



**universidad
de león**



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**LA MICROBIOTA COMO MODULADOR DE LA
ACCIÓN DE TLR4 EN LA ENFERMEDAD RENAL
CRÓNICA**

**THE MICROBIOTA AS A MODULATOR OF
TLR4 ACTION IN CHRONIC KIDNEY DISEASE**

Autor: Juan de la Puente Aldea

Tutores: María Victoria García Mediavilla y Roberto
Palacios Ramírez

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Julio, 2023

Índice

Página

Resumen	
Abreviaturas	
1. Introducción	1
1.1. Mecanismos de la enfermedad renal crónica.....	4
1.1.1. <i>Inflamación</i>	4
1.1.2. <i>Estrés oxidativo</i>	5
1.1.3. <i>Fibrosis</i>	6
1.1.4. <i>Procesos asociados</i>	7
1.2. Microbiota intestinal.....	8
1.2.1. <i>Disbiosis intestinal</i>	8
1.2.2. <i>Barrera intestinal</i>	10
1.3. TLR4	11
1.3.1. <i>Estructura y función</i>	11
1.3.2. <i>Regulación de TLR4</i>	12
1.3.3. <i>Los PAMPs y los DAMPs</i>	13
2. Hipótesis y objetivos	14
3. Métodos	15
4. Resultados	16
4.1. Microbiota: fisiología y patofisiología en la enfermedad renal crónica	16
4.1.1. <i>Toxinas urémicas</i>	16
4.1.2. <i>Ácidos grasos de cadena corta</i>	18
4.1.3. <i>Relación de la microbiota con la inflamación, estrés oxidativo y fibrosis</i>	19
4.1.4. <i>Intervenciones dirigidas a modular la microbiota intestinal</i>	21
4.2. Relación de TLR4 con la inflamación, el estrés oxidativo y la fibrosis	22
5. Discusión	25
6. Conclusiones	26
7. Referencias.....	27

Resumen

La enfermedad renal crónica (ERC) es una patología multifactorial que se prevé como la quinta causa de muerte global en 2040. Se caracteriza por un ambiente proinflamatorio, prooxidativo y profibrótico en los riñones que conduce a una pérdida de la función renal. Estas condiciones pueden desarrollarse a través de la activación del receptor TLR4, cuyo principal ligando son los lipopolisacáridos (LPS). Por otro lado, la microbiota intestinal tiene una población de bacterias extremadamente compleja, entre las que encontramos bacterias Gram negativas con LPS. Bajo ciertas condiciones se puede originar una disbiosis intestinal junto a un aumento de la permeabilidad de la barrera intestinal, que permite una filtración de material bacteriano al torrente sanguíneo, generando un estado inflamatorio constante de bajo grado que va a contribuir a la progresión de la ERC. El objetivo general es explorar, mediante una revisión bibliográfica, el papel de la microbiota intestinal y del receptor TLR4 en el desarrollo y la evolución de la ERC. Los resultados obtenidos permiten concluir que el LPS derivado de la existencia de disbiosis intestinal y la subsecuente alteración de la barrera intestinal puede contribuir al desarrollo de la ERC por la activación de TLR4, existiendo una retroalimentación de disbiosis derivada de la disfunción renal. Situando a la microbiota intestinal como una potencial diana terapéutica para el tratamiento de la ERC.

Palabras clave: enfermedad renal crónica, microbiota, TLR4.

