metabolism in CKD. *Am J Kidney Dis.* 2015;66(6):1071-1082. doi:10.1053/J.AJKD.2015.06.028
450. Shing CM, Fassett RG, Peake JM, Coombes JS. Voluntary exercise decreases atherosclerosis in nephrectomised ApoE knockout mice. *PLoS One.* 2015;10(3). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0120287
451. Wang JS, Tsai PH, Tseng KF, Chen FY, Yang WC, Shen MY. Sesamol Ameliorates Renal Injury-Mediated Atherosclerosis via Inhibition of Oxidative Stress/IKK α /p53. *Antioxidants (Basel, Switzerland).* 2021;10(10). doi:10.3390/ANTIOX10101519
452. Apostolov EO, Ray D, Savenka A V., Shah S V., Basnakian AG. Chronic uremia stimulates LDL carbamylation and atherosclerosis. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(11):1852-1857. doi:10.1681/ASN.2010040365
453. Davies MJ, Richardson PD, Woolf N, Katz DR, Mann J. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br Heart J.* 1993;69(5):377-381. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8518056/>. Accessed April 16, 2020.
454. Evrard SM, Lecce L, Michelis KC, et al. Endothelial to mesenchymal transition is common in atherosclerotic lesions and is associated with plaque instability. *Nat Commun.* 2016;7. doi:10.1038/NCOMMS11853
455. Mallat Z, Corbaz A, Scoazec A, et al. Expression of interleukin-18 in human atherosclerotic plaques and relation to plaque instability. *Circulation.* 2001;104(14):1598-1603. doi:10.1161/HC3901.096721
456. Koga M, Kai H, Yasukawa H, et al. Inhibition of progression and stabilization of plaques by postnatal interferon-gamma function blocking in ApoE-knockout mice. *Circ Res.* 2007;101(4):348-356. doi:10.1161/CIRCRESAHA.106.147256
457. Wachter DL, Neureiter D, Câmpean V, et al. In-situ analysis of mast cells and dendritic cells in coronary atherosclerosis in chronic kidney disease (CKD). *Histol Histopathol.* 2018;33(8):871-886. doi:10.14670/HH-11-988
458. Gross ML, Meyer HP, Ziebart H, et al. Calcification of coronary intima and media: immunohistochemistry, backscatter imaging, and x-ray analysis in renal and nonrenal patients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2007;2(1):121-134. doi:10.2215/CJN.01760506
459. Benz K, Varga I, Neureiter D, et al. Vascular inflammation and media calcification are already present in early stages of chronic kidney disease. *Cardiovasc Pathol.* 2017;27:57-67. doi:10.1016/J.CARPATH.2017.01.004
460. Jia Y, Zheng Z, Xue M, et al. Extracellular Vesicles from Albumin-Induced Tubular Epithelial Cells Promote the M1 Macrophage Phenotype by Targeting Klotho. *Mol Ther.* 2019;27(8):1452-1466. doi:10.1016/J.YMTHE.2019.05.019
461. Batra G, Ghukasyan Lakic T, Lindbäck J, et al. Interleukin 6 and Cardiovascular Outcomes in Patients With Chronic Kidney Disease and Chronic Coronary Syndrome. *JAMA Cardiol.* 2021;6(12):1440-1445. doi:10.1001/JAMACARDIO.2021.3079
462. Bro S, Borup R, Andersen CB, Moeller F, Olgaard K, Nielsen LB. Uremia-specific effects in the arterial media during development of uremic atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(3):570-575. doi:10.1161/01.ATV.0000201060.47945.CB
463. Bro S, Moeller F, Andersen CB, Olgaard K, Nielsen LB. Increased expression of adhesion molecules in uremic atherosclerosis in apolipoprotein-E-deficient mice. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(6):1495-1503. doi:10.1097/01.ASN.0000128371.33195.7B
464. Han H, Chen Y, Zhu J, Ni J, Sun J, Zhang R. Atorvastatin attenuates p-cresyl sulfate-induced atherogenesis and

