



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Modulación farmacológica de la disfunción endotelial en la uremia

Manel Vera Rivera



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

MODULACIÓN FARMACOLÓGICA DE LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN LA UREMIA

Tesis Doctoral

Manel Vera Rivera

2020

Facultat de Medicina i Ciències de la Salut

Programa de Doctorat:

Medicina i Recerca Translacional



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

MODULACIÓN FARMACOLÓGICA DE LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN LA UREMIA

Memoria presentada por:

Manel Vera Rivera

Para optar al Grado de Doctor por la Universitat de Barcelona

Dirigida por:

Dr. Aleix Cases Amenós

Dra. Maribel Díaz Ricart

Programa de Doctorat Medicina i Recerca Translacional

Facultat de Medicina i Ciències de la Salut

Universitat de Barcelona

2020

AUTORIZACIÓN PARA PRESENTAR LA TESIS DOCTORAL

El **Dr. Aleix Cases Amenós**, Consultor Sénior del Servei de Nefrologia i Trasplantament Renal, Profesor Asociado de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat de Barcelona y la **Dra. Maribel Díaz Ricart**, Consultora Sénior de la Secció d'Hematopatologia;

CERTIFICAN

La Tesis Doctoral:

MODULACIÓN FARMACOLÓGICA DE LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN LA UREMIA

Presentada por el doctorando **Manel Vera Rivera**, para optar al Grado de Doctor por la Universitat de Barcelona, inscrita en el programa de Doctorado Medicina i Recerca Translacional de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat de Barcelona, tiene la calidad científica necesaria para ser defendida ante el Tribunal designado a tal efecto.

Dra. Maribel Díaz Ricart
Directora de la Tesis

Dr. Aleix Cases Amenós
Director de la Tesis

Barcelona; hivern 2019-2020

Al Ferran, company amb qui comparteixo cam3 en la vida i que ha sabut tenir paci3ncia i entendre els moments dif3cils que suposa el treball del dia a dia a l'Hospital.

Als meus pares; la Tere i el Manel, per tot allò que m'han donat sense esperar res a canvi.

Als meus germans: el Xavi el "*primer doctor*" i
la Georgina per estar sempre quan es
necessiten.



A la Mica, pels moments

divertits.

“Tot està per fer i tot és possible”

Vers del poema: Ara Mateix.
Llibre: L'àmbit de tots els àmbits.

Miquel Martí i Pol (1929-2003)

AGRAÏMENTS

Quan s'escriu aquesta part de la Tesi Doctoral, vol dir que ja ha arribat el final d'un llarg camí, ple d'obstacles i dificultats.

No ha estat fàcil i el recorregut més llarg del compte: la meva "capacitat" per "distreure'm" del món de la recerca per altres àrees d'interès n'han estat els responsables, i, per aquest motiu, fa que encara tingui més valor el suport incondicional que he tingut dels meus directors de Tesi: el Dr. Aleix Cases Amenós i la Dra. Maribel Díaz Ricart.

Del Dr. Aleix Cases Amenós en vull destacar la capacitat de treball, la gran visió clínica, l'esperit crític, la seva tenacitat i constància i, sobretot, l'interès per buscar respostes als problemes de salut dels nostres pacients així com tots els seus ensenyaments i consells rebuts i que espero continuar rebent.

Moltes gràcies Aleix.

De la Dra. Maribel Díaz Ricart en vull destacar el seu lideratge dins del laboratori, l'elevat grau d'exigència i compromís amb la feina ben feta i el fet d'haver cregut que en l'estudi de la disfunció endotelial hi pot haver la clau de molts dels problemes que afecten als pacients amb insuficiència renal.

Moltes gràcies Maribel.

De la Dra. Marta Palomo de Udaeta, qui en tot moment ha actuat com una tercera directora sense ser-ho oficialment, en vull destacar la seva professionalitat i el domini de les diferents tècniques de laboratori i "l'art" de preparar els manuscrits.

Moltes gràcies Marta.

Vull que quedi aquí escrit, el meu agraïment pel treball i suport de tots els companys del Laboratori d'Hemostàsia Primària que han col·laborat durant aquests anys per poder dur a terme aquests treballs i evitar que un maldestre nefròleg fes escarafalls en el laboratori.

Especial i dedicada menció al Sergi Torramadé Moix (en breu també Doctor) i a la Dra. Susana Martín Rodríguez.

Moltes gràcies Sergi. Moltes gràcies Susana.

Del Dr. Ginés Escolar en vull destacar la seva capacitat d'anàlisi crítica dels treballs, que finalment han acabat sent una publicació.

Al cap i a la fi, els resultats aquí presentats són el fruit del treball en equip.

A l'equip d'infermeria, especialment la de la Unitat de Diàlisi Peritoneal, per la seva implicació i dedicació desinteressada i sobretot, per la paciència que han tingut per suportar les meves "manies".

Moltes gràcies Ángeles. Moltes gràcies Débora.

A la Dra. Glòria Martín i al Dr. Josep Maria Cruzado del Centre de Diàlisi Institut Hemodiàlisi Barcelona, per haver col·laborat de manera tant diligent en l'obtenció de les mostres de pacients en hemodiàlisi.

A les companyes i companys de la Secció de Diàlisi per la seva col·laboració, suport, amistat i per intentar que la feina sigui cada dia una mica millor.

També vull agrair el recolzament de la resta de membres del Servei de Nefrologia i Trasplantament Renal (*staff* mèdic, residents, MEAUs, becaris, i personal d'infermeria).

No vull, ni puc deixar d'agrair el suport de les diferents secretàries amb qui tinc una especial relació i que fan que el dia a dia sigui una mica més fàcil i em pugui distreure d'algun dels molts tràmits administratius que m'envolten diàriament: la Susana, la Montse, la Rosa Maria de l'APCDM-CDM i Ep ! la Roser Treig que des de la setena planta em continua tenint controlat.

Als ànims i suport de la persona de qui tinc un major número d' *e-mails*: la Dra. Esther Ponz. Gràcies, per ser una referent professional i personal i per ajudar-me a créixer "dins la peritoneal".

I a tots aquells companys i amics de dins i fóra de la l'Hospital que en un moment o altre m'han empès a continuar.

I òbviament als pacients per la seva generositat en voler col·laborar amb el "seu metge de la peritoneal" en aquests i altres estudis.

I especialment a la meva família: marit, pares, germans, nebodes i nebot, sogres, cunyada i cunyats que han estat i són el pilar fonamental. Sense ells res hagués estat possible.

I en definitiva, gràcies a tothom que encara que no he mencionat directament, m'han ajudat a ser qui sóc.

Barcelona, hivern 2019-2020

ÍNDICE

Índice	(i)
Índice de tablas y figuras	(vii)
Glosario de abreviaturas	(ix)
1. Resumen	(1)
2. Introducción	(5)
2.1 Definición de uremia y epidemiología de la ERC	(6)
2.2 Morbimortalidad cardiovascular en el contexto de la ERC	(11)
2.2.1 Epidemiología	(11)
2.2.2 Afectación macro y microvascular en la ERC	(15)
2.2.2.1 Aterosclerosis	(15)
2.2.2.2 Arteriosclerosis	(17)
2.2.2.3 Afectación microvascular	(20)
2.2.2.4 Consecuencias clínicas de la afectación macro y microvascular	(21)
2.3 Factores de riesgo cardiovascular en la ERC	(23)
2.3.1 Clásicos	(24)
2.3.1.1 Hipertensión arterial	(24)
2.3.1.2 Dislipemia	(24)
2.3.1.3 Diabetes Mellitus	(26)
2.3.1.4 Tabaquismo	(26)
2.3.1.5 Hipertrofia ventricular izquierda	(27)
2.3.2 Asociados a la ERC	(29)
2.3.2.1 Albuminuria	(29)
2.3.2.2 Anemia	(29)
2.3.2.3 Alteraciones del metabolismo óseo-mineral	(30)
2.3.2.4 Hiperhomocisteinemia	(31)
2.3.2.5 Hiperuricemia	(32)
2.3.2.6 Actividad del SRAA y del sistema simpático	(33)
2.3.2.7 Hipercoagulabilidad	(34)
2.4 Inflamación y estrés oxidativo	(34)
2.4.1 Inflamación	(34)
2.4.2 Estrés oxidativo	(39)
2.5 El endotelio	(50)

2.5.1 El endotelio normal	(50)
2.5.2 Disfunción endotelial	(54)
2.5.3 El endotelio en el entorno urémico	(58)
2.6 Potenciales estrategias terapéuticas	(64)
2.6.1 Flavonoides	(64)
2.6.2 N-acetilcisteína	(66)
2.6.3 Miméticos de la GPX y de la SOD	(68)
2.6.4 Defibrotide	(70)
2.6.5 Otros	(72)
3. Hipótesis	(73)
4. Objetivos	(75)
5. Resultados	(77)
5.1 Estrategias antioxidantes y antiinflamatorias para proteger el endotelio del efecto de la uremia.	(78)
5.2 Papel de HDAC, elemento crucial en la regulación epigenética, en la disfunción endotelial en la uremia. Efecto protector del defibrotide.	(97)
6. Discusión	(111)
7. Conclusiones	(126)
8. Bibliografía	(129)
9. Anexo	(150)

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Nº tabla	Descripción
1	Riesgo de mortalidad cardiovascular según el estadio de ERC
2	Factores de riesgo cardiovascular clásicos en la ERC
3	Factores de riesgo cardiovascular nuevos y asociados a la condición de ERC
4	Cambios cuantitativos del perfil lipídico en ERC
5	Cambios cualitativos del perfil lipídico en la ERC
6	Factores implicados en la HVI asociada a la ERC
7	Principales especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno
8	Principales productos finales de la oxidación
9	Mecanismos de acción de defibrotide

FIGURAS

Figura	Descripción
1	Clasificación KDIGO de la ERC
2	Incidencia de ERCT en España
3	Incidencia de la ERCT en los distintos países europeos
4	Prevalencia de ERCT en España
5	Prevalencia de ERCT en los distintos países europeos
6	Relación entre la reducción del FG y mortalidad cardiovascular
7	Relación entre el FG y eventos cardiovasculares
8	Causas de muerte de los pacientes con ERCT
9	Riesgo relativo de muerte de los pacientes con ERCT en función de la franja etaria (registro español)
10	Mortalidad cardiovascular en los pacientes con ERCT comparada con la población general (registro americano)
11	Placa de ateroma en ausencia de ERC
12	Placa de ateroma en presencia de ERC
13	Formación de ROS a partir de una molécula de oxígeno
14	Integración de los 3 principales sistemas antioxidantes constitutivos
15	Principales reacciones oxidantes-antioxidantes
16	Interdependencia del estrés oxidativo y la inflamación
17	Aspecto de un cultivo de células endoteliales en medio no urémico
18	Interacción de los leucocitos con la célula endotelial
19	Aspecto de un cultivo de células endoteliales tras 24 horas de exposición al medio urémico
20	Efecto de algunas toxinas urémicas sobre la función endotelial
21	Fórmula estructural de apigenina, genisteína y quercetina
22	Fórmula estructural de N-acetilcisteína
23	Vía de desaturación de GSH por N-acetilcisteína
24	Fórmula estructural de ebselen
25	Mecanismo de acción de ebselen como mimético de la GPX
26	Fórmula estructural de EUK-134 y EUK-118

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

En esta tesis doctoral han sido utilizados los siguientes acrónimos, algunos de ellos corresponden a siglas anglosajonas con el fin de seguir la nomenclatura internacional.

AGEs:	productos finales de glicación avanzada ("advanced glycation end products")
ADMA:	dimetilarginina asimétrica
AREs:	elementos de respuesta antioxidante ("antioxidant response elements")
CAT:	catalasa
CE:	célula endotelial
CEC:	célula endotelial circulante
CV:	cardiovascular
DAMPs:	patrones moleculares asociados a peligro ("damage-associated molecular patterns")
DE:	disfunción endotelial
DF:	defibrotide
DM:	diabetes mellitus
DP:	diálisis peritoneal
eNOS:	sintasa del óxido nítrico endotelial
EMPs:	micropartículas circulantes endoteliales
EMVs:	microvesículas endoteliales
EPCs:	células endoteliales progenitoras
ERA-EDTA:	European Renal Association – European Dialysis and Transplant Association
ERC:	enfermedad renal crónica
ERCT:	enfermedad renal crónica terminal
FG:	filtrado glomerular
FGF23:	factor de crecimiento de fibroblasto 23 ("fibroblast growth factor 23")
FR:	función renal

FT:	factor tisular
FvW:	factor von Willebrand
GPX:	glutación peroxidasa
GR:	glutación reductasa
GSH:	glutación reducido
GSHx:	glutación sintetasa
GSSG:	glutación oxidado
HCy:	homocisteína
HD:	hemodiálisis
HDAC:	histona desacetilasa
HDAC1:	histona desacetilasa tipo 1
HDAC2:	histona desacetilasa tipo 2
HDL:	lipoproteínas de alta densidad (“high density lipoprotein”)
HMGB1:	proteína “high mobility group box 1 protein”
HTA:	hipertensión arterial
HUVECs:	células endoteliales de cordón umbilical humano
HVI:	hipertrofia ventricular izquierda
IAM:	infarto agudo de miocardio
IC:	insuficiencia cardíaca
ICAM-1:	molécula de adhesión intercelular 1 (“intercellular adhesion molecule 1”)
IDL:	lipoproteínas de densidad intermedia (“intermediate density lipoprotein”)
IL1:	interleucina 1
IL6:	interleucina 6
IVUS:	ecografía intravascular
LDL:	lipoproteínas de baja densidad (“low density lipoprotein”)
Lp(a):	lipoproteína (a)
MCP-1:	proteína quimiotáctica de los monocitos 1 (“monocyte chemoattractant protein 1”)
MEC:	matriz extracelular
MGP:	“matrix-Gla protein”
MPO:	mieloperoxidasa

NAC:	N-acetilcisteína
NADPH oxidasa:	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa
NFκB:	factor nuclear kappa B
NO:	óxido nítrico
NOX:	NADPH oxidasa
Nrf2:	“nuclear factor erythroid 2-related factor 2”
PAMPs:	patrones moleculares asociados a patógenos (“pathogen-associated molecular patterns”)
PCR:	proteína C reactiva
PECAM-1:	molécula de adhesión endotelio-plaqueta 1 (“platelet-endotelial cell adhesion molecule 1”)
PI3/AKT	fosfatidilinositol- 3-cinasa/proteína cinasa B (“phosphatidylinositol 3-kinase/ protein kinase B”)
PTHi:	parathormona intact
p38MAPK:	proteína cinasa activada por mitógenos p38 (“p38 mitogen activated protein kinase”)
OS:	estrés oxidativo
RNS:	especies reactivas de nitrógeno
ROS:	especies reactivas de oxígeno o radicales libres de oxígeno
SNS:	sistema nervioso simpático
SRAA:	sistema renina angiotensina aldosterona
SOD:	superóxido dismutasa
TLR4:	receptor “toll-like” tipo 4
TNFα:	factor de necrosis tumoral alfa
TR:	trasplante renal
TRX:	tio redoxina
TSA:	tricotatina A
TSR:	tratamiento sustitutivo renal
XDH:	xantin dehidrogenasa
XO:	xantin oxidasa
VCAM-1:	molécula de adhesión celular vascular 1 (“vascular cell adhesion molecule 1”)

VI: ventrículo izquierdo
VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad
("very low density lipoprotein")

1.RESUMEN

1. RESUMEN

La enfermedad cardiovascular (CV) es la principal causa de muerte de los pacientes con enfermedad renal crónica terminal (ERCT). Es especialmente llamativa la diferencia que existe, con respecto a la población general, en el grupo de pacientes más jóvenes, siendo ésta de hasta 50 veces superior. A pesar de las mejoras técnicas implementadas en diálisis o de las estrategias farmacológicas disponibles, no se ha conseguido reducir la mortalidad de origen CV en este grupo de pacientes. Esto no ocurre con otros grupos de población de alto riesgo, afecta por ejemplo, de diabetes y/o enfermedad CV. En ellos los nuevos tratamientos sí que han supuesto una disminución de la morbimortalidad de origen CV.

Esta elevada prevalencia de enfermedad CV (en forma de alteraciones microvasculares o macrovasculares -aterosclerosis o arteriosclerosis-) tiene como nexo común la disfunción endotelial (DE), se encuentra agravada en la enfermedad renal crónica (ERC) y se manifiesta presentando un fenotipo proinflamatorio, prooxidante y protrombótico.

A partir de las premisas anteriores esta Tesis Doctoral (TD) plantea la **hipótesis** de que es posible mejorar la DE presente en la uremia mediante nuevos enfoques de modulación farmacológica a partir de la identificación de nuevas potenciales dianas terapéuticas.

En línea con la hipótesis formulada, **los objetivos** se centran en explorar los efectos de la modulación de distintos sistemas antioxidantes-antiinflamatorios, y la posibilidad de intervención sobre los cambios epigenéticos asociados a la exposición crónica de las células endoteliales (CE) al medio urémico.

La **metodología** de los trabajos presentados en esta TD se centra en el estudio de los cambios y capacidad de modulación de la DE. Para ello, se ha utilizado un modelo *in vitro* de cultivo de CE procedentes de venas de cordón umbilical humano (HUVECs), incubadas con suero de pacientes con ERCT en programa de diálisis (diálisis peritoneal o hemodiálisis) y donantes sanos tras la

exposición a los distintos compuestos estudiados.

Las técnicas utilizadas en el primer trabajo incluyen: inmunofluorescencia para medir la expresión de ICAM-1, técnicas de fluorescencia para la determinación de la generación de radicales libres de oxígeno (ROS), técnicas de ELISA y Western blot para el estudio de la expresión del factor de transcripción NFκB y de la vía p38MAPK y fluorimetría para la medición de glutatión (GSH).

Las técnicas utilizadas en el segundo trabajo incluyen: análisis proteómico para detectar proteínas expresadas de manera diferencial; Western blot e inmunofluorescencia para la cuantificación de la histona desacetilasa (HDAC) tipo 1 (HDAC1) y tipo 2 (HDAC2), y de la vía PI3-kinasa/AKT; inmunofluorescencia para medir la expresión de ICAM-1, Toll Like Receptor 4 (TLR4), factor von Willebrand (FvW) y técnicas de fluorescencia para la determinación de la generación de (ROS).

Los **resultados** del artículo *Antioxidant and anti-inflammatory strategies based on the potentiation of glutathione peroxidase activity prevent endothelial dysfunction in chronic kidney diseases* realizado utilizando suero procedente de pacientes en diálisis peritoneal (DP), demuestran que la modulación farmacológica de los sistemas antioxidantes, mediante la potenciación de la vía de la glutatión peroxidasa (GPX) inducen una mayor respuesta antioxidante y antiinflamatoria que las estrategias que potencian la vía de la superóxido dismutasa (SOD) o los distintos flavonoides, que obtienen unos resultados parciales.

Los **resultados** del artículo *Up-regulation of HDACs, a harbinger of uremic endothelial dysfunction, is prevented by defibrotide* realizado utilizando suero obtenido de pacientes en programa crónico de hemodiálisis (HD) demuestran que el medio urémico induce cambios en la expresión de proteínas a nivel de las CE. Algunos de estos cambios son revertidos por el fármaco defibrotide (DF), con reconocidas propiedades protectoras del endotelio en otros contextos. De las proteínas sobreexpresadas en las CE expuestas al medio urémico y que son normalizadas por el DF destacamos, por su relevancia biológica, HDAC1 y HDAC2.

El DF, regulando la sobreexpresión de HDAC1 y HDAC2, logra una mejoría del fenotipo proinflamatorio, protrombótico y prooxidante, y una disminución de la actividad de la inmunidad innata, de las CE expuestas al medio urémico.

Así pues, esta TD permite **concluir** que es posible mejorar la DE presente en la ERC *in vitro* mediante un abordaje distinto al disponible hasta la fecha, con estrategias que se centren en contrarrestar el entorno prooxidante, así como algunos de los cambios epigenéticos observados en estas CE, abriendo las expectativas de posibles nuevas dianas terapéuticas.

Los resultados presentados tienen como principal limitación el hecho que se han realizado en modelos *in vitro* y deberían completarse en modelos *in vivo*. Ello permitiría precisar aspectos farmacológicos para garantizar una correcta biodisponibilidad y demostrar su seguridad y eficacia.

No obstante, esta TD propone, a modo de prueba de concepto, posibles nuevos enfoques terapéuticos de los que se podrían beneficiar los pacientes con ERC para mejorar el elevado riesgo de enfermedad CV presente en este subgrupo de pacientes.

2. INTRODUCCIÓN

2.INTRODUCCIÓN

2.1 DEFINICIÓN DE UREMIA Y EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA

La uremia es el síndrome clínico resultado de la acumulación de las toxinas urémicas que normalmente se eliminan por los riñones, como consecuencia del deterioro funcional de los mismos. La pérdida progresiva e irreversible de la función renal (FR) es el escenario definitorio de la ERC. Las toxinas urémicas acumuladas tienen impacto y repercusión sistémica, interfiriendo en el normal funcionamiento de los distintos órganos y sistemas (1,2).

La ERC se define, a su vez, como la presencia de una alteración estructural o funcional renal (alteración del sedimento, alteraciones en pruebas de imagen, alteraciones histológicas) que persiste más allá de 3 meses, con o sin alteración de la función renal o un filtrado glomerular estimado (FGe) < 60 ml/min/1.73m² sin otros signos de enfermedad renal.

La ERCT se establece cuando el deterioro de la FR es tal (FGe < 15 ml/min/1.73m²), que obliga, para garantizar la supervivencia del paciente, plantear a corto plazo, alguna de las modalidades de tratamiento renal sustitutivo, ya sea la diálisis o el trasplante renal (TR).

Las guías KDIGO del 2002 unificaron los conceptos que definían los diferentes estadios evolutivos de la ERC estratificándola en 5 grados o categorías. Esta clasificación fue revisada en el 2012 en la que se incluía además 3 rangos de albuminuria, para reforzar su importancia debido a su correlación directa con el riesgo de progresión de la ERC y de morbimortalidad (3).

Prognosis of CKD by GFR
and albuminuria categories:
KDIGO 2012

				Persistent albuminuria categories, description and range		
				A1	A2	A3
				Normal to mildly increased	Moderately increased	Severely increased
				<30 mg/g <3 mg/mmol	30–300 mg/g 3–30 mg/mmol	>300 mg/g >30 mg/mmol
GFR categories (ml/min/1.73 m ²), description and range	G1	Normal or high	≥90			
	G2	Mildly decreased	60–89			
	G3a	Mildly to moderately decreased	45–59			
	G3b	Moderately to severely decreased	30–44			
	G4	Severely decreased	15–29			
	G5	Kidney failure	<15			

green, low risk (if no other markers of kidney disease, no CKD); yellow, moderately increased risk; orange, high risk; red, very high risk.

Figura 1: Clasificación de la ERC. Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney inter.*, Suppl. 2013; 3: 1–150 (con permiso de reproducción).

A partir de los resultados del análisis del Estudio de Nutrición y Riesgo Cardiovascular en España (ENRICA), un estudio epidemiológico, de ámbito nacional, de base poblacional, con una muestra de 11.505 sujetos representativos de la población adulta española se estimó que la prevalencia de la ERC era de un 15.1%. Era más frecuente en varones (23,1% vs. 7,3% en mujeres), y estaba relacionada con la edad (4,8% en sujetos de 18-44 años, 17,4% en sujetos de 45-64 años, y 37,3% en sujetos ≥65 años) y con la presencia de enfermedad CV (39,8% vs. 14,6% en sujetos sin enfermedad cardiovascular). Estos resultados (4) muestran porcentajes superiores a los del estudio anterior EPIRCE (5), donde se estimaba que aproximadamente la ERC afectaba al 10% de la población española adulta (el 20% en mayores de 60 años), sugiriendo un aumento de su prevalencia, como en otras partes del mundo.

La ERCT es un problema sanitario de primer orden. Los datos que ofrecen los distintos registros de enfermos renales así lo refuerzan. Se observa un lento, pero progresivo ascenso, tanto en términos de incidencia como de prevalencia (6–9).

Tal como se puede observar en la siguiente figura, en España, los últimos datos reflejan una incidencia anual de la ERCT de 141 pmp. En el 78% se inicia tratamiento sustitutivo renal (TSR) con hemodiálisis (HD), en un 17,1% se inicia TSR con diálisis peritoneal (DP) y un 4,9% de los pacientes reciben un TR preventivo (6).

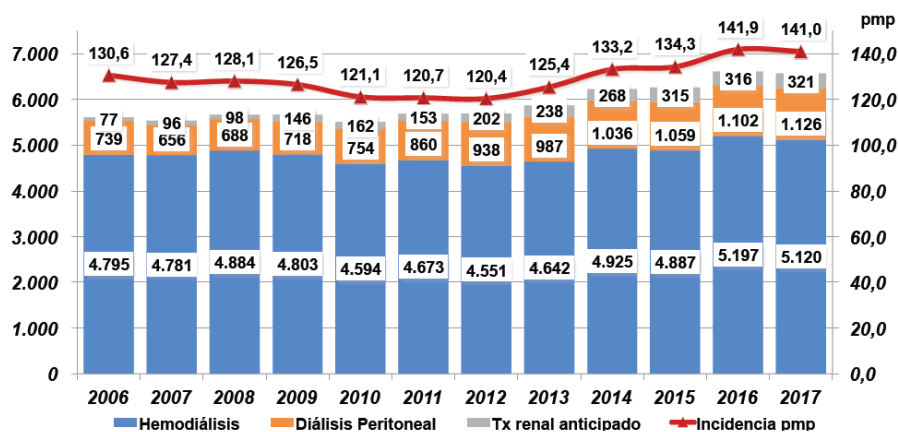


Figura 2: Incidencia de la ERCT en los últimos años en España. Fuente: Registro Español de Enfermos Renales 2017.

Comparado con los datos del último registro de la ERA-EDTA, el Estado Español ocuparía en términos de incidencia, una posición intermedia con respecto al resto de países europeos (7).

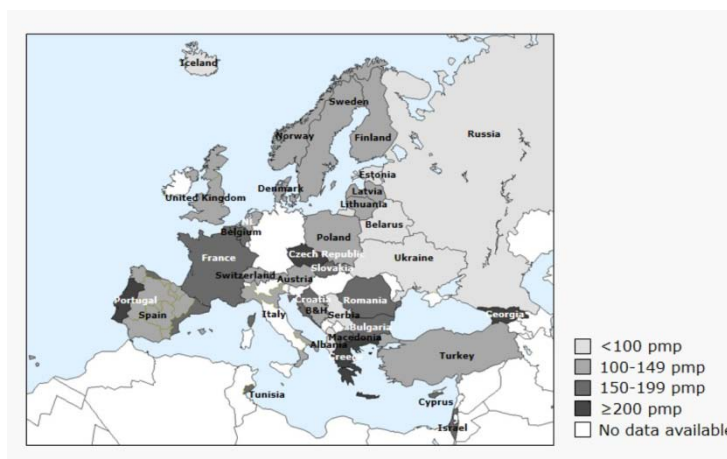


Figura 3: Incidencia de la ERCT en los distintos países europeos en comparación con España. Fuente: Registry of the European Renal Association- European Dialysis and Transplant Association (2017).

En términos de prevalencia, los datos de estos registros (6–8) apuntan también hacia un aumento progresivo de la ERCT en los últimos años.

La tasa de prevalencia de la ERCT en España, estaría situada en 1284,2 pmp, de los que, un 53,81% serían pacientes con TR funcionante, un 41% estarían en TSR con HD y un 5.19% con DP, lo que supone que prácticamente 60.000 pacientes reciben TSR.

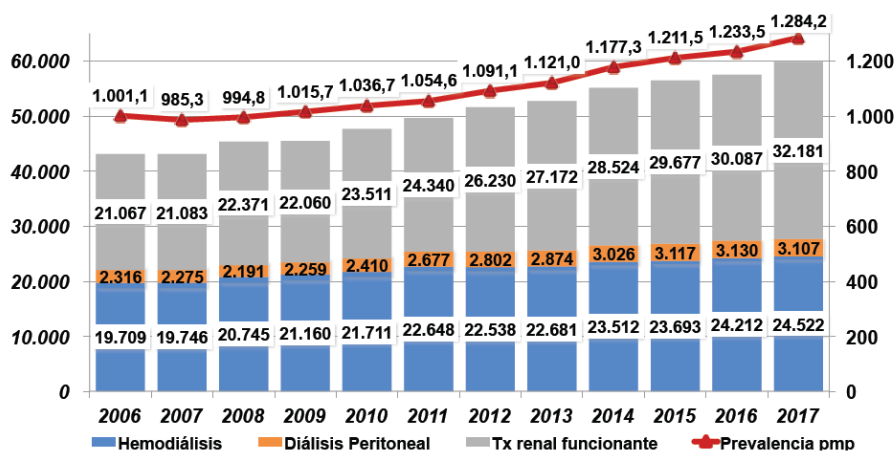


Figura 4: Prevalencia de la ERCT en los últimos años en España. Fuente: Registro Español de Enfermos Renales 2017.

Si comparamos la tasa de prevalencia del Estado Español con el resto de países recogidos en el último registro de la ERA-EDTA, ocupa una de las franjas de prevalencia más elevada, tal como se puede comprobar en la siguiente figura.



Figura 5: Prevalencia de la ERCT en los distintos países europeos en comparación con España. Fuente: Registry of the European Renal Association- European Dialysis and Transplant Association (2017).

Otro dato que refuerza el impacto que tiene la ERCT en el sistema sanitario es el elevado coste económico: en España se estima que el TSR consume entre un 2.5-3% del presupuesto del Sistema Nacional de Salud y más del 4% del presupuesto de la Atención Especializada, a pesar de afectar al 0.2% de la población. Este gasto supone, por ejemplo, 24 veces más que el destinado al tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica o 6 veces más que el que cuesta el tratamiento por la infección del VIH (10).

Dada, pues, la magnitud del problema se puede afirmar que, tanto la ERC, como la ERCT constituyen un problema de salud pública muy importante, situación que se ve acentuada si se tiene en cuenta la elevada morbimortalidad de estos pacientes, especialmente de causa CV (11).

2.2 MORBIMORTALIDAD CARDIOVASCULAR EN EL CONTEXTO DE LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA

2.2.1 EPIDEMIOLOGÍA

La presencia de ERC se asocia a un elevado riesgo CV, existiendo una relación entre el descenso del FG y el riesgo relativo de sufrir un evento CV y riesgo de muerte por causa CV (12,13).

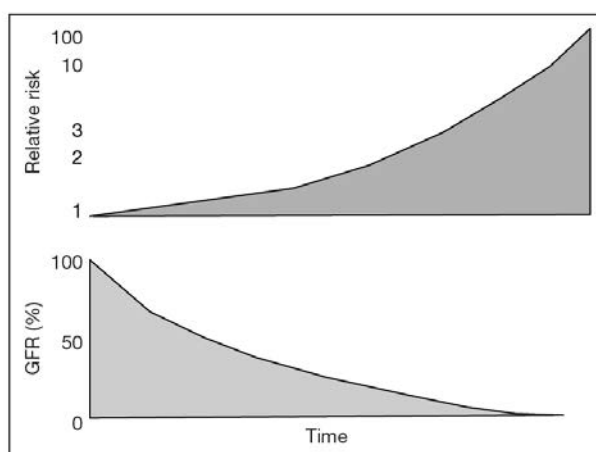


Figura 6: Relación entre la reducción del FG y mortalidad cardiovascular. Zoccali C. The burden of cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease and in end-stage renal disease. *Contrib Nephrol.* 2008; 161, 63–67 (con permiso de reproducción).

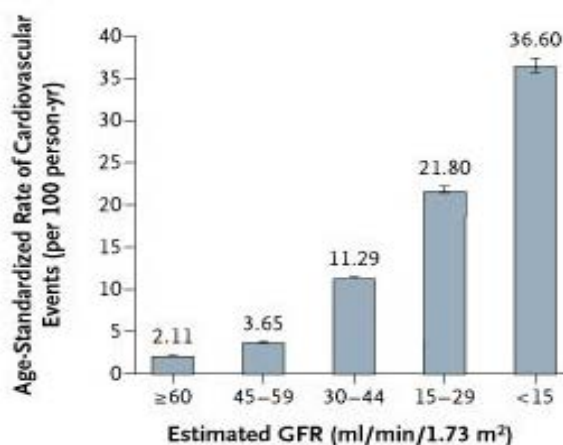


Figura 7: Relación entre FG y nº eventos cardiovasculares. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. *N Engl J Med.* 2004; 35 1(13):1296-305 (con permiso de reproducción).

Este riesgo se mantiene incluso tras ajustar por factores de riesgo CV clásicos, lo que permite definir la ERC como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de enfermedad CV (14). Esta circunstancia ha llevado a que las guías consideren estos pacientes como de riesgo CV alto (FGe entre 30-50 ml/min/1.73m²) o muy alto (FGe<30 ml/min/1.73m²), independientemente de la presencia o no de otros FRCV, y como tal, deben de ser considerados y tratados (15).

Se estima que el aumento global de riesgo CV es aproximadamente de un 20-30% por cada descenso del 30% de FG, independientemente de la existencia o no de enfermedad CV previa (16). De hecho, por ejemplo, el riesgo de desarrollar un infarto de miocardio (IAM) es mayor en pacientes no diabéticos con ERC avanzada que en pacientes diabéticos sin ERC (17).

Como caso extremo de asociación entre riesgo CV y ERC están los pacientes con ERCT y necesidad de TSR con diálisis. La mortalidad ajustada por edad es 3,5-4 veces superior a la de la población general y la patología cardiovascular es la principal causa de muerte de estos pacientes. Los distintos registros de pacientes en TSR coinciden en señalar que alrededor del 50% de las muertes son debidas a complicaciones cardiovasculares (incluye la muerte súbita, el de causa cardíaca y la enfermedad vascular), tal como se puede apreciar en la figura 8. Esta mortalidad resulta ser 10-20 veces superior a la de la población general tras ajustar por la edad, raza, sexo o presencia de diabetes (6–8,18).

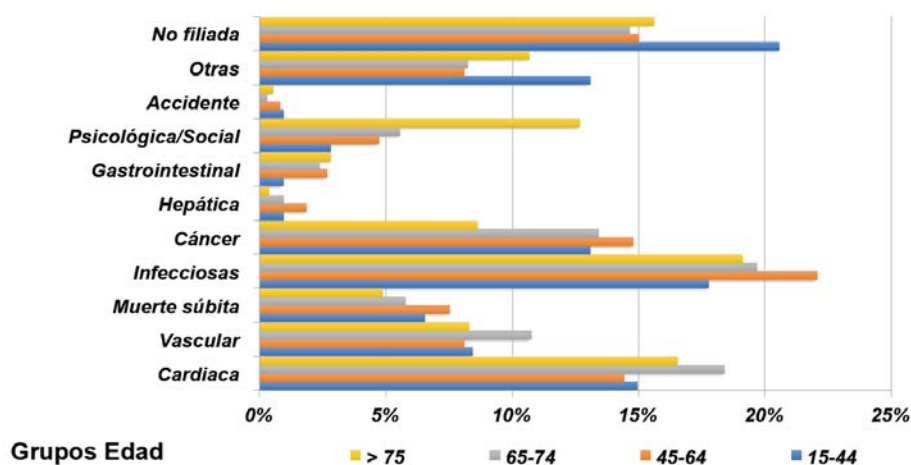


Figura 8: Causas de muerte de los pacientes con ERCT. Fuente: Registro Español de Enfermos Renales (2017).

Un dato de especial significado es que el riesgo relativo de muerte respecto a la población general es muy superior en los pacientes más jóvenes, tal como se constata en los últimos datos disponibles del Registro Español de Enfermos Renales (6) y que se reflejan en la figura 9.

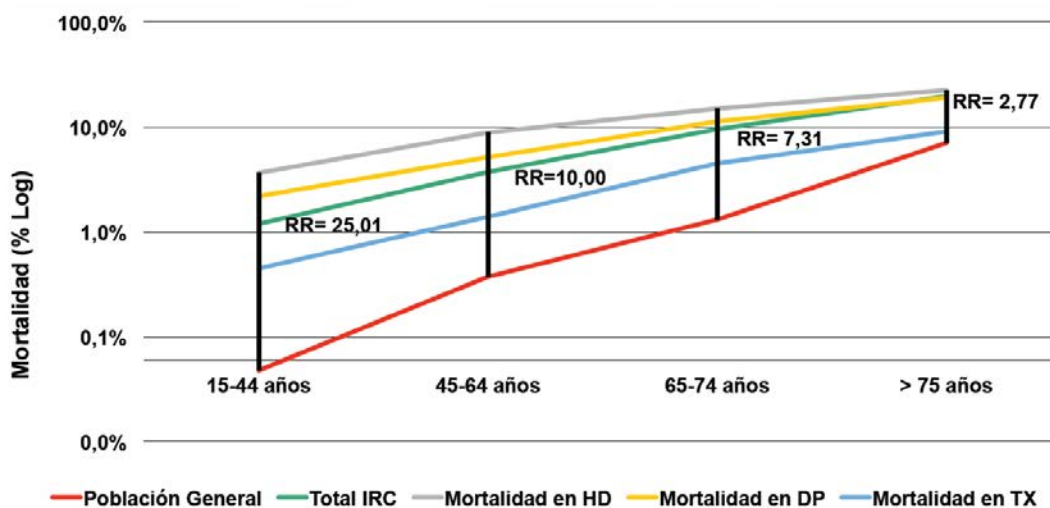


Figura 9: Riesgo relativo de muerte de los pacientes con ERCT en función de la franja etaria.

Fuente: Registro Español de Enfermos Renales (2017).

Los datos aportados por el Registro Español están en línea con los datos recogidos por el Registro Europeo que demuestran que la incidencia de muerte CV en pacientes de 15-30 años es 150 veces superior a la de la población general (7), sin mostrar cambios con respecto los resultados publicados del Registro Americano, ahora ya hace dos décadas, donde ya se señalaba que el riesgo de muerte de origen CV en pacientes menores de 45 años era 100 veces superior a la de la población general (18), tal como se puede observar en la figura 10.

Por otra parte, hay que considerar la elevada carga asistencial que supone la patología CV en este grupo de pacientes, dado que es la responsable de casi del 30% de las hospitalizaciones de los pacientes en diálisis (19).

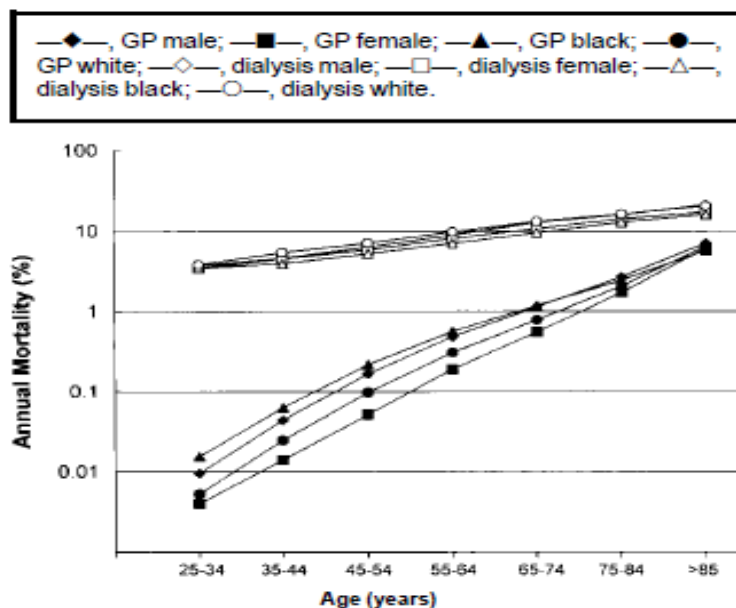


Figura 10: Mortalidad cardiovascular (muertes por arritmias, cardiomiopatía, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, enfermedad aterosclerótica y edema pulmonar) en la población general (GP) comparada con los pacientes con ERC en diálisis. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. AJKD, Vol 32, No 5, Suppl 3, 1998:S 112-S119 (con permiso de reproducción).

La explicación más plausible para justificar esta elevada prevalencia de enfermedad CV en la ERC se debe buscar en la circunstancia de que en la ERC convergen varias condiciones que favorecen el desarrollo de complicaciones CV. Estas condiciones incluyen: una mayor prevalencia de factores de riesgo CV clásicos, la presencia de los factores CV propios asociados a la condición de ERC, así como la existencia de cambios a nivel del sistema cardiovascular. Ello explicaría el peor pronóstico en estos pacientes, conllevando, por ejemplo, que la supervivencia de los pacientes que inician diálisis esté a los 5 y 10 años por debajo de los pacientes con cáncer de mama, próstata y colon (20).

Además, aquellos tratamientos que han demostrado tener una eficacia en la reducción de eventos CV en la población general o de alto riesgo (DM, cardiopatía isquémica) como los IECAS, ARA-II o las estatinas, no lo han demostrado en la población con ERCT (21–23).

2.2.2 AFECTACIÓN MACRO Y MICROVASCULAR EN LA ERC

La afectación vascular presente en la ERC abarca un amplio espectro que incluye un compromiso tanto a nivel macrovascular (aterosclerosis y arterioesclerosis), como a nivel microvascular. Es el resultado de la afectación de la pared de los vasos sanguíneos de distintos diámetros, en el que el principal actor implicado es el endotelio vascular.

2.2.2.1 Aterosclerosis en el contexto de la ERC

La aterosclerosis se caracteriza por la presencia de placas de ateroma, que se distribuyen de manera parcelar a nivel de la capa íntima de las arterias de mediano y gran tamaño.

En la formación de la placa de ateroma participan, en una fase inicial, los depósitos de material lipídico. Posteriormente, la placa mediante un proceso de fibrosis y calcificación tiende a encapsularse para dar lugar a una placa estable (24).

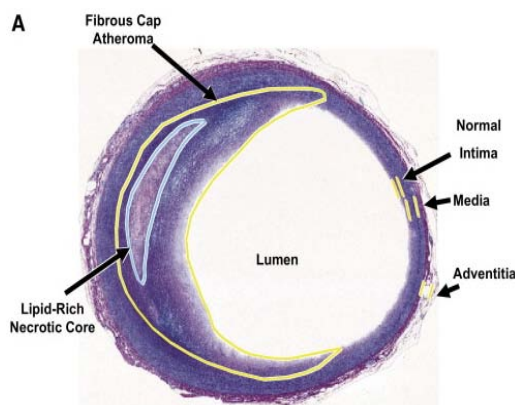


Figura 11: Placa de ateroma en paciente sin ERC. Insull W Jr .The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. Am J Med. 2009 Jan; 122 (1 Suppl):S3-S14 (Con permiso de reproducción).

Este proceso en la ERC se ve alterado por el estado prooxidante y proinflamatorio crónico en el que se encuentra embebido el endotelio que recubre las paredes vasculares. Las placas de ateroma en este contexto presentan unas características diferenciales que les confiere una organización peculiar: aumento del componente lipídico y del “core necrótico”, una

disminución del tapón fibroso, mayor presencia de cristales de colesterol, mayor presencia de macrófagos, una mayor neovascularización y una mayor presencia de hemorragia intraplaca, un mayor contenido de calcio y mayor disrupción y rotura de la placa. Todo ello las hace más vulnerables, frágiles e inestables (25). En parte, debido a la participación de leucocitos activados y la acción de metaloproteasas que conllevan una mayor posibilidad de rotura de las mismas, exposición del material a la sangre circulante, favoreciendo de esta manera, la trombosis de la luz vascular y el consiguiente evento isquémico agudo (26).

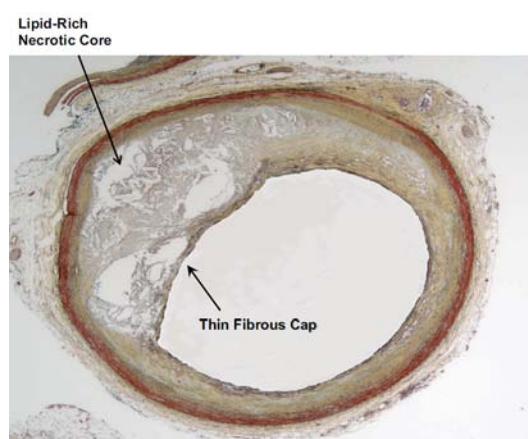


Figura 12: Placa de ateroma en paciente con ERC. Insull W Jr .The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. Am J Med. 2009 Jan; 122 (1 Suppl):S3-S14 (Con permiso de reproducción).

La localización más frecuente de la ateromatosis son las arterias coronarias, las carótidas y las arterias periféricas. Las placas de ateroma aparecen ya en las fases iniciales de la ERC, incluso en población joven y tienen además una velocidad de progresión rápida (27).

Estudios clínicos y necrópsicos han demostrado que la prevalencia de placas ateromatosas en arterias coronarias es elevada en los pacientes con ERC. La frecuencia de lesiones ateroscleróticas avanzadas y lesiones calcificadas aumentan de manera gradual a medida que disminuye el FG (28,29). En estudios angiográficos, las lesiones coronarias eran más frecuentes, proximales y severas en la ERC (27). La evaluación de la calcificación de las

arterias coronarias mediante tomografía (TAC) demuestra un score de calcio aumentado, el cual se correlaciona con una mayor morbimortalidad (25).

En pacientes con síndrome coronario agudo y ERC, las lesiones eran más largas, con una mayor carga de placa y mayor ocupación luminal. La composición de la placa aterosclerótica, evaluada mediante ecografía intravascular (IVUS), demostraba un aumento del “core” necrótico y de calcio y menos tapón fibroso (30,31), alteraciones que se asocian inversamente con el FG (31,32). Así pues, la enfermedad coronaria en la ERC, además de presentar una mayor carga aterosclerótica también presenta diferencias en la composición de la placa hacia un fenotipo más vulnerable (33). Análogos resultados se han observado mediante estudios ecográficos en otros territorios vasculares, como el ilíaco o el carotídeo (34–37).