Abstract

Chronic kidney disease (CKD) is a multifactorial disorder projected to be the fifth main cause of death worldwide by 2040. It is characterized by a proinflammatory, prooxidative and profibrotic environment in the kidneys, leading to a decline in renal function. These conditions can arise through TLR4 activation, whose main ligands are lipopolysaccharides (LPS). On the other hand, the intestinal microbiota is an extremely complex population of bacteria, including Gram-negative bacteria containing LPS. Under certain conditions, intestinal dysbiosis can occur along with increased permeability of the intestinal barrier, allowing bacterial material leakage into the bloodstream. This will eventually lead to a chronic low-grade inflammatory status that contributes to the progression of CKD. The overall objective is to explore, through a literature review, the role of the intestinal microbiota and the TLR4 receptor in the development and progression of CKD. The obtained results allow us to conclude that the LPS derived from the presence of intestinal dysbiosis and the subsequent alteration of the intestinal barrier can contribute to the development of CKD through the activation of TLR4, with a feedback loop of dysbiosis resulting from renal dysfunction. Positioning the intestinal microbiota as a potential therapeutic target for the treatment of CKD.

Keywords: chronic kidney disease, microbiota, TLR4.

Abreviaturas

AGCC: ácidos grasos de cadena corta.
AMPK: proteína quinasa activada por adenosina monofosfato cíclico.
AngII: angiotensina II.
ARM: antagonistas del receptor mineralocorticoide.
CCL5: quimiocina (motivo CC) ligando 5.
CD: clúster de diferenciación.
DT1: diabetes mellitus tipo 1.
DT2: diabetes mellitus tipo 2.
ECA: encima convertidora de angiotensina
ECA2: encima convertidora de angiotensina 2.
EO: estrés oxidativo.
ERA: enfermedad renal aguda.
ERC: enfermedad renal crónica.
ERD: enfermedad renal diabética.
ERN: especies reactivas de nitrógeno.
ERO: especies reactivas de oxígeno.
FGF23: factor de crecimiento de fibroblastos 23.
GPR: receptor acoplado a las proteínas G.
HIF: factor inducible por hipoxia.
IAA: ácido 3-indolacético.
IFN: interferón.
IL: interleucina.
LPS: lipopolisacáridos.
MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno.
MEX: matriz extracelular.
MyD88: proteína 88 de respuesta primaria de diferenciación mieloide.
NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.
NF- κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.
NLRP: receptor tipo NOD que contiene el dominio pirina.
NOD: dominio de oligomerización de unión a nucleótidos.
NOS: óxido nítrico sintasa.
NOX: NADPH oxidasa.
Olf: receptor olfatorio.
RAAS: sistema renina-angiotensina-aldosterona.
SI: sulfato de indoxilo.
SMet: síndrome metabólico.
SpC: sulfato de p-cresilo.
TGF: factor de crecimiento transformante.
TIRAP: proteína adaptadora que contiene el dominio TIR.
TLR: receptor similar a Toll (*Toll like receptor*).
TMA: trimetilamina.
TMAO: N-óxido de trimetilamina.
TNF: factor de necrosis tumoral.
TRAF: factor asociado al receptor TNF.
TRAM: molécula adaptadora asociada a TRIF.
TRIF: proteína adaptadora que induce interferón- β y contiene el dominio TIR.
TRS: terapia renal sustitutiva.

1. Introducción

Los riñones son órganos de unos 150 g con forma de habichuela encargados de regular la presión arterial, la producción de eritrocitos, el equilibrio hídrico, electrolítico y ácido-base, la osmolaridad y la vitamina D activa, además de excretar sustancias tóxicas mediante la generación de orina por la filtración de la sangre y la secreción de hormonas y enzimas (Vidal Riella *et al.*, 2016). La unidad funcional de riñón es la nefrona, la cual no tiene capacidad de regenerarse. Con la edad o por otras alteraciones, se produce la pérdida de nefronas, que inicialmente se puede compensar con la hiperfunción del resto de nefronas, pero si se mantiene el sobreesfuerzo puede desencadenar una insuficiencia renal (Arroyo y Gamba, 2014). En las fases más avanzadas de la enfermedad es necesario sustituir la función renal. La terapia renal sustitutiva (TRS) está constituida por la diálisis, dividiéndose a su vez en hemodiálisis y diálisis peritoneal, y el trasplante de riñón, con la consecuente inmunosupresión asociada y lo que ello conlleva (Vanholder *et al.*, 2022).