- plaque instability in ApoE knockout mice. *Mol Med Rep.* 2016;14(4):3122-3128. doi:10.3892/MMR.2016.5626
465. Bro S, Bollano E, Bruel A, Olgaard K, Nielsen LB. Cardiac structure and function in a mouse model of uraemia without hypertension. *Scand J Clin Lab Invest.* 2008;68(7):660-666. doi:10.1080/00365510802037272
466. Mallat Z, Gojova A, Marchiol-Fournigault C, et al. Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ Res.* 2001;89(10):930-934. doi:10.1161/HH2201.099415
467. Lutgens E, Gijbels M, Smook M, et al. Transforming growth factor-beta mediates balance between inflammation and fibrosis during plaque progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(6):975-982. doi:10.1161/01.ATV.0000019729.39500.2F
468. Lutgens E, Lutgens SPM, Faber BCG, et al. Disruption of the cathepsin K gene reduces atherosclerosis progression and induces plaque fibrosis but accelerates macrophage foam cell formation. *Circulation.* 2006;113(1):98-107. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.561449
469. Shah PK. Biomarkers of plaque instability. *Curr Cardiol Rep.* 2014;16(12). doi:10.1007/S11886-014-0547-7
470. Goto S, Haas S, Ageno W, et al. Assessment of Outcomes Among Patients With Venous Thromboembolism With and Without Chronic Kidney Disease. *JAMA Netw open.* 2020;3(10). doi:10.1001/JAMANETWORKOPEN.2020.22886
471. Qiao Y, Wang C, Kou J, et al. MicroRNA-23a suppresses the apoptosis of inflammatory macrophages and foam cells in atherogenesis by targeting HSP90. *Gene.* 2020;729. doi:10.1016/J.GENE.2019.144319
472. Sharif H, Wang L, Wang WL, et al. Structural mechanism for NEK7-licensed activation of NLRP3 inflammasome. *Nature.* 2019;570(7761):338-343. doi:10.1038/S41586-019-1295-Z
473. Xu X, Hou B, Fulzele A, et al. PD-1 and BTLA regulate T cell signaling differentially and only partially through SHP1 and SHP2. *J Cell Biol.* 2020;219(6). doi:10.1083/JCB.201905085
474. Yang C, Chen Y, Guo G, et al. Expression of B and T lymphocyte attenuator (BTLA) in macrophages contributes to the fulminant hepatitis caused by murine hepatitis virus strain-3. *Gut.* 2013;62(8):1204-1213. doi:10.1136/GUTJNL-2012-302239
475. Fernandez DM, Rahman AH, Fernandez NF, et al. Single-cell immune landscape of human atherosclerotic plaques. *Nat Med.* 2019;25(10):1576-1588. doi:10.1038/S41591-019-0590-4
476. Meier P, Dayer E, Blanc E, Wauters JP. Early T cell activation correlates with expression of apoptosis markers in patients with end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(1):204-212. doi:10.1681/ASN.V131204
477. Winterberg PD, Robertson JM, Kelleman MS, George RP, Ford ML. T Cells Play a Causal Role in Diastolic Dysfunction during Uremic Cardiomyopathy. *J Am Soc Nephrol.* 2019;30(3):407-420. doi:10.1681/ASN.2017101138
478. Fanelli C, Arias SCA, Machado FG, et al. Innate And Adaptive Immunity are Progressively Activated in Parallel with Renal Injury in the 5/6 Renal Ablation Model. *Sci Rep.* 2017;7(1). doi:10.1038/S41598-017-02915-6
479. Romero F, Rodríguez-Iturbe B, Parra G, González L, Herrera-Acosta J, Tapia E. Mycophenolate mofetil prevents the progressive renal failure induced by 5/6 renal ablation in rats. *Kidney Int.* 1999;55(3):945-955. doi:10.1046/J.1523-1755.1999.055003945.X
480. Fujihara CK, Noronha IDL, Malheiros DMAC, Antunes GR, De Oliveira IB, Zatz R. Combined mycophenolate mofetil and losartan therapy arrests established injury in the remnant kidney. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11(2):283-290. doi:10.1681/ASN.V112283
481. Crespo E, Lucia M, Cruzado JM, et al. Pre-transplant donor-specific T-cell alloreactivity is strongly associated with early acute cellular rejection in kidney transplant recipients not receiving T-cell depleting induction therapy. *PLoS One.* 2015;10(2). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0117618
482. Hamrahian SM, Falkner B. Hypertension in Chronic Kidney Disease. *Adv Exp Med Biol.* 2017;956:307-325. doi:10.1007/5584_2016_84
483. Mikolasevic I, Žutelija M, Mavrinac V, Orlic L. Dyslipidemia in patients with chronic kidney disease: etiology and management. *Int J Nephrol Renovasc Dis.* 2017;10:35-45. doi:10.2147/IJNRD.S101808
484. Garla V, Kanduri S, Yanes-Cardozo L, Lién LF. Management of diabetes mellitus in chronic kidney disease.