2.2.2.2 Arteriosclerosis en el contexto de la ERC

La arteriosclerosis es una condición caracterizada por un remodelado generalizado del árbol vascular. Se desarrolla primariamente en la capa media de las grandes y medianas arterias, y su principal consecuencia es la rigidez arterial. Afecta principalmente a las arterias elásticas, como la aorta o la carótida común y es menos pronunciado en arterias periféricas de tipo muscular, como la arteria radial. Este remodelado vascular, en los pacientes renales, se caracteriza por dilatación e hipertrofia de la pared arterial. En la arteriosclerosis hay cambios estructurales de la pared vascular con un aumento del ratio colágeno/elastina, hipertrofia e hiperplasia de la fibra muscular lisa vascular y del volumen de matriz extracelular, así como un aumento del contenido de calcio y calcificación de las lamelas elásticas (38).

La función de la aorta y las grandes arterias es distribuir la sangre por el organismo y amortiguar los cambios oscilatorios en la presión arterial que resultan de una eyección ventricular intermitente. Este sistema arterial distensible permite a nivel de la microcirculación, que muchos tejidos reciban un flujo laminar o casi laminar y de baja presión, sin exposición a picos de

presión sistólica y sin casi disminuciones de la presión arterial media periférica comparado con la presión arterial media en la aorta ascendente (36). La pérdida de la distensibilidad arterial conduce a una aorta más rígida, lo que conlleva una mayor velocidad de la onda de pulso e implica un retorno más precoz de las ondas reflejas desde la periferia a la aorta ascendente durante la sístole. Como consecuencia se produce un aumento de la presión sistólica aórtica, un descenso de la presión arterial diastólica y el aumento consiguiente de la presión de pulso (39).

Aunque la arteriosclerosis en la ERC es frecuente, el aumento de la rigidez arterial se ha atribuido también a la calcificación vascular. Contribuye el desbalance entre los factores inductores e inhibidores del proceso de calcificación y cuya prevalencia aumenta con la severidad de la enfermedad. Aproximadamente el 70-80% de los pacientes renales presentan evidencia de calcificación vascular al inicio de diálisis (40). Esta calcificación tiene lugar a nivel de la capa media de la pared arterial (mediacalcosis o esclerosis de Mönckeberg) y agrava la rigidez arterial y sus consecuencias (41). También contribuye a la rigidez vascular la propia inflamación, el OS y la propia DE (42,43).

La rigidez arterial aparece precozmente ya en las primeras etapas de la ERC y aumenta a medida que esta progresa (44,45). Los cambios hemodinámicos inducidos por la rigidez arterial inducen un aumento de la postcarga cardíaca, hipertrofia ventricular izquierda (HVI) y fibrosis, lo que aumenta la demanda miocárdica de oxígeno; una reducción del flujo sanguíneo coronario e isquemia subendocárdica, y DE (46).

La rigidez aórtica aumenta en un grado mucho mayor que la rigidez arterial periférica, disipando progresivamente el gradiente de la rigidez. Ello limita y disminuye progresivamente la reflexión parcial, y aumenta la transmisión de la energía pulsátil a la microcirculación periférica. Esta “no protección” es especialmente pronunciada en el cerebro y los riñones, dos órganos altamente perfundidos y de baja resistencia. También se asocia con una mayor fatiga de la pared vascular arterial. La rigidez arterial afecta la interacción arterial-

ventricular. En presencia de un árbol vascular rígido, el corazón aumenta la rigidez sistólica para mantener la eficiencia metabólica, asegurando la transferencia de la sangre al árbol vascular sin cambios excesivos en la presión. Estas adaptaciones compensadoras mantienen el rendimiento cardíaco con aumento de la contractilidad en reposo, pero al precio de disminuir la reserva cardíaca, disminuir la función diastólica y una respuesta cardiovascular a las alteraciones a las cargas de presión o volumen disminuida.

La rigidez arterial se asocia con mortalidad CV, tanto en pacientes con ERC terminal, como en todos los estadios de ERC (47,48). Además, la rigidez arterial es un factor predictor de la caída de la función renal en pacientes con ERC (49,50).

Entre los factores implicados en la arteriosclerosis en la ERC destacan: la edad, HTA, la diabetes, el tabaquismo, la sobrecarga de volumen (hipervolemia) y de presión, la hiperactividad simpática y la activación del sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), la inflamación, el OS, las alteraciones del metabolismo óseo-mineral y la calcificación vascular, así como cambios hormonales (p.e los niveles bajos de T3 o de testosterona).

Respecto a la activación del SRAA, la aldosterona está elevada en la ERC y su efecto sobre el OS y la inflamación favorecen los cambios fibróticos en la pared vascular y el miocardio. Además, la aldosterona favorece la DE, disfunción autonómica, vasoconstricción e HTA (51).

Sin embargo, los factores asociados con la rigidez arterial más frecuentemente observados en pacientes con ERC son las alteraciones del metabolismo óseo-mineral y la presencia de calcificaciones vasculares. En los pacientes urémicos la velocidad de la onda de pulso aórtica (un marcador de rigidez arterial) se asocia con mediocalcosis de la aorta y un aumento del producto calcio-fósforo. Asimismo, la distensibilidad de la arteria carótida común se ha relacionado con los niveles de PTH o el grado de calcificación de la misma.

La rigidez arterial es pues el resultado de alteraciones funcionales y estructurales de la pared vascular. Aunque la DE es potencialmente mejorable

(52) y por tanto susceptible de tratamiento, los cambios estructurales son difíciles de revertir.

La arteriosclerosis puede contribuir a la aterosclerosis y viceversa, posiblemente por mecanismos como la DE, estrés biomecánico sobre las células endoteliales y fragmentación de las fibras de elastina.

2.2.2.3 Afectación microvascular en el contexto de la ERC

La alteración microvascular, especialmente a nivel de la circulación coronaria es un aspecto especialmente crítico. Los estudios clínicos en la población general han demostrado que una mejor circulación colateral miocárdica predice una mayor supervivencia y un menor número de complicaciones después de un IAM (53).

La disfunción microvascular, al afectar la resistencia al flujo y la perfusión tisular, subyace en la disfunción orgánica asociada a los factores de riesgo CV clásicos y parece importante en su patogénesis y progresión (53).

La disfunción microvascular puede ser causada no sólo por una alteración de la vasodilatación endotelio-dependiente (que traduce una DE) sino también por una rarefacción en la microvasculatura (disminución del número de arteriolas y capilares en un volumen de tejido).

En la ERC, se ha descrito tanto la presencia de DE como de una rarefacción capilar. La rarefacción microvascular reduce la superficie de intercambio y aumenta la distancia entre los capilares y las células diana. Estudios experimentales demuestran un aumento del tamaño del infarto y una alteración de la angiogénesis inducida por isquemia en animales con ERC, lo que sugiere que los cambios en la perfusión microvascular podrían explicar en parte la alta tasa de mortalidad cardiovascular en la población con ERC. Se ha demostrado una marcada reducción de la densidad capilar en el ventrículo izquierdo (VI) en animales urémicos; así como en una cohorte de pacientes con ERCT, sin enfermedad de las arterias coronarias epicárdicas (54) y una disminución de la

densidad capilar en otros territorios en pacientes con ERC avanzada (55). Por lo que, las alteraciones estructurales de la microvasculatura coronaria, pueden explicar, en parte, el aumento del riesgo de eventos cardiovasculares en pacientes con ERC. En este sentido, la reserva de flujo coronario está disminuida en pacientes con ERC (56), hecho que se ha relacionado con los niveles de dimetilarginina asimétrica (ADMA) (57), y tiene implicaciones pronósticas (58).

2.2.2.4 Consecuencias clínicas de la afectación macro y microvascular en la ERC

La patología CV asociada a la ERC tiene características que la diferencian de la población general. Estos pacientes presentan una mayor prevalencia de: cardiopatía isquémica, ictus/accidente isquémico transitorio (AIT), enfermedad vascular periférica, así como de insuficiencia cardíaca, enfermedad valvular cardíaca, fibrilación auricular o arritmias/muerte súbita, lo que se asocia con una mayor morbimortalidad (59).

Estos pacientes presentan una incidencia creciente de complicaciones CV ateroscleróticas, especialmente durante los primeros estadios de la enfermedad (14,15,17), para luego estabilizarse en fases más avanzadas de la ERC. Por el contrario, en fases más evolucionadas siguen aumentando progresivamente las complicaciones CV no ateroscleróticas (HVI, insuficiencia cardíaca, arritmias, muerte súbita, calcificación valvular y vascular, ictus hemorrágico, etc) (59). De hecho, en los pacientes en HD la principal causa de muerte CV es la arritmia/muerte súbita, muy superior a la muerte por IAM o el ictus. Ello puede explicar el menor beneficio de tratamientos como las estatinas, que han demostrado reducir el riesgo CV en la población general (asociado a una disminución de complicaciones ateroscleróticas), pero no así en pacientes con ERC avanzada o terminal (60).

La presencia de ERC en pacientes que sufren un evento CV de cualquier tipo, aterosclerótico o no, se asocia con un peor pronóstico, a corto y a medio plazo, lo que también contribuye a la mayor mortalidad CV en pacientes con ERC. El

pronóstico empeora a medida que disminuye la función renal (61–65), tal como se sintetiza en la tabla siguiente.

Riesgo según estadio	Estadio 1	Estadio 2	Estadio 3	Estadio 4	Estadio 5
Enfermedad CV aterosclerótica	↑	↑↑	↑↑↑	↔	↔
Enfermedad CV no aterosclerótica	↑	↑↑	↑↑↑	↑↑↑↑	↑↑↑↑↑
Riesgo de mortalidad ante un evento CV	↑	↑↑	↑↑↑	↑↑↑↑	↑↑↑↑↑

Tabla 1: Resumen del Riesgo de morbimortalidad CV según estadio de ERC

A partir de: Mafham M, Emberson J, Landray MJ, Wen C-P, Baigent C.: Estimated glomerular filtration rate and the risk of major vascular events and all-cause mortality: a meta-analysis. PLoS One. 2011; 6(10):e25920.

En conclusión, la ERC se asocia con un mayor riesgo de sufrir eventos CV (tanto aterotrombóticos como no aterotrombóticos), consecuencia de la compleja interacción entre la mayor prevalencia de factores de riesgo CV clásicos y los emergentes y/o propios de la ERC, así como de los cambios en el sistema cardiovascular. Además, el pronóstico de un paciente con ERC que sufre un evento CV es peor, lo que contribuye a la mayor mortalidad CV en estos pacientes.

2.3 FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR

En los pacientes con ERC coexisten varios factores que se suman y potencian, determinando así el elevado riesgo CV que los caracteriza. La prevalencia de los factores de riesgo CV clásicos, como la hipertensión arterial (HTA), diabetes mellitus (DM), dislipipemia, etc. (Tabla 2) es elevada en la población con ERC y el número de factores de riesgo aumenta con la gravedad de la enfermedad (66).

FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR CLÁSICOS	
Edad	Sexo masculino
Historia familiar de enfermedad CV	Hipertensión arterial
Dislipemia: LDL elevado, HDL bajo	Diabetes
Tabaquismo	Sedentarismo
Hipertrofia ventricular izquierda	Menopausia

Tabla 2: Factores de riesgo CV clásicos del paciente con ERC.

Sin embargo, las escalas de riesgo CV validadas en la población general como por ejemplo la Escala de Framingham, infraestiman el riesgo CV en hasta un 50% en la ERC (67). Se ha postulado la implicación de factores de riesgo no tradicionales o propios de la ERC (Tabla 3) como consecuencia del ambiente urémico *per se* y que contribuirían a explicar este mayor riesgo CV (68–70).

FACTORES DE RIESGO NUEVOS Y ASOCIADOS A LA CONDICIÓN DE ERC	
Albuminuria	Anemia
Dislipemia aterogénica	Alteraciones del metabolismo óseo-mineral
Patrón “non-dipper” de presión arterial	Rigidez arterial
Síndrome de apnea obstructiva del sueño	Sobrecarga de volumen
Inflamación	Diselectrolitemia
Hiperactividad simpática y del SRAA	Estrés oxidativo
Disfunción autonómica cardíaca	Acumulación de toxinas urémicas
Disfunción endotelial	Hiperhomocisteinemia
Hiperuricemia	Resistencia a la insulina
Aumento de prolactina, déficit de testosterona en varones.	Factores trombogénicos
Niveles bajos de T3	Aumento niveles de ADMA

Tabla 3: Factores de riesgo CV nuevos y asociados a la condición de ERC.

2.3.1 FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR CLÁSICOS

Los pacientes con ERC presentan una mayor prevalencia de factores de riesgo CV clásicos. Algunos de ellos participan directamente como principal causa de ERC: la HTA, la DM o la obesidad. No obstante, su mayor presencia no resulta suficiente para explicar la elevada morbimortalidad CV de los pacientes con ERC.

2.3.1.1 Hipertensión arterial (HTA)

La HTA es prácticamente omnipresente en la ERC (entre el 80-85% de pacientes con ERC). No es únicamente un factor de riesgo CV, pues puede ser a la vez causa y consecuencia del daño renal (71). La HTA participa de manera directa en el desarrollo y progresión de ERC, y así mismo la propia ERC, incluso en fases precoces, puede inducir HTA, siendo más frecuente y severa a medida que disminuye la función renal (72). El riñón, pues, participa como víctima y villano.

No resulta infrecuente la presencia de HTA resistente en pacientes con ERC (73), en parte debido a una mayor rigidez arterial. Se acompaña de un mayor aumento de la presión de pulso, lo que determina que el tratamiento sea más complicado. Otra característica de la HTA de los enfermos ERC es la elevada prevalencia del patrón “non-dipper”, que es superior en esta población, y que aumenta a medida que empeora la función renal (74) con las consiguientes implicaciones pronósticas (75). Estas características de la HTA en el paciente renal determinan que su peso como factor de riesgo CV sea más marcado en comparación con aquellos sin enfermedad renal (76).

2.3.1.2 Dislipemia

La dislipemia es un factor clásico de riesgo CV en la población general (LDL-c elevado; HDL-c bajo). No obstante, el perfil lipídico presente en la ERC, especialmente en los estadios 5D, presenta cambios tanto cuantitativos como

cualitativos, lo que le confiere una condición de dislipemia especialmente aterogénica (77,78).

Colesterol total	Normal o ↑
LDL	Normal o ↑
HDL	↓
VLDL	↑
IDL	↑
LDL oxidadas	↑
Triglicéridos	↑
Lp (a)	↑
Ratio apolipoproteína C-III/C-II	↑
Apoproteína A1	↓

Tabla 4: Cambios cuantitativos del perfil lipídico en la ERC.

HDL-c	Cambios en la composición de las partículas Partículas disfuncionantes
LDL-c	Mayor oxidación, glicación y carbamilación

Tabla 5: Cambios cualitativos del perfil lipídico en la ERC.

El impacto de la presencia de estos cambios cualitativos y cuantitativos del perfil lipídico sobre el riesgo CV presente en los enfermos con ERC avanzada o en diálisis deja aspectos por esclarecer. En estudios con muestras relativamente pequeñas, la relación entre niveles de colesterol y riesgo CV en pacientes con ERC ha arrojado resultados contradictorios (69,79,80). En un estudio reciente, la asociación entre niveles elevados de LDL-c y riesgo de IAM era más débil cuanto más avanzado era el estadio de la enfermedad, a pesar de que estos pacientes presentaban un mayor riesgo absoluto de sufrir un evento coronario (81).

En pacientes con ERC en HD, los niveles de LDL-c no se asocian (o incluso lo hacen inversamente) con la mortalidad (81). Es posible que la relación decreciente entre niveles de LDL-c y riesgo de eventos coronarios a medida que disminuye FG pueda tener relación con una mayor prevalencia de malnutrición-inflamación en estadios más avanzados de la enfermedad (80,82) o el riesgo competitivo de eventos CV no ateroscleróticos, como la insuficiencia

cardiaca o la muerte súbita, que son más frecuentes en fases avanzadas de la ERC, y que no están relacionados con los niveles de LDL-c.

2.3.1.3 Diabetes Mellitus

La importancia de la DM en el contexto de la enfermedad renal es dual: por un lado es la principal causa de ERCT en el mundo occidental (83) y por otro lado, es un importante factor de riesgo CV (84). Aproximadamente entre un 20-40% de los pacientes con DM tipo 2 presentan ERC y a su vez, la presencia de ésta aumenta de forma marcada el riesgo CV, ya de por sí elevado en los pacientes diabéticos (17).

La microalbuminuria es un factor independiente de riesgo CV en la DM (así como en la población general) (85). La presencia de albuminuria o de un FG disminuido incrementan el riesgo de mortalidad y la presencia de ambos, aumenta el riesgo de forma más que aditiva (86). Por ello, es fundamental una identificación precoz de la ERC en esta población y conseguir un buen control glucémico y de los factores que pueden favorecer la aparición o progresión de la nefropatía diabética. Los pacientes diabéticos con ERC presentan un mayor riesgo de hipoglicemia, la cual se ha asociado con una mayor mortalidad total y CV, y podría contribuir al peor pronóstico CV en esta población (87).

2.3.1.4 Tabaquismo

Actualmente también se le atribuye un papel dual ya que claramente es un factor de riesgo CV y además juega un papel en la progresión de la ERC. Existe una evidencia creciente de la relación entre tabaquismo y enfermedad renal (88) y el tabaquismo aumenta el ya de por sí elevado riesgo CV en los pacientes con ERC (69). Por ello, aun en ausencia de evidencias que demuestren el beneficio del cese del hábito tabáquico en esta población, y por extrapolación de los beneficios del mismo en la población general debe recomendarse su cese en los pacientes fumadores con ERC.

2.3.1.5 Hipertrofia ventricular izquierda (HVI)

La prevalencia de HVI en los pacientes con ERC es elevada y aumenta a medida que disminuye la función renal (89,90). Oscila entre el 25-70% en pacientes con ERC y alcanza el 70% o más en pacientes con ERCT. Esta HVI es predominantemente concéntrica (88).

La HVI, resultado de una hipertrofia de los miocardiocitos, es una respuesta adaptativa a un incremento del trabajo cardíaco, clásicamente generado por un aumento de la sobrecarga de presión y/o de volumen, aunque en la ERC también están implicados mecanismos no hemodinámicos. En la ERC también se ha descrito un aumento de la fibrosis y de la matriz extracelular así y una disminución de la densidad capilar miocárdica lo que constituye en su conjunto la miocardiopatía urémica (88).

La HVI induce una disminución de la reserva coronaria, que puede verse agravada por la rarefacción capilar y la DE presentes en la ERC. La fibrosis miocárdica en la ERC conlleva un aumento de la rigidez del ventrículo izquierdo (VI), una alteración del llenado diastólico del VI que puede afectar la contractilidad cardíaca y favorecer la disfunción diastólica (91). De hecho, la prevalencia de disfunción diastólica aumenta paralelamente al incremento de la masa del ventrículo izquierdo (90). Además, podría favorecer las arritmias ventriculares y muerte súbita, cuya prevalencia está aumentada en esta población (92). La HVI y la fracción de eyección del VI, entre otros, predicen de forma independiente el riesgo de eventos CV en pacientes con ERC (93).

La HVI también se ha asociado con una mayor progresión de la enfermedad renal (89,94). En estos pacientes se ha descrito un aumento del volumen de la aurícula izquierda (91), atribuida a la disfunción diastólica, sobrecarga de volumen y el estado inflamatorio que se ha asociado con un aumento del riesgo mortalidad, eventos CV y progresión de la ERC (91,94).

En la siguiente tabla se resumen los factores implicados en la HVI asociada a la ERC.

Factores hemodinámicos (sobrecarga de volumen o de presión)	Factores no hemodinámicos
Hipertensión arterial Enfermedad valvular Rigidez arterial Hipervolemia Anemia Fistula arteriovenosa	Hiperactividad simpática Hiperactividad del SRAA Resistencia a la insulina Inflamación Dimetilarginina asimétrica Acumulación de toxinas urémicas (IS) Aumento de FGF-23 Déficit de α -klotho Déficit de vitamina D Hiperparatiroidismo secundario Hiperfosforemia Esteroides cardiotónicos (EO, MBG)

FGF-23: fibroblast growth factor 23, EO: endogenous ouabain, MBG: marinobufagenina, IS:indoxil sulfato,

Tabla 6: Factores implicados en la HVI asociada a la ERC.

2.3.2 FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR ASOCIADOS A LA INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA

2.3.2.1 Albuminuria

La presencia de albuminuria es un potente predictor de riesgo y de mortalidad CV y total (95), así como de progresión de la ERC. La relación entre albuminuria y riesgo CV es lineal, sin efecto umbral. El riesgo empieza a aumentar desde niveles considerados tradicionalmente bajos (cociente albumina / creatinina > 10 mg/g creatinina) (14).

Clásicamente, se ha considerado que la albuminuria es un marcador de daño vascular y DE (96), ya que se ha asociado con marcadores de la coagulación, DE o inflamación, que están directamente implicados en la aterogénesis. La reducción de la albuminuria con inhibidores del SRAA se asocia a una reducción del riesgo CV en la población general, en pacientes hipertensos con HVI o en pacientes diabéticos (97–99); así como un retraso de la progresión de la ERC (100).

2.3.2.2 Anemia

Es una complicación muy frecuente en los pacientes con ERC. Su prevalencia aumenta a medida que disminuye la función renal (101) y es un factor de riesgo independiente de desarrollo y progresión de la HVI e insuficiencia cardíaca. Su presencia, o su desarrollo durante el seguimiento, se asocian de forma independiente y sinérgica con un mayor riesgo de morbimortalidad CV en esta población (102–105). Estudios recientes sugieren que también es un factor de riesgo de progresión de la ERC (102,105). Así pues, la anemia es un factor de riesgo modificable en esta población, aunque no está claro que su corrección con agentes estimuladores de la eritropoyesis reduzca el riesgo CV o de progresión de la ERC (106).

2.3.2.3 Alteraciones del metabolismo óseo-mineral

En la ERC se producen alteraciones diversas y complejas del metabolismo óseo-mineral, como la hiperfosforemia, la hipocalcemia, el aumento de parathormona (PTH) o de fibroblast growth factor 23 (FGF-23); así como déficits de vitamina D y α -klotho. También existe un desbalance entre factores inhibidores (fetuina-A y matrix-Gla protein [MGP]), y promotores (hiperfosfatemia, inflamación, toxinas urémicas) de la calcificación vascular, en favor de los segundos, lo que favorece su desarrollo y progresión (107).

La hiperfosforemia, frecuente en la ERC, favorece el desarrollo de la calcificación vascular (108). Recientemente se ha descrito también su efecto vasculotóxico e inductor de DE (109). Estudios en pacientes con ERC y no renales, han descrito una asociación directa entre fosforemia y riesgo de eventos CV, fibrilación auricular, mortalidad y progresión de la ERC (110).

El hiperparatiroidismo secundario es otra complicación frecuente en la ERC. El aumento de los niveles de PTH se han asociado con un mayor riesgo CV, tanto en pacientes renales, como en la población general (111). Estudios clínicos y experimentales sugieren que la PTH puede participar en procesos patológicos implicados en la enfermedad CV, como la HVI (112).

Los receptores de vitamina D están presentes en diversos tejidos, incluidos el sistema CV. La vitamina D regula el SRAA, induce secreción de insulina y aumenta su sensibilidad, regula el crecimiento y la proliferación de los miocardiocitos y la fibra muscular lisa vascular, y tiene efectos inmunomoduladores que pueden proteger frente al desarrollo y progresión de la aterosclerosis (113). Niveles bajos de 25(OH) vitamina D se han asociado a HTA, alteraciones del metabolismo glucémico, albuminuria, DE, rigidez arterial, fibrilación auricular, así como a un mayor riesgo de mortalidad y progresión de la enfermedad renal en la ERC. De forma similar, niveles bajos de 1,25(OH)₂-vitamina D se han asociado con una mayor mortalidad (114). Sin embargo, aunque un metaanálisis de estudios observacionales ha descrito una reducción de la mortalidad total y CV en pacientes con ERC con el tratamiento con

vitamina D activa, especialmente en aquellos con hiperparatiroidismo secundario (115), ello no se ha confirmado en estudios aleatorizados y entra en contradicción con otro metanálisis recientemente publicado que concluye que la suplementación con vitamina D no se asocia con una reducción de la mortalidad CV (116) en la población general.

La relevancia clínica del aumento de FGF-23 y el déficit de α -klotho en la enfermedad CV asociada a la ERC está siendo progresivamente reconocida. FGF-23 es una hormona fosfatúrica que está incrementada en la ERC y está implicada en la HVI (59). α -klotho favorece la fosfaturia a través de los cotransportadores Na/P IIa y IIc, pero también tiene efectos protectores sobre la senescencia celular, apoptosis y calcificación vascular. El aumento de la fosforemia y FGF-23, junto al déficit de α -klotho se han implicado en la miocardiopatía urémica, calcificación vascular y la rigidez arterial (117).

Además, la calcificación vascular puede agravarse por los tratamientos prescritos para el manejo de estas complicaciones (p.e captosres de fósforo cálcicos o dosis altas de vitamina D activa para el tratamiento del hiperparatiroidismo secundario).

2.3.2.4 Hiperhomocisteinemia

La homocisteína (Hcy) es un aminoácido sulfurado que se origina a partir del metabolismo de la metionina. En las situaciones de déficit de ácido fólico, vitamina B6, vitamina B12 (cofactores necesarios de su vía metabólica), en casos de déficits enzimáticos de las vías de transulfuración, transmetilación o remetilación y en la ERC se produce una acumulación progresiva de la Hcy (118).

La hiperhomocisteinemia repercute directamente sobre la función endotelial y, consecuentemente, se ve incrementado el riesgo CV. Los mecanismos implicados serían: aumento del OS a través del incremento de la actividad de la NADPH oxidasa, desacoplamiento de la sintasa del óxido nítrico endotelial (eNOS), reducción de la actividad de la enzima dimetilarginina

dimetilaminohidrolasa (DDHD) con el consiguiente acúmulo de ADMA. Este último fomentaría la DE a través de su capacidad de inhibición de la NOS, de aumentar el OS, de activar la lipooxigenasa-1 y de incrementar la síntesis de colágeno y la expresión de integrinas en la superficie endotelial (119). Además la hiperhomocisteinemia favorece la agregación plaquetaria y atenúa la capacidad fibrinolítica

Todos los mecanismos descritos van a redundar en una pérdida de la respuesta vasodilatadora y van a favorecer un fenotipo protrombótico y proinflamatorio.

No obstante, los distintos estudios que han evaluado estrategias de reducción de los niveles de Hcy en la población de diálisis han demostrado resultados no concluyentes respecto el objetivo de lograr una reducción significativa de eventos cardiovasculares en los pacientes con ERC (118).

2.3.2.5 Hiperuricemia

El ácido úrico es el producto final del metabolismo de las purinas y se forma a partir de hipoxantinas y xantinas. Al ser la excreción renal su principal vía de eliminación, en la ERC, se van a encontrar frecuentemente elevados sus niveles. Su papel como factor de riesgo CV continua siendo hoy en día controvertido, más cuando el propio ácido úrico es uno de los antioxidantes presentes en el plasma (efecto paradójico).

Los mecanismos implicados a nivel endotelial que se contemplan como responsables de su efecto nocivo incluye la activación del SRAA, activación de la NADPH oxidasa, estimulación de distintas quimiocinas proinflamatorias, disminución de la disponibilidad del NO y la activación de mediadores vasoconstrictores (120).

2.3.2.6 Actividad del SRAA y del sistema simpático

La ERC se caracteriza por presentar un aumento de la actividad tanto del sistema nervioso simpático (SNS) como del SRAA. Ambas situaciones comparten mecanismos comunes que se han relacionado con un aumento del riesgo CV, tanto en la población general, como en el subgrupo de enfermos con ERC, destacando la inflamación, el incremento del OS y la disminución del NO (121,122).

2.3.2.7 Hipercoagulabilidad

La mayor tendencia al estado de hipercoagulabilidad presente en la ERC se explica por la confluencia de varios factores que modifican el equilibrio entre los sistemas procoagulantes y anticoagulantes, a favor de los primeros. Las plaquetas expresan más fosfatidilserina así como más P-selectina y receptores del fibrinógeno PAC-1, lo que les confiere una mayor reactividad y una mayor facilidad para formar agregados con leucocitos. En la ERC existe una elevación de los niveles de fibrinógeno, FvW, de los factores de coagulación XII_a, VIII y VII_a, de la proteína C activada y los complejos trombina-antitrombina y del D-dímero. La actividad anticoagulante de la antitrombina está disminuida y los niveles del inhibidor de la fibrinólisis, del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) están aumentados y hay una inhibición de la plasmina por aumento de los niveles de Lp(a). Todo ello supone que el coágulo de los pacientes con ERC sea más rígido, menos permeable y menos susceptible a fibrinólisis, asociándose a un peor pronóstico. Estos cambios observados se correlacionan con el grado de deterioro de la función renal (123).

La inflamación y el estrés oxidativo, por su importancia e implicación en la DE y, por lo tanto, en el desarrollo de la enfermedad CV, se tratan conjuntamente en el siguiente capítulo.

2.4 INFLAMACIÓN y ESTRÉS OXIDATIVO

Existe una estrecha relación entre inflamación y OS. Resulta imposible separar ambos fenómenos que se encuentran marcadamente incrementados en la ERC. Actúan como factores de riesgo CV al estar ambos directamente implicados en la DE. La uremia es causa de inflamación y esta, a su vez, un potente estímulo para potenciar el OS. Al mismo tiempo, la propia ERC o los tratamientos de diálisis son causa de OS y éste un potente estímulo inflamatorio (43).

2.4.1 INFLAMACIÓN

El proceso de inflamación es la consecuencia de la respuesta de defensa del organismo a la presencia de uno o varios agentes perniciosos con el objetivo de alcanzar su eliminación o neutralización. Lo que en un principio supone un efecto beneficioso, se convierte en perjudicial cuando la elevación de las citocinas proinflamatorias persiste en el tiempo, tal como sucede en la ERC (124,125).

En la ERC existe un estado proinflamatorio crónico, tal como se deduce de los niveles aumentados de los distintos biomarcadores disponibles para su medición, ya sea como consecuencia de un aumento de su producción o por un descenso de su eliminación debido a la reducción de su aclaramiento renal (126).

Son varios los marcadores séricos de inflamación que se encuentran elevados en la ERC. En la práctica habitual el más utilizado para cuantificar el grado de inflamación es la determinación de proteína C reactiva (PCR), una proteína reactante de fase aguda, gracias a su reproducibilidad, bajo coste y fácil disponibilidad. No se disponen de valores de referencia de PCR para los pacientes con ERC pero sí parece que los niveles están, por lo general, por encima de los valores de referencia de la población general (126). Su síntesis a nivel hepático es en respuesta a la presencia en sangre de citocinas

proinflamatorias circulantes, especialmente la Interleucina 6 (IL-6), el Factor de Necrosis Tisular alfa (TNF- α) y la Interleucina 1 (IL-1).

Son varias y diversas las circunstancias que participan en la perpetuación del ambiente inflamatorio en la ERC:

Acúmulo de toxinas urémicas y acidosis metabólica:

La ERC está asociada irremediablemente al acúmulo de distintos productos como consecuencia de la incapacidad de ser excretados adecuadamente por el riñón o por las técnicas de diálisis. Interfieren en el normal funcionamiento de los distintos órganos y sistemas biológicos, entre los que se encuentra el endotelio vascular (1,2). De las toxinas acumuladas, están adquiriendo de manera creciente, una mayor relevancia el papel que puedan jugar las toxinas urémicas originadas en la microflora intestinal y que se acumulan en la ERC (indoles, fenoles o trimetilamina-N-óxido), así como por el aumento de la permeabilidad intestinal asociado a la ERC, que permite el paso al plasma de endotoxinas o productos de origen bacteriano (127,128).

Una de las teorías que adquiere cada vez un mayor protagonismo es el de considerar que las toxinas actuarían como DAMPs (damage-associated molecular patterns) lo que se favorecería la activación crónica del sistema inmunitario, al ser interpretados como una noxa o señal de alarma, activando y perpetuando la respuesta inflamatoria (129).

Además, el desbalance entre la excreción y el balance positivo de H⁺ y la reducción de producción de bicarbonato a nivel renal, favorece el desarrollo de acidosis metabólica que también participa en la activación de la respuesta inflamatoria (1,2).

Aclaramiento renal disminuido de citocinas inflamatorias o proinflamatorias:

Este hallazgo es incluso detectable en etapas iniciales de pérdida de la FR existiendo una correlación entre la pérdida de FR y el grado de inflamación y OS. Se establece así un círculo vicioso: a mayor pérdida de función renal, mayor estado inflamatorio que, a su vez, acelera la caída de la FR (130,131).

Estrés oxidativo:

Está marcadamente aumentado en la ERC, guardando relación con la progresión de la ERC (132). Es un potente estímulo de producción de diversas citocinas proinflamatorias por parte de las células del sistema inmunitario (133) y del endotelio vascular, destacando el papel del factor de transcripción NFκB como nexo entre inflamación y el OS.

Productos avanzados de la glicosilación (AGEs):

Los AGEs se encuentran aumentados tanto como consecuencia de su mayor síntesis como por la incapacidad de las técnicas de diálisis de eliminarlos. En el caso de la DP el uso de soluciones hipertónicas o bioincompatibles aumentaría su síntesis y su absorción a través de la membrana peritoneal. Los AGEs, ya sea por interacción con sus propios receptores, o a través de los TLR4, participan en la activación de la cascada inflamatoria (134). Pero, a su vez, la propia inflamación está implicada en la síntesis de los AGEs (135), perpetuando así un círculo vicioso.

Modalidad de diálisis:

La diálisis estimula el proceso inflamatorio. En el caso de la HD, por exposición de la sangre a filtros poco biocompatibles (136) y al líquido de diálisis, especialmente cuando éste no es un líquido ultrapuro (libre de endotoxinas)

(137–140). El uso de catéteres o fistulas protésicas como accesos vasculares es otro estímulo de inflamación. En la DP, la exposición a las soluciones de diálisis (especialmente si son soluciones bioincompatibles) es también una causa de inflamación (126).

Infecciones:

Los agentes infecciosos estimulan la cascada de respuesta inflamatoria (141). No es nada infrecuente en la población de diálisis que la periodontitis pase desapercibida, siendo éste un foco importante de infección crónica e inflamación mantenida (142).

Sobrehidratación:

La hipervolemia es una situación muy frecuente en la población de diálisis, tanto en HD como en DP, Además de las consecuencias mecánicas sobre el sistema CV, como la HVI e HTA, el edema presente en la pared de la mucosa intestinal favorece la translocación bacteriana y, con ello, la exposición del sistema inmunitario a distintos estímulos proinflamatorios (143).

Síndrome de intolerancia al injerto renal:

Se trata de una causa nada infrecuente de estímulo inflamatorio de los pacientes que regresan a diálisis tras la pérdida de un injerto renal (144).

La inflamación mantenida en el tiempo, tal como sucede en la ERC está claramente asociada a un aumento del riesgo CV (126). La PCR elevada predice la mortalidad total y CV en pacientes en HD: los pacientes con valores basales de PCR más elevados tienen un riesgo relativo 2,4 más alto de muerte y un riesgo 1,7 más alto de muerte CV ($p < 0,0001$). La PCR elevada es el mayor predictor de mortalidad junto con la edad y la enfermedad CV previa (145).

La inflamación es capaz de activar múltiples mecanismos que al final van a tener un impacto directo sobre la DE y, por lo tanto, sobre la afectación macro y microvascular en la ERC (146). A continuación se resumen:

1. Aumento de la expresión de las moléculas de adhesión en la superficie celular.
2. Liberación de la citocina quimiotáctica de los monocitos (MCP-1), que atrae los leucocitos para atravesar la barrera endotelial y favorecer su localización en el subendotelio.
3. Liberación de endotelina 1, potente vasoconstrictor y promotor, por sí mismo, de la expresión de moléculas de adhesión y de MCP-1 en las CE.
4. Inhibición de la expresión de la eNOS y neutralización del NO producido.
5. Al menos *in vitro*, la PCR regula al alza los receptores AT1 e incrementa la proliferación y la migración dependiente de la angiotensina II de las células musculares lisas vasculares.
6. Incremento de la producción de ROS.
7. La calcificación vascular.
8. Liberación, por distintas vías y mecanismos, de distintas citocinas proinflamatorias con impacto local y sistémico, retroalimentando el fenómeno inflamatorio.

2.4.2 ESTRÉS OXIDATIVO

El OS es la consecuencia del desequilibrio entre la generación en exceso de compuestos oxidados: especies reactivas de oxígeno (ROS) y de especies reactivas de nitrógeno (RNS) y la insuficiente neutralización de los mismos por parte de los distintos sistemas antioxidantes del organismo. En condiciones fisiológicas, es necesaria una moderada generación de ROS/RNS, por su papel primordial como segundos mensajeros, regulación de señales de transducción celular y participación en los mecanismos de defensa celular como, por ejemplo, para hacer frente a las infecciones (147–149).

El medio urémico es un claro modelo de OS ya que en él existe un desequilibrio entre los factores pro y antioxidantes, debido a un acúmulo y producción exagerada junto con unos sistemas antioxidantes que son incapaces de compensar. Las toxinas urémicas (1) pueden actuar como desencadenantes del OS pero a la vez actuar como sustrato para reacciones de oxidación con el potencial efecto lesivo de las mismas. Además, el tratamiento con diálisis juega también su papel en el mantenimiento y perpetuación del OS, aunque no hay unanimidad para afirmar que haya diferencias significativas entre la HD o la DP (150,151). El hierro endovenoso administrado a los pacientes de diálisis, especialmente algunas de sus presentaciones más inestables, podrían tener un impacto en el desarrollo del OS a través de la liberación del hierro no ligado a transferrina (152).

A nivel celular, la formación de ROS y RNS es un hecho constante a partir de reacciones de oxidación que se generan durante los procesos normales del metabolismo aeróbico, a través de reacciones enzimáticas y no enzimáticas. Estas reacciones tienen lugar a nivel de la membrana celular y en el propio citoplasma, en mitocondrias, peroxisomas, lisosomas, y retículo endoplasmático, siendo en las mitocondrias donde su producción es mayor; mediante la participación de distintos sistemas enzimáticos (153).

Los radicales libres son especies químicas que poseen en su capa electrónica más externa uno o más electrones desapareados, que se caracterizan por tener una alta afinidad por otro elemento con un electrón desapareado y que químicamente se representan por (\cdot) (153). Los electrones ocupan regiones de los átomos o moléculas que se conocen como orbitales. En cada uno de ellos puede haber como máximo dos electrones, cada uno de ellos con un sentido de giro (spin) opuesto al otro. A los dos electrones de un orbital se les conoce como electrones apareados en contraposición de aquella situación en la que solo hay uno (153). Cuando se encuentran dos radicales libres pueden combinar sus electrones no apareados formando un enlace covalente. Un radical libre también puede donar su electrón no apareado a un compuesto no radical o bien apropiarse de un electrón de otra molécula para formar su par electrónico. Lo que sucede entonces es que el radical deja de serlo y, la otra molécula se transforma en un radical lo que permite iniciar y perpetuar una cadena de reacciones (153).

Radicales libres	Nombre completo
$\cdot\text{O}_2^-$	anión superóxido
$\cdot\text{OH}$	radical hidroxilo
$\text{NO}\cdot$	óxido nítrico
$\text{NO}_2\cdot$	dióxido de nitrógeno
No radicales	Nombre completo
H_2O_2	peróxido de hidrógeno
HOCl	ácido hipocloroso
OONO^-	peroxinitrito
O_3	ozono
O_2	oxígeno
HNO_2	ácido nitroso
N_2O_3	trioxido de dinitrógeno

Tabla 7: Principales especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS).

En la mayoría de las células aerobias, el 90% del oxígeno consumido es reducido a agua por el sistema respiratorio mitocondrial. No obstante, pequeñas cantidades de oxígeno, pueden ser metabolizadas por otras vías, en las que la molécula de oxígeno acepta un electrón por vez, generando distintos compuestos intermedios tóxicos.

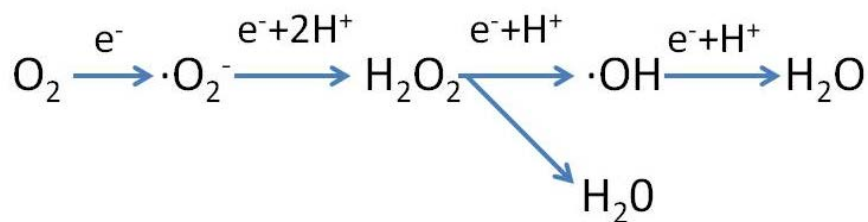


Figura 13: Formación de ROS a partir de una molécula de O₂

El $\cdot\text{O}_2^-$ se genera en la mayoría de las células aerobias por transferencia de un electrón al oxígeno molecular como producto colateral del transporte electrónico. Las enzimas cuya actividad normal pueden generar $\cdot\text{O}_2^-$ además de la cadena respiratoria mitocondrial son:

Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa:

Están identificadas 5 tipos de NADPH oxidasas (NOX) y dos formas duales (DUOX1-2 y DUOX1). La isoforma NOX4 es la que mayoritariamente se encuentra en el endotelio vascular. En condiciones normales la actividad basal de NOX es baja, pero son varios estímulos o situaciones que pueden incrementar su actividad: distintas citocinas, uremia, por acción de la angiotensina II, hiperglucemia o hiperlipemia (154,155).

Xantin oxidasa:

Esta enzima puede tener una actividad dual actuando como xantin dehidrogenasa (XDH) o como xantin oxidasa (XO). En condiciones fisiológicas, la XDH a partir de la hipoxantina o xantina como sustrato y NAD⁺ como cofactor produce ácido úrico y NADH. En situaciones de inflamación, en la uremia o por ejemplo debido a cambios translacionales la XDH se convierte en XO aumentando su afinidad para el O₂ como cofactor, generando entonces ácido úrico y $\cdot\text{O}_2^-$ / H₂O₂ (156).

Sintasa del óxido nítrico (NOS):

En los mamíferos hay identificados dos tipos: la constitutiva con dos isoformas, la neuronal (nNOS) y la endotelial (eNOS). Ésta última es la mayoritaria en el endotelio vascular (157). Estas son dependientes del complejo calcio-calmodulina. El tipo inducible (iNOS), se encuentra en los macrófagos, y se activa por citocinas o endotoxinas bacterianas siendo independiente del Ca^{++} .

En condiciones normales, la NOS metaboliza la L-arginina a L-citrulina y NO con la participación necesaria de la NADPH y el oxígeno como co-sustratos. Para el correcto funcionamiento de la NOS es imprescindible la participación como cofactor de la tetrahidrobiopterina (BH4) (158).

En condiciones no fisiológicas, como la ERC. caracterizada por el acúmulo de distintas toxinas, como el indoxil sulfato, o el aumento de ADMA (su eliminación es fundamentalmente renal y las técnicas de diálisis resultan insuficientes para alcanzar un aclaramiento adecuado), o el déficit de BH4 y/o de L-arginina, la NOS produce ROS/RNS por si misma, situación que se conoce como “NOS desacoplada” (159,160). En este contexto la transferencia de electrones dentro del sitio activo no está unida a la oxidación de L-arginina y el oxígeno se reduce generando $\cdot\text{O}_2^-$ (158), que se combina rápidamente con NO produciendo OONO^- . La generación de ROS/RNS perpetua a su vez el desacoplamiento de la NOS mediante reacciones de oxidación de la BH4 o de las enzimas proteína arginina N-metiltransferasa (PRMT) o de la dimetilarginina dimetilaminohidrolasa (DDAH), incrementando los niveles de ADMA al estar inhibida su degradación (158).

Mieloperoxidasa (MPO):

Esta enzima es muy abundante en los gránulos leucocitarios y participa en la formación de HClO a partir de H_2O_2 y la oxidación de haluros. La degranulación de la MPO a nivel extracelular provoca que la oxidación no afecte solo a los haluros, sino que además se oxiden otros sustratos. La MPO participa activamente en la oxidación de las LDL y varios estudios han demostrado que los niveles de MPO circulantes y moléculas derivadas de la oxidación por MPO se correlacionan con enfermedad coronaria y eventos vasculares en la ERC (161,162).

Otras enzimas:

Hay otras enzimas que contribuyen en menor proporción a la generación de ROS/RNS: la prostaglandina sintetasa, la lipooxigenasa, la flavoprotein deshidrogenasa, la ciclooxigenasa, los citocromos y la lisil oxidasa (162,163).

Otras fuentes no enzimáticas:

La polución ambiental, el tabaquismo, la exposición a metales pesados o disolventes industriales, la radiación o el alcohol son otras posibles fuentes de ROS/RNS por ejemplo mediante la participación de enzimas como la hidroperoxidasa o la ferroxidasa (164).

Los ROS/RNS son muy inestables y de vida media muy corta lo que dificulta su medición directa. Por este motivo, es preferible medir los productos finales de oxidación de lípidos, proteínas, aminoácidos o las alteraciones sobre el DNA que genera el OS (165–167) y que están presentes en los pacientes ERC (168–172).

En la tabla que sigue, se presentan los principales productos finales de oxidación.