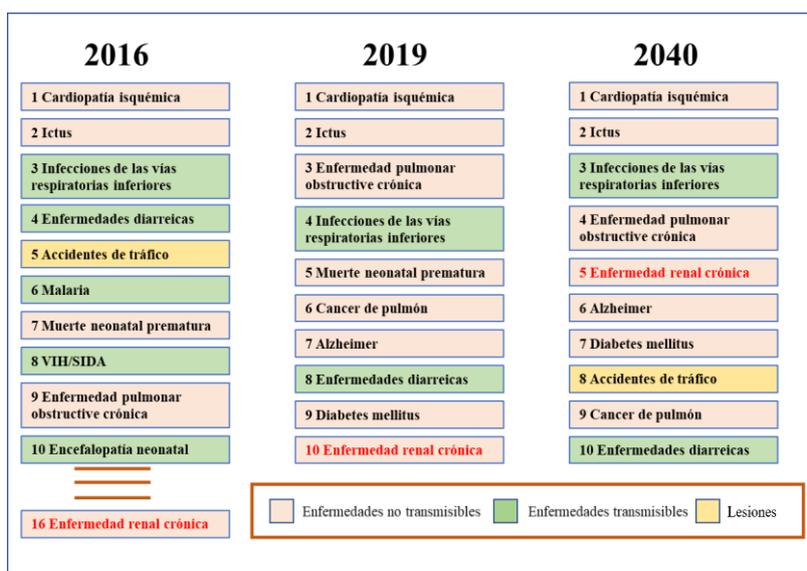


Figura 1. Evolución de las principales causas de mortalidad de nivel global (adaptado de Foreman *et al.*, 2018).

La enfermedad renal crónica (ERC) es una de las enfermedades no transmisibles más importantes que fue la decimosexta causa de muerte en 2016 y se espera que en 2040 se sitúe en quinta posición, por delante del alzhéimer, los accidentes de tráfico, la diabetes mellitus o el virus de la inmunodeficiencia humana (Figura 1), causando entre 2,2 y 4 millones de muertes ese año (Foreman *et al.*, 2018). El número de casos a nivel global por la ERC en 2017 fue de 843,6 millones (Kovesdy, 2022) y 1,2 millones de muertos (*Global Burden of Disease Chronic Kidney Disease Collaboration*, 2020). A nivel europeo la ERC causa unas 130.000 muertes anualmente (Vanholder *et al.*, 2022), concretamente en España la prevalencia es de un 15,1%, es decir, afecta a una de cada 7 personas (Gorostidi *et al.*, 2018). Para el año 2030 se espera que

5,4 millones de personas reciban TRS y que entre 2,3 y 7,1 millones de personas mueran por no tener acceso a estos tratamientos (*Global Burden of Disease Chronic Kidney Disease Collaboration, 2020*).

Los pacientes con ERC sufren fatiga, desórdenes sexuales, estrés emocional, dolor, malestar y problemas de salud mental, además de una alta carga de medicamentos. Para los sistemas de salud la detección, prevención y tratamiento de la ERC supone un gasto de recursos muy elevado, estimándose en 80.000 € anuales un tratamiento para un paciente de hemodiálisis. Además, la diálisis es un tratamiento que consume grandes cantidades de agua y energía, causando no solo un daño para la salud de las personas, sino también para el medio ambiente. De todas formas, la ERC no recibe la atención que merece y sigue habiendo mucho margen de mejora de las terapias actuales, ya que en los últimos 20 años no han mejorado las cifras de mortalidad (*Vanholder et al., 2022*).