- Minerva Endocrinol.* 2019;44(3):273-287. doi:10.23736/S0391-1977.19.03015-3
485. Schrezenmeier E V., Barasch J, Budde K, Westhoff T, Schmidt-Ott KM. Biomarkers in acute kidney injury - pathophysiological basis and clinical performance. *Acta Physiol (Oxf)*. 2017;219(3):554-572. doi:10.1111/APHA.12764
486. Mezzano SA, Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)*. 2001;38(3 Pt 2):635-638. doi:10.1161/HY09T1.094234
487. Lu Q, Ma Z, Ding Y, et al. Circulating miR-103a-3p contributes to angiotensin II-induced renal inflammation and fibrosis via a SNRK/NF-κB/p65 regulatory axis. *Nat Commun*. 2019;10(1). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31086184/>. Accessed May 13, 2020.
488. Nataraj C, Oliverio MI, Mannon RB, et al. Angiotensin II regulates cellular immune responses through a calcineurin-dependent pathway. *J Clin Invest*. 1999;104(12):1693-1701. doi:10.1172/JCI7451
489. P G Tipping, X R Huang, M Qi, G Y Van WWT. Crescentic glomerulonephritis in CD4- and CD8-deficient mice. Requirement for CD4 but not CD8 cells. *Am J Pathol*. 1998;152(6):1541-1548.
490. Kalluri R, Danoff TM, Okada H, Neilson EG. Susceptibility to anti-glomerular basement membrane disease and Goodpasture syndrome is linked to MHC class II genes and the emergence of T cell-mediated immunity in mice. *J Clin Invest*. 1997;100(9):2263-2275. doi:10.1172/JCI119764
491. Jabs DA, Burek CL, Hu Q, Kuppers RC, Lee B, Prendergast RA. Anti-CD4 monoclonal antibody therapy suppresses autoimmune disease in MRL/Mp-lpr/lpr mice. *Cell Immunol*. 1992;141(2):496-507. doi:10.1016/0008-8749(92)90166-M
492. Guzik TJ, Hoch NE, Brown KA, et al. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J Exp Med*. 2007;204(10):2449-2460. doi:10.1084/JEM.20070657
493. Tipping PG, Holdsworth SR. T cells in crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(5):1253-1263. doi:10.1681/ASN.2005091013
494. Amin HZ, Sasaki N, Hirata K, Rikitake Y. Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen-4 Protects Against Angiotensin II-Induced Kidney Injury in Mice. *Circ reports*. 2020;2(6):339-342. doi:10.1253/CIRCREP.CR-20-0023
495. Burne MJ, Daniels F, El Ghandour A, et al. Identification of the CD4(+) T cell as a major pathogenic factor in ischemic acute renal failure. *J Clin Invest*. 2001;108(9):1283-1290. doi:10.1172/JCI12080
496. Crispín JC, Oukka M, Bayliss G, et al. Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys. *J Immunol*. 2008;181(12):8761-8766. doi:10.4049/JIMMUNOL.181.12.8761
497. Castillo A, Toriqlul Islam M, Prieto MC, Majid DSA. Tumor necrosis factor-α receptor type 1, not type 2, mediates its acute responses in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012;302(12). doi:10.1152/AJPRENAL.00426.2011
498. Krishnan SM, Dowling JK, Ling YH, et al. Inflammasome activity is essential for one kidney/deoxycorticosterone acetate/salt-induced hypertension in mice. *Br J Pharmacol*. 2016;173(4):752-765. doi:10.1111/BPH.13230
499. Zhang RR, Wang LM, Shen JJ. Overexpression of miR-32 inhibits the proliferation and metastasis of ovarian cancer cells by targeting BTLA. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020;24(9):4671-4678. doi:10.26355/EURREV_202005_21154
500. Zhang M, Gao D, Shi Y, et al. miR-149-3p reverses CD8 + T-cell exhaustion by reducing inhibitory receptors and promoting cytokine secretion in breast cancer cells. *Open Biol*. 2019;9(10):190061. doi:10.1098/RSOB.190061
501. Yongan Liu , Wei Nie, Yu Jin, Anshan Zhuo, Yuansheng Zang QX. B and T Lymphocyte Attenuator is a Target of miR-155 during Naïve CD4+ T Cell Activation. *Iran J Immunol*. 2016;13(2):89-99.
502. An SQ, He K, Liu F, et al. Low microRNA150 expression is associated with activated carcinogenic pathways and a poor prognosis in patients with breast cancer. *Oncol Rep*. 2021;45(3):1235-1248. doi:10.3892/OR.2021.7945
503. Jiang C, Long J, Liu B, et al. miR-500a-3p promotes cancer stem cells properties via STAT3 pathway in human

- hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2017;36(1). doi:10.1186/S13046-017-0568-3
504. Lin H, Zhang L, Zhang C, Liu P. Exosomal MiR-500a-3p promotes cisplatin resistance and stemness via negatively regulating FBXW7 in gastric cancer. *J Cell Mol Med.* 2020;24(16):8930-8941. doi:10.1111/JCMM.15524
505. Liu Y, Tang W, Ren L, et al. Activation of miR-500a-3p/CDK6 axis suppresses aerobic glycolysis and colorectal cancer progression. *J Transl Med.* 2022;20(1). doi:10.1186/S12967-022-03308-8
506. Zheng B, Zheng C ying, Zhang Y, et al. Regulatory crosstalk between KLF5, miR-29a and Fbw7/CDC4 cooperatively promotes atherosclerotic development. *Biochim Biophys acta Mol basis Dis.* 2018;1864(2):374-386. doi:10.1016/J.BBADIS.2017.10.021
507. Chen Q, Lv J, Yang W, et al. Targeted inhibition of STAT3 as a potential treatment strategy for atherosclerosis. *Theranostics.* 2019;9(22):6424-6442. doi:10.7150/THNO.35528
508. Kang L, Jia H, Huang B, et al. Identification of Differently Expressed mRNAs in Atherosclerosis Reveals CDK6 Is Regulated by circHIPK3/miR-637 Axis and Promotes Cell Growth in Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Front Genet.* 2021;12. doi:10.3389/FGENE.2021.596169
509. Zhang S, Sun H, Kong W, Zhang B. Functional role of microRNA-500a-3P-loaded liposomes in the treatment of cisplatin-induced AKI. *IET nanobiotechnology.* 2020;14(6):465-469. doi:10.1049/IET-NBT.2019.0247
510. Abdel Galil SM, Ezzeldin N, El-Boshy ME. The role of serum IL-17 and IL-6 as biomarkers of disease activity and predictors of remission in patients with lupus nephritis. *Cytokine.* 2015;76(2):280-287. doi:10.1016/J.CYTO.2015.05.007
511. Song L, Schindler C. IL-6 and the acute phase response in murine atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2004;177(1):43-51. doi:10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2004.06.018
512. Cheng X, Yu X, Ding Y jun, et al. The Th17/Treg imbalance in patients with acute coronary syndrome. *Clin Immunol.* 2008;127(1):89-97. doi:10.1016/J.CLIM.2008.01.009
513. Zhu E, Wang X, Zheng B, et al. miR-20b suppresses Th17 differentiation and the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis by targeting ROR γ t and STAT3. *J Immunol.* 2014;192(12):5599-5609. doi:10.4049/JIMMUNOL.1303488
514. Qu X, Zhou J, Wang T, et al. MiR-30a inhibits Th17 differentiation and demyelination of EAE mice by targeting the IL-21R. *Brain Behav Immun.* 2016;57:193-199. doi:10.1016/J.BBI.2016.03.016
515. Karbasforooshan H, Karimi G. The role of SIRT1 in diabetic retinopathy. *Biomed Pharmacother.* 2018;97:190-194. doi:10.1016/J.BIOPHA.2017.10.075
516. Lavozy C, Rayego-Mateos S, Orejudo M, et al. Could IL-17A Be a Novel Therapeutic Target in Diabetic Nephropathy? *J Clin Med.* 2020;9(1). doi:10.3390/JCM9010272
517. Krebs CF, Kapffer S, Paust HJ, et al. MicroRNA-155 drives TH17 immune response and tissue injury in experimental crescentic GN. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24(12):1955-1965. doi:10.1681/ASN.2013020130
518. Brummelman J, Pilipow K, Lugli E. The Single-Cell Phenotypic Identity of Human CD8 + and CD4 + T Cells. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2018;341:63-124. doi:10.1016/BS.IRCMB.2018.05.007
519. Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007;23:175-205. doi:10.1146/ANNUREV.CELLBIO.23.090506.123406