Productos finales de oxidación	Abreviatura
Peroxidación lipídica	
LDL oxidada	OxLDL
Malondialdehído	MDA
4-hidroxinoneal	4HNE
Ácido tiobarbitúrico	TBARs
Oxidación del ácido araquidónico	
F ₂ -isoprostanos	8-iso-PGF ₂ α
Daño del DNA	
8-oxo-7,8-dihidroguanina	8-oxo-G
8-hydroxy-2'-deoxiguanosina	8(OH),2-oxo-dG
Oxidación proteínas y aminoácidos	
Productos avanzados de la oxidación proteica	AOPP
Proteínas carbamiladas	
Productos finales avanzados de glicosilación	AGEs
Hidroxileucina	OH-Leu
Hidrovalina	OH-Val
3-nitrotirosina	3-N-Tyr
3-clorotirosina	e-Cl-Tyr

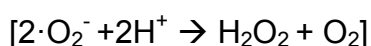
Tabla 8: Principales productos finales de oxidación.

Los organismos vivos poseen distintas vías para contrarrestar el OS mediante los sistemas antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos), ya sea frenando su producción o convirtiéndolos en elementos menos reactivos y, por lo tanto menos dañinos.

Los antioxidantes enzimáticos se dividen en primarios o constitutivos: superoxidodismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX), tioredoxina (TRX), y los elementos de respuesta antioxidante (AREs) (148).

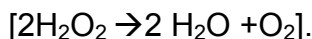
Superóxido dismutasa (SOD):

Existen 3 isoenzimas que se diferencian por su estructura y por el ión metálico presente en el centro activo. La SOD-Cu,Zn expresada básicamente en el citosol pero también en el núcleo, lisosomas y peroxisomas, SOD-Mn expresada en la matriz mitocondrial y la SOD-Cu,Zn-EC que se expresa en el espacio extracelular. Esta enzima convierte $\cdot\text{O}_2^-$ en H_2O_2 .



Catalasa (CAT):

Actúa directamente sobre el H_2O_2 convirtiéndolo en H_2O y O_2 y se encuentra ubicada principalmente en los peroxisomas.

**Glutación peroxidasa (GPX):**

Se trata del sistema antioxidante constitutivo más importante. Localizada predominantemente en el citoplasma y mitocondrias. Hay dos isoenzimas, una de ellas requiere selenio y utiliza como sustrato el H_2O_2 [$2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$], igual que la CAT, pero con un papel muy superior a ésta, porque se activa con niveles más bajos de H_2O_2 . La otra isoenzima, que no lo requiere, cataliza la degradación de los peróxidos orgánicos, especialmente los lipoperóxidos [$2\text{GSH} + \text{ROOH} \rightarrow \text{ROH} + \text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$].

La reducción del H_2O_2 está acoplada a la oxidación del glutatión reducido (GSH) generando glutatión oxidado (GSSG). La regeneración de este último tiene lugar mediante la enzima glutatión reductasa (GR) que requiere como coenzima la NADPH que se provisiona a partir del metabolismo de la glucosa a través del ciclo de las pentosas, sobretodo por la enzima glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PD). En menor medida, los H_2O_2 también se pueden eliminar por acción de la glutatión-S-transferasa.

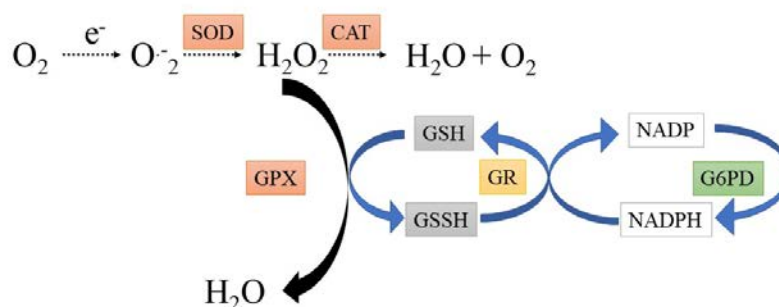


Figura 14: Integración de los tres principales sistemas antioxidantes constitutivos: GPX, SOD y CAT.

Tioredoxina (TRX):

Su actividad antioxidante se basa en la capacidad de intercambio de un grupo tiol-disulfuro en la cisteína que forma parte de su composición. Requiere la participación de la flavoenzima tioredoxina reductasa en la que participa como cofactor necesario la NADPH para mantener su estado reducido.

Elementos de respuesta antioxidante (AREs):

Incluyen un grupo de enzimas de efecto antioxidante, cuya expresión está inducida genéticamente, por acción del factor de transcripción nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) a partir de estímulos inflamatorios o de estados de OS, y que pueden inactivar directamente oxidantes, incrementar los niveles de GSH o estimular la síntesis de NADPH. De estas enzimas destacan la Hemoxigenasa-1 (HO-1) y la NADPH quinona oxireductasa (NQO-1) (173).

Los antioxidantes no enzimáticos se caracterizan por tener un bajo peso molecular y se encuentran en: plasma, espacio intra y extracelular, lipoproteínas y membranas celulares (174–177).

Glutación (GSH):

Es el principal antioxidante soluble. El GSH reducido es un tripéptido formado por glutamato, cisteína y glicina. Contiene un grupo tiol (SH) que es el principal responsable de su capacidad antioxidante y depende de la actividad de la glutatión sintetasa (GSHx) para su regeneración. La oxidación del GSH implica la unión de dos moléculas a través del grupo tiol. Juega un papel fundamental en la detoxificación del H_2O_2 y de los peróxidos lipídicos.

Antioxidantes procedentes de la dieta:

Estos pueden ser hidrosolubles, como el ácido ascórbico o vitamina C, o los polifenoles, como el grupo de los flavonoides (176,177), que son los más estudiados y que se detallaran más adelante.

Del grupo de los liposolubles destaca al α -tocoferol o vitamina E y la vitamina A (175,176).

Otros antioxidantes:

El complejo albúmina-bilirrubina o la propia albúmina por si misma, la ferritina, la lactoferrina, la glucosa o el propio ácido úrico tiene cierta capacidad de amortiguación del OS, aunque con un impacto residual (178,179).

De manera esquemática en la siguiente figura se resume las principales reacciones oxidantes / reacciones antioxidantes.

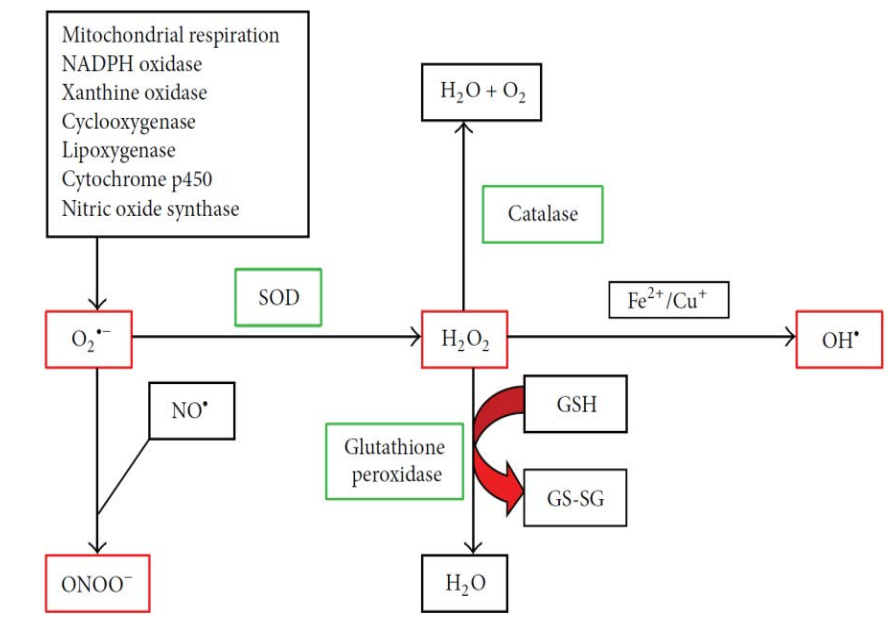


Figura 15: Principales reacciones prooxidantes-antioxidantes. Biswas SK. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? Oxid Med Cell Longev. 2016. DOI: 10.1155/2016/5698931 (Con permiso de reproducción).

El OS en que se encuentra inmerso el paciente con ERC va a tener una serie de consecuencias que se traducen en un impacto directo sobre el riesgo CV, especialmente por su efecto directo sobre la DE y el estrecho vínculo con la inflamación (180).

El OS es un potente estímulo para la activación del factor de transcripción NFκB. Éste se encuentra implicado en la expresión génica de citocinas proinflamatorias, proteínas implicadas en la cascada inflamatoria, moléculas de adhesión, receptores y microRNAs (180,181). También el OS es capaz de activar a través del receptor TLR4, el complejo inflamasoma NLRP3 (182,183), lo que provoca una activación de la cascada inflamatoria con liberación de distintas citocinas proinflamatorias. A su vez las propias citocinas proinflamatorias, como por ejemplo la IL-6, IL-8 (184), potencian el OS mediante la sobreexpresión y activación de la NOX4 (185), entrando así en un círculo de activación permanente.

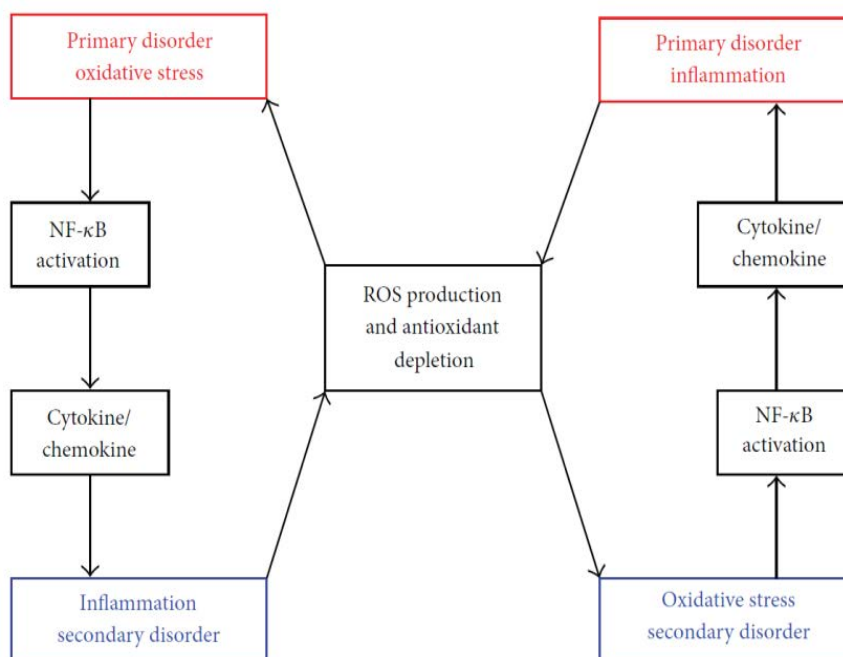


Figura 16: Interdependencia del OS y la inflamación. Principales reacciones prooxidantes-antioxidantes. Biswas SK. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox?. Oxid Med Cell Longev. 2016. DOI: 10.1155/2016/5698931(Con permiso de reproducción).

Además de la estrecha relación entre inflamación y OS (180) cabe destacar, a modo de resumen, otros efectos directos como consecuencia de la presencia de un exceso de ROS/RNS y que sin duda puede explicar la relación entre enfermedad CV y OS en los pacientes con ERC (119,186,187):

- a) El OS es uno de los más potentes inductores de cambios epigenéticos sobre el genoma o de daño directo sobre el ADN. En algunos casos, por ejemplo, las modificaciones del ADN se convierten en potentes activadores del factor de transcripción NFκB, y en otros casos se convierten en promotores de la senescencia celular.
- b) Desencadenan el proceso de lipoperoxidación y formación de las LDL oxidadas y la expresión de su receptor LOX-1 en macrófagos, favoreciendo la formación de las células espumosas.
- c) Alteran el metabolismo celular (aumento del Ca⁺⁺ libre intracelular, lo que conlleva la activación de proteasas, alteración de proteinquinasas, alteración de la síntesis de receptores de membrana, daño en los transportadores de membrana y alteración de otras proteínas específicas).
- d) Modifican la expresión génica de varias moléculas (eNOS, VCAM-1, MCP-1, entre otras).
- e) Favorecen la agregabilidad plaquetaria.
- f) Inhiben la respuesta vasodilatadora mediada por el NO.
- g) Desacoplamiento de eNOS que a su vez genera más ROS y peroxinitritos.

2.5 ENDOTELIO

2.5.1 ENDOTELIO NORMAL

El endotelio vascular recubre la superficie interna de los vasos. Tiene un grosor de entre 10-50 μm y está constituido por billones de células endoteliales (CE) dispuestas en una monocapa. Se estima que puede llegar a tener una superficie de hasta 1500 m^2 y un peso que podría alcanzar entre 1-2 Kg (188).

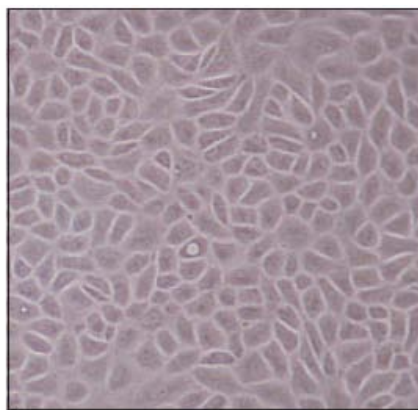


Figura 17: Aspecto de CE a partir de un cultivo de células procedentes de HUVECs. Tinción hematoxilina-eosina.

La CE se caracteriza por presentar una morfología que varía en función del territorio vascular que está recubriendo. Va desde una morfología aplanada a una morfología cuboidal. Sus dimensiones más comunes son: 50 μm de largo, 10 μm de ancho y 0.2 μm de alto, orientadas longitudinalmente al flujo sanguíneo. La CE está anclada sobre el subendotelio, que está formado por la matriz extracelular (MEC) sintetizada, en parte, por la propia CE. La composición de la MEC, puede variar atendiendo a la ubicación pero en general destaca la presencia de colágeno, laminina, vitronectina, fibronectina, FvW, factor tisular (FT), fibras musculares lisas y actina. El subendotelio, debido a su composición se convierte en una superficie que posee características trombogénicas pero que, en condiciones normales no queda expuesto ni interactúa con los elementos formes de la sangre. Cuando se produce una disrupción o disfunción del endotelio vascular, la interacción del mismo con las

plaquetas, así como la acción de las propias CE, ponen en marcha los mecanismos implicados en la hemostasia primaria y secundaria (189).

El endotelio tiene una capacidad de reparación y regeneración continua. Además de la proliferación de las células endoteliales adyacentes, se ha descrito la presencia de células progenitoras endoteliales circulantes (EPCs), que pueden ser movilizadas desde la médula ósea en respuesta a distintos estímulos (p.e citocinas, isquemia) y cuya función es la reparación del endotelio lesionado (190).

El endotelio muestra una notable heterogeneidad estructural en función del lecho vascular que se considere: en algunos territorios, las CE están estrechamente interconectadas con las adyacentes mediante uniones intercelulares por proteínas de adhesión de la familia de las cadherinas y están sobre una membrana basal continua (endotelio continuo), mientras que en otros territorios existen espacios y hendiduras intercelulares importantes y la membrana basal presenta irregularidades (endotelio discontinuo). Esta variabilidad no sólo es estructural sino también funcional (191).

Tradicionalmente, se le había considerado una barrera inerte a los elementos de la sangre. Hoy se sabe que es un potente interfaz biológicamente activo y con múltiples funciones. El endotelio, por su situación, ejerce un efecto sensor y efector (192).

El endotelio sensa los estímulos de las células y tejidos circundantes y del torrente sanguíneo mediante receptores transmembrana para numerosas moléculas, incluidas proteínas, partículas transportadoras de lípidos, metabolitos y hormonas; así como a través de proteínas de unión específicas y receptores que regulan las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular. Los estímulos incluyen mediadores solubles, contactos celulares, cambios hemodinámicos (estrés de cizallamiento), de temperatura, pH o de la oxigenación (192).

Podemos resumir las principales funciones del endotelio en (190–193):

- a) Favorecer la circulación y la fluidez del flujo sanguíneo.
- b) Proporcionar una tromborresistencia entre la sangre y los tejidos subendoteliales, que son potencialmente trombogénicos. En condiciones basales, las plaquetas no interactúan con el endotelio y se impide la activación del sistema de coagulación.
- c) Producir NO. Su función va más allá de su efecto vasodilatador: tiene funciones antiproliferativas, antiadhesivas, y antiinflamatorias, disminuye la permeabilidad capilar, inhibe la adhesión y agregación plaquetarias, la adhesión de monocitos, reduce la expresión de factor tisular y de moléculas de adhesión por citocinas o endotoxinas y también tiene reconocido su papel en la regulación de la rigidez de las grandes arterias. De aquí que una disminución en su función o disponibilidad, como ocurre en la DE, aumente el riesgo cardiovascular.
- d) Regular el tono vascular pues tiene la capacidad de liberar sustancias vasodilatadoras, como el NO, la prostaciclina y la bradiquinina o la liberación de sustancias vasoconstrictoras, como la endotelina, la angiotensina II o el tromboxano A₂.
- e) Participar directamente en la regulación de la hemostasia destacando la producción del FvW y del FT.
- f) Regular la permeabilidad vascular, la adhesión y trans migración celular, el crecimiento y migración de la fibra muscular lisa vascular subyacente y la angiogénesis.
- g) Contribuir al balance entre mediadores pro y antiinflamatorios locales.

- h) Participar en la respuesta inmunitaria: mediante la expresión en la superficie de la membrana, entre otros, de receptores de la familia Toll-like (TLR) que, tras su activación, son capaces de poner en marcha varias vías de señalización y estas a su vez promover la liberación de mediadores inflamatorios.

2.5.2 DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

La DE se define como la pérdida de las funciones normales del endotelio, como consecuencia de la incapacidad del mismo para adaptarse a la exposición crónica a un entorno que le resulta hostil, tal como pudiera ser el medio urémico, en el caso concreto de la ERC.

La persistencia en el tiempo de distintos estímulos conlleva la pérdida de las funciones fisiológicas y alteraciones morfológicas que precipitan al desarrollo de un estado patológico con las correspondientes consecuencias clínicas tanto a nivel macrovascular - aterosclerosis y arteriosclerosis - como a nivel de alteraciones microvasculares (194).

El ambiente inflamatorio crónico y prooxidante, propicia mediante la activación de las CE y la puesta en marcha de una cascada de fenómenos de distinta índole, la pérdida de las funciones normales: tono vasomotor, cambios en el balance hemostático, aumento de la adhesión y transmigración de leucocitos (diapédesis) hacia el espacio subendotelial, pérdida de la función de barrera y aumento de la apoptosis.

Los principales mecanismos y consecuencias implicadas en esta disfunción son:

Sobreexpresión de moléculas de adhesión

Las CE tienen la capacidad de expresar en su membrana celular distintas glicoproteínas que funcionan a modo de moléculas de adhesión. Esta expresión permite la interacción de las mismas con otros elementos celulares - p.e leucocitos, plaquetas, otras células endoteliales o con el espacio extracelular (195).

De la familia de las selectinas se conoce que la CE expresa P-Selectina y E-Selectina, favoreciendo ambas la adhesión débil de los leucocitos circulantes a la CE, lo que favorece una disminución de la velocidad de los leucocitos que

están circulando y esto potencia el contacto con las CE mediante el efecto “rolling” (196).

De la familia de las integrinas, las subfamilias $\beta 1$ y $\beta 3$ se expresan en la CE. La $\beta 1$ favorece la adhesión a la matriz extracelular y la $\beta 3$ favorece la agregación plaquetaria. La subfamilia $\beta 2$, se expresa solo en la superficie leucocitaria, pero interactúan con la CE (197).

De la familia de las inmunoglobulinas están identificadas tres tipos (198):

VCAM-1: “vascular cell adhesion molecule”, que no se expresan de manera constitutiva en la CE sino en respuesta a distintas citocinas, y que usan como ligando las integrinas leucocitarias.

ICAM-1: “intercellular adhesion molecule” que favorecen la diapédesis de leucocitos.

PECAM-1: “platelet-endothelial cell adhesion molecule”, que participan también en la migración de los leucocitos. La expresión se regula por la acción de varias citocinas proinflamatorias.

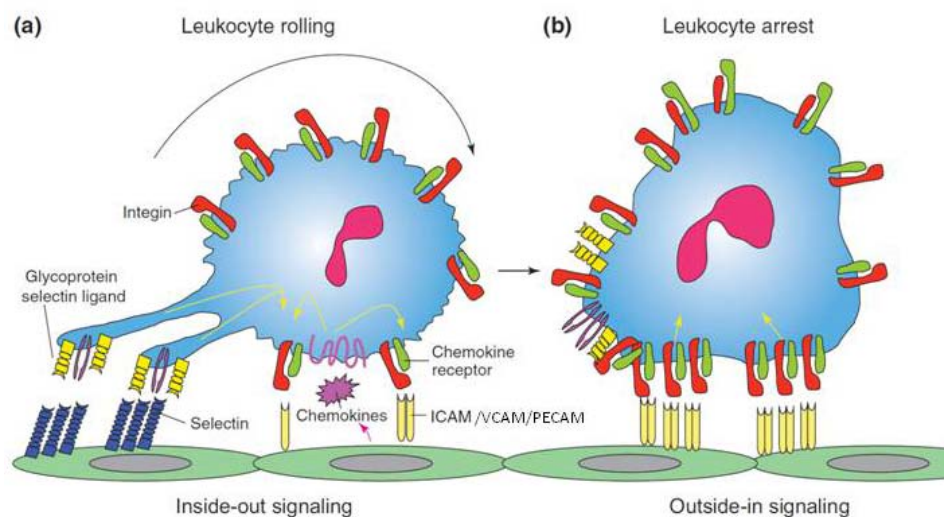


Figura 18: Representación gráfica interacción leucocitos con la célula endotelial. Takada Y, Ye X, Simon S. The integrins. Genome Biol.2007; Volume 8, Issue 5, Article 215 (con permiso de reproducción).

La familia de las cadherinas está representada en el endotelio vascular por la VE-cadherina “vascular endothelium-cadherin”. Interviene en la unión intercelular entre células del mismo tipo y también están implicadas en la regulación de la migración celular y de la permeabilidad del endotelio (199,200).

Sobreexpresión de receptores Toll-Like (TLR) y de los inflamomas.

Los TLR son receptores transmembrana que están presentes tanto en las células del sistema inmunitario, como en las células endoteliales (201). Estos receptores tienen la capacidad de identificar distintas moléculas que actuarían a modo de “señales de peligro”, que incluyen distintas citocinas, productos de degradación celular o toxinas exógenas o endógenas y que se conocen como PAMPs o DAMPs (201,202). El más estudiado es el TLR4 cuya estimulación induce la activación del factor de transcripción NFκB y con ello la expresión de genes productores de distintas citocinas inflamatorias (129). Además, la activación de los TLR incrementa la producción de ROS, amplificando la respuesta inflamatoria (203).

Los inflamomas son complejos multiproteicos, de localización intracelular y con capacidad de activarse mediante los PAMPs o DAMPs, y por el OS a través de la activación de los receptores tipo TLR. El más estudiado es el NALP3 o NLRP3 “NATCH, LRR and pyrin domain containing protein” que actúa activando la citocina proinflamatoria IL-1β entre otras, mediada a través de la Caspasa-1 (204,205).

Aumento de la producción de citocinas proinflamatorias.

En situaciones de exposición crónica a estímulos inflamatorios, no solo las células del sistema inmunitario tienen la capacidad de producir y liberar citocinas. Las CE, también tienen esta capacidad, participando entonces en la perpetuación y retroalimentación del proceso inflamatorio al estar implicadas en la expresión de moléculas de adhesión y con la liberación de más citocinas. Por

su importancia destacan el factor de necrosis tumoral α (TNF α), la interleucina 1 (IL-1) y la interleucina 6 (IL-6) (184).

Biodisponibilidad reducida del NO

En la DE existe una biodisponibilidad de NO disminuida, que junto a un aumento de la actividad vasoconstrictora de la endotelina 1 y la angiotensina II va a favorecer una reducción de la vasodilatación. Además, como el NO inhibe la adhesión y agregación plaquetarias, su biodisponibilidad disminuida aumenta la trombogenicidad (206). Esta menor biodisponibilidad de NO a su vez puede regular al alza la expresión de VCAM-1 a través de la inducción de la expresión del factor de transcripción NF- κ B. La disminución de NO induce la expresión de MCP-1, que recluta células mononucleares fagocitarias. Los monocitos en el subendotelio se transforman en células espumosas cargadas de lípidos. Las LDL oxidadas son captadas por los receptores LOX-1, lo que desencadena una variedad de efectos: reduce la expresión de eNOS y estimula a su vez la expresión de moléculas de adhesión. A su vez, la expresión de receptores LOX-1 puede estimularse por angiotensina II o endotelina 1. A medida que la placa aterosclerótica progresa, los macrófagos liberan factores de crecimiento en la placa que estimulan el crecimiento y migración de la fibra muscular lisa vascular y la síntesis de colágeno intersticial (206).

2.5.3 EL ENDOTELIO EN EL ENTORNO URÉMICO

La exposición permanente del endotelio al medio urémico lo convierte en un excelente modelo de DE. El elevado OS y el ambiente proinflamatorio perpetuado en el tiempo, va a suponer una pérdida del fenotipo quiescente y normofuncionante del endotelio para adquirir y mantener un fenotipo crónicamente activado, con la consiguiente pérdida de las funciones del mismo (207).

Una de las peculiaridades de la ERC es la capacidad de inducir una senescencia prematura del endotelio vascular a la par de lo que sucede con el resto de líneas celulares corporales. Este envejecimiento se presentaría de forma acelerada como consecuencia del daño inducido por parte de los ROS y el entorno proinflamatorio permanente asociado a la uremia sobre el genoma – acortamiento de los telómeros, daño del DNA, etc. - (187).

Esta senescencia de la CE conlleva asociada una serie de características que exacerba la DE: cambios morfológicos que supone la pérdida de la normal configuración espacial de las mismas adquiriendo una morfología alargada, disminución del tempo de vida, resistencia a la apoptosis, disminución de la replicación del DNA, disminución de la capacidad de migración, y la adquisición de un fenotipo secretor asociado al estado de senescencia (SASP) que se caracteriza por un aumento de la secreción de factores de crecimiento, citocinas proinflamatorias y metaloproteinasas entre otras (208,209).

Otra de las características que presentan las CE senescentes es la formación y liberación de un mayor número de microvesículas endoteliales (EMVs). Estas últimas, en condiciones normales juegan un papel esencial como sistema de señal participando en el mantenimiento de la homeostasis y funciones de los diferentes elementos que constituyen la pared vascular (209). La mayor liberación de EMVs, favorecería entre otros, la promoción de fenómenos protrombóticos, una mayor producción de ROS, perpetuación del ambiente inflamatorio, promoción de la calcificación de la musculatura lisa vascular y de la angiogénesis (209).

A continuación se reseñan algunas de las evidencias que apoyan la existencia de una DE en la ERC:

Evidencias *in vivo*

Alteración de la vasodilatación endotelio-dependiente.

La mayoría de estudios que han evaluado la vasodilatación endotelio-dependiente, tanto en prediálisis, HD o en DP, ya sea mediante estudios no invasivos (210–213) o invasivos (214), han demostrado una disminución de la respuesta vasodilatadora.

También se ha demostrado que la falta de respuesta vasodilatadora guarda relación con la caída del FG y es un predictor de eventos cardiovasculares (211).

Aumento de los niveles circulantes de las moléculas de adhesión solubles.

Distintos estudios han demostrado la presencia de niveles circulantes elevados de moléculas de adhesión ICAM-1, VCAM-1, E-selectina, P-selectina o PECAM-1 en pacientes con distintos grados de ERC (215,216).

Aumento de los niveles de citocinas circulantes.

Los niveles de las distintas citocinas proinflamatorias circulantes, tales como IL-1, IL-6 y TNF α entre otras, guardan relación con el grado de ERC (217,218).

Alteración de los mecanismos de reparación endotelial.

En condiciones normales, en respuesta al daño endotelial, existe una movilización de las EPCs desde la médula ósea, que juegan su papel en el retapizado y reparación de la superficie endovascular, así como en la restauración de la función endotelial. Distintos estudios han demostrado una menor movilización de las EPCs en la ERC y éstas, además, son disfuncionantes.

Una explicación que se propone para explicar este fenómeno es la de la senescencia acelerada que presentarían los progenitores de las CE en el entorno urémico, especialmente sensibles a la presencia de ROS (219). En contraposición, las células endoteliales circulantes (CEC) se encuentran aumentadas, traduciendo la disminución de la adherencia de las CE sobre el subendotelio y la MEC. Las micropartículas endoteliales circulantes (EMPs), que se forman a partir de membranas celulares, ya sea por activación o por apoptosis de las CE, se encuentran también aumentadas (207,220).

Evidencias *In vitro*:

Las CE cultivadas en presencia de un medio urémico presentan cambios morfológicos, de adhesividad, de crecimiento y de la composición y reactividad del subendotelio.

La adhesión de la CE al subendotelio en condiciones de flujo es inferior a las CE cultivadas en presencia de suero control (221,222). Asimismo, las matrices subendoteliales generadas por estas CE, que sería el equivalente al subendotelio vascular, son más pobres y desorganizadas (221), son más trombogénicas y muestran una expresión aumentada de FT y FvW (222–224) lo que determina que el endotelio en un entorno urémico presente una mayor trombogenicidad, hipercoagulabilidad y alteración de respuesta fibrinolítica.

Las CE urémicas presentan un crecimiento más acelerado y alteraciones morfológicas (225). Respecto el grado de apoptosis, resultados de nuestro grupo

demostró que no había un aumento de apoptosis (225), hay otros trabajos que encuentran un aumento-, quizás traducción del estado de senescencia de las CE expuestas al medio urémico (207-209).

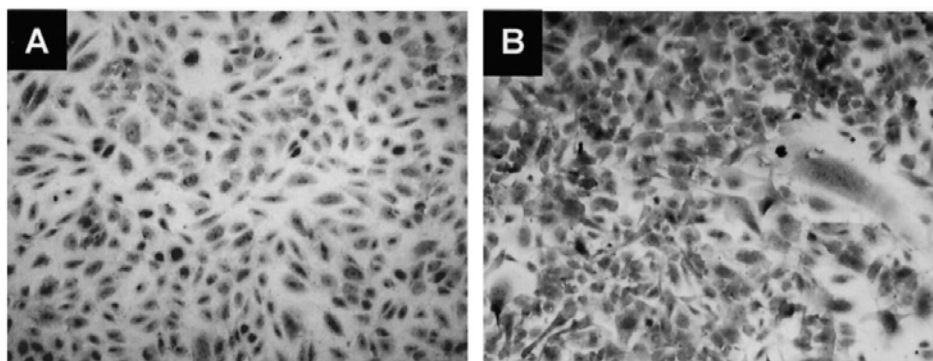


Figura 19: Aspecto de un cultivo de CE tras 24 horas de exposición a un medio con suero control (A) y con suero de paciente con ERC. Serradell M, Díaz-Ricart M, Cases A, Petriz J, Ordinas A, Escolar G. Uraemic medium accelerates proliferation but does not induce apoptosis of endothelial cells in culture. *Nephrol Dial Transplant.* 2003 Jun; 18(6):1079-85 (con permiso de reproducción).

Aumento de la expresión de moléculas de adhesión en la superficie.

Distintos estudios han demostrado un aumento de la expresión de distintas moléculas de adhesión (VCAM, ICAM-1, E-selectina) de las CE expuestas al medio urémico (225,226).

La vía de señalización del NFκB y la activación de la mitogen-activated protein quinasa (MAPK) se encuentran aumentadas en las CE expuestas al medio urémico.

En concreto, se ha podido identificar un aumento de la expresión del factor de transcripción NFκB en CE cultivadas en medio urémico (215,227) y también un aumento de la fosforilación de MAPK p24/44 y p38, ambas implicadas en distintas propiedades del endotelio y en el desarrollo de la aterosclerosis (215,225).

Aumento de la expresión del receptor TLR4 y activación del inflammasoma NALP3 en CE expuestas al entorno urémico.

El medio urémico resulta ser un potente inductor de la expresión del TLR4 y de NALP3 en las CE. Ambos tienen una implicación directa en la promoción de la respuesta inflamatoria mediante la liberación de distintas citocinas inflamatorias (227).

Cambios en el proteoma de las CE en cultivo en medio urémico.

Estudios previos de nuestro grupo permitieron describir cambios en el proteoma de las CE expuestas al medio urémico, incluyendo incrementos en: dos componentes del proteosoma “proteosome subunit β type 4 precursor” y “proteosome activator complex subunit 3”, la HMGB1 y la aldosa reductasa, todos ellos relacionados con la vía de activación del factor de transcripción NF κ B (228), así como aumentos de enzimas antioxidantes. Otros trabajos también han encontrado otros cambios en la expresión del proteoma de la CE (119), lo que refuerza la idea de que el entorno urémico induce cambios epigenéticos que se traducen en una expresión proteica diferenciada.

Las CE expuestas al medio urémico presentan una mayor producción de ROS.

El entorno prooxidante de las CE en la ERC determina que presenten una mayor producción de ROS (226,227) y además presentan una mayor expresión de los sistemas antioxidantes (GPX, SOD), lo que se atribuye a un intento de compensación (228), aunque resultan insuficientes para contrarrestarlo.

En la siguiente figura, a modo de resumen, se muestran algunas de las alteraciones en la función de la CE cuando estas se exponen a distintas toxinas urémicas (ADMA, AGEs, p-cresol e indoxil sulfato)

	Impaired Vascular Function	Correlation with circulatory markers	Endothelial Cell detachment or permeability	Increased ROS	Reduced NO	Endothelial Activation	Impaired cell-cell interactions	Enhanced EMP production	Impaired proliferation capacity	Impaired EPCs function
↑ ADMA	●	●		●	● ●	●	●		●	●
↑ AGEs	● ●			●	● ●	●				●
↑ PCS	● ●	●	● ●	●		●	●	●	●	●
↑ IS	● ●	●	●	● ●	● ●	●	●	●	●	●

●	●
●	●

● CKD patients ● CKD *in vivo* models
 ● *in vitro* assay ● non-CKD *in vivo* models

Figura 20: Efecto de las toxinas urémicas sobre la función endotelial. Vila Cuenca M, Hordijk PL, Vervloet MG. Most exposed: the endothelium in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2019. DOI: 10.1093/ndt/gfz055 (con permiso de reproducción).

2.6 POTENCIALES ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS

En los últimos años, varios grupos han focalizado su esfuerzo en buscar alternativas terapéuticas para mejorar la DE de los pacientes con ERC. Las estrategias farmacológicas disponibles hasta la fecha (como las estatinas y los IECAS/ARA II) que sí han demostrado su efectividad en la reducción de eventos CV en otros grupos de riesgo, resultan en este subgrupo ineficaces (21–23). Se ha recurrido a la evaluación ya sea *in vivo* o *in vitro* de varios compuestos, algunos de ellos con capacidad de disminuir la absorción intestinal de toxinas urémicas (AST-120) o de modular las alteraciones del metabolismo óseo-mineral: α -Klotho, vitamina D activa, sevelamero o anti-FGF23 (207) con resultados iniciales satisfactorios.

Teniendo en cuenta los siguientes aspectos: la importancia del OS y la inflamación, su estrecha interrelación, la incapacidad de los sistemas antioxidantes-antiinflamatorios para contrarrestar la excesiva producción de ROS y reducir el grado de inflamación presentes en la DE del paciente urémico, así como la falta de evidencia/consenso sobre la eficacia del uso de distintos compuestos con potencial capacidad antioxidante en pacientes en diálisis (229–231), parecería interesante considerar otras estrategias terapéuticas. Éstas se deberían centrar en mejorar el entorno prooxidante y proinflamatorio en el que se encuentran embebidas las CE u otras opciones que puedan ofrecer una protección del endotelio. Los flavonoides, la NAC, los miméticos de la GPX y de la SOD, y el defibrotide, aparecen, por sus características, como posibles alternativas.

2.6.1 Flavonoides

Los flavonoides (232) son compuestos polifenólicos. Químicamente, se caracterizan por estar constituidos al menos por un anillo aromático al que se unen uno o más grupos hidroxilos y son sintetizados por los vegetales y algunas algas, donde desarrollan funciones metabólicas importantes como, por ejemplo, la protección frente las radiaciones ultravioletas. Debido a los múltiples cambios que se pueden suceder en la parte final de su biosíntesis,

son muy diversos los compuestos que forman parte de la familia de los flavonoides, así como también lo son las concentraciones que se pueden encontrar en las distintas especies vegetales.

En la figura siguiente se muestra la fórmula de tres de los flavonoides sobre los que hay referenciados más datos.

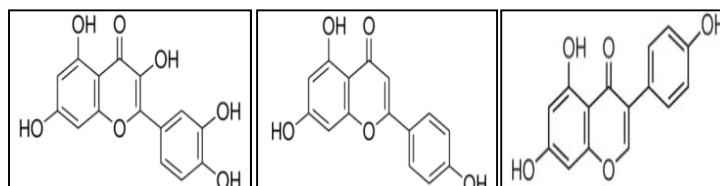


Figura 21: Fórmula estructural de los tres flavonoides testados en el primer trabajo de la TD: apigenina, genisteina y quercetina (de izquierda a derecha).

Clásicamente, se agrupan en 7 clases: chalconas, flavonas, flavonoles, flavandioles, antocianinas, taninos y auronas. Tienen una presencia universal en muchos de los alimentos de una dieta convencional: frutas, verduras, cereales, chocolate, café, té, vino tinto. Se ha descrito que el consumo de 500 mg/día de polifenoles de uva negra en polvo, reduce la inflamación y el OS en los pacientes en HD (232). Pero su biodisponibilidad es pobre debido a su baja absorción a nivel intestinal, pues requiere como paso previo la hidrólisis por parte de los enterocitos de la pared intestinal o su metabolización previa por parte de la flora intestinal del colon. Además algunos tipos de flavonoides pueden ver reducida su biodisponibilidad en los casos de baja exposición solar (177,232).

Probablemente estos motivos junto con la elevada heterogeneidad de los compuestos explican la falta de consenso sobre la utilidad real del uso de estas sustancias. Mientras hay revisiones que concluyen que no hay suficientes evidencias (177,233) otras publicaciones demuestran sus efectos beneficiosos en población con antecedentes de enfermedad CV previa (234) o en HD (235).

La actividad antioxidante de los flavonoides va a depender de su estructura química y, en concreto, del número y disposición de los radicales hidroxilo, ya que de estos van a depender muchos de los mecanismos implicados, entre ellos la función “scavenger” de los ROS.

Algunos de los mecanismos descritos mediante los que los flavonoides ejercerían su función antioxidante (y también antiinflamatoria) incluyen la interacción directa con los ROS, la interacción con la NOS y la XO, modulando de esta manera la producción de NO, la inhibición de distintas enzimas involucradas en las vías de oxidación, como la NADPH, favoreciendo la transcripción del factor Nrf2 o inhibiendo el inflamasoma NLRP3 (232).

2.6.2 N-acetilcisteína

En los últimos años, el uso de la NAC, un derivado del aminoácido cisteína y con un peso molecular de 163,19 KDa, se ha postulado como un fármaco prometedor más allá de sus indicaciones clásicas como mucolítico o como antídoto para tratar las intoxicaciones por paracetamol, debido a su actividad antioxidante.

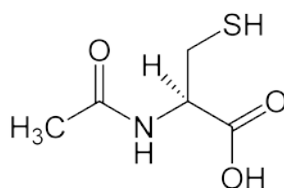


Figura 22: Fórmula estructural de N-acetilcisteína.

El efecto antioxidante de la NAC se puede explicar por un doble mecanismo: la oxidación del grupo sulfhidriilo, presente en la molécula favorece la formación de complejos formados por dos moléculas de NAC con capacidad de reducir el H_2O_2 , $\cdot\text{O}$ y el HOCl. Por otro lado, la NAC se convierte en un potente agente restaurador de los niveles de GSH debido a que, por la acción de una reacción de desacetilación se genera cisteína. Ésta, a su vez se une

mediante una reacción de conjugación con glutamato y, finalmente, por acción de la glutatión sintetasa se genera una molécula de GSH, permitiendo regenerar los niveles intracelulares del mismo, cuya importancia radica en ser uno de los antioxidantes solubles más importantes a nivel celular (236) y al mismo tiempo el sustrato sobre el que va a actuar la GPX. El efecto de la NAC es especialmente marcado en aquellos casos de depleción severa de los niveles intracelulares de GSH (237).

En la figura siguiente, de manera gráfica, se muestra el mecanismo de restauración de GSH a partir de una molécula de NAC.

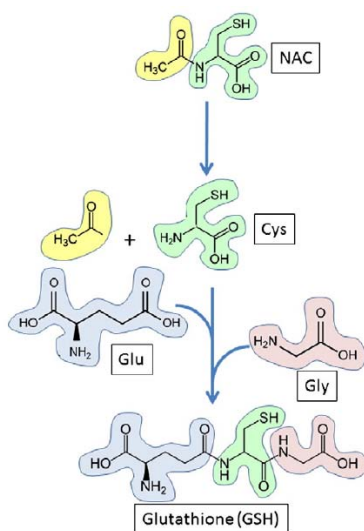


Figura 23: Vía de resaturación de GSH por NAC [Cisteína (Cys), glutamato (Glu), glicina (Gly)]. Gordon F. Rushworth, Ian L. Megson, Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: The need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. *Pharmacology & Therapeutics*. 2014; 141 (2), 992-5 (con permiso de reproducción).

Existen evidencias que refuerzan el beneficio que comportaría el uso de la NAC (231,238–241), basado en la capacidad de este compuesto de restaurar los niveles de GSH (237,241).

2.6.3 Miméticos de la glutatión peroxidasa y de la superóxido dismutasa

Una de las potenciales estrategias para reducir el OS pasa por potenciar los sistemas enzimáticos implicados en la reducción de los ROS. Una de las opciones es recurrir a miméticos de los sistemas enzimáticos más importantes: GPX y SOD.

En este sentido, ebselen, un compuesto sintético que contiene selenio en su estructura y que, en el principio de su desarrollo, se centró su uso en el tratamiento del ictus isquémico, parecería ser uno de los mejores candidatos. También se investigó su uso en el tratamiento de demencias, diabetes, artritis reumatoide, el daño isquemia-reperfusión en trasplante de órganos, entre otros. Su importante citotoxicidad (básicamente por afectación mitocondrial) ha obligado a replantear su formulación química y ha frenado la expansión de su uso (242).

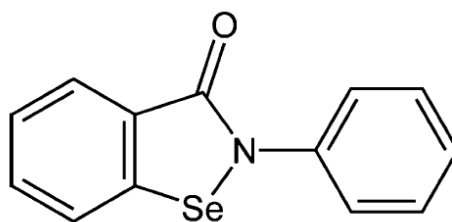


Figura 25: Fórmula estructural de ebselen.

Ebselen, tal como se muestra en la figura siguiente, presenta una actividad mimética de la GPX, ya que cataliza la reducción de los ROS de manera similar a como lo realiza la GPX: un mecanismo simple de tres pasos que implica cambios en el estado de oxidación del residuo del sitio activo (SeCys)

Las ROS oxidan el selenio en estado de reposo (EBS-SeH) a ácido selenénico (EBS-SeOH), que se reduce de nuevo por el glutatión (GSH) a través de un intermedio de selenenil sulfuro (EBS-SeSG).

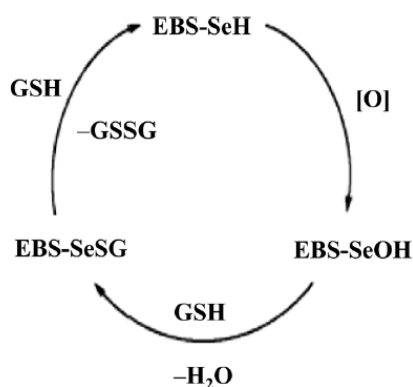


Figura 25: Mecanismo de acción de ebselen como mimético de la GPX. Azad GK, Tomar RS. Ebselen, a promising antioxidant drug: mechanisms of action and targets of biological pathways. Mol Biol Rep. 2014; 41(8):4865-79 (con permiso de reproducción).

Además de su acción mimética de la GPX, se le atribuyen otros mecanismos que participarían también en el control del OS. Así, está descrita su participación como sustrato de la TRX, su acción mimética a la reductasa del ácido dehidroascórbico (DHA), su capacidad de inhibición de la NOX, incluso a una dosis menor a la necesaria para ejercer *in vitro* el efecto mimético de GPX (243,244), de la NOS y de la lipooxigenasa, entre otras muchas enzimas y que, junto a otras muchas propiedades descritas (antiinflamatorio, antitrombótico, antimicrobiano, protector del DNA) le confieren un carácter multifuncional y lo convierte en una promesa de futuro (242–244).

EUK-134 y EUK-118 son sales complejas que contienen manganeso en su estructura y que poseen un actividad mimética de la SOD pero también poseen (en menor intensidad) actividad mimética de la CAT, actuando ambas eliminando $\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 y ONOO^- (245).

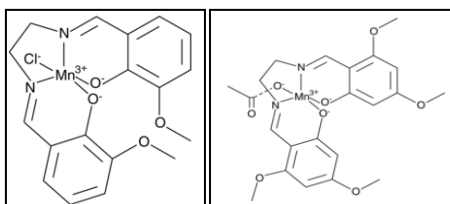


Figura 26: Fórmula estructural de EUK 134 y EUK 118 (de izquierda a derecha).

Los trabajos publicados hasta la fecha se han centrado en el área experimental, en el que se han reproducido distintos escenarios (enfermedades neuronales, pulmonares o articulares) en los que se han obtenido buenos resultados al mejorar el SO y el estado inflamatorio (246,247).