La ERC está asociada con una reducción en la tasa de filtración glomerular (TFG), pero no se puede definir si una persona tiene ERC solo por este factor ya que produciría un sobrediagnóstico, puesto que el envejecimiento también reduce la TFG y puede ser una persona completamente sana (*Glassock y Rule, 2016*). La ERC consiste en una pérdida gradual de la función renal durante un periodo de meses o años (*He et al., 2017*). De todas formas, la TFG junto con los valores de proteinuria y albúmina en suero son unos parámetros muy útiles para describir el estado de la ERC, diferenciando 5 etapas (Tabla 1) y la etapa final de la enfermedad renal, donde son necesarias terapias sustitutorias (*Global Burden of Disease Chronic Kidney Disease Collaboration, 2020*). En la etapa final de la ERC (EFER) se produce una fibrosis del órgano. Los tratamientos actuales no son suficientemente efectivos como para frenar la evolución de la enfermedad (*Kuppe et al., 2020*).

Tabla 1. Clasificación de las etapas de la enfermedad crónica renal (ERC) en función de la estimación de tasa de filtración glomerular (eTFG) (*Global Burden of Disease Chronic Kidney Disease Collaboration, 2020*).

ERC etapa 1	eTFG \geq 90 ml/min por 1,73 m ²
ERC etapa 2	eTFG 60-89 ml/min por 1,73 m ²
ERC etapa 3	eTFG 30-59 ml/min por 1,73 m ²
ERC etapa 4	eTFG 15-29 ml/min por 1,73 m ²
ERC etapa 5	eTFG < 15 ml/min por 1,73 m ²

Entre las principales causas de ERC se encuentran la diabetes mellitus, siendo la enfermedad renal diabética (ERD) la primera causa de ERC en países desarrollados (*Alicic et al., 2017; Liu et al., 2021b*); las enfermedades cardiovasculares, destacando la hipertensión; y la

glomerulonefritis (Foreman *et al.*, 2018), pero también tienen suma importancia el daño renal agudo (ERA) (He *et al.*, 2017), el síndrome metabólico (SMet) (El-Domiaty *et al.*, 2022), agentes nefrotóxicos, como por ejemplo, toxinas urémicas producidas por la microbiota (Lohia *et al.*, 2022), alteraciones autoinmunes o hereditarias, infecciones, el calentamiento global, contaminación o efectos secundarios de tratamientos contra el cáncer (Vanholder *et al.*, 2022). Por último, existen otros factores de riesgo que empeoran el diagnóstico, destacando la edad, las drogas, fumar, el sedentarismo, la dieta, el índice de masa corporal, un ambiente insalubre o el sexo, presentando los hombres un desarrollo de la enfermedad más rápido que las mujeres (*Global Burden of Disease Chronic Kidney Disease Collaboration*, 2020).

El sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS), regulado en parte por la secreción de renina en las células granulosas del riñón, está implicado en una gran cantidad de funciones. Podemos destacar que mediante RAAS se regula la presión arterial, el volumen extracelular y la homeostasis sodio-potasio, pero una sobreactivación de este sistema puede producir hipertensión, un aumento de la proliferación celular, estrés oxidativo (EO), inflamación, fibrosis y cambios en la expresión de genes, produciendo daños, especialmente en el riñón y el sistema cardiovascular (Patel *et al.*, 2017; Ames *et al.*, 2018). En la actualidad, una de las pocas opciones para el tratamiento de la ERC es el bloqueo del RAAS. Esto se puede realizar con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), antagonistas de los receptores de angiotensina II (AngII) o antagonistas del receptor mineralocorticoide (ARM). Algunos de los tratamientos en desarrollo son los inhibidores directos de renina, la enzima convertidora de AngII (ACE2) recombinante, encargada de convertir la AngII en angiotensina 1-7 (Ames *et al.*, 2018) o el fármaco diminazeno aceturato que activa ACE2, mostrando efectos reno-protectores en el SMet, reduciendo los niveles de AngII, generando una reducción en la inflamación, vasoconstricción, fibrosis y EO (El-Domiaty *et al.*, 2022).