ANEXOS

Publicaciones

- 1:** Morgado-Pascual, J. L., Marchant, V., Rodrigues-Diez, R., Dolade, N., Suarez-Alvarez, B., Kerr, B., Valdivielso, J. M., Ruiz-Ortega, M., & Rayego-Mateos, S. (2018). Epigenetic Modification Mechanisms Involved in Inflammation and Fibrosis in Renal Pathology. *Mediators of inflammation*, 2018, 2931049.
- 2:** Rayego-Mateos, S., Marquez-Expósito, L., Rodrigues-Diez, R., Sanz, A. B., Guiteras, R., Doladé, N., Rubio-Soto, I., Manonelles, A., Codina, S., Ortiz, A., Cruzado, J. M., Ruiz-Ortega, M., & Sola, A. (2022). Molecular Mechanisms of Kidney Injury and Repair. *International journal of molecular sciences*, 23(3), 1542.
- 3:** Crespo-Masip, M., Pérez-Gómez, A., Guzmán, C., Rayego, S., Doladé, N., García-Carrasco, A., Jover, R., & Valdivielso, J. M. (2022). PTEN Deletion in Adult Mice Induces Hypoinsulinemia With Concomitant Low Glucose Levels. *Frontiers in endocrinology*, 13, 850214.
- 4:** Rayego-Mateos, S., Doladé, N., García-Carrasco, A., Diaz-Tocados, J. M., Ibarz, M., & Valdivielso, J. M. (2022). The Increase in FGF23 Induced by Calcium Is Partially Dependent on Vitamin D Signaling. *Nutrients*, 14(13), 2576.

Comunicaciones en congresos

1: In vivo and in vitro models to study independent FGF23 regulation by calcium. Nuria Doladé, Sandra Rayego-Mateos, Jose Manuel Valdivielso. II Congreso de biología; 2018; Póster.

2: Regulación epigenética de la Aterosclerosis acelerada por la Enfermedad Renal Crónica. N Doladé, S Rayego-Mateos, A Pérez, M Crespo Masip, S Cambray, M Guerin, PL Tharaux, JM Valdivielso. XLIX Congreso de la S.E.N; 2019; Comunicación oral.

3: Papel de la Vía PI3K/Akt en la regulación del fósforo, FGF23 y Klotho. A Pérez, M Crespo-Masip, A García, N Doladé, S Rayego, JM Valdivielso. XLIX Congreso de la S.E.N; 2019; Comunicación oral.

4: Epigenetic regulation of chronic kidney disease accelerated atherosclerosis. Nuria Dolade, Sandra Rayego Mateos, Aurora Perez, Maria Crespo Masip, Maryse Guerin, Pierre Louis Tharaux, Jose Manuel Valdivielso. 57th ERA-EDTA Virtual Congress; 2020; Póster.