2.6.4 Defibrotide

DF es una mezcla polidispersa de fragmentos de DNA obtenido a partir de la despolimerización controlada de DNA de mucosa intestinal de origen porcino (en sus orígenes su producción se realizaba a partir de tejido pulmonar de origen bovino, pero debido al brote de encefalopatía espongiforme, a partir del año 2003 el origen es porcino). En concreto, es una mezcla constituida por un 90% de oligonucleótidos de cadena simple (longitud: 9-80 mer; masa molecular 16.5 ± 2.5 KDa) y un 10% de oligonucleótidos de doble cadena. Se trata de un fármaco que, debido a sus propiedades profibrinolíticas, antitrombóticas y antiinflamatorias, en cuyos mecanismos de acción se han identificado varias vías de acción, se considera como un protector del endotelio vascular (248,249).

Sus primeros usos en la década de los 90 se centraron en el tratamiento de la insuficiencia venosa y arterial periférica e incluso para evitar la coagulación del circuito extracorpóreo de diálisis debido a sus propiedades antitrombóticas (248,249); corroborándose posteriormente su eficacia en los estudios PROVEDIS (250) y DICLIS (251). No obstante, debido a las características farmacocinéticas del fármaco -vida media corta- que obligaba a una toma frecuente del compuesto, cuando éste se prescribía por vía oral, determinó que la extensión de su uso en este grupo de patologías se viera limitada.

En los últimos años, el uso de DF se ha aprobado para el tratamiento de la enfermedad venooclusiva hepática, una complicación muy grave que se presenta en el trasplante autólogo de médula ósea; así como también como fármaco huérfano en la prevención de la enfermedad del injerto contra el huésped (252,253), y que se ha visto refrendado por los buenos resultados

obtenidos inicialmente en modelos *in vitro* y posteriormente de los distintos ensayos clínicos.

En la siguiente tabla, basada en la información disponible a fecha de hoy (248,249), se resumen los principales mecanismos descritos atribuidos a DF y por los que realizaría su acción de protección endotelial.

Efecto	Mecanismo identificado
Antiinflamatorio y disminución permeabilidad vascular	<ul style="list-style-type: none"> • Disminución liberación leucotrienos • Disminución NFκB • Reducción activación plaquetas
Regulación expresión moléculas adhesión	<ul style="list-style-type: none"> • ICAM-1, VCAM-1 • E-selectinas, P-selectinas
Efecto antitrombótico y trombolítico	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento de: tPA, TFPI, TM • Disminución de: PAI, PAF, trombina
Modulación producción citocinas	<ul style="list-style-type: none"> • Regulación producción PGE2, PGI2 • Reducción de: IL-6, VEGF, TXA2, LTB4, TNFα
Regulación moléculas HLA	<ul style="list-style-type: none"> • Reducción de la expresión de las moléculas MHC I y MHC II
Regulación del tono vascular	<ul style="list-style-type: none"> • Antagonista Endotelina 1 • Aumento del NO y de la NOS

tPA: activador tisular del plasminógeno, TFPI: inhibidor del factor tisular, TM: trombosmodulina, PAI: inhibidor de la activación del plasminógeno, PAF: factor activador de plaquetas, PGE2: prostaglandina E2, PGI2: prostaciclina, VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular, TXA2: tromboxano A2, LTB4: leucotrieno B4, MHC I: complejo mayor de histocompatibilidad clase I, MHC II: complejo mayor de histocompatibilidad clase II.

Tabla 9: Mecanismos de acción de DF. Basado en: Pescador R, Capuzzi L, Mantovani M, Fulgenzi A, Ferrero ME. Defibrotide: properties and clinical use of an old/new drug. *Vascul Pharmacol.* 2013; 59 (1-2):1-10 y Richardson PG, Carreras E, Lacobelli M, Nejadnik B. The use of defibrotide in blood and marrow transplantation. *Blood Adv.* 2018; 2 (12):1495-1509.

Del mecanismo exacto de interacción de DF con las CE se sabe todavía pocas cosas. Es conocido que su simple interacción con la membrana celular es capaz de desencadenar sus acciones antiinflamatorias y antioxidantes, independientemente de que sea internalizado por mecanismos de

macropinocitosis. Los resultados de los trabajos hasta la fecha publicados apuntan hacia la modulación de la vía de p38MAPK y de AKT como posibles vías implicadas en el mecanismo de acción de DF (254,255).

2.6.5 Otros

Son varios los trabajos publicados en los que se evalúa el potencial efecto antioxidante de varios compuestos naturales en los pacientes en diálisis, como la vitamina C, la vitamina E, L-carnitina, coenzima Q10, el ácido α -lipoico, el selenio, el té verde o la curcumina (230,256), aunque no siempre los resultados son concluyentes.

Se disponen de resultados prometedores con el uso de inhibidores de la NOX, que es una de las principales enzimas implicadas en la generación de ROS, y que además se caracterizan por su aceptable tolerancia (257). Dentro de este grupo de compuestos cabe mencionar a ebselen, un mimético de la GPX como se ha comentado anteriormente, pero que además entre otros mecanismos antioxidantes actúa ejerciendo un efecto inhibitor sobre la NOX (258,259).

3.HIPÓTESIS

3. HIPÓTESIS

La elevada morbimortalidad cardiovascular presente en los pacientes con ERC, especialmente en sus fases más avanzadas, se debe, al menos en parte, a la existencia de una DE. Ésta se ha implicado en el desarrollo y perpetuación de la aterosclerosis, arterioesclerosis y afectación microvascular presentes en este grupo de población.

La exposición crónica del endotelio vascular al medio urémico, sea por efecto directo de las distintas toxinas urémicas acumuladas o por inducción de cambios epigenéticos, alteraría el equilibrio normal de funcionamiento del mismo, favoreciendo un fenotipo proinflamatorio, prooxidante y protrombogénico.

Los tratamientos clásicos que han demostrado un beneficio cardiovascular en la población general no han confirmado su efecto protector en este grupo de pacientes. Urge, pues, encontrar nuevas dianas terapéuticas que permitan reducir su elevado riesgo CV.

Por todo ello, la hipótesis que plantea esta TD, es que otros enfoques de modulación farmacológica podrían mejorar la DE presente en las CE expuestas al medio urémico, y con ello, previsiblemente, aportar nuevas opciones para reducir el impacto de la enfermedad CV en la población con ERC.

4. OBJETIVOS

4.OBJETIVOS

Con la hipótesis *in mente* y utilizando un modelo *in vitro* de DE, a partir de cultivos de células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVECs) expuestas al medio urémico, fueron planteados los siguientes objetivos.

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad de modular los cambios provocados por la ERC sobre la CE mediante la exposición a distintos compuestos farmacológicos, con el objetivo de identificar nuevas dianas terapéuticas sobre las que incidir para corregir la DE.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Caracterizar el efecto que ejerce el medio urémico sobre las CE, a través de evaluar cambios en marcadores de inflamación (ICAM-1, factor de transcripción NF κ B), protrombóticos (FvW), de inmunidad innata (receptores TLR4) y de estrés oxidativo (ROS y niveles de GSH).
- 2) Evaluar la acción de distintos compuestos antioxidantes – antiinflamatorios, tales como flavonoides (apigenina, genisteina, quercetina) y potenciadores de las enzimas antioxidantes GPX (ebselen, NAC) y SOD (EUK-134 y EUK-118) sobre la DE en CE expuestas al entorno urémico.
- 3) Investigar cambios en el proteoma de las CE expuestas al medio urémico y como defibrotide (un fármaco con efecto protector endotelial) afecta estos cambios.
- 4) Determinar el efecto de defibrotide sobre los fenotipos proinflamatorio, protrombótico y prooxidante de las CE expuestas al entorno urémico.

5. RESULTADOS

5.1 PRIMER ARTÍCULO

5.1.1 TÍTULO

Antioxidant and anti-inflammatory strategies based on the potentiation of glutathione peroxidase activity prevent endothelial dysfunction in chronic kidney disease.

5.1.2 AUTORES

Manel Vera, Sergi Torramadé-Moix, Susana Martín-Rodríguez, Aleix Cases, Josep Maria Cruzado, José Rivera, Ginés Escolar, Marta Palomo, Maribel Diaz-Ricart.

5.1.3 REVISTA

Cell Physiol Biochem 2018; 51(3): 1287-1300.

DOI: 10.1159/000495540;

[Erratum: Cell Physiol Biochem 2019; 52:1251-1252; DOI: 10.33594/000000085]

5.1.4 INDEXACIÓN de la revista en el momento de publicación del artículo

JCR Journal Rank: Q1

SCImago Journal Rank: Q1

Factor de impacto JCR: 5,5

SJR: 1,561

5.1.5 RESUMEN

Antecedentes y objetivos:

La enfermedad cardiovascular (macro y microvascular) está aumentada en la ERC y es precedida por la presencia de una severa DE. Las CE en medio urémico exhiben un fenotipo proinflamatorio, protrombótico y un aumento del estrés oxidativo. En este estudio, se evaluó el efecto de varios compuestos, con propiedades antiinflamatorias y/o antioxidantes, sobre la DE inducida por la uremia en un modelo *in vitro* de cultivo de CE expuestas al medio urémico.

Material y métodos:

Las CE cultivadas en medio urémico (conteniendo suero de pacientes con ERC en DP) o en medio control (conteniendo suero de sujetos sanos) fueron expuestas a los siguientes compuestos con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Tres tipos de flavonoides: apigenina, genisteína y quercetina; miméticos de los enzimas antioxidantes GPX (ebselen) y SOD (EUK-134 y EUK-118) y el fármaco NAC (restaurador de los niveles de GSH). Se evaluaron los cambios en: la expresión de la molécula de adhesión ICAM-1 en la superficie celular, mediante inmunofluorescencia, la producción de ROS, mediante fluorescencia y la activación de proteínas de las vías de señalización relacionadas con la inflamación (p38MAPK y NFκB), mediante ELISA basado en anticuerpos fosfoespecíficos y técnicas de inmunoblotting. Se midieron también los niveles de GSH.

Resultados:

El medio urémico provoca un aumento significativo de la expresión de ICAM-1, sobreproducción de ROS y activación de la proteína quinasa p38MAPK y del factor de transcripción NFκB en las CE. Quercetina, los miméticos de enzimas antioxidantes y NAC mostraron un efecto inhibitorio significativo sobre la expresión de ICAM-1 y la generación de ROS ($p < 0.05$). Todos los compuestos

disminuyeron la activación de p38MAPK, pero sólo los miméticos de enzimas antioxidantes y, en especial, ebselen y N-acetilcisteína, ambos potenciadores de la ruta de la GPX, inhibieron también la activación de NFκB, observando un efecto adicional de sus efectos cuando estos dos compuestos se usaban conjuntamente. Estos dos últimos compuestos fueron capaces de aumentar los niveles de GSH endotelial, en el contexto del entorno urémico.

Conclusiones:

Los resultados indican que la potenciación de las vías antioxidantes y antiinflamatorias, en especial la vía de la GPX, puede ser una estrategia efectiva para mejorar la disfunción endotelial en la uremia y una diana potencial para reducir el elevado riesgo CV en esta población.

Original Paper

Antioxidant and Anti-Inflammatory Strategies Based on the Potentiation of Glutathione Peroxidase Activity Prevent Endothelial Dysfunction in Chronic Kidney Disease

Manel Vera^{a,c} Sergi Torramade-Moix^{b,c} Susana Martin-Rodriguez^{b,c} Aleix Cases^{a,c}
Josep M Cruzado^{d,e} Jose Rivera^f Gines Escolar^{b,c} Marta Palomo^{b,c,g,h}
Maribel Diaz-Ricart^{b,c,g,h}

^aNephrology Department, Hospital Clinic of Barcelona, Barcelona, ^bHematopathology Department, Biomedical Diagnosis Centre (CDB), Hospital Clinic of Barcelona, Barcelona, ^cInstitute of Biomedical Research August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, ^dInstitut Hemodiàlisi Barcelona, Barcelona, ^eNephrology Department, Bellvitge Hospital, IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, ^fServicio de Hematología y Oncología Médica, Hospital Universitario Morales Meseguer, Centro Regional de Hemodonación, Universidad de Murcia, IMIBArrixaca, Murcia, ^gJosep Carreras Leukaemia Research Institute, Hospital Clinic/University of Barcelona Campus, Barcelona, ^hBarcelona Endothelium Team, Barcelona, Spain

Key Words

Endothelial dysfunction • Uremia • Antioxidants • Flavonoids • Glutathione peroxidase • Ebselen • N-acetylcysteine

Abstract

Background/Aims: Accelerated atherosclerosis in chronic kidney disease (CKD) is preceded by endothelial dysfunction (ED), which exhibits a proinflammatory and prothrombotic phenotype and enhanced oxidative stress. In this study, the effect of several compounds with anti-inflammatory and/or antioxidant properties on uremia-induced endothelial dysfunction has been evaluated in an *in vitro* model. **Methods:** Endothelial cells (ECs) were exposed to sera from uremic patients in the absence and presence of the flavonoids apigenin, genistein and quercetin, the antioxidant enzyme mimetics (AEM) ebselen (glutathione peroxidase mimetic), EUK-134 and EUK-118 (both superoxide dismutase mimetics), and the pharmacological drug N-acetylcysteine (NAC). We explored changes in the expression of adhesion receptors on the cell surface, by immunofluorescence, the production of radical oxygen species (ROS), by fluorescence detection, and the activation of signaling proteins related to inflammation, by

M. Palomo and M. Diaz-Ricart contributed equally to this work.

Dr. Aleix Cases

Nephrology Unit, Hospital Clínic
Villarroel 170, 08036 Barcelona (Spain)
Tel. 34-93-227 54 47, Fax 34-93-227 54 98, E-Mail acases@clinic.ub.es

both a phosphospecific antibody cell-based ELISA and immunoblotting techniques. **Results:** Uremic media induced a significantly increased expression of ICAM-1, overproduction of radical oxygen species (ROS) and activation of p38 mitogen activated protein kinase (p38MAPK) and Nuclear Factor κ B (NF κ B) in ECs. Quercetin, the AEM and NAC showed a significant inhibitory effect on both ICAM-1 expression and ROS generation ($p < 0.05$). All the compounds reduced p38MAPK activation, but only the AEM, especially ebselen, and NAC, both potentiating the glutathione peroxidase pathway, also inhibited NF κ B activation. These two compounds were capable of increasing endothelial glutathione levels, especially in response to uremia. **Conclusion:** Our results indicate that the potentiation of the antioxidant pathways can be an effective strategy to improve endothelial dysfunction in uremia and a potential target to reduce the cardiovascular risk in this population.

© 2018 The Author(s)
Published by S. Karger AG, Basel

Introduction

Endothelial dysfunction (ED) is considered to be the first step in the development and progression of atherosclerosis and has been observed in many disorders associated with increased cardiovascular morbidity and mortality [1–3]. Chronic kidney disease (CKD), is a well-recognized example of a chronic multisystemic disorder associated with an enhanced cardiovascular risk [4]. There is clinical [5, 6] and experimental evidence of an inflammatory state and enhanced oxidative stress in CKD, both major contributors to the progression of cardiovascular disease (CVD) in uremia [7, 8].

Oxidative stress has been proposed to play a major role in the development of ED through the production of radical oxygen species (ROS), which activate intracellular signaling pathways, including protein kinases, such as mitogen-activated protein kinases (MAPK) [9]. Moreover, the uremic endothelium exhibits a proinflammatory phenotype, with an increased expression of adhesion molecules and production of proinflammatory cytokines, which have been reported as key processes in endothelial activation and damage [10, 11].

Using an *in vitro* model, our group has previously characterized the CKD-induced endothelial damage [12, 13]. Exposure of endothelial cells (ECs) to growth media containing sera from uremic patients results in morphological alterations, increased proliferation, enhanced thrombogenicity of the extracellular matrix, and increased expression of diverse proteins related to inflammation, such as high mobility group box-1 protein (HMGB1), and to oxidative stress, such as superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) [14]. Moreover, in recent studies we have demonstrated that these changes are associated with enhanced ROS production, the activation of signaling pathways related to cell stress and inflammation, such as the p38MAPK and the transcription factor nuclear factor- κ B (NF κ B) [15], as well as to enhanced innate immunity, as seen with toll-like receptor 4 (TLR4) and the NALP3 inflammasome [16].

On the other hand, lipid-lowering therapy with statins or the use of renin-angiotensin system inhibitors (such as ACE inhibitors or angiotensin receptor blockers) that have proven its efficacy in reducing CVD in the general population, as well as subsets of high cardiovascular risk patients, such as diabetics or coronary artery disease patients, have failed to prove a benefit in dialysis patients [17–19]. Thus, there is a need for alternative therapies able to reduce the cardiovascular complications in this population. Strategies that improve ED in advanced CKD or ESRD may be a promising therapeutic approach.

Polyphenolic compounds, found in fruits and vegetables, have demonstrated both anti-inflammatory and antioxidant properties [20]. Different studies assert that a diet rich in flavonoids is associated with a reduction in the cardiovascular risk, suggesting that these compounds might have potential protective effects on the endothelium [21]. There is evidence indicating that mammalian cells activate intrinsic antioxidant defense mechanisms, such as antioxidant enzymes, in response to stress molecules induced by ROS production. Recently, synthetic compounds with antioxidant enzyme mimetic activity have emerged as novel anti-inflammatory and antioxidant agents potentially useful in different clinical situations such

as stroke, respiratory infections and diabetes [22–24]. A recent systematic review [25] of clinical trials, assessing the effects of antioxidant therapy in CKD patients, indicates that N-acetylcysteine (NAC) has promising effects by decreasing the levels of oxidative stress markers and in a small study it reduced the risk of cardiovascular events in dialysis patients [26]. Furthermore, NAC improves endothelial dysfunction in dialysis patients [27] and in an *in vitro* model of uremic dysfunction [28].

The aim of the present study was to investigate the potential protective effect on CKD-induced ED of three flavonoids (apigenin, genistein and quercetin), three chemically-synthesized compounds with antioxidant enzyme mimetic effect (EUK134, EUK118, and ebselen), and NAC. We have performed the experiments in our well-characterized *in vitro* model of uremia-induced endothelial dysfunction.

Materials and Methods

Experimental design

Endothelial cells (ECs) were exposed to sera samples from uremic patients under peritoneal dialysis (U, n=16) or from healthy donors selected as controls (C, n=15), in the absence and presence of the following pharmacological compounds: the flavonoids apigenin (flavone), genistein (isoflavone) and quercetin (flavonol); the antioxidant enzyme mimetics ebselen (GPx mimetic), EUK134 and EUK118 (SOD mimetics); and NAC, which acts as a donor of cysteine precursors, the substrate for GPx, aimed at glutathione (GSH) restoration [29–32]. Cell viability studies (using the MTT assay) were performed to determine the appropriate compound concentrations. Cells were pretreated with the compounds for 24h before and during the exposure to the growth media containing the uremic serum, to evaluate changes in: i) the expression of the cell surface adhesion molecule ICAM-1, ii) the intracellular production of ROS, and iii) the activation of the signal transduction protein p38MAPK and NFκB, by ELISA and Western-Blot techniques.

Patients and sample collection

End-stage renal disease patients on peritoneal dialysis using biocompatible solutions with low levels of glucose degradation products (GDP) were included. In order to dissect as much as possible uremia from other conditions known to induce endothelial dysfunction, diabetic patients, patients with dyslipidemia and/or previous cardiovascular disease, current smokers and patients who had had an episode of peritonitis in the previous 2 months were excluded. Patients' characteristics are detailed in Table 1. Sex and age-matched healthy donors, with no previous history of cardiovascular disease, and preserved renal function (eGFR > 90 ml/min/1.73 m², CKD-EPI formula) were enrolled as controls. Written informed consent was obtained from every healthy donor and patient included in the study. The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital Clinic and was carried out according to the principles of the Declaration of Helsinki.

Sera samples were obtained from each uremic patient and from each healthy donor by centrifugation of non-anticoagulated blood (3000xg, 15 min) and immediately stored at -80°C until used. Pools of serum were prepared containing serum samples from different donors / patients, which were used as reagent for the different experiments performed.

Table 1. Main demographic characteristics, biochemical parameters and treatments in healthy subjects (control) and CKD patients

Parameter	Control (15)	Uremic (16)
Age, years (mean ± SD)	57.6 ± 10.0	62.7 ± 20.4
Gender (male/female)	7/8	7/9
Residual renal function (ml/min) (mean ± SD)	--	6.4 ± 4.7
Mean time on dialysis, months (mean ± SD)	--	17.6 ± 8.2
Serum Albumin (g/dl) (mean ± SD)	4.3 ± 0.3	4.1 ± 0.6
Hemoglobin (g/dl) (mean ± SD)	12.5 ± 2	11.8 ± 1.9
Leukocytes (10 ⁹ /L) (mean ± SD)	7.8 ± 1.4	8.1 ± 2.3
Causes of CKD n (%)		
Glomerulonephritis		2 (12.5%)
Interstitial nephropathy		1 (6.25%)
Polycystic kidney disease		3 (18.75%)
Obstructive kidney disease		1 (6.25%)
Nephrocalcinosis		3 (18.75%)
Unknown		6 (37.5%)
Hypertension, n (%)	0	9 (56.25%)
Statin prescription, n (%)	0	12 (75%)
Vitamin D supplementation, n (%)	0	16 (100%)
Erythropoiesis stimulating agents, n (%)	0	14 (87.5%)
Inhibitors of the Renin-Angiotensin System, n (%)	0	9 (56.25%)

Materials and reagents

Culture media MEM199, L-glutamine, penicillin/streptomycin, fetal bovine serum (FBS) and accutase were all purchased from Gibco-Life Technologies (NY, US). The 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5 Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) and the flavonoids apigenin, genistein and quercetin were obtained from Sigma Aldrich (St.Louis, MO, US). The enzyme mimetics ebselen, EUK134 and EUK118 were purchased from Cayman Chemical (MI, US). N-acetylcysteine solution (100 mg/mL) was from Zambon (Barcelona, Spain). The pharmacological compounds were dissolved according with manufacturer protocols, with a final concentration of DMSO <0.1%, NaOH < 0.01% and EtOH 100% <0.02% in culture medium.

The ROS detection reagent 5-(and 6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester (CM-H2DCFDA) was purchased from Molecular Probes (NY, USA). ELISA p38MAPK and NFκB p65 kit superArrays were obtained from SABiosciences (MD, USA). Antibodies against phospho-p38 MAPK (thr180/tyr182), phospho-IκBα (Ser35) and β-actin were from Cell Signaling Technology Inc (MA, US), while the antibody against ICAM-1 was purchased from Millipore (Temecula, CA, US). Sulfosalicylic acid was from Sigma-Aldrich (MO, US) and the commercially available GSH detection kit K0006-F1 was from Arbor Assays (MI, US).

Endothelial cell cultures

ECs were isolated from human umbilical veins [32] and maintained in Medium 199 supplemented with 100 U/mL penicillin, 100 g/mL streptomycin and 20% pooled human serum at 37°C under a humidified atmosphere with 5% of CO₂. Culture medium was replaced every 48h, together with the compounds under study when required. Cells were used between the 2nd and 3rd passage.

Cell viability analysis (MTT assay)

ECs were seeded in a 96-well microplate (10.000 cells/well) and exposed to different concentrations of the selected compounds, as well as to the different vehicles used at maximal concentration (0.1% DMSO, 0.01% NaOH and 0.02% EtOH). After incubation, cell viability was examined by using 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide (thiazolyl blue tetrazolium bromide). All procedures were performed in triplicate according to the manufacturer's instructions. The absorbance was measured at 530 nm. According to the results obtained, experiments were performed using the pharmacological compounds under study at the concentrations that exhibited the lowest cell toxicity (less than 10% of cell death), being: 25 μM apigenin, 0.1 μM genistein, 1 μM quercetin, 5 μM ebselen, 1 μM EUK134, and 5 μM EUK118. NAC was used at a concentration of 10 mM, similar to the one used in previous studies [33].

Expression of ICAM-1 on endothelial cell surface

ECs on 6-well microplates were pretreated with the different compounds for 24 h and then stimulated with media containing 20% of pooled sera from the uremic patients or healthy donors (24h), according to previous studies by our group [15, 34]. Cells were fixed with 2% (for 10 min) followed by 4% (for 10 min) paraformaldehyde in 0.15M PBS, pH 7.4 (4°C), blocked with 1% BSA and incubated with a primary antibody against ICAM-1 (dilution 1:200, 1 h, RT), and a secondary antibody anti-mouse IgG conjugated with Alexa 555 (dilution 1:2000 1 h, at RT) [15]. Then samples were evaluated by light microscopy (Leica DM4000B, Barcelona, Spain), images captured through a videocamera (Leica DFC310FX, Barcelona, Spain) and the density of labeling calculated by computerized morphometric analysis (ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). All procedures were performed in duplicate.

Production of intracellular reactive oxygen species (ROS)

ROS production was explored by using the ROS detection reagent CM-H2DCFDA. This compound can passively diffuse into cells and it is specifically oxidized into the highly fluorescent dichlorofluorescein (DCF) by ROS. The measure of the fluorescence emitted reflects the intracellular ROS production.

ECs seeded on 24-well plates (TPP, Sigma-Aldrich, MO, US) were preincubated with 10 μM CM-H2DCFDA (37°C, 15 min). Then, cells were washed with PBS (3x) followed by cell stimulation with pooled uremic serum for 30 min in the absence and presence of the compounds under study. Intracellular ROS production was monitored by fluorescence microscopy (Leica DM4000B, Barcelona, Spain), images captured through a videocamera (Leica DFC310FX, Barcelona, Spain) and the density of labeling calculated by computerized

morphometric analysis (ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). All procedures were performed in duplicate [15].

Activation of p38MAPK and NFκB signaling pathways in endothelial cells

To investigate the effect of the different compounds studied on the activation of the inflammation-related signaling pathways p38MAPK and NFκB, we performed two different approaches: a phosphospecific antibody cell-based ELISA and immunoblotting techniques.

In order to carry out the phosphospecific antibody cell-based ELISA, ECs were seeded in 96-well plates and pretreated with the different flavonoids and mimetics for 24 h. After 4 h of starving (media with 2% pooled human sera), ECs were then incubated for 15 min with the uremic sera in the absence or presence of the selected compounds. Detection of total and phosphorylated protein expression was determined by colorimetric quantification of the relative amount of phosphorylated protein and total target protein, according to the manufacturer's protocol, and results were corrected for cell number [14].

Immunoblotting techniques were then performed to confirm the results obtained by ELISA. In this case, ECs seeded on 6-well plates were pretreated, after starving for 4 h, with the different compounds (24 h), followed by incubation with uremic sera for 15 min [13, 15]. Cells were lysed with Laemmli buffer (125 mmol/l of Tris-HCl, 2% SDS, 5% glycerol, and 0.003% bromophenol blue), sonicated for 15 sec to shear DNA and reduce viscosity, and heated to 90°C for 5 min. Protein concentrations of the supernatants were determined using the Bradford's method. Samples were resolved by 10% sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel (SDS-PAGE) and proteins were transferred to nitrocellulose membranes. After blocking with 2% BSA, membranes were probed with the specific primary antibodies phosphorylated p38MAPK (Thr180 and Tyr182), phosphorylated IκB and β-actin, used as loading control. Considering that translocation of NFκB to the nucleus is preceded by the phosphorylation and degradation of IκB, we decided to analyze the phosphorylation of the IκB protein in the presence of N-acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal (ALLN) which blocks IκB degradation by the 26S proteasome [14]. Following extensive washing, membranes were incubated with a peroxidase-conjugated anti-rabbit immunoglobulin G and visualized using the chemiluminescence technique. Densitometric analysis was performed to quantify the intensity of phosphorylation (ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) and results were normalized relative to β-actin.

Evaluation of intracellular GSH

To evaluate intracellular levels of GSH, cells were grown in 6-well plates (TPP, Sigma-Aldrich, MO, US) to confluence. Cells were incubated with 20% uremic or control sera and in presence or absence of ebselen and/or NAC for 24h. Cells were then washed with PBS and collected with accutase. Cell pellets were deproteinized in cold 5% sulfosalicylic acid (SSA, Sigma-Aldrich) and centrifuged (2500xg, 5 min). Sample supernatants were analyzed using the commercial kit K0006-F1 (Arbor Assays) in a fluorimeter (Fluoroskan FL) following the manufacturer's procedure. Raw data, corrected with respect to the cell number, is expressed as a fold increase of GSH with respect to the control.

Statistics

Results are expressed as mean ± standard deviation (SD) of data generated in independent experiments (n) using different cell batches and different pooled serum samples from various patients. Statistical analyses were performed by using ANOVA with the SPSS statistical package 17.0.0 (SPSS Inc, Chicago, IL). Results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Results

Changes in the expression of ICAM-1 on the endothelial cell surface

There was an enhanced expression of the adhesion molecule ICAM-1 on the cell surface in response to the uremic sera (U) when compared to control sera (increase of $111 \pm 2\%$ vs control, $n=5$, $p < 0.01$) (Fig. 1). When cells were pretreated with flavonoids, only quercetin had a slight but statistically significant effect on ICAM-1 expression (decrease of $26 \pm 11\%$ with respect to the uremic condition, $n=5$, $p < 0.05$), whereas no remarkable changes were observed when apigenin and genistein were used. In contrast, the antioxidant enzyme mi-

metics ebselen, EUK134 and EUK118 significantly inhibited the expression of ICAM-1 on the ECs surface exposed to uremic sera, with ICAM-1 expression levels similar to those obtained in control experiments (decreases of $47 \pm 6\%$, $42 \pm 11\%$ and $53 \pm 6\%$ vs the uremic condition, respectively, $n=5$, $p<0.01$) (Fig. 1). No changes were observed in control cells after being exposed to the different compounds.

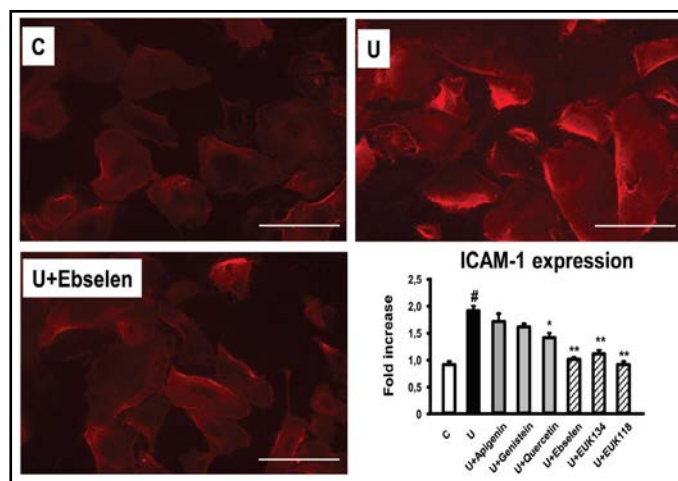
Production of intracellular ROS by endothelial cells

The incubation of ECs with uremic sera for 15 min resulted in an increase in the levels of ROS of $117 \pm 3\%$ compared to control levels ($n=5$, $p<0.01$). Pretreatment of cells with ebselen and quercetin had a remarkably significant inhibitory effect on intracellular ROS generation induced by the uremic sera (decreases of $56 \pm 5\%$ and $37 \pm 4\%$ vs the uremic condition, $n=5$, $p<0.01$). The inhibitory effect of the antioxidant enzyme mimetics EUK134 and EUK118 was moderate (decreases of $23 \pm 3\%$ and $26 \pm 2\%$, respectively, vs the uremic condition, $n=5$, $p<0.05$). Genistein induced a significant but less intense reduction ($11 \pm 3\%$ vs the uremic condition, $n=5$, $p<0.05$), whereas apigenin did not modify ROS production (Fig. 2). No significant changes were observed in control cells in response to the compounds under study.

Modulation of the activation of intracellular protein p38MAPK

The exposure of ECs to the uremic sera for 15 min resulted in a significant activation of p38MAPK (increase of $90 \pm 5\%$ vs control sera, $n=5$, $p<0.05$), this increase in the phosphorylation of p38MAPK was inhibited by pretreating ECs with all the pharmacological compounds under study. The flavonoid apigenin and ebselen induced a potent inhibition of p38MAPK activation (decreases of $37 \pm 19\%$ and $49 \pm 9\%$ respectively, vs the uremic condition, $n=5$, $p<0.01$). Pretreatment with quercetin, EUK134 and EUK118 produced a remarkable but less intense reduction of p38MAPK activation (decreases of $32 \pm 16\%$, $26 \pm 14\%$ and $28 \pm 15\%$, respectively, vs the uremic group, $p<0.05$). Genistein induced a slight, although statistically significant, decrease of the p38MAPK phosphorylation (decrease of $16 \pm 6\%$ vs uremic condition, $p<0.05$) (Fig. 3A). Western Blot analysis confirmed the results obtained by ELISA (Fig. 3B). No modifications on the activation of p38MAPK were detected in control cells exposed to the compounds under study.

Fig. 1. Antioxidant enzyme mimetics prevent the increase in the expression of ICAM-1 on the endothelial cell surface induced by uremic sera. ECs were pretreated with apigenin ($25\mu\text{M}$), genistein ($0.1\mu\text{M}$), quercetin ($1\mu\text{M}$), ebselen ($5\mu\text{M}$), EUK134 ($1\mu\text{M}$) and EUK118 ($5\mu\text{M}$) for 24h and then stimulated with media containing 20% different pooled sera from uremic patients or healthy donors. Surface expression of the surface receptor ICAM-1 was explored by immunofluorescence. Micrographs show the ICAM-1 surface expression in ECs exposed to control media (C),



uremic condition (U) and uremic condition treated with ebselen (U+ebselen). Bar diagrams show the effect of the uremic sera (# $p<0.05$ vs control) and the different compounds selected ($n=5$, * $p<0.05$ and ** $p<0.01$ vs uremia).

Fig. 2. ROS production in endothelial cells exposed to uremic media is inhibited with pharmacological approaches. After pretreatment with apigenin (25 μ M), genistein (0.1 μ M), quercetin (1 μ M), ebselen (5 μ M), EUK134 (1 μ M) and EUK118 (5 μ M) for 24 h, ECs were stained with the cell permeable ROS detection reagent H₂DFFDA (10 μ M, 10min), washed with PBS, and exposed to sera from healthy donors (C) and uremic patients (U), for 30min. ROS production was detected by fluorescence microscopy. Bar diagrams show the effect of the uremic sera (#p<0.05 vs control) and the different compounds assayed (n=5, *p<0.05 and **p<0.01 vs uremia).

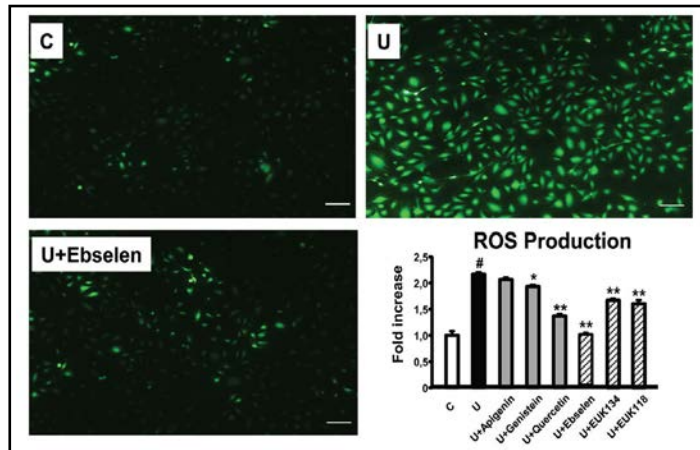
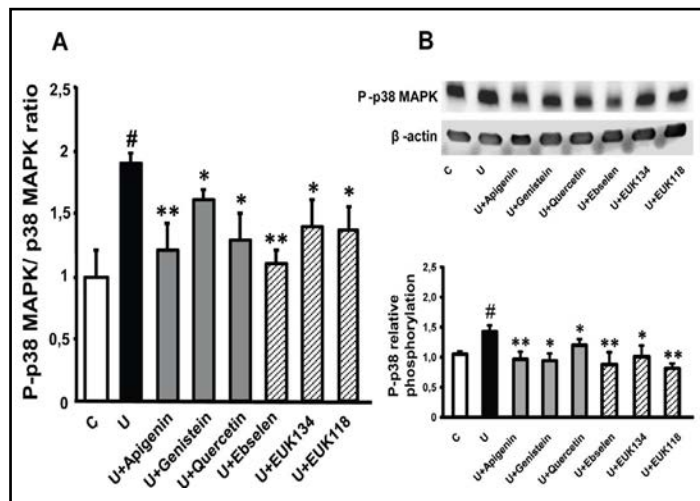


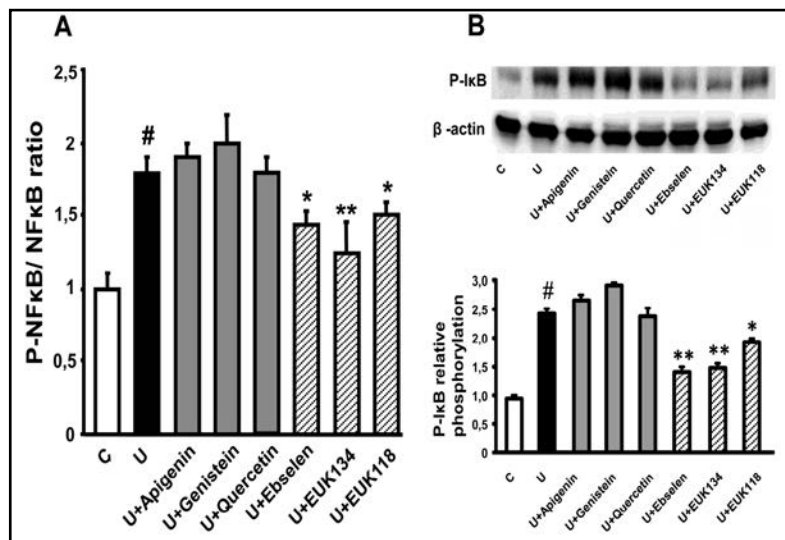
Fig. 3. Activation of p38MAPK signaling pathway by uremic sera is inhibited by flavonoids and antioxidant mimetics. ECs were incubated (15 min) with sera from control donors (C), and uremic patients (U) in the absence and presence of apigenin, genistein, quercetin, ebselen, EUK134 and EUK118 (n=5). A. Bar diagrams represent the ratios of phosphorylated p38 MAPK relative to the total protein, obtained from antibody cell-based ELISA technique. B. Phospho-p38 MAPK in ECs was also assessed by Western-Blot. Images are representative of 4 different experiments. Results were quantified and represented as Mean \pm SD by bar diagram. # p<0.01 vs control and *p<0.05, **p<0.01 vs uremia.



Effect on the NFKB signaling pathway

Activation of NFKB (p65) protein was significantly higher after exposing ECs to the sera from the uremic patients when compared to the control experiments (increase of 80 \pm 6% with respect to controls, n=4, p<0.01) (Fig. 4A). No differences were observed in the phosphorylation levels of NFKB (p65) when ECs were previously treated with the flavonoids assayed. NFKB activation was notably attenuated by ebselen and EUK118 (decreases of 21 \pm 7% and 17 \pm 7% vs the uremic condition, respectively, n=4, p<0.05) and the most remarkable reduction was observed in the presence of EUK134 (decrease of 31 \pm 16% vs uremic condition, n=4, p<0.01). Western Blot analysis of IKBphosphorylation showed similar results as those obtained with the cell-based ELISA assay (Fig. 4B). Exposure of control cells to the compounds under study did not induce any modification in the IKBphosphorylation.

Fig. 4. Activation of NFκB (p65) signaling pathway by uremic sera is prevented by antioxidant enzyme mimetics. ECs were incubated (15 min) with sera from control donors (C), and uremic patients (U) in the absence and presence of apigenin, genistein, quercetin, ebselen, EUK134 and EUK118 (n=4). A. Ratios of phosphorylated NFκB (p65) relative to the total protein. Data are corrected for cell number and are represented as Mean±SD. B. IκB was assessed by



Western-Blot in ECs previously treated with ALLN (50 μg/ml, 30 min, 37°C). Images are representative of 4 different experiments. # p<0.01 vs control and *p<0.05, **p<0.01 vs uremia.

Anti-inflammatory and antioxidant effects of NAC on endothelial cells

NAC demonstrated both anti-inflammatory and antioxidant properties in ECs exposed to the uremic condition, showing effects comparable to ebselen regarding inflammation markers and even greater with respect to the antioxidant effect. NAC was able to inhibit the expression of ICAM-1 (decrease of 49 ± 8% vs the uremic condition, n=4, p<0.01), intracellular ROS generation (decrease of 62 ± 12% vs the uremic condition, n=4, p<0.01), phosphorylation of p38MAPK (decrease of 47 ± 13% vs the uremic condition, n=5, p<0.01), and NFκB activation (decrease of 31 ± 8% vs the uremic condition, n=4, p<0.01) (Fig. 5).

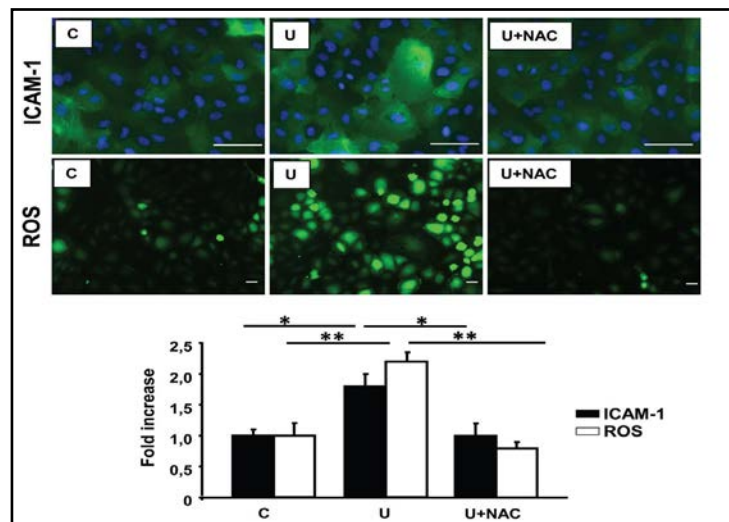


Fig. 5. Anti-inflammatory and antioxidant effects of NAC on endothelial cells exposed to uremic sera. Micrographs show ICAM-1 surface expression and ROS production in ECs exposed to control media (C), uremia (U) and uremia treated with NAC (U+NAC). Bar diagrams show the effect of the uremic sera (# p<0.05 vs control) and the NAC treatment (*p<0.05, **p<0.01 vs uremia) (n=4). NAC (10mM) inhibited phosphorylation of p38MAPK and activation of NFκB (n=4).

Changes of GSH levels in endothelial cells treated with ebselen and NAC

Cells grown under uremic conditions showed slightly higher GSH concentrations than control cells (% of increase of 28 ± 17% vs. control, n=5). Ebselen pretreatment increased GSH levels in both control and uremic cells (% of increase with respect to their baseline condition of 32 ± 3%, n=5, p<0.01, and of 18 ± 14%, n=5, p<0.05, respectively). NAC also raised GSH levels in cell culture in both the control and the uremic conditions (increases of 24 ±

3%, $n=5$, $p<0.01$ and $32 \pm 15\%$, $n=5$, $p<0.05$, respectively). Coincubation with ebselen and NAC together in the culture media increased GSH in ECs both in control and uremic cells ($47 \pm 13\%$, $n=5$, $p<0.05$ and $52 \pm 7\%$, $n=5$, $p<0.01$, respectively) (Fig. 6).

Discussion

In the present study we confirm that endothelial dysfunction in uremia is associated with a proinflammatory phenotype and enhanced oxidative stress, as we and others have previously demonstrated [13-16, 28, 35-37]. Furthermore, we have shown the different protective effects of several anti-inflammatory and antioxidant strategies. While some of the flavonoids assayed exhibited moderate anti-inflammatory and antioxidant effects, the antioxidant enzyme mimetics of SOD and GPx, and NAC, were more effective at inhibiting the expression of adhesion molecules on the cell surface, ROS production, and the activation of the inflammation-related pathways p38MAPK and NF κ B. Interestingly, the enhancement of the GPx pathway, either by a mimetic of the enzyme activity (ebselen) or by promoting the restoration of the reduced glutathione (NAC), proved to be the most effective strategy to protect the endothelium from the deleterious effect of the uremic milieu.

An imbalance between oxidative stress and the antioxidant mechanisms, together with the chronic inflammation present in uremia, are likely to play a major role in the development of an accelerated atherosclerosis and enhanced cardiovascular risk in long-term dialysis patients [4, 6-8]. Therefore, the modulation of inflammation and oxidative stress appears to be a promising strategy to prevent endothelial damage in this condition. Based on our previous evidence [13, 15, 35, 36], we aimed to investigate the potential protective effect of different compounds with antioxidant and/or anti-inflammatory properties on the CKD-induced endothelial dysfunction.

Flavonoids possess certain antitumoral, antioxidant, and anti-inflammatory activities [37, 38]. However, there are several limitations to assay these compounds as potential pharmacological targets: the large number of the identified flavonoids, their different chemical structures and the high doses required, difficult to achieve with a regular diet. In our study, only the flavonol quercetin prevented ROS production, being the only flavonoid tested able to also reduce the expression of the adhesion receptor ICAM-1, and the activation of the inflammation-related pathways p38MAPK and NF κ B. Although the isoflavone genistein reduced the generation of ROS and the phosphorylation of p38MAPK, it failed to prevent NF κ B activation and ICAM-1 expression in uremic ECs. The flavone apigenin did not show any antioxidant effect on ECs exposed to the conditions assayed. In contrast with our results, there are studies reporting beneficial antioxidant and anti-inflammatory effects of genistein and apigenin in other situations. These effects include the prevention of LDL oxidation, the attenuation of ROS production, the inhibition of NF κ B signaling pathway and the expression of cell adhesion molecules [39-42]. The discrepancies with the results found in our study suggest that the effect of these compounds may depend on several factors, including dosage, type of stimuli and the heterogeneity of ECs lines used in the in vitro studies.