Ha quedado demostrado que la sobreactivación del receptor mineralocorticoide tiene efectos negativos en el riñón (Nakamura *et al.*, 2022), mientras que los ARM han mostrado reducir la albuminuria y fibrosis renal y prevenir la inflamación en la ERC diabética (Palacios-Ramírez *et al.*, 2022). Los ARM clásicos tienen origen esteroideo, se han desarrollado nuevos ARM no esteroideos que, se espera, tendrán menos efectos secundarios que los primeros, aunque también menos potencia, como es el caso de la finerenona. Este compuesto ha demostrado ser capaz de prevenir el desarrollo de la ERC, reduciendo el riesgo cardiovascular en pacientes con ERC o diabetes mellitus tipo 2 (DT2) (Bakris *et al.*, 2020; Filippatos *et al.*, 2022). Incluso tratamientos antidiabéticos han mostrado ser beneficiosos para la ERC, como los inhibidores del

cotransportador 2 sodio-glucosa que incrementan la secreción de glucosa y sodio. Esto reduce la presión sanguínea, mejora la sensibilidad a insulina y funcionamiento células β , y reduce la inflamación y EO renal (Tang y Yiu, 2020).

1.1. Mecanismos de la enfermedad renal crónica

La inflamación es el pilar fundamental de la ERC (Kimura *et al.*, 2017; Andrade-Oliveira *et al.*, 2019), a su vez el EO y la fibrosis juegan un papel esencial en su desarrollo y su patogénesis (Duni *et al.*, 2019; Kuppe *et al.*, 2020). También, existen otros procesos que están relacionados con esta patología, como son la autofagia (Kimura *et al.*, 2017), la hipoxia (Wang *et al.*, 2022) o diferentes tipos de muerte celular, como puede ser la piroptosis (Liu *et al.*, 2021b).

1.1.1. Inflamación

La inflamación tiene como objetivo la reparación de un tejido o la defensa frente a ciertos patógenos invasores (Ciesielska *et al.*, 2021). Una serie de situaciones de estrés en el riñón pueden activar a las células del sistema inmune, liberando mediadores inflamatorios para restaurar la homeostasis, pero se puede producir una interacción con las células renales causando un daño renal grave (Andrade-Oliveira *et al.*, 2019). Estas situaciones de estrés pueden ser causadas por isquemia, hipertensión, hiperglicemia, agresiones químicas, una elevada concentración de proteínas, sobreactivación del RAAS, disbiosis intestinal, una infección crónica, hiperuricemia, etc. (Kimura *et al.*, 2017; Andrade-Oliveira *et al.*, 2019; Jung *et al.*, 2020; Holle *et al.*, 2022). Los receptores similares a Toll (TLR) y los receptores similares al dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD) son esenciales para activar las vías que liberan los mediadores proinflamatorios (Andrade-Oliveira *et al.*, 2019).

El que una serie de factores estresantes desencadene ERC depende del balance pro- y anti-inflamatorio (Sato *et al.*, 2018). En la ERA existe una fase inicial inflamatoria y de daño tisular, donde las células T CD4⁺ liberan interferón (IFN) γ y los macrófagos M1 median la destrucción y liberan interleucina (IL) 6 y factor de necrosis tumoral (TNF) α , compuestos asociados con una rápida pérdida de la función renal y riesgo cardiovascular. Posteriormente, en una fase tardía, se resuelve la inflamación y se produce la reparación, en la que participan los macrófagos M2 y los linfocitos T reguladores (Treg), liberando IL-10. Una inflamación aberrante en la ERC afecta a la segunda fase, limitando la reparación y llegada de los macrófagos M2, predisponiendo los riñones a la inflamación y daño tisular (He *et al.*, 2017; Sato *et al.*, 2018). En ciertos casos, la ERA puede ser una potencial causa de desarrollo de ERC o riesgo

cardiovascular, al no recuperarse la función renal al completo y desarrollarse una inflamación crónica y fibrosis anormal (Vázquez-Carballo *et al.*, 2021).

Los diversos factores estresantes dañan las células tubulares, que actuarán como una fuente de citoquinas proinflamatorias, quimiocinas y factores profibróticos (Sato *et al.*, 2018). También, el estrés provoca la liberación del ácido araquidónico en las células, compuesto que va a ser metabolizado por la vía de la ciclooxigenasa (COX), de la lipooxigenasa o vía citocromo P450, produciendo compuestos como prostaglandinas, leucotrienos o ácido epoxieicosatrienoico respectivamente, que generarán daño inflamatorio en el riñón (Wang *et al.*, 2019). Las bacterias, patógenos o sus endotoxinas pueden activar una muerte celular programada que incluye la liberación de los mediadores inflamatorios IL-1 β e IL-18, conocida como piroptosis, la cual tiene especial importancia en la enfermedad renal (Liu *et al.*, 2021b). La hiperuricemia puede desencadenar una respuesta inflamatoria al activar el inflamasoma receptor tipo NOD que contiene el dominio pirina (NLRP) 3 en macrófagos, liberando IL-1 β e IL-18, estimulando las células T CD8⁺ y la diferenciación de células T CD4⁺ en células T colaboradoras (Th) 17, liberando IL-17A. En este proceso participan las vías de las proteínas kinasa activadas por mitógeno (MAPKs), el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B), AngII, TLR2, TLR4, receptor de renina y COX2 (Jung *et al.*, 2020). Incluso factores de riesgo como la edad conllevan niveles sistémicos inflamatorios crónicos, desregulación de la inflamación y desarrollo del tejido linfoide terciario (Sato *et al.*, 2018).

Lo que se quiere indicar, es que la naturaleza de la inflamación crónica en la ERC está representada por una tormenta de citoquinas inflamatorias e IFN, en respuesta a muchas condiciones adversas que conducen a la infiltración de células inflamatorias en el riñón (He *et al.*, 2017; Jung *et al.*, 2020). Destacando la participación de la vía NF- κ B y el inflamasoma NLRP3 (Andrade-Oliveira *et al.*, 2019), se desencadena una inflamación crónica renal y glomerulonefritis, que causa la pérdida de nefronas, proteinuria, empeora la TFG (Kimura *et al.*, 2017), produce un remodelado anormal y disfunción renal (Sato *et al.*, 2018).

1.1.2. Estrés oxidativo

El EO se define como un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN), y la activación de mecanismos antioxidantes del organismo, lo que provoca daño oxidativo en células, tejidos y órganos debido a la oxidación de varios tipos de moléculas como proteínas o ADN (Daenen *et al.*, 2018; Duni *et al.*, 2019). Las mitocondrias son los principales productores de ERO y el riñón es un órgano muy energético, además de que las ERO participan en la regulación de la función renal, por lo

que el riñón es especialmente susceptible al EO, existiendo una asociación entre el EO y la progresión de la enfermedad renal (Daenen *et al.*, 2018). Durante la ERC existe una disfunción mitocondrial; aumenta la actividad de otras enzimas productoras de ERO como es la NADPH oxidasa (NOX); disminuye la actividad de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) o se produce un desacoplamiento de la enzima que empieza a funcionar incorrectamente al estar oxidado su cofactor, produciendo EO y disfunción endotelial (defecto de relajación vascular y activación celular) (Daenen *et al.*, 2018). La activación de NOX, la disfunción mitocondrial y activación de RAAS puede ser inducida entre otros factores por el ácido úrico (Jung *et al.*, 2020). También los productos finales de glicosilación avanzada (AGEs) de la diabetes mellitus incrementan la producción de ERO (Panizo *et al.*, 2021). El óxido nítrico (NO) es necesario en el endotelio para la correcta relajación y expresión de genes antioxidantes, y para evitar la apoptosis y la fibrosis en células mesangiales. El EO, la inflamación crónica y la disfunción endotelial acentúan el daño renal y cardiovascular. Adicionalmente, el NO puede reaccionar con el anión superóxido generando peroxinitrito, que es aún más tóxico (Duni *et al.*, 2019).