Uremic patients exhibit an impaired production of endogenous antioxidant defenses and accumulate uremic toxins that induce oxidative stress [43-46]. Moreover, the accumula-

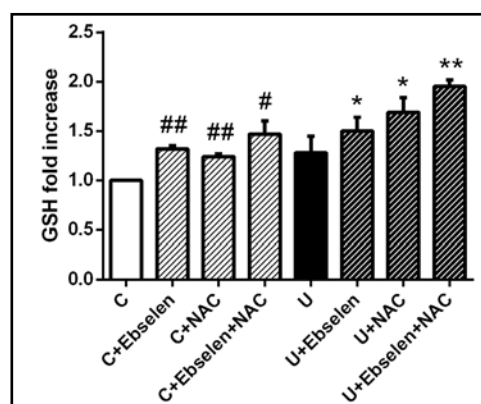


Fig. 6. GSH restoration is promoted by ebselen and NAC in endothelial cell cultures. Endothelial cell cultures were grown in the presence of control or uremic sera for 24h. Bar diagrams represent GSH levels with respect to the control. The effect of the compounds was statistically compared with respect to their respective basal situation (# $p<0.05$ and ## $p<0.01$ vs control; * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs uremia). NAC (10mM) and ebselen (5 μ M).

tion of endogenous ROS results in the activation of intracellular signaling pathways involved in proliferation, survival, and inflammatory responses [46]. The main intracellular antioxidant enzymes include SOD and GPx, among others. Recently, a group of cell-permeable and low molecular weight antioxidant enzyme mimetics are acquiring growing interest for the prevention of complications related to conditions associated with enhanced oxidative stress. Of those, EUK118 and EUK134 show SOD enzyme mimetic activity; while ebselen, an organoselenium compound, catalyzes the reduction of ROS in a manner similar to GPx. This last compound also reacts with the thioredoxin system and acts as a dehydroascorbic acid reductase mimetic. Our present results clearly demonstrated that the antioxidant enzyme mimetics studied exhibit not only free radical scavenging activity, but also anti-inflammatory effects, with a significant inhibition of the activation of the signaling pathways p38MAPK and NFκB, together with the reduction in the expression of adhesion molecules on the EC surface when cells were exposed to the uremic condition.

Interestingly, ebselen and NAC showed the most potent protective antioxidant and anti-inflammatory effects on ECs exposed to uremic milieu. Ebselen appears to be a promising drug because of the multiplicity of its mechanisms for inhibiting free radical-induced injury coupled with a rapid absorption following oral administration. However, as ebselen has been shown to have significant cellular toxicity, novel ebselen-based agents are being developed [47]. NAC is currently used as an antioxidant and a mucolytic agent. The therapeutic potential of NAC is currently being investigated as an antidote for specific toxins, as a bioprotective agent against oxidative stress and ischemic injury, and as a treatment for certain mental and physical disorders. Although reduced glutathione is the most important intracellular antioxidant, oral administration of NAC is even more efficient than direct glutathione administration [48]. Further, NAC stimulates glutathione-S-transferase activity, promotes detoxification and acts as a scavenger of free radicals due to its direct interaction with ROS [49]. GPx pathway is largely known to minimize lipid peroxidation of cellular membranes and other biological processes associated with oxidative stress. Thus, the potentiation of this antioxidant pathway could be a promising strategy to prevent uremia-induced endothelial dysfunction. In fact, a decrease in plasma levels of GSH or GPx have been shown in CKD patients [9, 45-47], and a decreased GSH/GSSG ratio in ECs exposed to uremic media have been previously reported [35]. This later finding is in contrast to our results, since a slight increase in GSH in uremic endothelial cells has been observed, which could be a compensatory response against the prooxidant state present in endothelial cells in response to the uremic milieu. However, and in agreement with the previous and another study, uremic endothelial dysfunction was improved by NAC [28, 35], as well as by ebselen. Furthermore, the combined effect of ebselen and NAC on GSH levels were additive in uremic endothelial cells, suggesting a beneficial effect of enhancing the GPx pathway in CKD-induced ED.

The main limitations of the present study are that the concentrations used in these experiments were based on cell viability analysis and not plasma levels physiologically or pharmacologically achieved. The results of this *in vitro* model should be confirmed in *in vivo* studies.

The results of the present study indicate that uremic endothelial dysfunction can be minimized through an antioxidant strategy. While the benefit of flavonoids is unclear and may be controversial due to the concentrations needed to cause a beneficial effect, the changes observed with the antioxidant enzyme mimetics and NAC indicate that these compounds may be promising therapeutic strategies to provide endothelial protection against the uremic insult. Specifically, the activation of the glutathione peroxidase pathway, either by using an enzyme mimetic and/or by providing the substrate for GSH through NAC, reduce not only the oxidative stress but also the inflammatory process induced by the uremic milieu on the endothelium.

Basic and clinical investigations provide strong evidence of the development of an endothelial dysfunction in chronic kidney disease (CKD), leading to accelerated atherosclerosis and increased cardiovascular risk. However, a pharmacological holistic approach to reduce the broad features involved in vascular remodeling in CKD remains to be discovered. The

results of our study provide a new approach for the prevention and treatment of the CKD-related endothelial dysfunction, and perhaps can arise as a useful strategy to reduce the incidence of cardiovascular events in this high risk population.

Abbreviations

AEM (Antioxidant enzyme mimetic); ECs (endothelial cells); ED (endothelial dysfunction); CVD (cardiovascular disease); CKD (chronic kidney disease); GDP (glucose degradation products); GPx (glutathione peroxidase); HMGB1 (high mobility group box-1 protein); ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1); MAPK (mitogen-activated protein kinase); NAC (N-acetylcysteine); ROS (reactive oxygen species); SOD (superoxide dismutase); TLR4 (toll-like receptor 4); U (uremic sera).

Acknowledgements

This work has been partially supported by Integrated Project in Health Institutes (PIE15/00027) and Technology Development Projects in Health 2016 (DTS16/00133) from the Instituto de Salud Carlos III, Spanish Government; 2017-SGR671 from Generalitat de Catalunya, Jazz Pharmaceuticals Plc (IST-16-10355), grant from the German José Carreras Leukaemia Foundation (11R/2016) and CERCA Programme of the Generalitat de Catalunya.

Research by the group of JR is supported by grants from Instituto de Salud Carlos III and Fundación Séneca (PI14/01956, CB15/00055).

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- 1 Aird WC: Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res* 2007;100:174–190.
- 2 Le Brocq M, Leslie SJ, Milliken P, Megson IL: Endothelial dysfunction: From molecular mechanisms to measurement, clinical implications, and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2008;10:1631–1674.
- 3 Grassi D, Desideri G, Ferri C: Cardiovascular risk and endothelial dysfunction: the preferential route for atherosclerosis. *Curr Pharm Biotechnol* 2011;12:1343–1353.
- 4 Zoccali C, Vanholder R, Massy ZA, Ortiz A, Sarafidis P, Dekker FW, Fliser D, Fouque D, Heine GH, Jager KJ, Kanbay M, Mallamaci F, Parati G, Rossignol P, Wiecek A, London G: The systemic nature of CKD. *Nat Rev Nephrol* 2017;13:344–358.
- 5 Gris JC, Branger B, Vécina F, Al Sabadani B, Fourcade J, Schved JF: Increased cardiovascular risk factors and features of endothelial activation and dysfunction in dialyzed uremic patients. *Kidney Int* 1994;46:807–813.
- 6 Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, Metzger T, Wanner C: Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int* 1999;55:648–658.
- 7 Stenvinkel P: New insights on inflammation in chronic kidney disease-genetic and non-genetic factors. *Nephrol Ther* 2006;2:111–119.
- 8 Himmelfarb J, Stenvinkel P, Ikizler TA, Hakim RM: Perspectives in renal medicine: The elephant in uremia: Oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int* 2002;62:1524–1538.

- 9 Duni A, Liakopoulos V, Rapsomanikis KP, Dounousi E: Chronic Kidney Disease and Disproportionally Increased Cardiovascular Damage: Does Oxidative Stress Explain the Burden?. *Oxid Med Cell Longev* 2017;2017:9036450.
- 10 Sato A, Okada M, Shibuya K, Watanabe E, Seino S, Narita Y, Narita Y, Shibui S, Kayama T, Kitanaka C: Pivotal role for ROS activation of p38 MAPK in the control of differentiation and tumor-initiating capacity of glioma-initiating cells. *Stem Cell Res* 2014;12:119–131.
- 11 Palomo M, Diaz-Ricart M, Carbo C, Rovira M, Fernandez-Aviles F, Escolar G, Eissner G, Holler E, Carreras E: The Release of Soluble Factors Contributing to Endothelial Activation and Damage after Hematopoietic Stem Cell Transplantation Is Not Limited to the Allogeneic Setting and Involves Several Pathogenic Mechanisms. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009;15:537–546.
- 12 Hanzu FA, Palomo M, Kalko SG, Parrizas M, Garaulet M, Escolar G, Gomis R, Diaz-Ricart M: Translational evidence of endothelial damage in obese individuals: Inflammatory and prothrombotic responses. *J Thromb Haemost* 2011;9:1236–1245.
- 13 Serradell M, Diaz-Ricart M, Cases A, Petriz J, Ordinas A, Escolar G: Uraemic medium accelerates proliferation but does not induce apoptosis of endothelial cells in culture. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:1079–1085.
- 14 Carbo C, Arderiu G, Escolar G, Fusté B, Cases A, Carrascal M, Abian J, Diaz-Ricart M: Differential Expression of Proteins From Cultured Endothelial Cells Exposed to Uremic Versus Normal Serum. *Am J Kidney Dis* 2008;51:603–612.
- 15 Caballo C, Palomo M, Cases A, Galan AM, Molina P, Vera M, Bosch X, Escolar G, Diaz-Ricart M: NFκB in the Development of Endothelial Activation and Damage in Uremia: An In vitro Approach. *PLoS One* 2012;7:e43374.
- 16 Martin-Rodriguez S, Caballo C, Gutierrez G, Vera M, Cruzado JM, Cases A, Escolar G, Diaz-Ricart M: TLR4 and NALP3 inflammasome in the development of endothelial dysfunction in uraemia. *Eur J Clin Invest* 2015;45:160–169.
- 17 Wanner C: Chronic kidney disease and statin therapy: To treat or not to treat? *Eur Heart J* 2013;34:1772–1774.
- 18 Agarwal R, Sinha AD, Pappas MK, Abraham TN, Tegegne GG: Hypertension in hemodialysis patients treated with atenolol or lisinopril: a randomized controlled trial. *Nephrol Dial Transplant* 2014;29:672–681.
- 19 Iseki K, Arima H, Kohagura K, Komiya I, Ueda S, Tokuyama K, Shiohira Y, Uehara H, Toma S: Effects of angiotensin receptor blockade (ARB) on mortality and cardiovascular outcomes in patients with long-term haemodialysis: a randomized controlled trial. *Nephrol Dial Transplant* 2013;28:1579–1589.
- 20 Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L: Polyphenols: Food sources and Bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004;79:727–747.
- 21 Mennen LI, Sapinho D, de Bree A, Arnault N, Bertrais S, Galan P, Hercberg S: Consumption of foods rich in flavonoids is related to a decreased cardiovascular risk in apparently healthy French women. *J Nutr* 2004;134:923–926.
- 22 Baker K, Marcus CB, Huffman K, Kruk H, Malfroy B, Doctrow SR: Synthetic combined superoxide dismutase/catalase mimetics are protective as a delayed treatment in a rat stroke model: a key role for reactive oxygen species in ischemic brain injury. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;284:215–221.
- 23 Hosakote YM, Komaravelli N, Mautemps N, Liu T, Garofalo RP, Casola A: Antioxidant mimetics modulate oxidative stress and cellular signaling in airway epithelial cells infected with respiratory syncytial virus. *AJP Lung Cell Mol Physiol* 2012;303:L991–L1000.
- 24 Chew P, Yuen DYCC, Koh P, Stefanovic N, Febbraio MA, Kola I, Cooper ME, de Haan JB: Site-specific antiatherogenic effect of the antioxidant ebselen in the diabetic apolipoprotein E-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:823–830.
- 25 Coombes JS, Fasset RG: Antioxidant therapy in hemodialysis patients: A systematic review. *Kidney Int* 2012;81:233–246.
- 26 Tepel M, Van der Giet M, Statz M, Jankowski J, Zidek W: The antioxidant acetylcysteine reduces cardiovascular events in patients with end-stage renal failure: A randomized, controlled trial. *Circulation* 2003;107:992–995.
- 27 Sahin G, Yalcin AU, Akcar N: Effect of N-acetylcysteine on endothelial dysfunction in dialysis patients. *Blood Purif* 2007;25:309–315.

- 28 Shang F, Wang S-C, Hsu C-Y, Miao Y, Martin M, Yin Y, Wu CC, Wang YT, Wu G, Chien S, Huang HD, Tarng DC, Shiu YT, Cheung AK, Huang PH, Chen Z, Shyy JY: MicroRNA-92a Mediates Endothelial Dysfunction in CKD. *J Am Soc Nephrol* 2017;28:3251-3261.
- 29 Rushworth GF, Megson IL: Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: the need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. *Pharmacol Ther* 2014;141:150-159.
- 30 Samuni Y, Goldstein S, Dean OM, Berk M: The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 2013;1830:4117-4129.
- 31 Gressier B, Cabanis A, Lebegue S, Brunet C, Dine T, Luyckx M, Cazin M, Cazin JC: Decrease of hypochlorous acid and hydroxyl radical generated by stimulated human neutrophils: comparison in vitro of some thiol-containing drugs. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1994;16:9-13.
- 32 Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR: Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973;52:2745-2756.
- 33 Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J: The antioxidant action of N-acetylcysteine: Its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 1989;6:593-597.
- 34 Spagnuolo G, D'Anto V, Cosentino C, Schmalz G, Schweikl H, Rengo S: Effect of N-acetyl-L-cysteine on ROS production and cell death caused by HEMA in human primary gingival fibroblasts. *Biomaterials* 2006;27:1803-1809.
- 35 Rodrigues SD, França KC, Dallin FT, Fujihara CK, Nascimento AJ, Pecoits-Filho R, Nakao LS: N-acetylcysteine as a potential strategy to attenuate the oxidative stress induced by uremic serum in the vascular system. *Life Sci* 2015;121:110-116.
- 36 Serradell M, Diaz-Ricart M, Cases A, Zurbano MJ, Aznar-Salatti J, Lopez-Pedret J, Ordinas A, Escolar G: Uremic medium disturbs the hemostatic balance of cultured human endothelial cells. *Thromb Haemost* 2001;86:1099-1105.
- 37 Serradell M, Diaz-Ricart M, Cases A, Zurbano MJ, Lopez-Pedret J, Arranz O, Ordinas A, Escolar G: Uremic medium causes expression, redistribution and shedding of adhesion molecules in cultured endothelial cells. *Haematologica* 2002;87:1053-1061.
- 38 Gerritsen ME, Carley WW, Ranges GE, Shen CP, Phan SA, Ligon GF, Perry CA: Flavonoids inhibit cytokine-induced endothelial cell adhesion protein gene expression. *Am J Pathol* 1995;147:278-292.
- 39 Read MA: Flavonoids: naturally occurring anti-inflammatory agents. *Am J Pathol* 1995;147:235-227.
- 40 Wang J, Liao Y, Fan J, Ye T, Sun X, Dong S: Apigenin inhibits the expression of IL-6, IL-8, and ICAM-1 in DEHP-stimulated human umbilical vein endothelial cells and in vivo. *Inflammation* 2012;35:1466-1476.
- 41 Siow RCM, Li FYL, Rowlands DJ, de Winter P, Mann GE: Cardiovascular targets for estrogens and phytoestrogens: transcriptional regulation of nitric oxide synthase and antioxidant defense genes. *Free Radic Biol Med* 2007;42:909-925.
- 42 Palmieri D, Perego P, Palombo D: Apigenin inhibits the TNF α -induced expression of eNOS and MMP-9 via modulating Akt signalling through oestrogen receptor engagement. *Mol Cell Biochem* 2012;371:129-136.
- 43 Takano-Ishikawa Y, Goto M, Yamaki K: Inhibitory Effects of Several Flavonoids on E-selectin Expression on Human Umbilical Vein Endothelial Cells Stimulated by Tumor Necrosis Factor- α . *Phytother Res* 2003;17:1224-1227.
- 44 Chao CT, Chiang C-KK: Uremic toxins, oxidative stress, and renal fibrosis: An intertwined complex. *J Ren Nutr* 2015;25:155-159.
- 45 Tbahriti HF, Kaddous A, Bouchenak M, Mekki K: Effect of Different Stages of Chronic Kidney Disease and Renal Replacement Therapies on Oxidant-Antioxidant Balance in Uremic Patients. *Biochem Res Int* 2013;2013:358985.
- 46 Annuk M, Fellstrom B, Akerblom O, Linde T, Fellstrom B: Oxidative stress markers in pre-uremic patients. *Clin Nephrol* 2001;56:308-314.
- 47 Roxborough HE, Mercer C, McMaster D, Maxwell AP, Young IS: Plasma glutathione peroxidase activity is reduced in haemodialysis patients. *Nephron* 1999;81:278-283.
- 48 Deanfield JD, Halcox JP, Rabelink TJ: Endothelial function and dysfunction: Testing and clinical relevance. *Circulation* 2007;115:1285-1295.
- 49 Azad GK, Tomar RS: Ebselen, a promising antioxidant drug: mechanisms of action and targets of biological pathways. *Mol Biol Rep* 2014;41:4865-4879.

- 50 Witschi A, Reddy S, Stofer B, Lauterburg BH: The systemic availability of oral glutathione. *Eur J Clin Pharmacol* 1992;43:667–669.
- 51 Dodd S, Dean O, Copolov DL, Malhi GS, Berk M: N-acetylcysteine for antioxidant therapy: pharmacology and clinical utility. *Expert Opin Biol Ther* 2008;8:1955–1962.

Erratum

In the original article by Vera, et al., entitled „Antioxidant and Anti-Inflammatory Strategies Based on the Potentiation of Glutathione Peroxidase Activity Prevent Endothelial Dysfunction in Chronic Kidney Disease“ [Cell Physiol Biochem 2018;51(3):1287-1300, DOI: 10.1159/000495540], the figures Fig. 3, Fig. 4 and Fig. 5 have not been displayed correctly. The correct figures are displayed below, and the results of this article are not affected by this.

The authors sincerely apologize for this mistake.

Fig. 3. Activation of p38MAPK signaling pathway by uremic sera is inhibited by flavonoids and antioxidant mimetics. ECs were incubated (15 min) with sera from control donors (C), and uremic patients (U) in the absence and presence of apigenin, genistein, quercetin, ebselen, EUK134 and EUK118 (n=5). A. Bar diagrams represent the ratios of phosphorylated p38 MAPK relative to the total protein, obtained from antibody cell-based ELISA technique. B. Phospho-p38 MAPK in ECs was also assessed by Western-Blot. Images are representative of 4 different experiments. Results were quantified and represented as Mean±SD by bar diagram. # p<0.01 vs control and *p<0.05, **p<0.01 vs uremia.

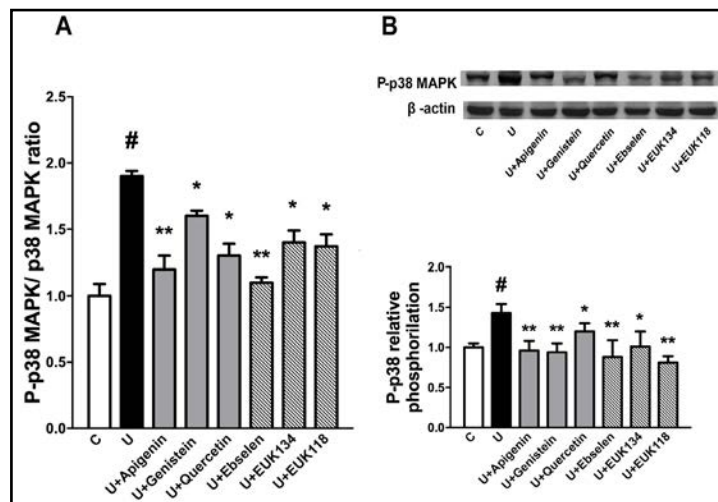


Fig. 4. Activation of NFκB (p65) signaling pathway by uremic sera is prevented by antioxidant enzyme mimetics. ECs were incubated (15 min) with sera from control donors (C), and uremic patients (U) in the absence and presence of apigenin, genistein, quercetin, ebselen, EUK134 and EUK118 (n=4). A. Ratios of phosphorylated NFκB (p65) relative to the total protein. Data are corrected for cell number and are represented as Mean±SD. B. IκB was assessed by Western-Blot in ECs previously treated with ALLN (50 µg/ml, 30 min, 37°C). Images are representative of 4 different experiments. # p<0.01 vs control and *p<0.05, **p<0.01 vs uremia.

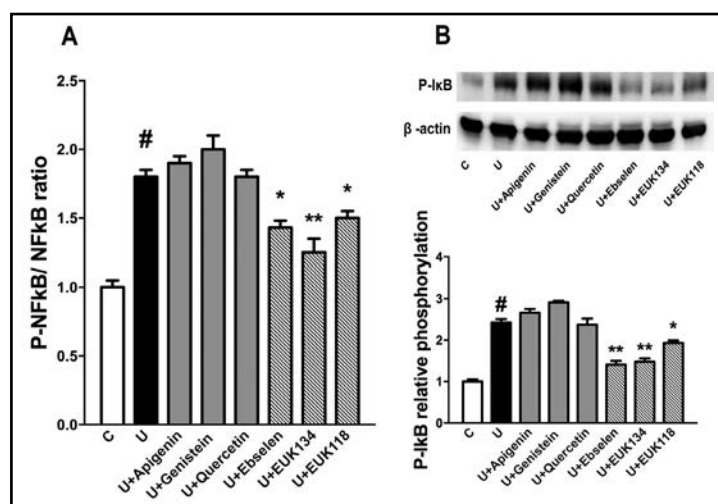
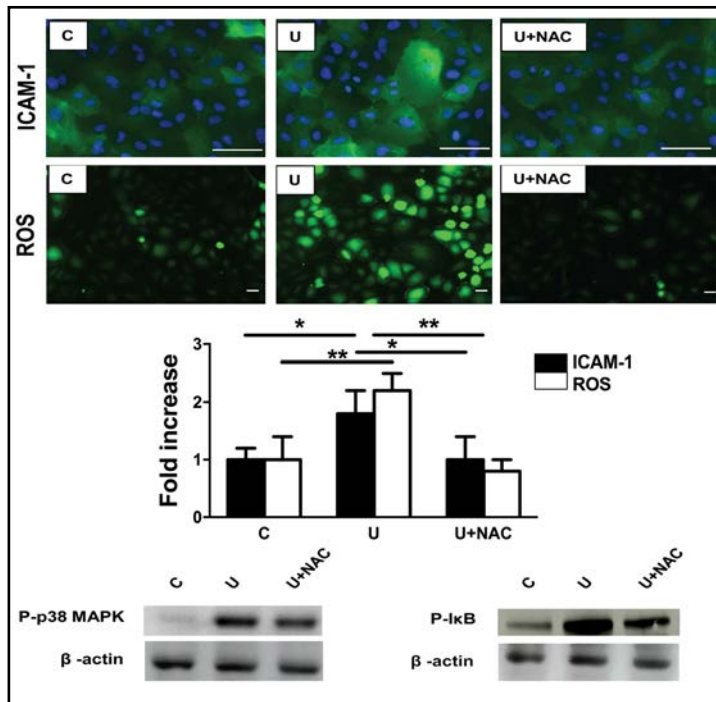


Fig. 5. Anti-inflammatory and antioxidant effects of NAC on endothelial cells exposed to uremic sera. Micrographs show ICAM-1 surface expression and ROS production in ECs exposed to control media (C), uremia (U) and uremia treated with NAC (U+NAC). Bar diagrams show the effect of the uremic sera (# p<0.05 vs control) and the NAC treatment (*p<0.05, **p<0.01 vs uremia) (n=4). NAC (10mM) inhibited phosphorylation of p38MAPK and activation of NFκB (n=4).



5.2 SEGUNDO ARTÍCULO

5.2.1 TÍTULO

Upregulation of HDAC, a harbinger of uremic endothelial dysfunction is prevented by defibrotide.

5.2.2 AUTORES

Marta Palomo, **Manel Vera**, Susana Martín, Sergi Torramadé-Moix, Julia Martínez-Sánchez, Ana Belen Moreno, Enric Carreras, Ginés Escolar, Aleix Cases, Maribel Díaz-Ricart.

5.2.3 REVISTA

J Cell Mol Med 2020;24:1713-1723.

DOI: 10.1111/jcmm.14865

5.2.4 INDEXACIÓN de la revista en el momento de publicación del artículo

JCR Journal Rank: Q1

SCImago Journal Rank: Q1

Factor de impacto JCR: 4,658

SJR: 1,439

5.2.5 RESUMEN

Antecedentes y objetivos:

La DE es la alteración previa al desarrollo de la enfermedad vascular acelerada presente en la ERC, en la que no se puede descartar la implicación de cambios epigenéticos promovidos por el medio urémico. En este contexto DF, un fármaco con propiedades protectoras del endotelio vascular podría tener un papel importante. Evaluamos los cambios inducidos por suero procedente de pacientes con ERC en programa de HD sobre el proteoma de CE, el efecto de DF en este entorno y su efecto sobre los cambios proinflamatorios, prooxidantes y protrombóticos.

Material y métodos:

Cultivos de CE obtenidas a partir de HUVECs fueron expuestas a medio conteniendo suero de pacientes con ERC en HD o de donantes sanos. La expresión diferencial de proteínas en estas CE fue analizada mediante análisis proteómico, Western blot e inmunofluorescencia. El papel de unas de las proteínas identificadas en CE en respuesta al medio urémico, la HDAC, fue investigado mediante la evaluación de cambios en distintos marcadores de DE como la expresión de ICAM-1, TLR4 y FvW mediante inmunofluorescencia, y la producción de ROS por fluorescencia, en ausencia o presencia de un inhibidor específico de las mismas Tricostatin A (TSA) y del DF.

Resultados:

El medio urémico indujo una sobreexpresión de HDAC1 y HDAC2 en las CE. La expresión de HDAC1 aumentó significativamente tanto en el citoplasma como en el núcleo, efectos inhibidos por DF de una manera dosis dependiente. TSA, un paninhibidor de HDAC, y DF fueron capaces de mejorar la DE asociada a la uremia al prevenir la sobreexpresión de ICAM1, TLR4, vWF y ROS.


Además, los resultados obtenidos indicaron que el DF ejerce su efecto protector endotelial en la uremia probablemente a través de la inhibición de la vía de señalización PI3K/AKT, implicada en la expresión de HDAC.

Conclusión:

El daño endotelial asociado con la ERC podría estar mediado, en parte, por un aumento de la expresión de HDAC1 y HDAC2, lo que le confiere un papel clave como modulador en la DE asociada a la uremia y, por lo tanto, como una potencial diana terapéutica. En este contexto, el DF debido a su capacidad de reducir la expresión de HDAC1 y HDAC2 inducida por el medio urémico, podría emerger como una nueva posibilidad terapéutica.

ORIGINAL ARTICLE

Up-regulation of HDACs, a harbinger of uraemic endothelial dysfunction, is prevented by defibrotide

Marta Palomo^{1,2,3} | Manel Vera⁴  | Susana Martin¹ | Sergi Torramadé-Moix¹ | Julia Martinez-Sanchez^{1,2,3} | Ana Belen Moreno¹ | Enric Carreras^{2,3} | Ginés Escolar¹ | Aleix Cases⁴ | Maribel Díaz-Ricart^{1,3}

¹Hematopathology, Centre Diagnòstic Biomèdic (CDB), Hospital Clinic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona (UB), Barcelona, Spain

²Josep Carreras Leukaemia Research Institute, Hospital Clinic/University of Barcelona Campus, Barcelona, Spain

³Barcelona Endothelium Team (BET), Barcelona, Spain

⁴Nephrology Department, Hospital Clinic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona (UB), Barcelona, Spain

Correspondence

Marta Palomo, Josep Carreras Leukaemia Research Institute, Hospital Clinic/ University of Barcelona Campus, C/ Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. Email: mpalomo@carrerasresearch.org

Funding information

Jazz Pharmaceuticals, Grant/Award Number: IST-16-10355; Germán José Carreras Leukaemia Foundation, Grant/Award Number: 03R/2019 and 11R/2016; Generalitat de Catalunya, Grant/Award Number: 2017-SGR675 and CERCA Programme; Instituto de Salud Carlos III Spanish Government, Grant/Award Number: DTS16/00133 and PIE15/0027

Abstract

Endothelial dysfunction is an earlier contributor to the development of atherosclerosis in chronic kidney disease (CKD), in which the role of epigenetic triggers cannot be ruled out. Endothelial protective strategies, such as defibrotide (DF), may be useful in this scenario. We evaluated changes induced by CKD on endothelial cell proteome and explored the effect of DF and the mechanisms involved. Human umbilical cord vein endothelial cells were exposed to sera from healthy donors (n = 20) and patients with end-stage renal disease on haemodialysis (n = 20). Differential protein expression was investigated by using a proteomic approach, Western blot and immunofluorescence. HDAC1 and HDAC2 overexpression was detected. Increased HDAC1 expression occurred at both cytoplasm and nucleus. These effects were dose-dependently inhibited by DF. Both the HDACs inhibitor trichostatin A and DF prevented the up-regulation of the endothelial dysfunction markers induced by the uraemic milieu: intercellular adhesion molecule-1, surface Toll-like receptor-4, von Willebrand Factor and reactive oxygen species. Moreover, DF down-regulated HDACs expression through the PI3/AKT signalling pathway. HDACs appear as key modulators of the CKD-induced endothelial dysfunction as specific blockade by trichostatin A or by DF prevents endothelial dysfunction responses to the CKD insult. Moreover, DF exerts its endothelial protective effect by inhibiting HDAC up-regulation likely through PI3K/AKT.

KEYWORDS

chronic kidney disease, defibrotide, endothelial dysfunction, HDAC, HDAC1, HDAC2, inflammation, oxidative stress

1 | INTRODUCTION

Chronic kidney disease (CKD) is a major public health concern due to its increased prevalence, high morbidity and mortality associated, high

costs, poorer quality of life and reduced life expectancy.¹ CKD is associated with an increased cardiovascular (CV) risk, and CV disease accounts for nearly half of all deaths.² The increased incidence of CV disease (CVD) in CKD cannot be explained by the high prevalence of

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2019 The Authors. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* published by Foundation for Cellular and Molecular Medicine and John Wiley & Sons Ltd.

traditional risk factors in this setting, and classical CV risk scores, such as the Framingham risk score, underestimate the CV risk in this population.³ Further, the results of pharmacological interventions that have proven a cardio-protective benefit in the general population or other high risk populations (eg in diabetes or in patients with established cardiovascular disease), such as statins or inhibitors of the renin-angiotensin system, have failed to show a benefit in patients with end-stage renal disease.⁴⁻⁷ Because of that, new or uraemia-related CV risk factors have been postulated to play a role in the CV risk of these patients.⁸ Thus, there is a need for the search of new therapies able to reduce the high CV risk and the associated mortality in this population.

There is wide evidence indicating that endothelial dysfunction is an initial stage for the development of atherosclerosis, and in vivo and in vitro studies have demonstrated that endothelial dysfunction is present in CKD.⁹ In previous in vitro studies, endothelial dysfunction induced by the CKD milieu has been characterized. Exposure of endothelial cells (ECs) to sera from CKD patients results in morphological alterations, enhanced thrombogenicity of the extracellular matrix and changes towards a pro-inflammatory phenotype, with increased expression of adhesion receptors and activation of signalling pathways, such as nuclear factor-kappa B (NFkB),¹⁰ or the innate immunity Toll-like receptor 4 (TLR4) and the NALP3 inflammasome.¹¹ Moreover, the endothelial response to the CKD insult is also characterized by an enhanced oxidative stress and changes in the expression of related proteins.¹²⁻¹⁵

Our previous in vitro results suggest that the CKD setting induces activation of specific genes in the endothelium that promotes a pro-oxidant, pro-inflammatory, prothrombotic and proliferative state. In this regard, HDACs enzymes are important epigenetic factors that regulate pro-inflammatory gene expression, in ECs and in other tissues, and also deacetylate non-histone proteins that regulate inflammatory signalling.¹⁶ Therefore, they appear to be promising therapeutic targets for the treatment of atherosclerosis and other cardiovascular diseases.^{17,18} Furthermore, HDAC activity is linked to a number of cardio-renal pathologies, including heart failure,¹⁹ hypertension,²⁰ and diabetes or diabetic kidney disease.^{21,22} Thus, the dysfunctional endothelium and its epigenetic regulation arise as an attractive target for interventions designed to reduce the risk and burden of CVD in CKD patients.^{23,24} Defibrotide (Defitelio®) (DF) is a drug composed by a complex single-stranded oligodeoxyribonucleotides derived from porcine intestinal mucosal DNA that has demonstrated profibrinolytic, antithrombotic-thrombolytic, antiischaemic, antishock, antiatherosclerotic, antirejection and anti-angiogenic effects.²⁵ The endothelial protective activity of this drug has been demonstrated in different clinical settings.²⁶⁻²⁸ This drug interacts specifically with the membrane of ECs where it displays its anti-inflammatory and anti-oxidant effects.²⁹

In the present study, we applied a translational approach¹² to identify proteins differentially expressed in an endothelium exposed to the CKD milieu and the effect of DF. Functional assays were performed to confirm the role of the most physiologically relevant identified proteins and their implication in the development of endothelial dysfunction. Moreover, we aimed at identifying the mechanisms involved in the protective effect exerted by DF in this setting.

2 | METHODS

2.1 | Patients and sample collection

Sera from patients with end-stage renal disease on maintenance haemodialysis (HD, n = 20) were included. Patient characteristics are detailed in Table 1. In order to exclude causes other than uraemia in endothelial dysfunction, patients with diabetes, dyslipidaemia and/or previous CVD and/or current smokers were excluded. All CKD patients were dialysed with biocompatible membranes, ultrapure water, for ≥ 4 hours, three times a week with a Kt/V ≥ 1.3 . None of the patients were dialysed through an HD catheter as a vascular access. Blood samples were collected before the 2nd or 3rd HD session of the week. Sex and age-matched healthy donors (n = 20), with no previous history of CVD, and preserved renal function (eGFR > 90 mL/min/1.73 m², CKD-EPI formula) were enrolled as controls (Table 1). Serum samples from CKD patients and from healthy donors were obtained by centrifugation of non-anticoagulated blood (3000 g, 15 minutes) and stored at -80°C until used. Pools of serum were

TABLE 1 Clinical characteristics of patients and controls

	Control (n = 20)	HD (n = 20)
Age, years, mean \pm SD	48.3 \pm 9.3	55.4 \pm 15.7
Female/male	12/8	9/11
Estimated filtration rate CKD-EPI (mL/min/1.73 m ²)	>90	0
Mean time on dialysis, months \pm SD		23 \pm 5.7
Dialysis adequacy, Kt/V, mean, \pm SD		2.3 \pm 0.4
Serum albumin (g/L), mean \pm SD	44 \pm 4	39 \pm 6
CRP (mg/dL), mean \pm SD	0.2 \pm 0.1	0.4 \pm 0.2
Haemoglobin (g/L), mean \pm SD	12.6 \pm 1.6	11.3 \pm 0.4
Leucocytes (10 ⁹ /L), mean \pm SD	7.4 \pm 1.6	6.8 \pm 1.2
Causes of CKD n (%)		
Glomerulonephritis		4 (20%)
Polycystic kidney disease		3 (15%)
Interstitial nephropathy		4 (20%)
Obstructive kidney disease		2 (10%)
Nephrosclerosis		3 (15%)
Unknown		4 (20%)
Hypertension n (%)	0	14 (70%)
Use of statins n (%)	0	8 (40%)
Use of vitamin D n (%)	0	18 (90%)
Use of erythropoiesis stimulating agents n (%)	0	17 (85%)
Use of inhibitors of the renin-angiotensin system n (%)	0	6 (30%)

Abbreviation: CRP, C-Reactive protein.

prepared containing serum samples from different healthy donors or HD patients, which were used as reagent for the different experiments performed.

2.2 | Endothelial cell cultures

ECs were isolated from human umbilical cord veins.³⁰ Cells were maintained and subcultured at 37°C in a 5% CO₂ humidified incubator in EGM-2 Endothelial Cell Growth Medium-2 BulletKit (Lonza, Cultek SLU). Culture medium was replaced every 48 hours. To perform the experiments, ECs were used between the 2nd and 3rd passage. To study the CKD-induced endothelial damage, we used an established in vitro model of uraemic endothelial dysfunction.^{11,13-15,24} This model consists of exposing endothelial cells to Medium 199 (Gibco BRL, Life Technologies) supplemented with 100 U/mL penicillin, 100 g/mL streptomycin (Gibco BRL, Life Technologies) and 20% of pooled sera from patients (n = 20) or from matched healthy donors (n = 20), for different periods depending on the endothelial damage marker to be evaluated.

2.3 | Differential proteomic analysis

ECs were isolated from human umbilical cord veins (n = 6) and cultured as previously described. After reaching confluence during the first passage, cells were mixed, seeded in 75-cm² flasks and exposed to media containing 20% of pooled sera of controls (n = 20 distributed in 6 different pools) or CKD patients (n = 20 distributed in 6 different pools) with or without DF (100 µg/mL, a dose selected from our previous studies)^{27,29} during 24 hours. Then ECs were washed, trypsinized, counted, pelleted and stored at -80°C until proteomic analysis.

Each sample was then solubilized in Laemmli lysis buffer (60 mmol/L Tris HCl, pH 6.8, 2.2% (w/v) SDS, 5% (v/v) glycerol, 0.1 mol/L DTT), incubated for 3 minutes at 99°C, sonicated and centrifuged for 15 minutes. Protein concentration was determined using the Quick Start Bradford Protein Assay (Bio-Rad) following the manufacturer's recommendation.³¹ Then, 100 µg of proteins was separated by using SDS-PAGE 12% acrylamide gel. The gel was fixed with 30% ethanol and 10% acetic acid and preconditioned with sodium thiosulphate, before silver nitrate staining treatment with the modified Blum et al³² silver staining protocol. Gels were cut into 3 mm slices prior to trypsin digestion and peptide extraction.³³ Peptides were separated by means of nano liquid chromatography using a Proxeon EASY-nLC (Thermo Fisher Scientific) with a flow rate of 300 nL/min, a C18 trap column (5 µm, 120 Å, 100 µm inner diameter 2 cm in length), an EASY C18 analytical column (3 µm, 120 Å, 75 µm inner diameter 10 cm in length). The following linear gradient, using solvent B (97% acetonitrile, 0.1% formic acid) and solvent A (3% acetonitrile, 0.1% formic acid), was employed: 5%-40% buffer B (90 minutes); 40%-100% buffer B (5 minutes); 100% buffer B (15 minutes) finally. MS/MS analysis was performed using an LTQ Orbitrap Velos (Thermo

Fisher Scientific) coupled to a nano electrospray ion source (Thermo Fisher Scientific). MS/MS data acquisition was completed using Xcalibur 2.1 (Thermo Fisher Scientific).³⁴

Data were processed using Proteome Discoverer 1.2 (Thermo Fisher Scientific). For database searching, processed data were submitted to the in-house Homo sapiens UniProtKB/Swiss-Prot database (released June 2011; 20 211 protein entries) using SEQUEST, version 28.0 (Thermo Fisher Scientific). The following search parameters were used: two maximum missed cleavages for trypsin; carbamidomethylation as a fixed modification; methionine oxidation as a variable modification; 20 pp peptide mass tolerance; and 0.8 Da fragment ion tolerance. Criteria used to accept identification included a false discovery rate (FDR) of 0.05, and five minimum spectra (and at least one unique peptide) matched per protein. Proteins identified were classified according to biological function(s) using the information available at the UniProt Knowledge base (UniProtKB/Swiss-Prot) website (<http://www.uniprot.org>) and checked according to previous descriptions found in PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>; National Center for Biotechnology Information, US National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, MD). Spectral counts were normalized using the average of the sum of raw counts across all samples. Differentially expressed proteins were identified using stringent selection criteria: fold change ≥ 3 for up-regulated proteins, detected in all samples and a mean normalized count in positive samples of ≥ 2 .

2.4 | Confirmation of proteins by Western blot and immunofluorescence studies

From the differentially up-regulated proteins found comparing the analysed settings, both HDAC1 and HDAC2 were selected to be deeply studied. First, protein lysates from ECs exposed to the same conditions studied in the proteomic assay were analysed by Western blot (WB, n = 4) and immunofluorescence (IF, n = 6) with specific primary antibodies (Abcam) to confirm the proteomic results.

For WB analysis, ECs were exposed to media containing 20% of pooled sera of controls (4 different pools) or CKD patients (4 different pools) with or without DF (100 µg/mL, a dose selected from our previous studies)^{27,29} during 24 hours. Then, ECs were lysed with Laemmli's buffer, sonicated to shear DNA and reduce viscosity (15 seconds), and heated to 90°C (5 minutes). Protein concentration in the supernatants was determined using Coomassie Plus (Pierce). Samples were resolved by 8% SDS-PAGE, proteins transferred to nitrocellulose membranes and probed with specific antibodies against HDAC1, HDAC2 (Abcam) and B-actin (Cell Signaling). Membranes were incubated with a peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG and developed by chemiluminescence.²⁹ Densitometric assay of protein bands was performed using Fiji (ImageJ, National Institutes of Health), and all values were normalized with their respective B-actin bands.

For IF analysis, ECs were exposed to the same conditions previously described, fixed with 4% paraformaldehyde in 0.15 mol/L

PBS, pH 7.4 (4°C, 10 minutes), blocked with 1% BSA, permeabilized with triton X-100 (Sigma) and incubated with a primary antibody against HDAC1 and a secondary antibody anti-rabbit IgG conjugated with Alexa 488 (Molecular probes). Nuclei were stained with DAPI (Sigma). Samples were evaluated by a fluorescence microscopy (Leica DM4000B), images were captured through a video camera (Leica DFC310FX), and the percentage of the area positive for staining was calculated by computerized establishing a threshold through morphometric analysis (Fiji, ImageJ, National Institutes of Health). Moreover, with the aim of analysing the location of HDAC1, a colour threshold tool defining blue colour was used to differentiate nuclei (blue) and cytoplasm (not blue). Then, HDAC1 expression was differentially quantified in these two compartments. Moreover, to evaluate the specificity of HDAC1 inhibition by DF, a dose-dependent study (0, 50 and 100 µg/mL) was performed by using an IF assay.

2.5 | Roles of HDAC1 and HDAC2 in endothelial damage induced by CKD sera

To evaluate the role of HDAC1 and HDAC2 in uraemic endothelial dysfunction, a pan-HDAC inhibitor trichostatin A (TSA) (Sigma Aldrich) and DF were used as HDAC inhibitors. ECs on 6-well microplates were pretreated (24 hours) with TSA (50 nmol/L) or DF (100 µg/mL) and exposed to media containing 20% of pooled sera from the uraemic patients or healthy donors, as previously described for the differential proteomic analysis. Cells were then fixed and labelled for intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) (Millipore, Merck), Toll-like receptor 4 (TLR4) (Abcam) and von Willebrand Factor (vWF) (DAKO) using IF, as previously described. Reactive oxygen species (ROS) production was explored by using CM-H2DCFDA. This compound can passively diffuse into cells being oxidized by ROS to the highly fluorescent dichlorofluorescein. ROS production was monitored by fluorescence microscopy. All samples were evaluated by microscopy (Leica DM4000B), and images were captured through a videocamera (Leica DFC310FX). Fluorescence micrographs were analysed using ImageJ (version 1.43m; NIH, <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/manual/tech.html#>). Cultured cells were selected from the background with the threshold tool, and the fluorescence intensity was measured.

2.6 | Activation of PI 3-kinase/AKT pathway as inducer of HDAC1 and HDAC2 expression and inhibitory effect of defibrotide

740 Y-P (Tocris Bioscience, Bio-Techne R&D Systems, S.LU), a cell-permeable PI 3-kinase/AKT activator, was used as reagent to investigate the interaction between DF and HDAC1 and HDAC2. 740 Y-P was added (20 µmol/L, 5 hours) to ECs cultures in the presence or absence of DF and HDAC1 and HDAC2 expression was evaluated through IF (n = 6) and WB (n = 4).

2.7 | Study approval

Written informed consent was obtained from all participants, and the study was approved by the Ethical Committee of the Hospital Clinic (HCB/2014/0302) and carried out according to the principles of World Medical Association Declaration of Helsinki.

2.8 | Statistics

Results are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM) and correspond to the % of labelled area/% of nuclei area for IF assays when analysing total HDAC1 expression, in % of labelled area when analysing HDAC1 expression in nuclei or cytoplasm, and in fold increase vs control for the values obtained from densitometric analysis of the protein bands normalized with their respective B-actin bands for WB. N corresponds to different experiments performed with different pools (from healthy donors or CKD patients) for each value analysed. Statistical analysis was performed using SPSS statistical package 17.0.0 (SPSS Inc, Chicago, IL) with raw data using *t* test. Results were considered statistically significant when *P* < .05.