En los podocitos, especialmente sensibles al EO, el factor de crecimiento transformante (TGF)- β 1 promueve la síntesis de endotelina y sus receptores induciendo daño oxidativo al ADN, y la activación de la vía Wnt/ β -catenina, conduce a la pérdida de podocitos y glomeruloesclerosis. Las vías Wnt y RAAS se estimulan mutuamente, siendo la AngII el estimulador de la producción de ERO. TGF- β 1 también activa NOX2 y NOX4 en los fibroblastos renales y ciertas toxinas urémicas aumentan la producción de ERO. Los compuestos oxidados producidos activan al NF- κ B con la activación inmune que supone, siendo la inflamación crónica una potente fuente de ERO que retroalimentan el EO (Duni *et al.*, 2019). También a través del EO o los niveles altos de glucosa o albúmina se puede estimular la vía intrínseca de apoptosis mediada por la mitocondria (He *et al.*, 2017).

1.1.3. Fibrosis

La fibrosis es el síntoma final de la ERC, consistiendo en una acumulación excesiva de matriz extracelular (MEX) en respuesta a diferentes tipos de heridas en el tejido, que desencadena una degeneración del órgano (Kuppe *et al.*, 2020; Panizo *et al.*, 2021). Estímulos como la inflamación, una herida o golpe, una infección, la ERC, etc. llevan a cabo un reclutamiento de fibroblastos y miofibroblastos que generan fibrosis para restaurar la homeostasis, pero una fibrosis descontrolada es patológica, generando esclerosis y fibrosis tubulointersticial, deteriorando los riñones al romper la estructura y limitar la llegada de sangre por rarefacción

de los capilares y anemia, pudiendo llegar a un fallo renal irreversible (He *et al.*, 2017; Sato *et al.*, 2018; Panizo *et al.*, 2021).

En este proceso, destacan las células inmunes reclutadas por la inflamación crónica que liberan TGF- β 1, un potente factor profibrótico que activa los fibroblastos y pericitos, diferenciándolos a miofibroblastos. Los miofibroblastos son los principales productores de MEX, aunque también contribuye el avance de las células epiteliales a un estado mesenquimal (Kuppe *et al.*, 2020; Panizo *et al.*, 2021; Vázquez-Carballo *et al.*, 2021). TGF- β 1 se genera inicialmente para promover la proliferación celular y la regeneración funcional, pero en las condiciones patológicas mencionadas, aparte de fomentar EO y fibrosis, conduce a la degeneración tubular por autofagia y aumento de daño y muerte celular de los túbulos renales (He *et al.*, 2017). Otros factores que empeoran la fibrosis son la edad, el sexo masculino, la hormona paratiroidea, el factor de crecimiento de fibroblastos 23 (FGF23), la AngII, el TNF- α o los AGEs que forman puentes covalentes con las proteínas de la MEX (Panizo *et al.*, 2021). También durante la ERC se activan ciertas vías que promueven la fibrosis como son la vía Notch, la vía de señalización Hedgehog, el eje Wnt/ β -catenina o el factor inducible por hipoxia (HIF) (He *et al.*, 2017). Por último, debido a la situación actual, se ha observado que el virus SARS-CoV-2 es capaz de infectar organoides de riñón derivados de células madre pluripotentes humanas, provocando daño celular y desencadenando fibrosis (Jasen *et al.*, 2022).