3 | RESULTS

3.1 | Endothelial dysfunction in CKD is characterized by an increase in HDAC1 and HDAC2, among other proteins

To study the proteomic changes involved in endothelial uraemic dysfunction and the potential protective role of DF in this setting, a proteomic approach was performed on ECs exposed to sera of healthy controls or CKD patients in the absence and presence of DF. After normalization, 11 proteins were differentially expressed comparing the analysed settings (Table 2). Proteins related to inflammation, such as protein arginine N-methyltransferase 5 or histone arginine methyltransferase; proteins involved in epigenetic regulation and proteins related to cell motility; proliferation and survival (HDAC1, HDAC2, ATP-dependent DNA helicase Q1, TRIO and F-actin-binding protein), among others were overexpressed in the uraemic setting. Results suggested that DF could re-establish the proper expression of proteins that were found overexpressed in the ECs exposed to CKD conditions.

3.2 | DF prevents the overexpression of HDAC1 and HDAC2 induced by CKD sera, as well as increased HDAC1 in both nucleic and cytoplasmic locations

WB and IF techniques were applied to confirm HDAC1 and HDAC2 overexpression in ECs exposed to CKD sera and the effect of DF. WB results confirmed that CKD induced an overexpression of HDAC1 (1.9 ± 0.3 fold vs Control, n = 4, *P* < .05) and HDAC2

TABLE 2 Overexpressed proteins in endothelial cells exposed to CKD sera

Swiss-Prot accession no.	Protein name	Gene	Cellular location	Molecular function	Biological process
P33121	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 1	ACSL1	Mitochondrion, endoplasmic reticulum, and peroxisome	Ligase, activation of long-chain fatty acids for both synthesis of cellular lipids, and degradation via beta-oxidation	Fatty acid metabolism, lipid metabolism
O14744	Protein arginine N-methyltransferase 5	PRMT5	Golgi apparatus, nucleus, and cytoplasm	Chromatin regulator methyltransferase, repressor, and transferase	Biological rhythms, transcription
Q03701	CCAAT/enhancer-binding protein zeta	CEBPZ	Nucleus	Activator	Transcription regulation
Q9UJW0	Dynactin subunit 4	DCTN4	Cytoskeleton, cell cortex, and sarcomere	Protein N-terminus binding	Endoplasmic reticulum to Golgi vesicle-mediated transport and nuclear migration
Q9BY44	Eukaryotic translation initiation factor 2A	EIF2A	Cytosol, extracellular region, and secreted	Initiation factor	Protein biosynthesis and translation regulation
Q92556	Engulfment and cell motility protein 1	ELMO1	Plasma membrane	SH3 domain binding	Actin cytoskeleton organization, apoptotic process, and vascular endothelial growth factor receptor signalling pathway
Q13451	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP5	FKBP5	Nucleus and cytoplasm	Heat shock protein binding	Chaperone-mediated protein folding
Q96124	Far upstream element-binding protein 3	FUBP3	Nucleus	DNA-binding transcription activator activity, RNA polymerase II-specific, and RNA binding	Positive regulation of gene expression
Q96PP9	Guanylate-binding protein 4	GBP4	Golgi apparatus and nucleus	GTPase activity	Cellular response to interferon-gamma
Q13547	Histone deacetylase 1	HDAC1	Nucleus	Chromatin regulator, Hydrolase, and repressor	Biological rhythms and Transcription regulation
Q92769	Histone deacetylase 2	HDAC2	Nucleus and cytoplasm	Chromatin regulator, hydrolase, and repressor	Biological rhythms and transcription regulation

(1.5 ± 0.1 fold vs Control, $n = 4$, $P < .05$) that was normalized in the presence of DF (1.1 ± 0.2 for HDAC1, and 0.9 ± 0.2 for HDAC2, $n = 4$ and $P < .05$ vs CKD for all experiments) (Panel A, Figure 1). Similarly, an increase in HDAC1 was detected by IF in ECs exposed to CKD from $3 \pm 0.3\%$ of labelled area/% nuclei area in controls to $4.7 \pm 0.2\%$ of labelled area/% nuclei area in CKD ($n = 6$, $P < .01$). The effect of uraemic sera on endothelial HDAC1 expression was prevented by DF ($2.6 \pm 0.1\%$ of labelled area/% nuclei area, $n = 6$, $P < .01$ vs CKD) (Micrographs and left scatterplot, Panel B, Figure 1). Specifically at the nucleus, CKD sera induced a significant increase in HDAC1 ($77.5 \pm 2.9\%$ vs $50.3 \pm 2.4\%$ of nuclei labelled area in control samples, $n = 6$, $P < .01$), which was prevented by DF ($41.8 \pm 5.2\%$ of nuclei labelled area, $n = 6$, $P < .01$ vs CKD). In addition, the effect of DF was also notable in the cytoplasmic location in ECs exposed to CKD, as the overexpression of the protein in ECs exposed to uraemic sera vs controls was reduced to almost 75% of cytoplasmic labelled area (Micrographs and right scatterplot, Panel B, Figure 1).

3.3 | The inhibitory effect of DF on CKD-induced HDAC1 overexpression is dose-dependent

Immunofluorescence assays were performed with different DF doses to test the specificity of the reduction of HDAC1 expression previously detected. In ECs exposed to CKD sera, HDAC1 total expression increased to $4.7 \pm 0.2\%$ of labelled area/% nuclei area compared to control, and was dose-dependently inhibited in the presence of $50 \mu\text{g/mL}$ ($4.2 \pm 0.3\%$ of labelled area/% nuclei area, $n = 6$,) and $100 \mu\text{g/mL}$ ($3.8 \pm 0.1\%$ of labelled area/% nuclei area, $n = 6$, $P < .05$ vs CKD) of DF (Figure 2).

3.4 | CKD-induced endothelial dysfunction is mediated through HDAC1 and HDAC2 overexpression

ICAM-1 and TLR4 expression on cell surfaces and vWF content were higher in ECs exposed to the CKD patients' sera when

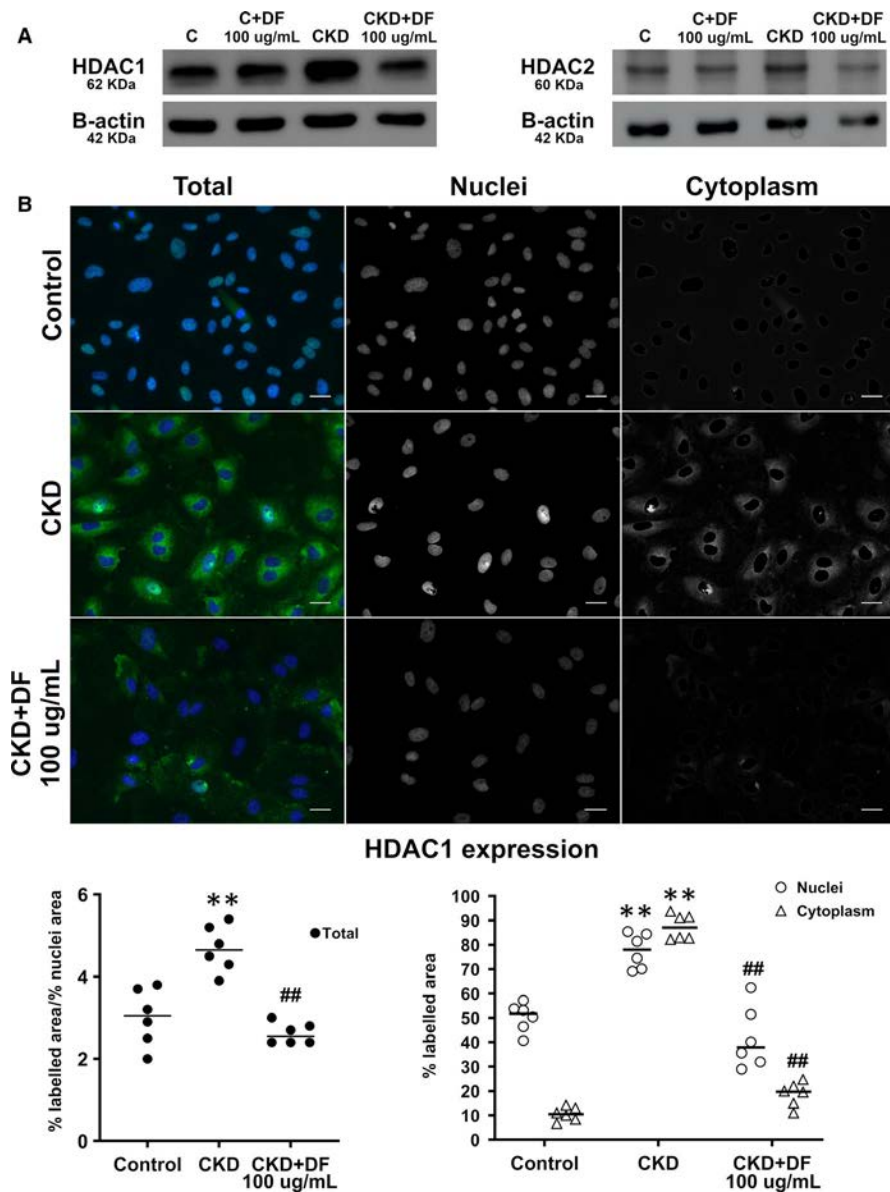


FIGURE 1 Defibrotide prevents HDAC1 increased expression induced by CKD sera at both nucleic and cytoplasmic locations. A, Immunoblot images show expression of HDAC1 (left) and HDAC2 (right) when endothelial cells were exposed to control or CKD sera (24 h) in the absence or presence of DF (100 μ g/mL). B, Micrographs show HDAC1 expression (green) in endothelial cells exposed to control and CKD sera in the absence or presence of defibrotide (CKD + DF). Left column shows total presence of HDAC1 (green) and nucleic (blue) staining. The middle column shows HDAC1 expression only in the nuclei and the right column shows HDAC1 expression only in the cytoplasm (40 \times magnification). Left scatterplot (with median) represents HDAC1 expression in terms of the total percentage of labelled area/percentage of nuclei area, and right scatterplot represent HDAC1 expression in terms of the total percentage of labelled area in nuclei or cytoplasm, in endothelial cells exposed to healthy sera (Control) and sera from CKD patients with or without the presence of defibrotide (CKD and CKD + DF, respectively) ($n = 6$, being $**P < .01$ vs control and $##P < .01$ vs CKD, $n =$ number of independent experiments, statistical analysis was performed with raw data using t test)

compared to control sera ($1.5 \pm 0.2\%$, $0.8 \pm 0.1\%$, and $7.5 \pm 0.9\%$ vs $0.6 \pm 0.1\%$, $0.4 \pm 0.1\%$, and $3.9 \pm 0.2\%$, respectively, $n = 6$, $P < .05$). Exposure of ECs to CKD sera in the presence or absence of TSA was performed to assess if HDAC1 and HDAC2 overexpression mediated the increases in markers of endothelial damage induced by CKD. Our results point out that inhibition of HDACs overexpression reduced the increase in the markers of endothelial damage evaluated. In the presence of TSA, ICAM-1 expression was reduced from $1.5 \pm 0.2\%$ to $0.9 \pm 0.1\%$, TLR4 from $0.8 \pm 0.1\%$ to $0.4 \pm 0.1\%$, vWF from $7.5 \pm 0.9\%$ to $3.6 \pm 0.4\%$ and ROS production from 4.1 ± 2.1 of mean fluorescence intensity to $21.8 \pm 2.0\%$ ($P < .05$ for all values) (Figure 3). Furthermore, DF was also capable to inhibit the expression of ICAM-1, TLR4 and vWF content on cells exposed to uraemic sera in a significant manner, decreasing their expression to control levels ($0.4 \pm 0.1\%$, $0.4 \pm 0.1\%$ and $4.1 \pm 0.2\%$, respectively, $n = 6$, $P < .05$ vs CKD for ICAM and $P < .05$ vs CKD for TLR4 and vWF) (Figure 3). DF also exhibited a remarkably and significant inhibitory

effect on ROS generation in response to the uraemic sera, reducing its production to control levels (18.1 ± 1.3 of mean fluorescence intensity, $n = 6$, $P < .05$ vs CKD) (Figure 3).

3.5 | Effect of DF on HDAC1 and HDAC2 is potentially mediated through PI3K/AKT pathway inhibition

ECs were exposed to P740-Y-P, a cell-permeable phosphopeptide activator of the PI3K/AKT pathway in the presence or absence of DF (100 μ g/mL). Then, HDAC1 expression was assessed by WB and IF, and HDAC2 by WB (Figure 4).

WB results revealed that the expression of HDAC1 and HDAC2 was increased in ECs incubated with P740-Y-P (5 hours) (fold of 1.9 ± 0.1 and 1.4 ± 0.2 , respectively vs control, $n = 4$, $P < .05$) and that these increases were prevented by DF (0.9 ± 0.1 and 1.1 ± 0.2 fold vs control,

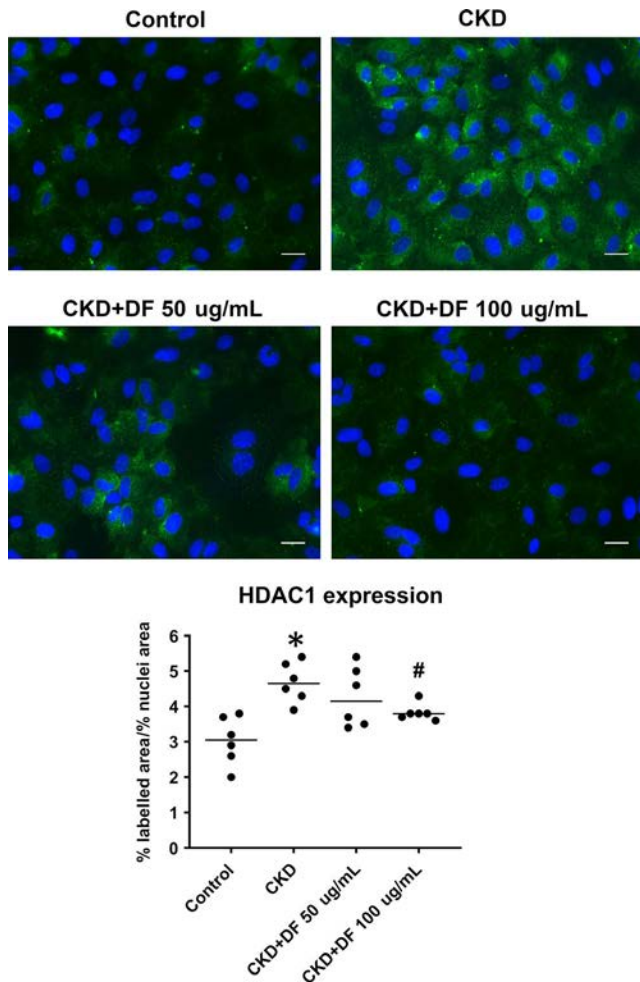


FIGURE 2 Defibrotide prevents HDAC1 increased expression induced by CKD sera in a dose-dependent manner. Micrographs show endothelial cells exposed to CKD sera in absence (up) and presence of defibrotide (50 µg/mL and 100 µg/mL). Nuclei are labelled with DAPI (blue) (40× magnification). Scatterplot (with median) represents quantification of the area positive for HDAC1 staining normalized by percentage of nuclei area, by immunofluorescence technique ($n = 6$, being $*P < .05$ vs control and $\#P < .05$ vs CKD, $n =$ number of independent experiments, statistical analysis was performed with raw data using t test)

respectively). Moreover, through an IF assay HDAC1 overexpression in the nuclei was confirmed after the incubation of ECs with P740-Y-P (from $32.6 \pm 4.4\%$ of covered area to $44.9 \pm 6.4\%$, $n = 6$, $P < .05$). Defibrotide was able to prevent this increase (27.6 ± 5.9 , $n = 6$, $P < .05$).

4 | DISCUSSION

Our present study explored the protein signature of the endothelium exposed to CKD sera in the presence and absence of DF, and pointed out to HDACs as key molecules that mediate the endothelial response to the CKD milieu. Both TSA and DF prevented the endothelium from developing its pro-inflammatory, prooxidant, prothrombotic and activated innate immunity phenotype induced by the CKD sera. Further, PI3K/AKT signalling pathway was identified

as a putative pathway through which DF modulates HDACs expression (Figure 5). Thus, the results of the present study highlight the relevance of the epigenetic changes associated with endothelial dysfunction in CKD and uncover the potential mechanisms of action by which DF exerts its protective effect on ECs in this setting.

The involvement of vascular endothelium in the initiation and the progression of atherosclerosis in CKD patients has been progressively recognized. So far, the endothelial phenotype in CKD has been extensively characterized, but there is a lack of information regarding the mechanisms through which the uraemic milieu exerts an impact on the endothelial cell and its epigenome. To approach this knowledge, we applied an established translational methodology¹² to look for the signature of endothelial dysfunction in CKD and find key factors that may be susceptible to be regulated by DF. We were able to identify two proteins, HDAC1 and HDAC2, involved in epigenetic regulation, among other up-regulated proteins. Epigenetics refer to chromatin-based mechanisms important in the regulation of gene expression that do not involve changes in the DNA sequence per se.^{35,36}

Our proteomic results were confirmed by other techniques and revealed that the CKD milieu induces overexpression of both HDAC1 and 2 and the accumulation of HDAC1 in both the nucleus and the cytoplasm of ECs. These two enzymes are widely expressed in human tissues, belong to class I HDACs, which are considered the 'classical' HDACs, whose activities could be inhibited by TSA, and are involved in cell proliferation and cell survival.³⁷ Although HDAC class I (HDAC 1, 2, 3 and 8) is classically described as being expressed in the nucleus, these proteins are also found in the cytosol. In this sense, several studies have shown that HDAC1 can also be expressed in the cytosol in different cell lines,³⁸⁻⁴⁰ and although its expression is mainly located in the nucleus, its expression is enhanced in the cytosol in pathological conditions.⁴¹ Further, it has been reported that the up-regulation of HDAC1 in ECs deacetylates nitric oxide synthase 3 (NOS₃), directly resulting in a decrease of endothelial nitric oxide production.⁴² HDAC overexpression in ECs in response to CKD sera is in concordance with previous evidence by other authors showing enhanced expression of these proteins in other cardio-renal pathologies.¹⁹⁻²² The protective effect of DF in this setting concord with its proved beneficial effect in other clinical entities associated with endothelial dysfunction.²⁷⁻²⁹

HDACs positively act on pro-inflammatory candidates, such as cytokines (IL-6, IL-12, TNF), chemokines (CCL2, CCL7 and CXCL) and other inflammatory mediators (MMP-9 and endothelin-1).^{43,44} In this regard, HDACs inhibitors show broad anti-inflammatory effects through different mechanisms. In our model of uraemic endothelium, both TSA and DF reduced ICAM-1 expression and vWF production. Moreover, there are many studies demonstrating the important role of HDACs both in innate and adaptive immunity. In particular, these enzymes seem to act on the expression of TLR target genes.⁴⁵ In this regard, we show in the present study that TLR4 expression is regulated by HDACs in ECs exposed to a uraemic milieu. In addition, the inhibition of ROS production by TSA and DF demonstrates that HDACs are also involved in the prooxidant endothelial response to CKD.

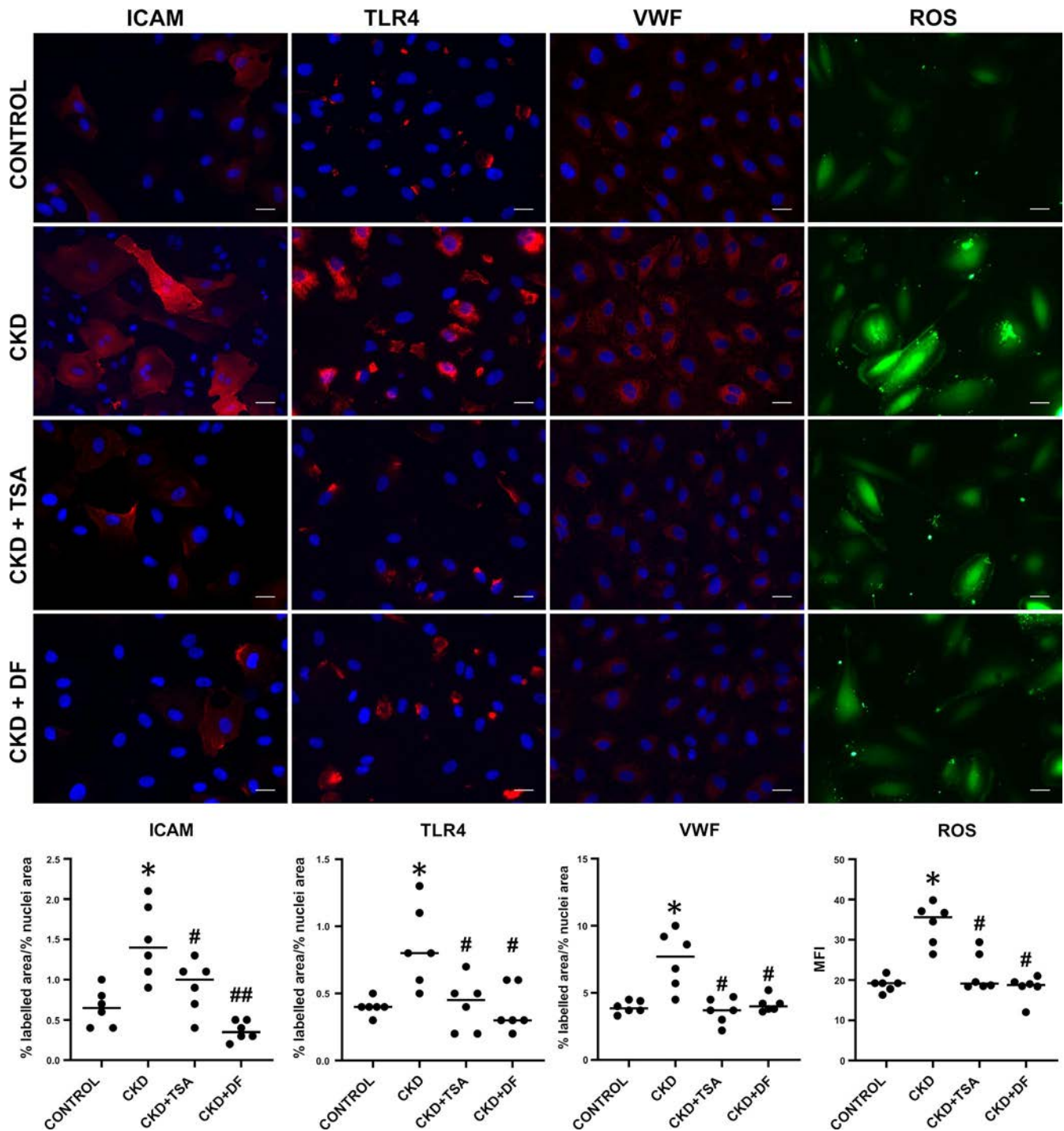
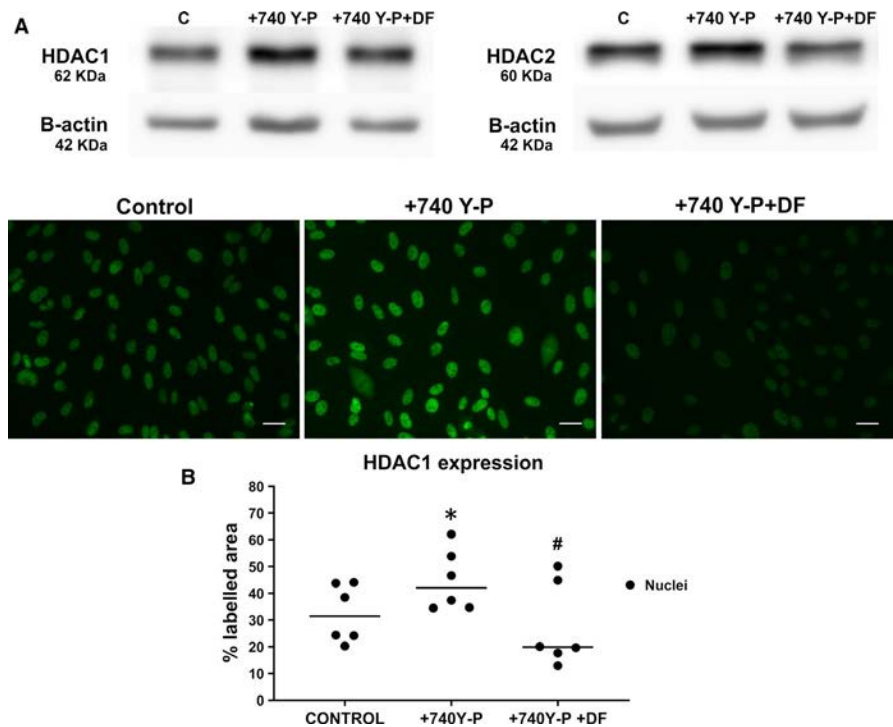


FIGURE 3 ICAM-1, TLR4, vWF and ROS increases in CKD are mediated through HDACs induction. Micrographs show enhanced expression of the adhesion receptor ICAM-1 (red), TLR4 (red), the adhesive protein vWF (red) and production of ROS (green) when endothelial cells were exposed to CKD patients' sera. The co-incubation of cells with CKD patients' sera and TSA (CKD + TSA, middle row) or defibrotide (CKD + DF, lower row) induced a decrease in the expression of the markers of endothelial damage markers evaluated. Cell nuclei are stained with DAPI (blue) (40× magnification). Scatterplots (with median) correspond to the quantification of the endothelial damage markers evaluated. All data correspond to relative expression compared to control levels (n = 6, being *P < .05 vs control and #P < .05 and ##P < .01 vs CKD, n = number of independent experiments, statistical analysis was performed with raw data using t test)

The pharmacological inhibition of HDACs is a new target for several disorders. These drugs have been approved for the treatment of some lymphomas, or epilepsy (valproic acid) and several others are in clinical trials. Further, these agents have shown its efficacy in

animal models of inflammatory diseases, attenuating the progression of renal fibrogenesis in obstructive nephropathy or reducing cyst formation in polycystic kidney disease.⁴⁶ This property has been successfully applied to ameliorate endothelial activation and vascular

FIGURE 4 Defibrotide acts as a PI3/AKT inhibitor to interact with HDACs. A, Immunoblot images show expression of HDAC1 (left) and HDAC2 (right) when endothelial cells were exposed to 740 Y-P in absence or presence of DF (100 μ g/mL). B, Micrographs show an increase in HDAC1 expression (green) in endothelial cells exposed to P740-Y-P (+P740-Y-P) and a decrease when DF was added (+740 Y-P + DF). Scatterplot (with median) represents the quantification of HDAC1 expression in the three situations (Control, +740 Y-P, +740 Y-P + DF) in terms of the labelled area ($n = 6$, being $*P < .05$ vs control and $\#P < .05$ vs CKD, $n =$ number of independent experiments, statistical analysis was performed with raw data using t test)



pathophysiology in sickle cell anaemia in transgenic mice. In this experimental animal model, and also in HUVECs,^{47,48} TSA significantly reduced VCAM-1 and tissue factor expression.⁴⁹ Although many of the underlying mechanisms and functions of HDACs in human cells are poorly understood and remain unclear, they appear to be promising targets in the modulation of endothelial dysfunction.

Once we demonstrated that DF is able to reduce HDACs expression and their downstream effects in the CKD-induced endothelial damage, we focused on the search of the signalling pathway potentially used by the drug to modulate these epigenetic regulators. There is evidence demonstrating that HDAC expression is regulated by the PI3K/AKT pathway.^{17,50} In addition, our group has previously

HDAC upregulation contributes to uremia endothelial dysfunction. Defibrotide protective effect

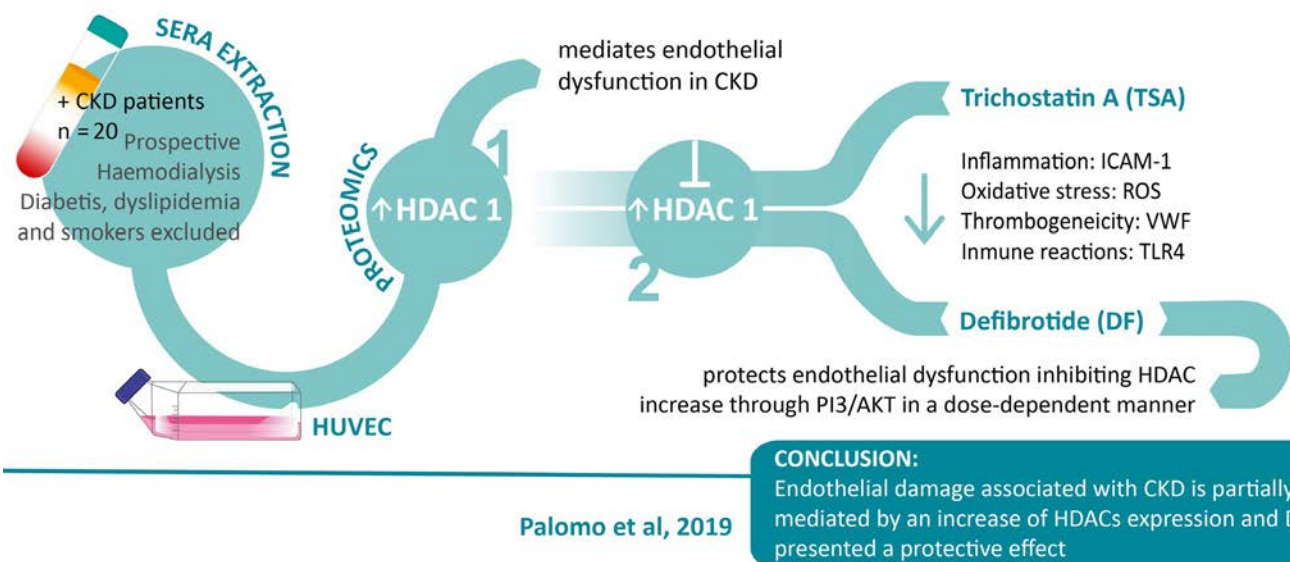


FIGURE 5 Visual abstract. A single, concise, pictorial and visual summary of the main findings of the present study in which we demonstrate that HDACs appear as key modulators of the CKD-induced endothelial dysfunction and that DF prevents endothelial dysfunction responses to the CKD insult likely through PI3K/AKT

demonstrated that DF inhibits the activation of PI3K/AKT.^{27,51} Both facts prompted us to hypothesize that DF was regulating HDACs through this pathway. To prove this hypothesis, ECs were exposed to a PI3K/AKT inducer to stimulate HDAC expression, and then, the effect of DF was explored. Our results indicate that DF could act as a PI3K/AKT pathway inhibitor to modulate HDACs expression. One of the limitations of our study is that we measured protein levels, but not HDACs activity or other HDACs not appearing in our proteomic approach. Another limitation of our study is that we used a pan-HDAC inhibitor rather than specific HDAC1 or 2 inhibitor, and its effects on other HDACs cannot be ruled out.

In conclusion, CKD is an example of a complex disease in which the phenotype arises from a combination of environmental and inheritable factors.⁵² Evidence suggests that the contribution of the uraemic milieu may be mediated via modifications of the epigenome. The findings of the present study revealed a role for HDACs as key modulators of the endothelial phenotype in response to the CKD insult. These enzymes seem to mediate, at least in part, the endothelial enhanced oxidative stress, the up-regulation of the innate immunity, and the pro-inflammatory and pro-thrombogenic responses. In addition, we provide strong evidence showing that DF may confer a protection to the endothelium from the uraemic insult acting as a potential HDAC modulator. Finally, DF seems to exert its endothelial protective effect by inhibiting HDAC up-regulation likely through PI3K/AKT signalling pathway.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Jazz Pharmaceuticals Plc (IST-16-10355 to MDR. and EC); German José Carreras Leukaemia Foundation (Grant 11R/2016 and 03R/2019 to MDR. and EC); Instituto de Salud Carlos III, Spanish Government (PIE15/00027 to MDR, DTS16/00133 to MDR and GE) and Generalitat de Catalunya (2017-SGR675 to G.E, CERCA Programme to MV, AC, GE, MDR.), and FIS PI19/00888 ISCIII (to MDR.). We would like to thank the Proteomics unit staff (CCIT, University of Barcelona) for their support in the proteomic assay performance and analysis, and to the Primary Hemostasis laboratory group for their technical support. We also acknowledge the collaboration of Dr Josep Maria Cruzado of Institut d'Hemodiàlisi Barcelona who collaborated in obtaining the blood samples, the staff of the Maternitat Hospital, in Barcelona, for providing the umbilical cords that made possible some of the current results and to Shook Studio for the visual abstract design.

CONFLICT OF INTEREST

MDR and MP declares conflict of interest with Jazz Pharmaceuticals plc/Gentium Inc in the form of speaker's fee for symposiums, and EC declares conflict of interest with Jazz Pharmaceuticals plc/Gentium Inc as consultant and in the form of speaker's fee for symposiums. All other authors have declared that no conflict of interest exists.

AUTHORS CONTRIBUTIONS

MP designed and conducted the experiments, analysed the results, designed the images and wrote the manuscript. MV selected the

patients, performed the images and reviewed the results and the manuscript. SM contributed to the design and the conducting of the experiments, acquired the data and analysed the results. ST and JMS contributed to the conduction of the experiments and the maintenance of cell cultures. ABM, EC, GE, and AC reviewed the results and the manuscript. MDR. designed and supervised the project and reviewed the results and the manuscript.

ORCID

Manel Vera  <https://orcid.org/0000-0001-9937-7235>

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

REFERENCES

- Levin A, Tonelli M, Bonventre J, et al. Global kidney health 2017 and beyond: a roadmap for closing gaps in care, research, and policy. *Lancet*. 2017;390(10105):1888-1917.
- Tonelli M, Wiebe N, Culleton B, et al. Chronic kidney disease and mortality risk: a systematic review. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(7):2034-2047.
- Anker SD, Gillespie IA, Eckardt KU, et al. Development and validation of cardiovascular risk scores for haemodialysis patients. *Int J Cardiol*. 2016;216:68-77.
- Fellström BC, Jardine AG, Schmieder RE, et al. Rosuvastatin and cardiovascular events in patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med*. 2009;360(14):1395-1407.
- Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration, Herrington W, Emberson J, et al. Impact of renal function on the effects of LDL cholesterol lowering with statin-based regimens: a meta-analysis of individual participant data from 28 randomised trials. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2016;4(10):829-839.
- Iseki K, Tokuyama K, Shiohira Y, et al. Olmesartan clinical trial in Okinawan patients under OKIDS (OCTOPUS) study: design and methods. *Clin Exp Nephrol*. 2009;13(2):145-151.
- Agarwal R, Sinha AD. Cardiovascular protection with antihypertensive drugs in dialysis patients. *Hypertension*. 2009;53(5):860-866.
- Stenvinkel P, Carrero JJ, Axelsson J, Lindholm B, Heimbürger O, Massy Z. Emerging biomarkers for evaluating cardiovascular risk in the chronic kidney disease patient: how do new pieces fit into the uremic puzzle? *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3(2):505-521.
- Malyszko J. Mechanism of endothelial dysfunction in chronic kidney disease. *Clin Chim Acta*. 2010;411(19-20):1412-1420.
- Caballo C, Palomo M, Cases A, et al. NFκB in the development of endothelial activation and damage in uremia: an in vitro approach. *PLoS ONE*. 2012;7(8):e43374.
- Martin-Rodriguez S, Caballo C, Gutierrez G, et al. TLR4 and NALP3 inflammasome in the development of endothelial dysfunction in uraemia. *Eur J Clin Invest*. 2015;45(2):160-169.
- Carbó C, Arderiu G, Escolar G, et al. Differential expression of proteins from cultured endothelial cells exposed to uremic versus normal serum. *Am J Kidney Dis*. 2008;51(4):603-612.
- Serradell M, Diaz-Ricart M, Cases A, Petriz J, Ordinas A, Escolar G. Uraemic medium accelerates proliferation but does not induce apoptosis of endothelial cells in culture. *Haematologica*. 2003;18(6):1079-1085.
- Serradell M, Diaz-Ricart M, Cases A, et al. Uremic medium causes expression, redistribution and shedding of adhesion molecules in cultured endothelial cells. *Haematologica*. 2002;87(10):1053-1061.

15. Serradell M, Diaz-Ricart M, Cases A, et al. Uremic medium disturbs the hemostatic balance of cultured human endothelial cells. *Thromb Haemost.* 2001;86(4):1099-1105.
16. Shakespear MR, Halili MA, Irvine KM, Fairlie DP, Sweet MJ. Histone deacetylases as regulators of inflammation and immunity. *Trends Immunol.* 2011;32(7):335-343.
17. Lee D-Y, Lee C-I, Lin T-E, et al. Role of histone deacetylases in transcription factor regulation and cell cycle modulation in endothelial cells in response to disturbed flow. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(6):1967-1972.
18. Zhou B, Margariti A, Zeng L, Xu Q. Role of histone deacetylases in vascular cell homeostasis and arteriosclerosis. *Cardiovasc Res.* 2011;90(3):413-420.
19. McKinsey TA. Therapeutic potential for HDAC inhibitors in the heart. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2012;52(1):303-319.
20. Cardinale JP, Sriramula S, Pariaut R, et al. HDAC inhibition attenuates inflammatory, hypertrophic, and hypertensive responses in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2010;56(3):437-444.
21. Christensen D, Dahllöf M, Lundh M, et al. Histone deacetylase (HDAC) inhibition as a novel treatment for diabetes mellitus. *Mol Med.* 2011;17(5-6):378-390.
22. Advani A, Huang Q, Thai K, et al. Long-term administration of the histone deacetylase inhibitor vorinostat attenuates renal injury in experimental diabetes through an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism. *Am J Pathol.* 2011;178(5):2205-2214.
23. Martens CR, Edwards DG. Peripheral vascular dysfunction in chronic kidney disease. *Cardiol Res Pract.* 2011;2011:1-9.
24. Vera M, Torramade-Moix S, Martin-Rodriguez S, et al. Antioxidant and anti-inflammatory strategies based on the potentiation of glutathione peroxidase activity prevent endothelial dysfunction in chronic kidney disease. *Cell Physiol Biochem.* 2018;51(3):1287-1300.
25. Pescador R, Capuzzi L, Mantovani M, et al. Defibrotide: properties and clinical use of an old/new drug. *Vascul Pharmacol.* 2013;59(1-2):1-10.
26. Falanga A, Vignoli A, Marchetti M, Barbui T. Defibrotide reduces procoagulant activity and increases fibrinolytic properties of endothelial cells. *Leukemia.* 2003;17:1636-1642.
27. Palomo M, Diaz-Ricart M, Rovira M, Escolar G, Carreras E. Defibrotide prevents the activation of macrovascular and microvascular endothelia caused by soluble factors released to blood by autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011;17(4):497-506.
28. Richardson PG, Carreras E, Iacobelli M, Nejadnik B. The use of defibrotide in blood and marrow transplantation. *Blood Adv.* 2018;2(12):1495-1509.
29. Palomo M, Mir E, Rovira M, Escolar G, Carreras E, Diaz-Ricart M. What is going on between defibrotide and endothelial cells? Snapshots reveal the hot spots of their romance. *Blood.* 2016;127(13):1719-1727.
30. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest.* 1973;52(11):2745-2756.
31. Amaral A, Castillo J, Maria Estanyol J, et al. Human sperm tail proteome suggests new endogenous metabolic pathways. *Mol Cell Proteomics.* 2013;12(2):330-342.
32. Nesterenko MV, Tilley M, Upton SJ. A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J Biochem Biophys Methods.* 1994;28(3):239-242.
33. Barrachina F, Jodar M, Delgado-Dueñas D, et al. Novel and conventional approaches for the analysis of quantitative proteomic data are complementary towards the identification of seminal plasma alterations in infertile patients. *Mol Cell Proteomics.* 2019;18(suppl 1):S77-S90.
34. Sepil I, Hopkins BR, Dean R, et al. Quantitative proteomics identification of seminal fluid proteins in male *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Proteomics.* 2019;18(suppl 1):S46-S58.
35. Matouk CC, Marsden PA. Epigenetic regulation of vascular endothelial gene expression. *Circ Res.* 2008;102(8):873-887.
36. Saha A, Wittmeyer J, Cairns BR. Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(6):437-447.
37. Gray SG, Ekström TJ. The human histone deacetylase family. *Exp Cell Res.* 2001;262(2):75-83.
38. Demyanenko S, Neginskaya M, Berezhnaya E. Expression of class I histone deacetylases in ipsilateral and contralateral hemispheres after the focal photothrombotic infarction in the mouse brain. *Transl Stroke Res.* 2018;9(5):471-483.
39. Zhu Y, Vidaurre OG, Adula KP, et al. Subcellular distribution of HDAC1 in neurotoxic conditions is dependent on serine phosphorylation. *J Neurosci.* 2017;37(31):7547-7559.
40. Hanigan TW, Taha TY, Aboukhatwa SM, et al. Scaffold dependent histone deacetylase (HDAC) inhibitor induced re-equilibration of the subcellular localization and post-translational modification state of class I HDACs. *PLoS ONE.* 2017;12(10):e0186620.
41. Kim JY, Casaccia P. HDAC1 in axonal degeneration. *Cell Cycle.* 2010;9(18):3704-3708.
42. Hyndman K, Ho DH, Sega MF, Pollock JS. Histone deacetylase 1 reduces NO production in endothelial cells via lysine deacetylation of NO synthase 3. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2014;307(19):803-809.
43. Roger T, Lugrin J, Le Roy D, et al. Histone deacetylase inhibitors impair innate immune responses to Toll-like receptor agonists and to infection. *Blood.* 2011;117(4):1205-1217.
44. Bode KA, Schroder K, Hume DA, et al. Histone deacetylase inhibitors decrease Toll-like receptor-mediated activation of proinflammatory gene expression by impairing transcription factor recruitment. *Immunology.* 2007;122(4):596-606.
45. Halili MA, Andrews MR, Labzin LI, et al. Differential effects of selective HDAC inhibitors on macrophage inflammatory responses to the Toll-like receptor 4 agonist LPS. *J Leukoc Biol.* 2010;87(6):1103-1114.
46. New M, Olzscha H, La Thangue NB. HDAC inhibitor-based therapies: can we interpret the code? *Mol Oncol.* 2012;6(6):637-656.
47. Hebbel RP. Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Adhesive interactions of sickle erythrocytes with endothelium. *J Clin Invest.* 1997;99(11):2561-2564.
48. Inoue K, Kobayashi M, Yano K, et al. Histone deacetylase inhibitor reduces monocyte adhesion to endothelium through the suppression of vascular cell adhesion molecule-1 expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(12):2652-2659.
49. Hebbel RP, Vercellotti GM, Pace BS, et al. The HDAC inhibitors trichostatin A and suberoylanilide hydroxamic acid exhibit multiple modalities of benefit for the vascular pathobiology of sickle transgenic mice. *Blood.* 2010;115(12):2483-2490.
50. Zampetaki A, Zeng L, Margariti A, et al. Histone deacetylase 3 is critical in endothelial survival and atherosclerosis development in response to disturbed flow. *Circulation.* 2010;121(1):132-142.
51. Koehl GE, Geissler EK, Iacobelli M, et al. Defibrotide: an endothelium protecting and stabilizing drug, has an anti-angiogenic potential in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther.* 2007;6(5):686-690.
52. Stenvinkel P, Ekström TJ. Epigenetics and the uremic phenotype: a matter of balance. *Contrib Nephrol.* 2008;161:55-62.

How to cite this article: Palomo M, Vera M, Martin S, et al. Up-regulation of HDACs, a harbinger of uremic endothelial dysfunction, is prevented by defibrotide. *J Cell Mol Med.* 2019;00:1-11. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14865>

6. DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

El planteamiento que ha llevado a realizar esta TD es el de intentar responder a la pregunta de si es posible modificar la DE presente en la uremia mediante nuevas estrategias de modulación farmacológica. El objetivo era buscar opciones y dianas terapéuticas distintas a las que disponemos en la actualidad, ya que éstas no han demostrado un beneficio en reducir la elevada morbimortalidad CV de los enfermos con ERCT.

Como ejemplo de ineficacia terapéutica cabe destacar el grupo de las estatinas o los IECA/ARAII que, si bien han demostrado tener efectos beneficiosos en otros subgrupos de elevado riesgo CV, como los pacientes diabéticos o con historia de cardiopatía isquémica (21–23), no lo han demostrado en los pacientes en diálisis. Los resultados de uno de los últimos ensayos publicados - estudio SHARP- (260) reafirma esta idea de ineficacia: la combinación de simvastatina+ezetimibe no redujo el riesgo de los eventos CV en el subgrupo de pacientes del estudio que estaban en HD, a diferencia de la reducción del 17% para el conjunto de pacientes con ERC avanzada o ERCT. De aquí que se justifique que la mayoría de las guías (KDIGO; American Heart Association, National Lipid Association o NICE) no recomienden el inicio de estatinas en aquellos pacientes que estén en diálisis. Ello refuerza la idea de la complejidad de los mecanismos implicados en la DE en la uremia y, consiguientemente, de un riesgo CV residual muy elevado y difícilmente reducible.

Es probable que el desequilibrio entre el OS y los mecanismos antioxidantes, junto con la inflamación crónica, la activación de la inmunidad innata y los cambios epigenéticos presentes en la uremia, desempeñen un papel crucial en el desarrollo y perpetuación de la DE. El daño endotelial constituye el eslabón inicial para el desarrollo de la aterosclerosis acelerada, arteriosclerosis y afectación microvascular de los pacientes con ERCT en diálisis crónica y por lo tanto el motivo de su elevado riesgo CV (43,261–263).

Con estas premisas, la posible modulación de la inflamación y el OS, así como una estrategia de protección de la CE podrían ser dianas prometedoras para prevenir la DE presente en este contexto.

Los resultados presentados en esta TD, obtenidos a partir del análisis del efecto de distintos compuestos sobre un modelo *in vitro* de CE humanas incubadas en presencia de medio urémico, permiten ser optimistas y dar una respuesta afirmativa a la pregunta formulada.

En el primer estudio *Antioxidant and anti-inflammatory strategies based on the potentiation of glutathione peroxidase activity prevent endothelial dysfunction in chronic kidney disease* se evaluó el impacto que tiene sobre la DE la modificación del entorno prooxidante/proinflamatorio que caracteriza el medio urémico utilizando muestras de suero procedente de pacientes con ERCT en programa de DP. En concreto, fueron evaluados los cambios que suceden tras la exposición de las CE a distintos flavonoides -antioxidantes no enzimáticos- (177,232,234,235), un mimético de la GPX (ebselen) (242–244), dos miméticos de la SOD (EUK134, EUK118) (245–247), que son los sistemas antioxidantes constitutivos más importantes del organismo (148,174,176,177,179), y NAC (231,236–241), un fármaco usado en la práctica clínica habitual con propiedades antioxidantes.

El segundo estudio *Upregulation of HDAC, a harbinger of uremic endothelial dysfunction, is prevented by defibrotide* planteó un enfoque distinto al explorar la posibilidad de mejorar la DE inducida por el entorno urémico, mediante un agente protector endotelial. En este caso utilizando muestras de suero procedente de pacientes con ERCT en HD y tomando como referencia los cambios identificados en la expresión proteómica de las CE en el entorno urémico. En este estudio, se evaluó el efecto de defibrotide, un fármaco con propiedades protectoras del endotelio que ha demostrado tener su papel en otras entidades nosológicas donde el endotelio juega un papel fundamental, como la enfermedad venooclusiva hepática, una complicación muy grave que se presenta en el trasplante autólogo de médula ósea, en la enfermedad del

injerto contra el huésped (248–254) y, previamente, en la enfermedad arterial y venosa periférica.

Cabe destacar que, con el objetivo de evitar la interacción de otras situaciones o comorbilidades asociadas a la DE *per se*, en el momento de interpretar el efecto del suero urémico sobre el endotelio vascular, fue realizada una selección muy cuidadosa de los pacientes, tanto de DP como de HD, excluyendo los pacientes diabéticos, con dislipemia severa, HTA mal controlada, enfermedad cardiovascular conocida o historia de tabaquismo.

El estado urémico se asocia a disfunción endotelial

Como punto de partida, los dos trabajos presentados en esta TD, han permitido corroborar la presencia de una DE inducida por la exposición de las CE al medio urémico y que se manifiesta asociada a un fenotipo proinflamatorio (medido por una mayor expresión de ICAM-1), protrombogénico (determinado por una mayor producción de FvW), un aumento del OS (evaluado por una mayor producción de ROS), así como una activación de la respuesta de la inmunidad innata (demostrado por el aumento de la expresión de los receptores “Toll-Like”, en concreto de TLR4). Estos resultados están en línea con los obtenidos en otros trabajos previos de nuestro grupo y de otros autores (215,222,225–228,240,241) y permite reforzar la idea de interrelación entre los distintos mecanismos implicados en la DE.

Modulación farmacológica del estado oxidativo de la uremia

En el primer estudio, y partiendo de la evidencia generada previamente con trabajos de nuestro grupo (215,222,225), se planteó el objetivo de investigar el posible efecto protector de diferentes compuestos con propiedades antioxidantes y, por ende, su repercusión sobre la inflamación al estar ambos fenómenos estrechamente relacionados (43). En concreto, fue explorado el efecto del uso de tres flavonoides: apigenina (una flavona); genisteina (una isoflavona) y quercetina (un flavonol), EUK134 y EUK118 (ambos miméticos de

la SOD), ebselen (mimético de la GPX) y NAC (un fármaco con actividad antioxidante debido a la capacidad de restaurar los niveles de GSH).

La elección de estos compuestos se justifica por la importancia que tienen los sistemas antioxidantes como mecanismo de defensa. En la ERC existe un marcado desequilibrio entre la generación de ROS y los sistemas antioxidantes endógenos, lo que se traduce en una situación de OS marcado (229,264–266). Como ya se ha comentado en esta TD, existe una interrelación directa entre la inflamación y el SO, lo que se traduce en que la acumulación de ROS da como resultado la activación de vías de señalización intracelular implicadas en respuestas inflamatorias (266) que perpetúan y amplifican la DE en la ERC. Además, estudios previos de nuestro grupo identificaron un aumento en la expresión de enzimas antioxidantes en respuesta al medio urémico, posiblemente como respuesta de defensa de las mismas células (228).

Las principales enzimas antioxidantes intracelulares incluyen la GPX y la SOD. Una de las líneas de investigación en los últimos años ha sido la búsqueda de compuestos sintéticos que simularan el funcionamiento de estas enzimas. Varias publicaciones han demostrado su potencial en el tratamiento, por ejemplo, del accidente cerebral isquémico agudo o la DM (242–247). De estos compuestos el más estudiado ha sido ebselen, un compuesto que contiene selenio en su estructura, que cataliza la reducción de ROS de una manera similar a GPX, pero que además también reacciona con el sistema de TRX y actúa como un mimético de la reductasa del ácido deshidroascórbico, posee capacidad para inhibir la NOX, la NOS y la lipooxigenasa, entre otras varias enzimas (242–244). Los compuestos EUK118 y EUK134 muestran una actividad mimética de la enzima SOD y, en menor grado, de la CAT (245–247).

Desde la década de los 90 se ha venido proponiendo de forma creciente el uso de los flavonoides, presentes en frutas y verduras, por su potencial efecto antioxidante, antiinflamatorio y antitumoral (267,268). Estos compuestos (que presentan una importante heterogeneidad química) actuarían como antioxidantes hidrosolubles. Existen varias publicaciones que demuestran beneficios cardiovasculares con el uso flavonoides (ya sea aportando

suplementos alimenticios o potenciando una dieta rica en ellos), tanto en pacientes en HD (232,235), como en pacientes no renales con factores de riesgo CV (234). Sin embargo, existen varias limitaciones para ensayar estos compuestos como posibles agentes farmacológicos: el gran número de flavonoides identificados, sus diferentes estructuras químicas y las altas dosis requeridas, que son difíciles de lograr con una dieta regular.

La NAC, un fármaco con amplia experiencia en su uso y de bajo coste, ha demostrado tener un impacto positivo en la reducción del OS y en la reducción del riesgo cardiovascular en un pequeño grupo de pacientes en diálisis (238), así como una mejoría de la DE en la ERC (239-241). El principal mecanismo de acción de la NAC sería el de proporcionar los precursores de la cisteína, que es el sustrato de la GPX para la regeneración del GSH y además también posee una actividad “scavenger” directa por su capacidad de neutralizar distintos ROS a partir del grupo sulfidrilo (236,237).

De forma similar a lo publicado previamente, nuestro estudio no ha obtenido una respuesta uniforme con los tres flavonoides testados. La quercetina fue el flavanoide que impidió la producción de ROS de forma más marcada y el único capaz de reducir también la expresión del receptor de adhesión ICAM-1 y la activación de las vías relacionadas con la inflamación p38MAPK y del factor de transcripción NFκB. Aunque la isoflavona genisteína redujo la generación de ROS y la fosforilación de p38MAPK, no logró inhibir la activación del factor de transcripción NFκB, ni la expresión de ICAM-1 en las CE expuestas a medio urémico. La flavona apigenina no mostró ningún beneficio antioxidante en las CE expuestas a las condiciones analizadas.

En contraste con nuestros resultados, otras publicaciones, han observado efectos antioxidantes y antiinflamatorios beneficiosos con el uso de genisteína y apigenina en diferentes situaciones. Estos efectos incluyen la prevención de la oxidación de las partículas LDL, la atenuación de la producción de ROS, la inhibición de la vía de señalización del factor de transcripción NFκB y la expresión de moléculas de adhesión (268–271). Las discrepancias con los resultados de nuestro estudio sugieren que el efecto de estos compuestos

puede depender de varios factores, incluida la dosis o el tipo de estímulo, aunque también puede contribuir la heterogeneidad de las líneas de CE utilizadas en los estudios *in vitro*.

Respecto al uso de los miméticos de las enzimas antioxidantes los resultados presentados en la presente TD demuestran que estos compuestos exhiben no solo una actividad de eliminación de radicales libres (función “scavenger”), sino que también poseen importantes efectos antiinflamatorios, tal como lo demuestra la inhibición significativa de la activación de las vías de señalización p38MAPK y del factor de transcripción NFκB, junto con una reducción de la expresión de ICAM-1 en la superficie de la CE cuando las células fueron expuestas a la condición urémica.

Esta TD también pone en manifiesto que no todos los miméticos lograron el mismo grado de intensidad de respuesta. La mayor respuesta fue obtenida en respuesta a ebselen, mimético de la GPX, que es la principal vía antioxidante celular, frente a los resultados que se obtienen con los miméticos de la SOD, EUK118 y EUK134.

Son varios los artículos publicados sobre ebselen y sus posibles usos clínicos, tal como se ha comentado a lo largo de esta TD. Además de ser un potente mimético de la GPX, ebselen posee otros mecanismos de acción que reducen el OS, como ya se ha comentado, lo que podría explicar su mayor impacto sobre la modulación de DE en la uremia. Hay evidencias publicadas que muestran resultados positivos, en varias situaciones clínicas (demencia, artritis reumatoide, diabetes, lesiones cerebrales de origen isquémico). Los efectos reportados parecen estar favorecidos por una adecuada farmacocinética, con una rápida absorción después de la administración oral. Sin embargo, una de las principales limitaciones de su uso es la elevada toxicidad, fundamentalmente a nivel mitocondrial, circunstancia que ha limitado hasta la fecha su indicación terapéutica, mientras se buscan nuevas formulaciones con menor toxicidad (242).

La NAC, un fármaco conocido mayoritariamente por sus propiedades como agente mucolítico, se ha posicionado en los últimos años como un importante

antioxidante. El potencial terapéutico de la NAC es amplio y son varias las líneas de investigación abiertas, destacando por ejemplo su uso como agente bioprotector contra el OS y lesión isquémica, y como tratamiento para ciertos trastornos mentales (231,238–241). Se da la paradoja que la respuesta antioxidante que se alcanza con la administración oral de NAC es superior a la que se logra tras la administración directa de GSH, aun siendo éste el antioxidante intracelular más importante (237,241). El mecanismo por el que NAC ejercería sus efectos antioxidantes incluyen la regeneración de GSH que es el sustrato sobre el que actúa la GPX, a la vez que el principal antioxidante soluble de los sistemas biológicos, y la capacidad directa que posee NAC de neutralizar los ROS al interactuar con su grupo sulfhidrilo (237).

Los resultados de esta TD confirman el efecto antioxidante de la NAC y su acción antiinflamatoria con una reducción de la fosforilación de p38MAPK y de la activación del factor de transcripción NFκB, así como de la expresión de ICAM-1 en la superficie celular.

La combinación de ebselen y NAC: la mejor opción

Los mejores resultados en cuanto a potencia antioxidante y antiinflamatoria fueron observados cuando las CE incubadas en medio urémico eran pretratadas con la combinación de ebselen y NAC. Estos resultados serían explicables por la acción e implicación de ambos compuestos sobre la vía de la GPX y, además, probablemente por los mecanismos de acción sinérgicos que presenta ebselen y NAC, descritos con anterioridad, todos ellos con un impacto directo sobre la regulación del OS.

De los resultados obtenidos se deduce que la potenciación de esta vía antioxidante podría ser una estrategia prometedora para prevenir la DE inducida por la uremia. Son varios los estudios que han demostrado una disminución en los niveles plasmáticos de GSH o GPX en pacientes con ERC (229,266,272,273), aunque también se ha descrito un aumento de la expresión de GPX en el proteoma de la CE urémica (228), lo que podría ser interpretado como un mecanismo compensatorio, pero que resultaría insuficiente para

contrarrestar el ambiente excesivamente prooxidante en el que se encuentran la CE.

Por otra parte, existen evidencias que muestran una disminución de la relación GSH / GSSG en las CE expuestas a medio urémico (241). Los resultados de la presente TD, muestran un ligero aumento de GSH en las CE urémicas, hecho que podría ser una respuesta compensatoria frente al estado prooxidante del medio urémico. Sin embargo, y de acuerdo con el estudio anterior y otros, la DE fue mejorada tanto por NAC (240,241), como por ebselen. Además, el efecto combinado de ebselen y NAC sobre los niveles de GSH fue aditivo en las CE, lo que sugiere un efecto beneficioso al potenciar la vía de la GPX sobre la DE inducida por la ERC.

En conclusión, los resultados del primer estudio indican que la DE en la uremia se puede minimizar a través de una estrategia antioxidante y antiinflamatoria. Si bien el beneficio de los flavonoides no está claro y puede ser controvertido debido a las concentraciones necesarias para conseguir un efecto beneficioso, los cambios observados con los miméticos de los enzimas antioxidantes (especialmente con ebselen) y NAC indican que estos compuestos pueden constituir estrategias terapéuticas prometedoras para brindar protección endotelial frente al insulto urémico. En concreto, la potenciación de la vía GPX, ya sea mediante un mimético de la actividad de la enzima (ebselen) y/o la posibilidad de promover la restauración del GSH como sucede con NAC, demostró ser la estrategia más efectiva para proteger el endotelio del efecto perjudicial del entorno urémico, tal como lo demuestra la reducción de la expresión de ICAM-1 y de la producción de ROS y la menor activación de las vías dependientes de p38MAPK y de NFκB.

El medio urémico induce cambios epigenéticos en las células endoteliales

El segundo estudio de esta TD planteó un enfoque distinto para conocer el impacto del medio urémico sobre las CE e identificar posibles nuevas dianas terapéuticas sobre las que poder actuar.

Uno de los mecanismos de adaptación que poseen las células cuando se encuentran en un medio que les resulta hostil es modificar la regulación de la expresión de sus genes. Son varias las evidencias disponibles que demuestran que el medio urémico induce cambios en la expresión génica o lo que es lo mismo, el medio urémico resulta ser un potente inductor de cambios epigenéticos (274–276).

Los mecanismos más implicados en dicha regulación genética incluyen la metilación del DNA, la modificación de las histonas (mediante acetilación, desacetilación, metilación o fosforilación) y la acción de los microRNA. Aunque los cambios epigenéticos no suponen ninguna modificación de la secuencia del DNA (277,278), en la práctica se traduciría en un perfil proteómico distinto, lo que podría llevar asociados cambios funcionales a nivel celular. Trabajos previos publicados por nuestro grupo ya demostraron una expresión diferenciada de proteínas en las CE expuestas al medio urémico en comparación a CE expuestas a controles sanos (228).

A diferencia del fenotipo de la CE en la uremia, caracterizado ampliamente, se dispone de poca información de los posibles mecanismos a través de los cuales el medio urémico podría ejercer su impacto sobre la CE y su epigenoma.

El desarrollo de esta TD ha permitido demostrar, mediante análisis proteómico la sobreexpresión de un número significativo de proteínas en CE en respuesta al medio urémico. De estas proteínas, la expresión de al menos 11 fue normalizada cuando el DF, un agente protector endotelial en otras situaciones clínicas, estaba presente en el medio.

De las proteínas sobreexpresadas destacamos, debido a su papel reconocido en la regulación de la expresión génica a nivel nuclear, la HDAC1 y la HDAC2. Ambas proteínas tienen un papel clave en la regulación epigenética, ya que tienen como función principal participar en la eliminación de los grupos acetilo de los residuos de lisina en las histonas, modificando así su afinidad por las cadenas de ADN y, como consecuencia, modificando la transcripción de las secuencias de las cadenas de ADN. La sobreexpresión de HDAC1 y HDAC2 y el efecto modulador ejercido por el DF también fue corroborado mediante análisis por transferencia proteica e inmunofluorescencia. Los resultados que se presentan en esta TD estarían en línea con los de otros autores que encuentran un aumento de la expresión de HDAC en otras patologías del ámbito CV (279–282).

Las otras proteínas sobreexpresadas en respuesta al medio urémico y normalizadas por el DF fueron: Long-chain-fatty-acid- CoA ligase 1, Protein arginine N-methyltransferase 5, CCAAT/enhancer-binding protein zeta, Dynactin subunit 4, Eukaryotic translation initiation factor 2, Engulfment and cell motility protein 1, Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP5, Far upstream element-binding protein 3, Guanylate-binding protein 4 cuyas funciones se detallan en la tabla 2 del segundo artículo. El papel de estas proteínas será motivo de futuras investigaciones.

Papel de HDAC1 y HDAC2 en la disfunción endotelial de la uremia

Estas dos enzimas, junto HDAC3 y HDAC8, pertenecen a la familia de HDAC de clase I, también conocidas como HDAC “clásicas”, y que se caracterizan porque su actividad puede ser inhibida por tricostatina A (TSA) (283). Inicialmente se describieron como expresadas únicamente en el núcleo celular, pero posteriormente se pudo comprobar que tenían una expresión más ubicua y que algunas de estas proteínas también se encontraban expresadas en el citoplasma de distintas líneas celulares (284–287).

En concreto, y reforzando el hallazgo de la expresión de HDAC1 en el citoplasma de las CE expuestas al medio urémico descrito en esta TD,

remarcamos evidencias previas que mostraron que la sobreexpresión de la HDAC1 citoplasmática reducía la producción de NO mediante la desacetilación de la NOS tipo 3 (288). La función principal de las HDAC es la regulación de la transcripción genética, mediante la modificación de histonas y de la estructura de la cromatina, variando así la accesibilidad de los factores de transcripción al ADN. Pero también están implicadas en el control de cambios postransduccionales, modulando reacciones de fosforilación y defosforilación o de acetilación y deacetilación de proteínas distintas a las histonas, tanto a nivel nuclear como citoplasmático. Ello explica que, entre otras misiones, están involucradas en la proliferación y la supervivencia celular (283). En este contexto resulta interesante remarcar la capacidad de modulación sobre el factor de transcripción NFκB y otros factores de transcripción, así como de otros mediadores inflamatorios, como son las citocinas (IL-6, IL-12, TNF), las quimiocinas (CCL2, CCL7 y CXCL) y otros mediadores inflamatorios (MMP-9 y endotelina-1) (289–291).

Defibrotide modula la expresión de HDAC1 y HDAC2

En esta TD se ha podido demostrar que DF, un fármaco protector del endotelio vascular con propiedades profibrinolíticas, antitrombóticas y antiinflamatorias (239,240), también tiene un efecto modulador de la DE en la uremia. Esta capacidad de modulación del fármaco estaría, en parte, explicada por su capacidad de regular la sobreexpresión de HDAC1 y HDAC2.

Los resultados de esta TD han demostrado que la regulación de la expresión de HDAC1 mediante DF mejora el fenotipo inflamatorio, la producción de ROS y la trombogenicidad de las CE expuestas al medio urémico. Por otro lado, en consonancia con lo ya publicado sobre el rol de HDAC en la regulación de la inmunidad innata (292), esta TD ha evidenciado que la expresión de los receptores TLR4 está regulada al alza en las CE expuestas al suero urémico, a través, en parte, de la sobreexpresión de HDAC1, que hemos podido demostrar, disminuye en presencia de DF.

Esta TD también ha querido incidir sobre el posible mecanismo implicado en la regulación de la expresión de HDAC por parte de DF. Partimos de evidencias previas en las que se constata que la expresión de HDAC está regulada por la vía de señalización de la fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K/AKT) (293,294) y de resultados publicados que demuestran que DF inhibe la activación de AKT(254,255). En este sentido, los resultados obtenidos demostraron que la activación química de la PI3K/AKT en CE, por el compuesto 740 YP fue inhibida de manera dosis-dependiente con la exposición de las CE al DF. Esta aproximación experimental, permitió demostrar que el DF actúa sobre la vía de señalización PI3K/AKT y que probablemente, sea la vía por la que el DF modula la expresión de HDAC. Ello explicaría, su capacidad de incidir sobre los cambios epigenéticos asociados en la DE asociada a la ERC y ejercer parte de sus efectos como protector endotelial en este contexto.

La inhibición farmacológica de HDAC, una posible alternativa terapéutica

La inhibición farmacológica de HDAC es una estrategia que ya ha sido utilizada para desarrollar fármacos con diferentes objetivos y funciones. Un ejemplo de ello son algunos fármacos, ya comercializados en el área de la oncología, debido a su efecto antiproliferativo, o en el campo de la neurología, como antiepilépticos, como en el caso del ácido valproico. Otras áreas de interés en nefrología, incluyen el desarrollo de compuestos con capacidad de atenuación de la progresión de la fibrogénesis renal en la uropatía obstructiva o para reducir la formación de quistes en la enfermedad poliquística renal (295). A pesar de todas estas indicaciones, existe una creciente evidencia que muestra que los inhibidores de HDAC tienen otros efectos beneficiosos cuando se usan como agentes antiinflamatorios. Esta propiedad se ha aplicado con éxito para mejorar la activación endotelial y la fisiopatología vascular en la anemia de células falciformes en ratones transgénicos. En este modelo experimental animal y también en modelos celulares utilizando HUVECs (296,297), el inhibidor de HDAC, TSA, redujo significativamente la expresión de VCAM-1 y del FT (298). En la uremia la expresión del FT se encuentra aumentada y se asocia a un fenotipo protrombótico, por lo que su disminución podría conferir un

beneficio CV. Aunque muchos de los mecanismos y funciones subyacentes de las HDAC en las células humanas son poco conocidos y no están claros, parecen ser objetivos prometedores en la modulación de la DE.

Esta TD ha permitido demostrar, que la administración del DF podría ser una alternativa terapéutica válida para modular la DE presente en la ERC al inhibir parcialmente la expresión de HDAC, probablemente mediante la regulación de la vía PI3K/AKT, y confiriendo una protección al endotelio frente a la exposición crónica al medio urémico.

Es posible un nuevo enfoque para la modulación farmacológica de la disfunción endotelial en la ERC

Podemos afirmar que la DE presente en la ERC es un ejemplo de complicación patológica compleja en la que el fenotipo proinflamatorio, protrombogénico y prooxidante surge como consecuencia de la interacción del medio urémico sobre los distintos sistemas biológicos a nivel celular, así como también de los cambios epigenéticos que éste induce.

Esta complejidad explica la dificultad de encontrar una estrategia farmacológica que resulte eficaz para tratar la elevada morbimortalidad cardiovascular presente en la ERC y en la que subyace una DE grave.

Esta TD ha permitido demostrar, en un modelo *in vitro* de DE, que es posible mejorar el daño endotelial presente en la uremia mediante una estrategia de modulación farmacológica antioxidante – antiinflamatoria, especialmente mediante el uso de potenciadores de la GPX o mediante un agente protector endotelial como el DF, cuyos efectos parecen mediados al menos en parte, por la modulación de los cambios epigenéticos inducidos por el medio urémico.

Limitaciones

Las principales limitaciones de los estudios incluidos en esta TD son, por un lado, que ambos son aproximaciones *in vitro* utilizando un modelo celular y por

otro lado, que las concentraciones de los distintos compuestos farmacológicos utilizadas en los experimentos fueron extrapoladas de estudios de viabilidad celular, propios o reportados en la literatura.

Los resultados aquí presentados deben ser entendidos como una prueba de concepto sobre la posibilidad de nuevas estrategias terapéuticas para la prevención y el tratamiento de la DE relacionada con la ERC y, por lo tanto, como una estrategia prometedora para reducir la incidencia de eventos CV en esta población de alto riesgo.

Los resultados de este modelo *in vitro* deberían confirmarse en estudios *in vivo* que permitieran establecer la dosis equivalentes necesarias para garantizar una correcta biodisponibilidad, seguridad y eficacia de los compuestos evaluados para que en un futuro se pueda ofertar un nuevo enfoque farmacológico para mejorar la DE en la ERC avanzada o ERCT y potencialmente reducir el riesgo CV.

7. CONCLUSIONES

7.CONCLUSIONES

De los resultados expuestos en la presente TD, obtenidos a partir de un modelo *in vitro* de CE expuestas al medio urémico, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Las células endoteliales expuestas al medio urémico expresan un fenotipo proinflamatorio, prooxidante, protrombogénico, con un aumento en la expresión de elementos que participan en la inmunidad innata.
2. La potenciación de la vía de la glutatión peroxidasa, mediante N-acetilcisteína y ebselen por separado, o en combinación, es la estrategia antioxidante evaluada que logra los mejores resultados para prevenir la disfunción endotelial inducida por el medio urémico, reduciendo del fenotipo proinflamatorio, la producción de ROS, así como la activación del factor de transcripción NFκB.
3. Las células endoteliales expuestas al entorno urémico expresan cambios en su proteoma que afectan elementos que intervienen en la regulación epigenética, como indica la sobreexpresión de HDAC1 y HDAC2.
4. La sobreexpresión de HDAC1 se observa tanto en el núcleo celular como en el citoplasma de las CE urémicas, por lo que sus efectos podrían ir más allá de la modulación de la cromatina.
5. Las proteínas HDAC1 y HDAC2, juegan un papel relevante en el desarrollo de daño endotelial en la uremia, dado que la inhibición de su sobreexpresión atenúa este efecto deletéreo.

6. El defibrotide muestra un efecto protector sobre la disfunción endotelial presente en la uremia, efecto que parece mediado, en parte, por la capacidad de reducir la sobreexpresión de HDAC1 y HDAC2.
7. La inhibición de la vía de señalización PI3K/AKT es un posible mecanismo de acción por el que defibrotide modula la sobreexpresión de HDAC1 y HDAC2.
8. La potenciación farmacológica de la vía de la glutatión peroxidasa mediante la utilización de N-acetilcisteína y/o ebselen, así como el efecto protector endotelial del defibrotide, son, en nuestro modelo *in vitro*, estrategias efectivas para la prevención de la disfunción endotelial en la uremia. Estos resultados, abren un nuevo abanico de posibles dianas terapéuticas a explorar en el futuro con la finalidad de reducir el daño endotelial y, como consecuencia, la morbimortalidad cardiovascular en la ERC.

8. BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Vanholder R, Pletinck A, Schepers E, Glorieux G. Biochemical and clinical impact of organic uremic retention solutes: A comprehensive update. *Toxins*. 2018;10(1):1–57.
2. Claro LM, Moreno-Amaral AN, Gadotti AC, Dolenga CJ, Nakao LS, Azevedo MLV, et al. The impact of uremic toxicity induced inflammatory response on the cardiovascular burden in chronic kidney disease. *Toxins*. 2018;10(10):1–17.
3. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int Suppl*. 2013;3(1):1–150
4. Gorostidi M, Sanchez-Martinez M, Ruilope LM, Graciani A, de la Cruz JJ, Santamaria R, et al. Chronic kidney disease in Spain: Prevalence and impact of accumulation of cardiovascular risk factors. *Nefrologia*. 2018;38(6):606–15.
5. Otero A, de Francisco A, Gayoso P, Garcia F. Prevalence of chronic renal disease in Spain: results of the EPIRCE study. *Nefrologia*. 2010;30(1):78–86.
6. Informe de de diálisis y trasplante 2017 [Internet]. [Último acceso: 15 octubre 2019]. http://www.senefro.org/contents/webstructure/InformeREER_2016_BURGOS.pdf.
7. The ERA-EDTA Registry Annual Report 2017 [Internet]. [Último acceso: 8 diciembre 2019]. <https://era-edta-reg.org/files/annualreports/pdf/AnnRep2017.pdf>
8. USRDS. Annual Data Report 2018 [Internet]. [Último acceso: 08 diciembre 2019] <https://www.usrds.org/adr.aspx>
9. Bruck K, Stel VS, Gambaro G, Hallan S, Volzke H, Arnlov J, et al. CKD Prevalence Varies across the European General Population. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(7):2135–47.
10. Documento Marco sobre Enfermedad Renal Crónica (ERC) dentro de la Estrategia de abordaje a la cronicidad en el SNS 2015 [Internet]. [Último acceso: 15 octubre 2019]. https://www.mscbs.gob.es/organizacion/sns/planCalidadSNS/pdf/Enfermedad_Renal_Cronica_2015.pdf
11. Sarnak MJ. Cardiovascular complications in chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis*. 2003;41(6):11–7.
12. Zoccali C. The burden of cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease and in end-stage renal disease. *Contrib Nephrol*. 2008;161:63–7.
13. 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):1296–305.
14. Matsushita K, van der Velde M, Astor BC, Woodward M, Levey AS, de Jong PE, 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*. 2010;375(9731):2073–81.
15. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL, et al. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives

- of 10 societies and by invited experts) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Atherosclerosis*. 2016;252:207–74.
16. Maffham M, Emberson J, Landray MJ, Wen C-P, Baigent C. Estimated glomerular filtration rate and the risk of major vascular events and all-cause mortality: a meta-analysis. *PLoS One*. 2011;6(10):e25920.
 17. Tonelli M, Muntner P, Lloyd A, Manns BJ, Klarenbach S, Pannu N, et al. Risk of coronary events in people with chronic kidney disease compared with those with diabetes: a population-level cohort study. *Lancet*. 2012;380(9844):807–14.
 18. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 1998;9(12 Suppl):S16-23.
 19. Sarnak MJ, AS L. Epidemiology of cardiac disease in dialysis patients. *Semin Dial*. 1999;12:69–76.
 20. Naylor KL, Kim SJ, McArthur E, Garg AX, McCallum MK, Knoll GA. Mortality in Incident Maintenance Dialysis Patients Versus Incident Solid Organ Cancer Patients: A Population-Based Cohort. *Am J Kidney Dis*. 2019;73(6):765–76.
 21. Wanner C. Chronic kidney disease and statin therapy: To treat or not to treat? *Eur Heart J*. 2013;34(24):1772–4.
 22. Agarwal R, Sinha AD, Pappas MK, Abraham TN, Tegegne GG. Hypertension in hemodialysis patients treated with atenolol or lisinopril: a randomized controlled trial. *Nephrol Dial Transplant*. 2014;29(3):672–81.
 23. Iseki K, Arima H, Kohagura K, Komiya I, Ueda S, Tokuyama K, et al. Effects of angiotensin receptor blockade (ARB) on mortality and cardiovascular outcomes in patients with long-term haemodialysis: A randomized controlled trial. *Nephrol Dial Transplant*. 2013;28(6):1579–89.
 24. Insull W. The Pathology of Atherosclerosis: Plaque Development and Plaque Responses to Medical Treatment. *Am J Med*. 2009;122(1 Suppl.):S3–14.
 25. Munnur RK, Nerlekar N, Wong DTL. Imaging of coronary atherosclerosis in various susceptible groups. *Cardiovasc Diagn Ther*. 2016;6(4):382–95.
 26. Horl WH, Cohen JJ, Harrington JT, Madias NE, Zusman CJ. Atherosclerosis and uremic retention solutes. *Kidney Int*. 2004;66(4):1719–31.
 27. Lindner A, Charra B, Sherrard DJ, Scribner BH. Accelerated atherosclerosis in prolonged maintenance hemodialysis. *N Engl J Med*. 1974;290(13):697–701.
 28. Nakano T, Ninomiya T, Sumiyoshi S, Fujii H, Doi Y, Hirakata H, et al. Association of kidney function with coronary atherosclerosis and calcification in autopsy samples from Japanese elders: the Hisayama study. *Am J Kidney Dis*. 2010;55(1):21–30.
 29. Nakamura S, Ishibashi-Ueda H, Niizuma S, Yoshihara F, Horio T, Kawano Y. Coronary calcification in patients with chronic kidney disease and coronary artery disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4(12):1892–900.
 30. Mukherjee D. Spatial distribution of coronary artery thromboses in patients with chronic kidney disease: implications for diagnosis and treatment. *Kidney Int*. 2009;75(1):7–9.

31. Baber U, Stone GW, Weisz G, Moreno P, Dangas G, Maehara A, et al. Coronary plaque composition, morphology, and outcomes in patients with and without chronic kidney disease presenting with acute coronary syndromes. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2012;5(3 Suppl):S53-61.
32. Hayano S, Ichimiya S, Ishii H, Kanashiro M, Watanabe J, Kurebayashi N, et al. Relation between estimated glomerular filtration rate and composition of coronary arterial atherosclerotic plaques. *Am J Cardiol*. 2012;109(8):1131–6.
33. Miyagi M, Ishii H, Murakami R, Isobe S, Hayashi M, Amano T, et al. Impact of renal function on coronary plaque composition. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25(1):175–81.
34. Kato K, Yonetsu T, Jia H, Abtahian F, Vergallo R, Hu S, et al. Nonculprit coronary plaque characteristics of chronic kidney disease. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2013 ;6(3):448–56.
35. Leskinen Y, Lehtimäki T, Loimaala A, Lautamatti V, Kallio T, Huhtala H, et al. Carotid atherosclerosis in chronic renal failure—the central role of increased plaque burden. *Atherosclerosis*. 2003;171(2):295–302.
36. Pelisek J, Hahntow IN, Eckstein H-H, Ockert S, Reeps C, Heider P, et al. Impact of chronic kidney disease on carotid plaque vulnerability. *J Vasc Surg*. 2011;54(6):1643–9.
37. Coll B, Betriu A, Martínez-Alonso M, Borrás M, Craver L, Amoedo ML, et al. Cardiovascular risk factors underestimate atherosclerotic burden in chronic kidney disease: usefulness of non-invasive tests in cardiovascular assessment. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25(9):3017–25.
38. Davies JE, Parker KH, Francis DP, Hughes AD, Mayet J. What is the role of the aorta in directing coronary blood flow? *Heart*. 2008;94(12):1545–7.
39. Mitchell GF. Arterial Stiffness and Wave Reflection: Biomarkers of Cardiovascular Risk. *Artery Res*. 2009;3(2):56–64.
40. Schwaiger JP, Neyer U, Sprenger-Mahr H, Kollerits B, Mundle M, Langle M, et al. A simple score predicts future cardiovascular events in an inception cohort of dialysis patients. *Kidney Int*. 2006;70(3):543–8.
41. Guerin AP, London GM, Marchais SJ, Metivier F. Arterial stiffening and vascular calcifications in end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2000;15(7):1014–21.
42. Toussaint ND, Lau KK, Strauss BJ, Polkinghorne KR, Kerr PG. Associations between vascular calcification, arterial stiffness and bone mineral density in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23(2):586–93.
43. Himmelfarb J, Stenvinkel P, Ikizler TA, Hakim RM. The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int*. 2002;62(5):1524–38.
44. Wang M-C, Tsai W-C, Chen J-Y, Huang J-J. Stepwise increase in arterial stiffness corresponding with the stages of chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis*. 2005;45(3):494–501.
45. Edwards NC, Ferro CJ, Townend JN, Steeds RP. Aortic distensibility and arterial-ventricular coupling in early chronic kidney disease: a pattern resembling heart failure

- with preserved ejection fraction. *Heart*. 2008;94(8):1038–43.
46. O'Rourke MF, Safar ME. Relationship between aortic stiffening and microvascular disease in brain and kidney: cause and logic of therapy. *Hypertens*. 2005;46(1):200–4.
 47. Blacher J, Guerin AP, Pannier B, Marchais SJ, Safar ME, London GM. Impact of aortic stiffness on survival in end-stage renal disease. *Circulation*. 1999;99(18):2434–9.
 48. Karras A, Haymann J-P, Bozec E, Metzger M, Jacquot C, Maruani G, et al. Large artery stiffening and remodeling are independently associated with all-cause mortality and cardiovascular events in chronic kidney disease. *Hypertens*. 2012;60(6):1451–7.
 49. Chen S-C, Chang J-M, Liu W-C, Tsai Y-C, Tsai J-C, Hsu P-C, et al. Brachial-ankle pulse wave velocity and rate of renal function decline and mortality in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6(4):724–32.
 50. Ford ML, Tomlinson LA, Chapman TPE, Rajkumar C, Holt SG. Aortic stiffness is independently associated with rate of renal function decline in chronic kidney disease stages 3 and 4. *Hypertens*. 2010;55(5):1110–5.
 51. Brown NJ. Aldosterone and vascular inflammation. *Hypertens*. 2008;51(2):161–7.
 52. Mustata S, Groeneveld S, Davidson W, Ford G, Kiland K, Manns B. Effects of exercise training on physical impairment, arterial stiffness and health-related quality of life in patients with chronic kidney disease: a pilot study. *Int Urol Nephrol*. 2011;43(4):1133–41.
 53. Levy BI, Schiffrin EL, Mourad J-J, Agostini D, Vicaut E, Safar ME, et al. Impaired tissue perfusion: a pathology common to hypertension, obesity, and diabetes mellitus. *Circulation*. 2008;118(9):968–76.
 54. Amann K, Tyralla K. Cardiovascular changes in chronic renal failure: pathogenesis and therapy. *Clin Nephrol*. 2002;58 (Suppl 1):S62-72.
 55. Thang OHD, Serne EH, Grooteman MPC, Smulders YM, ter Wee PM, Tangelder G-J, et al. Capillary rarefaction in advanced chronic kidney disease is associated with high phosphorus and bicarbonate levels. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26(11):3529–36.
 56. Chade AR, Brosh D, Higano ST, Lennon RJ, Lerman LO, Lerman A. Mild renal insufficiency is associated with reduced coronary flow in patients with non-obstructive coronary artery disease. *Kidney Int*. 2006;69(2):266–71.
 57. Fujii H, Takiuchi S, Kawano Y, Fukagawa M. Putative role of asymmetric dimethylarginine in microvascular disease of kidney and heart in hypertensive patients. *Am J Hypertens*. 2008;21(6):650–6.
 58. Nakanishi K, Fukuda S, Shimada K, Miyazaki C, Otsuka K, Kawarabayashi T, et al. Prognostic value of coronary flow reserve on long-term cardiovascular outcomes in patients with chronic kidney disease. *Am J Cardiol*. 2013;112(7):928–32.
 59. Wanner C, Amann K, Shoji T. The heart and vascular system in dialysis. *Lancet*. 2016;388(10041):276–84.
 60. Herrington W, Emberson J, Mihaylova B, Blackwell L, Reith C, Solbu M, et al. Impact of renal function on the effects of LDL cholesterol lowering with statin-based

- regimens: a meta-analysis of individual participant data from 28 randomised trials. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2016;4(10):829–39.
61. Schiffrin EL, Lipman ML, Mann JFE. Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system. *Circulation.* 2007;116(1):85–97.
 62. Smith GL, Masoudi FA, Shlipak MG, Krumholz HM, Parikh CR. Renal impairment predicts long-term mortality risk after acute myocardial infarction. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19(1):141–50.
 63. Fox CS, Muntner P, Chen AY, Alexander KP, Roe MT, Cannon CP, et al. Use of evidence-based therapies in short-term outcomes of ST-segment elevation myocardial infarction and non-ST-segment elevation myocardial infarction in patients with chronic kidney disease: a report from the National Cardiovascular Data Acute Coronary . *Circulation.* 2010;121(3):357–65.
 64. Cherng Y-G, Lin C-S, Shih C-C, Hsu Y-H, Yeh C-C, Hu C-J, et al. Stroke risk and outcomes in patients with chronic kidney disease or end-stage renal disease: Two nationwide studies. *PLoS One.* 2018;13(1):e0191155.
 65. Dries DL, Exner D V, Domanski MJ, Greenberg B, Stevenson LW. The prognostic implications of renal insufficiency in asymptomatic and symptomatic patients with left ventricular systolic dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35(3):681–9.
 66. Foley RN, Wang C, Collins AJ. Cardiovascular risk factor profiles and kidney function stage in the US general population: the NHANES III study. *Mayo Clin Proc.* 2005;80(10):1270–7.
 67. Weiner DE, Tighiouart H, Elsayed EF, Griffith JL, Salem DN, Levey AS, et al. The Framingham predictive instrument in chronic kidney disease. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50(3):217–24.
 68. Muntner P, Hamm LL, Kusek JW, Chen J, Whelton PK, He J. The prevalence of nontraditional risk factors for coronary heart disease in patients with chronic kidney disease. *Ann Intern Med.* 2004;140(1):9–17.
 69. Muntner P, He J, Astor BC, Folsom AR, Coresh J. Traditional and nontraditional risk factors predict coronary heart disease in chronic kidney disease: results from the atherosclerosis risk in communities study. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(2):529–38.
 70. Chen S-C, Su H-M, Tsai Y-C, Huang J-C, Chang J-M, Hwang S-J, et al. Framingham risk score with cardiovascular events in chronic kidney disease. *PLoS One.* 2013;8(3):e60008.
 71. Coffman TM. The inextricable role of the kidney in hypertension. *J Clin Invest.* 2014;124(6):2341–7.
 72. Kuznik A, Mardekian J, Tarasenko L. Evaluation of cardiovascular disease burden and therapeutic goal attainment in US adults with chronic kidney disease: an analysis of National Health and Nutritional Examination Survey Data, 2001-2010. *BMC Nephrol.* 2013;14:132.
 73. De Nicola L, Gabbai FB, Agarwal R, Chiodini P, Borrelli S, Bellizzi V, et al. Prevalence and prognostic role of resistant hypertension in chronic kidney disease patients. *J Am Coll Cardiol.* 2013;61(24):2461–7.
 74. Portaluppi F, Montanari L, Massari M, Di Chiara V, Capanna M. Loss of nocturnal decline of blood pressure in hypertension due to chronic renal failure. *Am J*

- Hypertens. 1991;4(1):20–6.
75. Minutolo R, Agarwal R, Borrelli S, Chiodini P, Bellizzi V, Nappi F, et al. Prognostic role of ambulatory blood pressure measurement in patients with nondialysis chronic kidney disease. *Arch Intern Med.* 2011;171(12):1090–8.
 76. Kokubo Y, Nakamura S, Okamura T, Yoshimasa Y, Makino H, Watanabe M, et al. Relationship between blood pressure category and incidence of stroke and myocardial infarction in an urban Japanese population with and without chronic kidney disease: the Suita Study. *Stroke.* 2009;40(8):2674–9.
 77. Bulbul MC, Dagele T, Afsar B, Ulusu NN, Kuwabara M, Covic A, et al. Disorders of Lipid Metabolism in Chronic Kidney Disease. *Blood Purif.* 2018;46(2):144–52.
 78. Pascual V, Serrano A, Pedro-Botet J, Ascaso J, Barrios V, Millan J, et al. Chronic kidney disease and dyslipidaemia. *Clin Investig Arterioscler.* 2017;29(1):22–35.
 79. Shlipak MG, Fried LF, Cushman M, Manolio TA, Peterson D, Stehman-Breen C, et al. Cardiovascular mortality risk in chronic kidney disease: comparison of traditional and novel risk factors. *JAMA.* 2005;293(14):1737–45.
 80. Kovesdy CP, Anderson JE, Kalantar-Zadeh K. Inverse association between lipid levels and mortality in men with chronic kidney disease who are not yet on dialysis: effects of case mix and the malnutrition-inflammation-cachexia syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(1):304–11.
 81. Tonelli M, Muntner P, Lloyd A, Manns B, Klarenbach S, Pannu N, et al. Association between LDL-C and risk of myocardial infarction in CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24(6):979–86.
 82. Liu Y, Coresh J, Eustace JA, Longenecker JC, Jaar B, Fink NE, et al. Association between cholesterol level and mortality in dialysis patients: role of inflammation and malnutrition. *JAMA.* 2004;291(4):451–9.
 83. Reutens AT, Atkins RC. Epidemiology of diabetic nephropathy. *Contrib Nephrol.* 2011;170:1–7.
 84. Stolar M. Glycemic control and complications in type 2 diabetes mellitus. *Am J Med.* 2010;123(Suppl 3):S3-11.
 85. Basi S, Fesler P, Mimran A, Lewis JB. Microalbuminuria in type 2 diabetes and hypertension: a marker, treatment target, or innocent bystander? *Diabetes Care.* 2008;31(Suppl 2):S194-201.
 86. Afkarian M, Sachs MC, Kestenbaum B, Hirsch IB, Tuttle KR, Himmelfarb J, et al. Kidney disease and increased mortality risk in type 2 diabetes. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24(2):302–8.
 87. Neumiller JJ, Alicic RZ, Tuttle KR. Therapeutic Considerations for Antihyperglycemic Agents in Diabetic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28(8):2263–74.
 88. Hallan SI, Orth SR. Smoking is a risk factor in the progression to kidney failure. *Kidney Int.* 2011;80(5):516–23.
 89. Paoletti E, De Nicola L, Gabbai FB, Chiodini P, Ravera M, Pieracci L, et al. Associations of Left Ventricular Hypertrophy and Geometry with Adverse Outcomes in Patients with CKD and Hypertension. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2016;11(2):271–9.

90. Park M, Hsu C, Li Y, Mishra RK, Keane M, Rosas SE, et al. Associations between kidney function and subclinical cardiac abnormalities in CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(10):1725–34.
91. Paoletti E, Zoccali C. A look at the upper heart chamber: the left atrium in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2014;29(10):1847–53.
92. Whitman IR, Feldman HI, Deo R. CKD and sudden cardiac death: epidemiology, mechanisms, and therapeutic approaches. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(12):1929–39.
93. Chen S-C, Chang J-M, Liu W-C, Huang J-C, Tsai J-C, Lin M-Y, et al. Echocardiographic parameters are independently associated with increased cardiovascular events in patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(3):1064–70.
94. Chen S-C, Su H-M, Hung C-C, Chang J-M, Liu W-C, Tsai J-C, et al. Echocardiographic parameters are independently associated with rate of renal function decline and progression to dialysis in patients with chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6(12):2750–8.
95. Weir MR. Microalbuminuria and cardiovascular disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007;2(3):581–90.
96. Deckert T, Feldt-Rasmussen B, Borch-Johnsen K, Jensen T, Kofoed-Enevoldsen A. Albuminuria reflects widespread vascular damage. The Steno hypothesis. *Diabetologia*. 1989;32(4):219–26.
97. Brouwers FP, Asselbergs FW, Hillege HL, de Boer RA, Gansevoort RT, van Veldhuisen DJ, et al. Long-term effects of fosinopril and pravastatin on cardiovascular events in subjects with microalbuminuria: Ten years of follow-up of Prevention of Renal and Vascular End-stage Disease Intervention Trial (PREVEND IT). *Am Heart J*. 2011;161(6):1171–8.
98. Ibsen H, Olsen MH, Wachtell K, Borch-Johnsen K, Lindholm LH, Mogensen CE, et al. Reduction in albuminuria translates to reduction in cardiovascular events in hypertensive patients: Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study. *Hypertens*. 2005;45(2):198–202.
99. Holtkamp FA, de Zeeuw D, de Graeff PA, Laverman GD, Berl T, Remuzzi G, et al. Albuminuria and blood pressure, independent targets for cardioprotective therapy in patients with diabetes and nephropathy: a post hoc analysis of the combined RENAAL and IDNT trials. *Eur Heart J*. 2011;32(12):1493–9.
100. Heerspink HJL, Kropelin TF, Hoekman J, de Zeeuw D. Drug-Induced Reduction in Albuminuria Is Associated with Subsequent Renoprotection: A Meta-Analysis. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(8):2055–64.
101. McClellan W, Aronoff SL, Bolton WK, Hood S, Lorber DL, Tang KL, et al. The prevalence of anemia in patients with chronic kidney disease. *Curr Med Res Opin*. 2004;20(9):1501–10.
102. Levin A, Djurdjev O, Duncan J, Rosenbaum D, Werb R. Haemoglobin at time of referral prior to dialysis predicts survival: an association of haemoglobin with long-term outcomes. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(2):370–7.
103. Portoles J, Gorriz JL, Rubio E, de Alvaro F, Garcia F, Alvarez-Chivas V, et al. The development of anemia is associated to poor prognosis in NKF/KDOQI stage 3 chronic kidney disease. *BMC Nephrol*. 2013 ;14:2. DOI:10.1186/1471-2369-14-2.

104. Astor BC, Coresh J, Heiss G, Pettitt D, Sarnak MJ. Kidney function and anemia as risk factors for coronary heart disease and mortality: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am Heart J.* 2006;151(2):492–500.
105. Kovesdy CP, Trivedi BK, Kalantar-Zadeh K, Anderson JE. Association of anemia with outcomes in men with moderate and severe chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2006;69(3):560–4.
106. Palmer SC, Navaneethan SD, Craig JC, Johnson DW, Tonelli M, Garg AX, et al. Meta-analysis: erythropoiesis-stimulating agents in patients with chronic kidney disease. *Ann Intern Med.* 2010;153(1):23–33.
107. Lewis R. Mineral and bone disorders in chronic kidney disease: new insights into mechanism and management. *Ann Clin Biochem.* 2012;49(Pt 5):432–40.
108. Kendrick J, Chonchol M. The role of phosphorus in the development and progression of vascular calcification. *Am J Kidney Dis.* 2011;58(5):826–34.
109. Stevens KK, Denby L, Patel RK, Mark PB, Kettlewell S, Smith GL, et al. Deleterious effects of phosphate on vascular and endothelial function via disruption to the nitric oxide pathway. *Nephrol Dial Transplant.* 2017;32(10):1617–27.
110. Ellam TJ, Chico TJA. Phosphate: the new cholesterol? The role of the phosphate axis in non-uremic vascular disease. *Atherosclerosis.* 2012;220(2):310–8.
111. Hagstrom E, Hellman P, Larsson TE, Ingelsson E, Berglund L, Sundstrom J, et al. Plasma parathyroid hormone and the risk of cardiovascular mortality in the community. *Circulation.* 2009;119(21):2765–71.
112. Khundmiri SJ, Murray RD, Lederer E. PTH and Vitamin D. *Compr Physiol.* 2016;6(2):561–601.
113. Quarles LD. Endocrine functions of bone in mineral metabolism regulation. *J Clin Invest.* 2008;118(12):3820–8.
114. Melamed ML, Thadhani RI. Vitamin D therapy in chronic kidney disease and end stage renal disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2012;7(2):358–65.
115. Duranton F, Rodriguez-Ortiz ME, Duny Y, Rodriguez M, Daures J-P, Argiles A. Vitamin D treatment and mortality in chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *Am J Nephrol.* 2013;37(3):239–48.
116. Barbarawi M, Kheiri B, Zayed Y, Barbarawi O, Dhillon H, Swaid B, et al. Vitamin D Supplementation and Cardiovascular Disease Risks in More Than 8300 Individuals in 21 Randomized Clinical Trials: A Meta-analysis. *JAMA Cardiol.* 2019;4(8):765–75.
117. Olauson H, Vervloet MG, Cozzolino M, Massy ZA, Urena Torres P, Larsson TE. New insights into the FGF23-Klotho axis. *Semin Nephrol.* 2014;34(6):586–97.
118. Lai WKC, Kan MY. Homocysteine-Induced Endothelial Dysfunction. *Ann Nutr Metab.* 2015;67(1):1–12.
119. Goligorsky MS. Pathogenesis of endothelial cell dysfunction in chronic kidney disease: A retrospective and what the future may hold. *Kidney Res Clin Pract.* 2015;34(2):76–82.
120. Richette P, Perez-Ruiz F, Doherty M, Jansen TL, Nuki G, Pascual E, et al. Improving cardiovascular and renal outcomes in gout: what should we target? *Nat Rev*

- Rheumatol. 2014;10(11):654–61.
121. Atlas SA. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Pharm.* 2007;13(8 Suppl B):9–20.
 122. Ewen S, Ukena C, Linz D, Schmieder RE, Bohm M, Mahfoud F. The sympathetic nervous system in chronic kidney disease. *Curr Hypertens Rep.* 2013;15(4):370–6.
 123. Huang MJ, Wei RB, Wang Y, Su TY, Di P, Li QP, et al. Blood coagulation system in patients with chronic kidney disease: A prospective observational study. *BMJ Open.* 2017;7(5):7–13.
 124. Undas A, Nycz K, Pastuszczak M, Stompor T, Zmudka K. The effect of chronic kidney disease on fibrin clot properties in patients with acute coronary syndrome. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2010;21(6):522–7.
 125. Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature.* 2002;420(6917):846–52.
 126. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 2008;454(7203):428–35.
 127. Cigarran Guldris S, Gonzalez Parra E, Cases Amenos A. Gut microbiota in chronic kidney disease. *Nefrologia.* 2017;37(1):9–19.
 128. Ramezani A, Massy ZA, Meijers B, Evenepoel P, Vanholder R, Raj DS. Role of the Gut Microbiome in Uremia: A Potential Therapeutic Target. *Am J Kidney Dis.* 2016;67(3):483–98.
 129. Sun Y, Johnson C, Zhou J, Wang L, Li Y-F, Lu Y, et al. Uremic toxins are conditional danger- or homeostasis-associated molecular patterns. *Front Biosci.* 2018;23:348–87.
 130. Oberg BP, McMenamin E, Lucas FL, McMonagle E, Morrow J, Ikizler TA, et al. Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2004;65(3):1009–16.
 131. Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson RJ, Lindholm B, Pecoits-Filho R, Riella M, et al. IL-10, IL-6, and TNF-alpha: central factors in the altered cytokine network of uremia—the good, the bad, and the ugly. *Kidney Int.* 2005;67(4):1216–33.
 132. Suliman ME, Heimburger O, Barany P, Anderstam B, Pecoits-Filho R, Rodriguez Ayala E, et al. Plasma pentosidine is associated with inflammation and malnutrition in end-stage renal disease patients starting on dialysis therapy. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(6):1614–22.
 133. Dounousi E, Papavasiliou E, Makedou A, Ioannou K, Katopodis KP, Tselepis A, et al. Oxidative stress is progressively enhanced with advancing stages of CKD. *Am J Kidney Dis.* 2006;48(5):752–60.
 134. Pereira BJ, Shapiro L, King AJ, Falagas ME, Strom JA, Dinarello CA. Plasma levels of IL-1 beta, TNF alpha and their specific inhibitors in undialyzed chronic renal failure, CAPD and hemodialysis patients. *Kidney Int.* 1994;45(3):890–6.
 135. Miyata T, Ueda Y, Horie K, Nangaku M, Tanaka S, van Ypersele de Strihou C, et al. Renal catabolism of advanced glycation end products: the fate of pentosidine. *Kidney Int.* 1998;53(2):416–22.

136. Anderson MM, Hazen SL, Hsu FF, Heinecke JW. Human neutrophils employ the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system to convert hydroxy-amino acids into glycolaldehyde, 2-hydroxypropanal, and acrolein. A mechanism for the generation of highly reactive alpha-hydroxy and alpha,beta-unsaturated aldehydes by phagocytes at sites of inflammation. *J Clin Invest.* 1997;99(3):424–32.
137. Memoli B, Minutolo R, Bisesti V, Postiglione L, Conti A, Marzano L, et al. Changes of serum albumin and C-reactive protein are related to changes of interleukin-6 release by peripheral blood mononuclear cells in hemodialysis patients treated with different membranes. *Am J Kidney Dis.* 2002;39(2):266–73.
138. Schindler R, Beck W, Deppisch R, Aussieker M, Wilde A, Gohl H, et al. Short bacterial DNA fragments: detection in dialysate and induction of cytokines. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(12):3207–14.
139. Arizono K, Nomura K, Motoyama T, Matsushita Y, Matsuoka K, Miyazu R, et al. Use of ultrapure dialysate in reduction of chronic inflammation during hemodialysis. *Blood Purif.* 2004;22 (Suppl) 2:26–9.
140. Schiffli H, Lang SM, Stratakis D, Fischer R. Effects of ultrapure dialysis fluid on nutritional status and inflammatory parameters. *Nephrol Dial Transplant.* 2001;16(9):1863–9.
141. Bossola M, Sanguinetti M, Scribano D, Zuppi C, Giungi S, Luciani G, et al. Circulating bacterial-derived DNA fragments and markers of inflammation in chronic hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009;4(2):379–85.
142. Buhlin K, Barany P, Heimburger O, Stenvinkel P, Gustafsson A. Oral health and pro-inflammatory status in end-stage renal disease patients. *Oral Health Prev Dent.* 2007;5(3):235–44.
143. Enia G, Mallamaci F, Benedetto FA, Panuccio V, Parlongo S, Cutrupi S, et al. Long-term CAPD patients are volume expanded and display more severe left ventricular hypertrophy than haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2001;16(7):1459–64.
144. Lopez-Gomez JM, Perez-Flores I, Jofre R, Carretero D, Rodriguez-Benitez P, Villaverde M, et al. Presence of a failed kidney transplant in patients who are on hemodialysis is associated with chronic inflammatory state and erythropoietin resistance. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(9):2494–501.
145. Yeun JY, Levine RA, Mantadilok V, Kaysen GA. C-reactive protein predicts all-cause and cardiovascular mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 2000;35: 469–76.
146. Bernelot Moens SJ, Verweij SL, van der Valk FM, van Capelleveen JC, Kroon J, Versloot M, et al. Arterial and Cellular Inflammation in Patients with CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28(4):1278–85.
147. González Maqueda I, Casanova Rodriguez C, Escobar Cervantes C, García García A, Pereira Moral JR PME et al. Cardiovascular disease and renal function. Pathogenetic mechanisms. *Rev Esp Cardiol.* 2008;8:10E-21E.
148. Daenen K, Andries A, Mekahli D, Van Schepdael A, Jouret F, Bammens B. Oxidative stress in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol.* 2019;34(6):975–91.
149. Niki E. Oxidant-specific biomarkers of oxidative stress. Association with atherosclerosis and implication for antioxidant effects. *Free Radic Biol Med.*

- 2018;120:425–40.
150. Liakopoulos V, Roumeliotis S, Gorny X, Eleftheriadis T, Mertens PR. Oxidative Stress in Patients Undergoing Peritoneal Dialysis: A Current Review of the Literature. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:3494867.
 151. 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;2017:3081856.
 152. Lim PS, Wei YH, Yu YL, Kho B. Enhanced oxidative stress in haemodialysis patients receiving intravenous iron therapy. *Nephrol Dial Transplant*. 1999;14(11):2680–7.
 153. Di Meo S, Reed TT, Venditti P, Victor VM. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:1245049
 154. Stocker R, Keaney JFJ. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev*. 2004;84(4):1381–478.
 155. Brandes RP, Kreuzer J. Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Cardiovasc Res*. 2005;65(1):16–27.
 156. Chen F, Haigh S, Barman S, Fulton DJR. From form to function: the role of Nox4 in the cardiovascular system. *Front Physiol*. 2012;3:412.
 157. Gondouin B, Jourde-Chiche N, Sallee M, Dou L, Cerini C, Loundou A, et al. Plasma Xanthine Oxidase Activity Is Predictive of Cardiovascular Disease in Patients with Chronic Kidney Disease, Independently of Uric Acid Levels. *Nephron*. 2015;131(3):167–74.
 158. Forstermann U, Li H. Therapeutic effect of enhancing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling. *Br J Pharmacol*. 2011;164(2):213–23.
 159. Alp NJ, Channon KM. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(3):413–20.
 160. Yu M, Kim YJ, Kang D-H. Indoxyl sulfate-induced endothelial dysfunction in patients with chronic kidney disease via an induction of oxidative stress. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6(1):30–9.
 161. Tumur Z, Niwa T. Indoxyl sulfate inhibits nitric oxide production and cell viability by inducing oxidative stress in vascular endothelial cells. *Am J Nephrol*. 2009;29(6):551–7.
 162. Daugherty A, Dunn JL, Rateri DL, Heinecke JW. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*. 1994;94(1):437–44.
 163. Martínez-González J, Varona S, Cañes L, Galán M, Briones AM, Cachafeiro V, et al. Emerging roles of lysyl oxidases in the cardiovascular system: New concepts and therapeutic challenges. *Biomolecules*. 2019;9(10).
 164. Nicholls SJ, Tang WHW, Brennan D, Brennan M-L, Mann S, Nissen SE, et al. Risk prediction with serial myeloperoxidase monitoring in patients with acute chest pain. *Clin Chem*. 2011;57(12):1762–70.

165. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci.* 2008;4(2):89–96.
166. Czerska M, Mikolajewska K, Zielinski M, Gromadzinska J, Wasowicz W. Today's oxidative stress markers. *Med Pr.* 2015;66(3):393–405.
167. Santilli F, D'Ardes D, Davi G. Oxidative stress in chronic vascular disease: From prediction to prevention. *Vascul Pharmacol.* 2015;74:23–37.
168. Lin L, Zhao G-J, Qin L-L. Association between advanced oxidation protein products (AOPP) and vascular calcification in uremic patients. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017;21(18):4147–52.
169. Nguyen-Khoa T, Massy ZA, De Bandt JP, Kebede M, Salama L, Lambrey G, et al. Oxidative stress and haemodialysis: role of inflammation and duration of dialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant.* 2001;16(2):335–40.
170. Handelman GJ, Walter MF, Adhikarla R, Gross J, Dallal GE, Levin NW, et al. Elevated plasma F2-isoprostanes in patients on long-term hemodialysis. *Kidney Int.* 2001;59(5):1960–6.
171. Holvoet P, Donck J, Landeloos M, Brouwers E, Luijckens K, Arnout J, et al. Correlation between oxidized low density lipoproteins and von Willebrand factor in chronic renal failure. *Thromb Haemost.* 1996;76(5):663–9.
172. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 1996;49(5):1304–13.
173. Ma Q. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2013;53:401–26.
174. Battin EE, Brumaghim JL. Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. *Cell Biochem Biophys.* 2009;55(1):1–23.
175. Satoh M, Yamasaki Y, Nagake Y, Kasahara J, Hashimoto M, Nakanishi N, et al. Oxidative stress is reduced by the long-term use of vitamin E-coated dialysis filters. *Kidney Int.* 2001;59(5):1943–50.
176. Kabel AM. Free Radicals and Antioxidants Role of Enzymes and Nutrition. *World Journal of Nutrition and Health.* 2014;2(3):35–8.
177. Croft KD. Dietary polyphenols: Antioxidants or not? *Arch Biochem Biophys.* 2016;595:120–4.
178. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem.* 2015;97:55–74.
179. Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett.* 2008;582(13):1783–7.
180. Biswas SK. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:5698931.
181. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic

- inflammatory diseases. *N Engl J Med.* 1997;336(15):1066–71.
182. Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer.* 2013;12:86.
 183. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature.* 2011;469(7329):221–5.
 184. Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol.* 2010 11(2):136–40.
 185. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell.* 2010;140(6):821–32.
 186. Ravarotto V, Simioni F, Pagnin E, Davis PA, Calo LA. Oxidative stress - chronic kidney disease - cardiovascular disease: A vicious circle. *Life Sci.* 2018;210:125–31.
 187. Stenvinkel P, Larsson TE. Chronic kidney disease: A clinical model of premature aging. *Am J Kidney Dis.* 2013;62(2):339–51.
 188. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood.* 1998;91(10):3527–61.
 189. Sumpio BE, Riley JT, Dardik A. Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002;34(12):1508–12.
 190. Basile DP, Yoder MC. Circulating and tissue resident endothelial progenitor cells. *J Cell Physiol.* 2014;229(1):10–6.
 191. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res.* 2007;100(2):174–90.
 192. Hunt BJ, Jurd KM. Endothelial cell activation. A central pathophysiological process. *BMJ;*1998(316):328–9.
 193. Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(10):803–15.
 194. Vanhoutte PM, Shimokawa H, Feletou M, Tang EHC. Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update. *Acta Physiol.* 2017;219(1):22–96.
 195. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, et al. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci.* 2013;9(10):1057–69.
 196. Barreiro O, Vicente-Manzanares M, Urzainqui A, Yanez-Mo M, Sanchez-Madrid F. Interactive protrusive structures during leukocyte adhesion and transendothelial migration. *Front Biosci.* 2004;9:1849–63.
 197. Miyasaka M, Kawashima H, Korenaga R, Ando J. Involvement of selectins in atherogenesis: a primary or secondary event? *Ann N Y Acad Sci.* 1997;811:25.
 198. Takada Y, Ye X, Simon S. The integrins. *Genome Biol.* 2007;8:215. DOI:10.1186/gb-2007-8-5-215
 199. Vestweber D. How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(11):692–704.

200. Gavard J. Endothelial permeability and VE-cadherin: a wacky comradeship. *Cell Adh Migr.* 2013;7(6):455–61.
201. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010;11(5):373–84.
202. Rubartelli A, Lotze MT. Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends Immunol.* 2007;28(10):429–36.
203. Anderson K V. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol.* 2000;12(1):13–9.
204. Kawai T, Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med.* 2007;13(11):460–9.
205. Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R. Inflammasomes in health and disease. *Nature.* 2012;481(7381):278–86.
206. Olson TS, Ley K. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002;283(1):R7-28.
207. Vila Cuenca M, Hordijk PL, Vervloet MG. Most exposed: the endothelium in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2019;1–10. DOI: 10.1093/ndt/gfz055
208. Herranz N, Gil J, Herranz N, Gil J. Mechanisms and functions of cellular senescence Find the latest version Mechanisms and functions of cellular senescence. *J Clin Invest.* 2018;128(4):1238–46.
209. Carracedo J, Ramírez-Carracedo R, Alique M, Ramírez-Chamond R. Endothelial Cell Senescence in the Pathogenesis of Endothelial Dysfunction. *Endothel Dysfunct - Old Concepts New Challenges [Internet].* 2018. [Último acceso:15 octubre 2019]. <http://www.intechopen.com/books/endothelial-dysfunction-old-concepts-and-new-challenges/endothelial-cell-senescence-in-the-pathogenesis-of-endothelial-dysfunction>
210. Moody WE, Edwards NC, Madhani M, Chue CD, Steeds RP, Ferro CJ, et al. Endothelial dysfunction and cardiovascular disease in early-stage chronic kidney disease: cause or association? *Atherosclerosis.* 2012;223(1):86–94.
211. Joannides R, Bakkali EH, Le Roy F, Rivault O, Godin M, Moore N, et al. Altered flow-dependent vasodilatation of conduit arteries in maintenance haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant.* 1997;12(12):2623–8.
212. Van Guldener C, Janssen MJ, Lambert J, Steyn M, Donker AJ, Stehouwer CD. Endothelium-dependent vasodilatation is impaired in peritoneal dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 1998;13(7):1782–6.
213. 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):205–9.
214. Passauer J, Bussemaker E, Range U, Plug M, Gross P. Evidence in vivo showing increase of baseline nitric oxide generation and impairment of endothelium-dependent vasodilation in normotensive patients on chronic hemodialysis. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11(9):1726–34.
215. Caballo C, Palomo M, Cases A, Galán AM, Molina P, Vera M, et al. NFkB in the Development of Endothelial Activation and Damage in Uremia: An In Vitro Approach. *PLoS One.* 2012;7(8):e43374.

216. Bonomini M, Reale M, Santarelli P, Stuard S, Settefrati N, Albertazzi A. Serum levels of soluble adhesion molecules in chronic renal failure and dialysis patients. *Nephron*. 1998;79(4):399–407.
217. Papayianni A, Alexopoulos E, Giamalis P, Gionanlis L, Belechri A-M, Koukoudis P, et al. Circulating levels of ICAM-1, VCAM-1, and MCP-1 are increased in haemodialysis patients: association with inflammation, dyslipidaemia, and vascular events. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17(3):435–41.
218. Tbahriti HF, Messaoudi A, Kaddous A, Bouchenak M, Mekki K. The degree of chronic renal failure is associated with the rate of pro-inflammatory cytokines, hyperhomocysteinemia and with oxidative stress. *Ann Cardiol Angeiol*. 2014;63(3):135–9.
219. D'Apolito M, Colia AL, Lasalvia M, Capozzi V, Maffione AB, Giardino I, et al. Urea-induced ROS accelerate senescence in endothelial progenitor cells. *Atherosclerosis*. 2017;263:127–36.
220. Faure V, Dou L, Sabatier F, Cerini C, Sampol J, Berland Y, et al. Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure. *J Thromb Haemost*. 2006;4(3):566–73.
221. Aznar-Salatti J, Escolar G, Cases A, Gomez-Ortiz G, Anton P, Castillo R, et al. Uraemic medium causes endothelial cell dysfunction characterized by an alteration of the properties of its subendothelial matrix. *Nephrol Dial Transplant*. 1995;10(12):2199–204.
222. Serradell M, Díaz-Ricart M, Cases A, Zurbano MJ, Aznar-Salatti J, López-Pedret J, et al. Uremic medium disturbs the hemostatic balance of cultured human endothelial cells. *Thromb Haemost*. 2001;86(4):1099–105.
223. Semeraro N, Colucci M. Tissue factor in health and disease. *Thromb Haemost*. 1997;78(1):759–64.
224. Sagripanti A, Morganti M, Carpi A, Cupisti A, Nicolini A, Barsotti M, et al. Uremic medium increases cytokine-induced PAI-1 secretion by cultured endothelial cells. *Biomed Pharmacother*. 1998;52(7–8):298–302.
225. Serradell M, Díaz-Ricart M, Cases A, Petriz J, Ordinas A, Escolar G, et al. Uraemic medium accelerates proliferation but does not induce apoptosis of endothelial cells in culture. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18(6):1079–85.
226. Serradell M, Díaz-Ricart M, Cases A, Zurbano MJ, López-Pedret J, Arranz O, et al. Uremic medium causes expression, redistribution and shedding of adhesion molecules in cultured endothelial cells. *Haematologica*. 2002;87(10):1053–61.
227. Martin-Rodriguez S, Caballo C, Gutierrez G, Vera M, Cruzado JM, Cases A, et al. TLR4 and NALP3 inflammasome in the development of endothelial dysfunction in uraemia. *Eur J Clin Invest*. 2015;45(2):160–9.
228. Carbo C, Arderiu G, Escolar G, Fuste B, Cases A, Carrascal M, et al. Differential expression of proteins from cultured endothelial cells exposed to uremic versus normal serum. *Am J Kidney Dis*. 2008 Apr;51(4):603–12.
229. Tbahriti HF, Kaddous A, Bouchenak M, Mekki K. Effect of Different Stages of Chronic Kidney Disease and Renal Replacement Therapies on Oxidant-Antioxidant Balance

- in Uremic Patients. *Biochem Res Int.* 2013;2013:1–6.
230. Siti HN, Kamisah Y, Kamsiah J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascul Pharmacol.* 2015;71:40–56.
 231. Coombes JS, Fassett RG. Antioxidant therapy in hemodialysis patients: A systematic review. *Kidney Int.* 2012;81(3):233–46.
 232. Hussain, Tarique; Tan, Bie; Yin, Yulong; Blachier, Francois; Myrlene C. B. T. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? 2016;2016:7432797
 233. Croft KD. Dietary polyphenols: Antioxidants or not? *Arch Biochem Biophys.* 2016;595:120–4.
 234. Sansone R, Rodriguez-Mateos A, Heuel J, Falk D, Schuler D, Wagstaff R, et al. Cocoa flavanol intake improves endothelial function and Framingham Risk Score in healthy men and women: A randomised, controlled, double-masked trial: the Flaviola Health Study. *Br J Nutr.* 2015;114(8):1246–55.
 235. Rassaf T, Rammos C, Hendgen-Cotta UB, Heiss C, Kleophas W, Dellanna F, et al. Vasculoprotective effects of dietary cocoa flavanols in patients on hemodialysis: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2016;11(1):108–18.
 236. Samuni Y, Goldstein S, Dean OM, Berk M. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2013;1830(8):4117–29.
 237. Rushworth GF, Megson IL. Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: The need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. *Pharmacol Ther.* 2014;141(2):150–9.
 238. Tepel M, Van der Giet M, Statz M, Jankowski J, Zidek W. The antioxidant acetylcysteine reduces cardiovascular events in patients with end-stage renal failure: A randomized, controlled trial. *Circulation.* 2003;107(7):992–5.
 239. Sahin G, Yalcin AU, Akcar N. Effect of N-acetylcysteine on endothelial dysfunction in dialysis patients. *Blood Purif.* 2007;25(4):309–15.
 240. Shang F, Wang S-C, Hsu C-Y, Miao Y, Martin M, Yin Y, et al. MicroRNA-92a Mediates Endothelial Dysfunction in CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28(11):3251–61.
 241. Rodrigues SD, França KC, Dallin FT, Fujihara CK, Nascimento AJ, Pecoits-Filho R, et al. N-acetylcysteine as a potential strategy to attenuate the oxidative stress induced by uremic serum in the vascular system. *Life Sci.* 2015;121:110–6. 4
 242. Azad GK, Tomar RS. Ebselen, a promising antioxidant drug: mechanisms of action and targets of biological pathways. *Mol Biol Rep.* 2014;41(8):4865–79.
 243. Kade IJ, Balogun BD, Rocha JBT. In vitro glutathione peroxidase mimicry of ebselen is linked to its oxidation of critical thiols on key cerebral suphydryl proteins - A novel component of its GPx-mimic antioxidant mechanism emerging from its thiol-modulated toxicology and pharmacology. *Chem Biol Interact.* 2013;206(1):27–36.
 244. Azad GK, Singh V, Mandal P, Singh P, Golla U, Baranwal S, et al. Ebselen induces reactive oxygen species (ROS)-mediated cytotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae* with inhibition of glutamate dehydrogenase being a target. *FEBS Open Bio [Internet].*

- 2014;4:77–89.
245. Sharpe MA, Ollosson R, Stewart VC, Clark JB. Oxidation of nitric oxide by oxomanganese-salen complexes: a new mechanism for cellular protection by superoxide dismutase/catalase mimetics. *Biochem J.* 2002;366(Pt 1):97–107.
 246. Himori K, Abe M, Tatebayashi D, Lee J, Westerblad H, Lanner JT, et al. Superoxide dismutase/catalase mimetic EUK-134 prevents diaphragm muscle weakness in monocrotalin-induced pulmonary hypertension. *PLoS One.* 2017;12(2):e0169146.
 247. Kumar A, Shukla S, Chauhan AK, Singh D, Pandey HP, Singh C. The manganese-salen compound EUK-134 and N-acetyl cysteine rescue from zinc- and paraquat-induced toxicity in rat polymorphonuclear leukocytes. *Chem Biol Interact.* 2015;231:18–26.
 248. Pescador R, Capuzzi L, Mantovani M, Fulgenzi A, Ferrero ME. Defibrotide: Properties and clinical use of an old/new drug. *Vascul Pharmacol.* 2013;59(1–2):1–10.
 249. Richardson PG, Carreras E, Iacobelli M, Nejadnik B. The use of defibrotide in blood and marrow transplantation. *Blood Adv.* 2018;2(12):1495–509.
 250. Coccheri S, Andreozzi GM, D'Addato M, Gensini GF. Effects of defibrotide in patients with chronic deep insufficiency. The PROVEDIS study. *Int Angiol.* 2004;23(2):100–7.
 251. Violi F, Marubini E, Coccheri S, Nenci GG. Improvement of walking distance by defibrotide in patients with intermittent claudication—results of a randomized, placebo-controlled study (the DICLIS study). *Defibrotide Intermittent CLaudication Italian Study.* *Thromb Haemost.* 2000;83(5):672–7.
 252. www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/.../WC500153150.pdf. [Internet]. [Último acceso 15 octubre 2019]
 253. Corbacioglu S, Kernan N, Lehmann L, Brochstein J, Revta C, Grupp S, et al. Defibrotide for the treatment of hepatic veno-occlusive disease in children after hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Rev Hematol.* 2012;5(3):291–302.
 254. Palomo M, Mir E, Rovira M, Escolar G, Carreras E, Diaz-Ricart M. What is going on between defibrotide and endothelial cells? Snapshots reveal the hot spots of their romance. *Blood.* 2016;127(13):1719–27.
 255. Palomo M, Diaz-Ricart M, Rovira M, Escolar G, Carreras E. Defibrotide Prevents the Activation of Macrovascular and Microvascular Endothelia Caused by Soluble Factors Released to Blood by Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011;17(4):497–506.
 256. Signorini L, Granata S, Lupo A, Zaza G. Naturally occurring compounds: New potential weapons against oxidative stress in chronic kidney disease. *Int J Mol Sci.* 2017;18(7):1481. DOI: 10.3390/ijms18071481
 257. Teixeira G, Szyndralewicz C, Molango S, Carnesecchi S, Heitz F, Wiesel P, et al. Therapeutic potential of NADPH oxidase 1/4 inhibitors. *Br J Pharmacol.* 2017;174(12):1647–69.
 258. Brandes RP, Weissmann N, Schröder K. Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Free Radic Biol Med.* 2014;76:208–26.
 259. Altenhöfer S, Radermacher KA, Kleikers PWM, Wingler K, Schmidt HHHW. Evolution

- of NADPH Oxidase Inhibitors: Selectivity and Mechanisms for Target Engagement. *Antioxid Redox Signal*. 2015;23(5):406–27.
260. Baigent C, Landray MJ, Reith C, Emberson J, Wheeler DC, Tomson C, et al. The effects of lowering LDL cholesterol with simvastatin plus ezetimibe in patients with chronic kidney disease (Study of Heart and Renal Protection): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2011 Jun;377(9784):2181–92.
 261. Zoccali C, Vanholder R, Massy ZA, Ortiz A, Sarafidis P, Dekker FW, et al. The systemic nature of CKD. *Nat Rev Nephrol*. 2017;13(6):344–58.
 262. Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, Metzger T, Wanner C. Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int*. 1999;55(2):648–58.
 263. Stenvinkel P. New insights on inflammation in chronic kidney disease-genetic and non-genetic factors. *Nephrol Ther*. 2006;2(3):111–9.
 264. Takano-Ishikawa Y, Goto M, Yamaki K. Inhibitory Effects of Several Flavonoids on E-selectin Expression on Human Umbilical Vein Endothelial Cells Stimulated by Tumor Necrosis Factor- α . *Phytother Res*. 2003;17(10):1224–7.
 265. Chao C-T Ter, Chiang C-KK. Uremic toxins, oxidative stress, and renal fibrosis: An intertwined complex. *Journal of Renal Nutrition*. 2015;25(2):155–9.
 266. Annuk M, Fellstrom B, Akerblom O, Zilmer K, Vihalemm T, Zilmer M. Oxidative stress markers in pre-uremic patients. *Clin Nephrol*. 2001;56(4):308–14.
 267. Gerritsen ME, Carley WW, Ranges GE, Shen CP, Phan SA, Ligon GF, et al. Flavonoids inhibit cytokine-induced endothelial cell adhesion protein gene expression. *Am J Pathol*. 1995;147(2):278–92.
 268. Read MA. Flavonoids: naturally occurring anti-inflammatory agents. *Am J Pathol*. 1995;147(2):235–7.
 269. Wang J, Liao Y, Fan J, Ye T, Sun X, Dong S. Apigenin inhibits the expression of IL-6, IL-8, and ICAM-1 in DEHP-stimulated human umbilical vein endothelial cells and in vivo. *Inflammation*. 2012;35(4):1466–76.
 270. Siow RCM, Li FYL, Rowlands DJ, de Winter P, Mann GE. Cardiovascular targets for estrogens and phytoestrogens: transcriptional regulation of nitric oxide synthase and antioxidant defense genes. *Free Radic Biol Med*. 2007;42(7):909–25.
 271. Palmieri D, Perego P, Palombo D. Apigenin inhibits the TNF α -induced expression of eNOS and MMP-9 via modulating Akt signalling through oestrogen receptor engagement. *Mol Cell Biochem*. 2012;371(1–2):129–36.
 272. Duni A, Liakopoulos V, Rapsomanikis K-P, Dounousi E. Chronic Kidney Disease and Disproportionally Increased Cardiovascular Damage: Does Oxidative Stress Explain the Burden? *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:9036450.
 273. Roxborough HE, Mercer C, McMaster D, Maxwell AP, Young IS. Plasma glutathione peroxidase activity is reduced in haemodialysis patients. *Nephron*. 1999;81(3):278–83.
 274. Stenvinkel P, Ekstöm TJ. Epigenetics and the Uremic Phenotype: A Matter of Balance. *Contrib Nephrol*. 2008;161: 55–62.

275. Scherer A, Günther OP, Balshaw RF, Hollander Z, Wilson-Mcmanus J, Ng R, et al. Alteration of human blood cell transcriptome in uremia. *BMC Med Genomics*. 2013;6:23. DOI: 10.1186/1755-8794-6-23
276. Cheng L, Yonggui W. Co-expression analysis of blood cell genome expression to preliminary investigation of regulatory mechanisms in Uremia. *Med Sci Monit*. 2017;23:38–45.
277. Matouk CC, Marsden PA. Epigenetic regulation of vascular endothelial gene expression. *Circ Res*. 2008;102(8):873–87.
278. Saha A, Wittmeyer J, Cairns BR. Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(6):437–47.
279. McKinsey TA. Therapeutic Potential for HDAC Inhibitors in the Heart. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2012;52(1):303–19.
280. Cardinale JP, Sriramula S, Pariaut R, Guggilam A, Mariappan N, Elks CM, et al. HDAC Inhibition Attenuates Inflammatory, Hypertrophic, and Hypertensive Responses in Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension*. 2010;56(3):437–44.
281. Christensen D, Dahllof M, Lundh M, Rasmussen DN, Nielsen MD, Billestrup N, et al. Histone deacetylase (HDAC) inhibition as a novel treatment for diabetes mellitus. *Mol Med*. 2011;17(5–6):1.
282. Advani A, Huang Q, Thai K, Advani SL, White KE, Kelly DJ, et al. Long-Term Administration of the Histone Deacetylase Inhibitor Vorinostat Attenuates Renal Injury in Experimental Diabetes through an Endothelial Nitric Oxide Synthase-Dependent Mechanism. *Am J Pathol*. 2011;178(5):2205–14.
283. Gray SG, Ekström TJ. The Human Histone Deacetylase Family. *Exp Cell Res*. 2001;262(2):75–83.
284. Demyanenko S, Neginskaya M, Berezhnaya E. Expression of Class I Histone Deacetylases in Ipsilateral and Contralateral Hemispheres after the Focal Photothrombotic Infarction in the Mouse Brain. *Transl Stroke Res*. 2018;9(5):471–83.
285. Zhu Y, Vidaurre OG, Adula KP, Kezunovic N, Wentling M, Huntley GW, et al. Subcellular distribution of HDAC1 in neurotoxic conditions is dependent on serine phosphorylation. *J Neurosci*. 2017;37(31):7547–59.
286. Hanigan TW, Taha TY, Aboukhatwa SM, Frasor J, Petukhov PA. Scaffold dependent histone deacetylase (HDAC) inhibitor induced re-equilibration of the subcellular localization and post-translational modification state of class I HDACs. *PLoS One*. 2017;12(10):1–18.
287. Kim JY, Casaccia P. HDAC1 in axonal degeneration: A matter of subcellular localization. *Cell Cycle*. 2010;9(18):3680–4.
288. Hyndman KA, Ho DH, Sega MF, Pollock JS. Histone deacetylase 1 reduces NO production in endothelial cells via lysine deacetylation of NO synthase 3. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2014;307(5):803–9.
289. Chen L -f., Fischle W, Verdin E, Greene WC. Duration of Nuclear NF-kappa B Action Regulated by Reversible Acetylation. *Science*. 2001;293(5535):1653–7.
290. Roger T, Lugin J, Le Roy D, Goy G, Mombelli M, Koessler T, et al. Histone deacetylase inhibitors impair innate immune responses to Toll-like receptor agonists

- and to infection. *Blood*. 2011 117(4):1205–17.
291. Bode KA, Schroder K, Hume DA, Ravasi T, Heeg K, Sweet MJ, et al. Histone deacetylase inhibitors decrease Toll-like receptor-mediated activation of proinflammatory gene expression by impairing transcription factor recruitment. *Immunology*. 2007;122(4):596–606.
 292. Halili MA, Andrews MR, Labzin LI, Schroder K, Matthias G, Cao C, et al. Differential effects of selective HDAC inhibitors on macrophage inflammatory responses to the Toll-like receptor 4 agonist LPS. *J Leukoc Biol*. 2010;87(6):1103–14.
 293. Lee D-Y, Lee C-I, Lin T-E, Lim SH, Zhou J, Tseng Y-C, et al. Role of histone deacetylases in transcription factor regulation and cell cycle modulation in endothelial cells in response to disturbed flow. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(6):1967–72.
 294. Zampetaki A, Zeng L, Margariti A, Xiao Q, Li H, Zhang Z, et al. Histone deacetylase 3 is critical in endothelial survival and atherosclerosis development in response to disturbed flow. *Circulation*. 2010;121(1):132–42.
 295. New M, Olzscha H, La Thangue NB. HDAC inhibitor-based therapies: Can we interpret the code? *Mol Oncol*. 2012;6(6):637–56.
 296. Hebbel RP. Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Adhesive interactions of sickle erythrocytes with endothelium. *J Clin Invest*. 1997;99(11):2561–4.
 297. Inoue K, Kobayashi M, Yano K, Miura M, Izumi A, Mataka C, et al. Histone Deacetylase Inhibitor Reduces Monocyte Adhesion to Endothelium Through the Suppression of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(12):2652–9.
 298. Hebbel RP, Vercellotti GM, Pace BS, Solovey AN, Kollander R, Abanonu CF, et al. The HDAC inhibitors trichostatin A and suberoylanilide hydroxamic acid exhibit multiple modalities of benefit for the vascular pathobiology of sickle transgenic mice. *Blood*. 2010;115(12):2483–90.

9. ANEXO

PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES RELACIONADAS CON LA TEMÁTICA DE LA TESIS DOCTORAL

La línea de trabajo en la que está incluida esta TD disfunción endotelial en la uremia ha permitido la participación del doctorando en la publicación de distintos artículos aparte de los ya incluidos en la memoria de esta TD, y en presentaciones en forma de comunicación oral o póster en congresos durante los últimos años:

ARTÍCULOS en los que ha participado el doctorando:

1.- Torramade-Moix, Sergi; Palomo, Marta; **Vera, Manel**; Jerez-Dolz, Didac; Garcia-Pagan, Joan-Carles; Escolar, Gines; Cases, Aleix; Diaz-Ricart, Maribel. Apixaban downregulates endothelial inflammatory and prothrombotic phenotype in an in vitro model of endothelial dysfunction in uremia. *Submitted.*

2.- Susana Martin-Rodriguez, Carolina Caballo, Gabriela Gutierrez, **Manel Vera**, Josep Maria Cruzado, Aleix Cases, Ginés Escolar, Maribel Diaz-Ricart. TLR4 and NALP3 inflammasome in the development of endothelial dysfunction in uremia. *Eur J Clin Invest.* 2015 Feb; 45 (2):160-9.

3.- Caballo C, Palomo M, Cases A, Molina P, **Vera M**, Hernández R, Bosch X, Escolar G, Diaz-Ricart M. NFκB in the development of endothelial activation and damage in uremia: an vitro approach. *PLoS One.* 2012; 7(8):e43374.

COMUNICACIONES EN CONGRESOS:

ÁMBITO INTERNACIONAL

1.-Endothelial damage in chronic kidney disease is mediated through histone deacetylase upregulation and can be prevented by defibrotide. Oral communication. Aleix Cases, **Manel Vera**, Marta Palomo, Sergi Torramade, Gines Escolar, Maribel Diaz-Ricart. 56th ERA-EDTA Congress. 13th-16th June 2019. Budapest.

2.-Direct factor Xa Inhibitor apixaban prevents endothelial activation and damage associated with chronic kidney disease. Poster Communication. Aleix Cases, **Manel Vera**, Marta Palomo, Sergi Torramade, Gines Escolar, Maribel Diaz-Ricart. 54th ERA-EDTA Congress. June 6th-9th 2017. Madrid.

3.-Antioxidant and anti-inflammatory strategies to prevent endothelial dysfunction in chronic kidney disease: the role of N-acetyl cysteine. Poster Communication A. Cases, **M.Vera**, M. Palomo, S. Martin, JM Cruzado, M. Diaz-Ricart. 53rd Congress ERA-EDTA May 21th-24th 2016. Viena.

4.-Involvement of TLR4 and NALP3 inflammasome in the development of endothelial dysfunction in peritoneal dialysis patients. Poster Communication. **Manel Vera**, Susana Martin, Carolina Caballo, Patricia Molina, Gabriela Gutiérrez, Ginés Escolar, Aleix Cases, Maribel Diaz-Ricart. 12th European Peritoneal Dialysis Meeting. 2nd-5th October 2015. Krakow (Poland).

5.-Uremic Medium induces changes in the expression of genes related to inflammation and atherothrombosis. Oral Communication. **Manel Vera**, Susana Martín, Carolina Caballo, Gabriela Gutiérrez, Josep Maria Cruzado, Ginés Escolar, Maribel Diaz-Ricart, Aleix Cases. 52nd ERA-EDTA Congress. May 28th-31th 2015. London

6.-Involvement of TLR4 and NALP3 inflammasome in the development of endothelial dysfunction in peritoneal dialysis patients. Poster Comunicación. **Manel Vera**, Susana Martin, Carolina Caballo, Patricia Molina, Gabriela Gutiérrez, Ginés Escolar, Aleix Cases, Maribel Diaz-Ricart. 5th Congress of the International Society for Peritoneal Dialysis. 7th-10th September 2014, Madrid.

ÁMBITO NACIONAL

1.-Cambios epigenéticos en el desarrollo de disfunción endotelial en la insuficiencia renal crónica. Efecto protector de defibrotide. Comunicación oral. A. Cases, **M.Vera**, M. Palomo, G. Escolar, M. Diaz-Ricart. XLVII Congreso Nacional de la S.E.N y IX Congreso Iberoamericano de Nefrología. Madrid 16-19 noviembre 2018. **PREMIO A LA MEJOR COMUNICACIÓN ORAL**.

2.-El inhibidor directo del factor Xa apixaban previene la activación y daño endoteliales asociados a la uremia". Comunicación oral. A. Cases, **M.Vera**, M.Palomo, S.Torramadé, G.Escolar, M.Diaz-Ricart. XLVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nefrología. Burgos; 6-11 octubre 2017.

3.- Estrategias antioxidantes y anti-inflamatorias para prevenir la disfunción endotelial en la enfermedad renal crónica en un modelo in vitro. Comunicación oral. A.Cases, **M. Vera**, M. Palomo, S.Martín-Rodríguez, JM Cruzado, G.Escolar, M.Diaz-Ricart. XLVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nefrología. Oviedo; 8-11 octubre 2016.

4.-Mejora de la disfunción endotelial en la uremia mediante flavonoides y antioxidantes sintéticos. Comunicación oral. Cases A, **Vera M**, S. Martin, C. Caballo, G. Gutiérrez, JM Cruzado, G. Escolar, M. Diaz-Ricart. XLV

Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nefrología. Valencia 3-6; octubre 2015.

5.-El medio urémico induce cambios en la expresión de los genes relacionados con la inflamación y la aterotrombosis. Comunicación oral. **Vera M**, Martin S, Caballo C, Gutiérrez G, Cruzado JM, Escolar G, Diaz-Ricart M, Cases A. XLV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nefrología. Valencia 3-6; octubre 2015.

6.- Papel del TLR4 y del inflamasoma NALP3 en el desarrollo de la disfunción endotelial en pacientes en diálisis peritoneal. Comunicación oral. **M. Vera**, S. Martin, C. Caballo, P. Molina, G. Gutiérrez, M. Diaz-Ricart, G. Escolar, JM Cruzado, A. Cases. XLIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nefrología. Barcelona; 4-7 de octubre de 2014.

7.- Papel del TLR4 y del inflamasoma NALP3 en el desarrollo de la disfunción endotelial en pacientes en hemodiálisis. Comunicación oral. **M. Vera**, S. Martin, C. Caballo, P. Molina, G. Gutiérrez, M. Diaz-Ricart, G. Escolar, JM Cruzado, Alex Cases. XLIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nefrología. Barcelona; 4-7 de octubre de 2014.