1.1.4. Procesos asociados

La ERC daña la microcirculación renal, lo que reduce el flujo de sangre y genera hipoxia en los tejidos, produciendo la pérdida de la estructura capilar y de nefronas. El EO es otra consecuencia de la necesidad de oxígeno y la fibrosis reduce la eficiencia de difusión de oxígeno, empeorando la hipoxia. La hipoxia estimula la diferenciación de pericitos y fibroblastos a miofibroblastos, desarrollando fibrosis, y genera un metabolismo anaerobio muy ineficiente, perjudicando en especial a las células tubulares proximales, produciendo apoptosis. También activa las células inflamatorias y el HIF, que amplifica la respuesta inmune, promueve la inflamación y limita el gasto de energía (Sato *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2022).

La autofagia es un sistema de degradación intracelular para mantener la homeostasis que tiene ciertos beneficios frente al desarrollo de la ERC. La autofagia evita la acumulación de mitocondrias, la ruptura de lisosomas y la liberación de elementos de daño, tiene un papel protector en los glomérulos frente a la ERD, eliminando AGEs y frente a las tensiones celulares del envejecimiento, y regula la inflamación sistémica por la producción de citoquinas y autoanticuerpos o restringiendo los patógenos (Kimura *et al.*, 2017). Aunque la autofagia se

suele asociar con un papel protector, no contribuye a la recuperación y reparación del órgano en pacientes con ERC, incluso en ciertas situaciones puede ser negativo (He *et al.*, 2017).

Adicionalmente, en la ERC se pueden desarrollar otras comorbilidades como la **enfermedad mineral ósea**, donde la peor función renal genera hiperfosfatemia y falta de vitamina D, lo que altera la absorción de calcio induciendo hiperplasia paratiroidea. Esto induce la desmineralización ósea y produce FGF23. Al final en el hueso se origina remodelación y pérdida de hueso, osteoporosis y fracturas, y en los vasos sanguíneos la acumulación de calcio y fosfato ocasiona calcificación vascular, reduciendo la distensibilidad vascular y aumentando el riesgo de hipertensión (Reiss *et al.*, 2018).

1.2. Microbiota intestinal

La microbiota intestinal consiste en un conjunto de entre 10^{12} y 10^{14} de microorganismos en simbiosis con el hospedador, que engloban bacterias, virus, hongos, arqueas y eucariotas unicelulares. Participa en la regulación y educación del sistema inmune del hospedador (reduce alergias, potencia las células Treg y Th, células NK y estructuras linfoides, efecto antiinflamatorio, etc.); mantiene la homeostasis energética del epitelio intestinal y fisiológica (desarrollo cerebral y salud neuronal); protege frente a patógenos (competición y fagocitosis) y proporciona metabolitos al hospedador (ruptura polisacáridos no digeribles, degradación de oxalato, biotransformación de ácidos biliares conjugados, vitamina B12, riboflavina, biotina, ácido nicotínico, vitamina K, etc.) (Nallu *et al.*, 2017; Rysz *et al.*, 2021; Bhargava *et al.*, 2022; Lohia *et al.*, 2022;), mientras que los microorganismos reciben el ambiente necesario para su crecimiento (Sabatino *et al.*, 2015). La colonización de la microbiota intestinal comienza en el nacimiento y se adapta a lo largo de toda la vida, influenciada por la edad, drogas y medicamentos, dieta, estrés, excreción de urea y toxinas al tracto gastrointestinal, geolocalización, genotipo, condiciones extraintestinales como la hiperglicemia, etc. (Sabatino *et al.*, 2015; Nallu *et al.*, 2017; Bhargava *et al.*, 2022; Lohia *et al.*, 2022).

1.2.1. Disbiosis intestinal

Se ha comprobado que la microbiota está implicada tanto en mantener la salud del hospedador como en ciertos procesos patológicos. La **disbiosis intestinal** hace referencia a un desequilibrio de la microbiota intestinal con cambios cualitativos y cuantitativos en su composición y actividad metabólica, implicados en ciertas patologías (Nallu *et al.*, 2017; Rysz *et al.*, 2021; Wehedy *et al.*, 2022). La disbiosis puede afectar al sistema cardiovascular, endocrino, nervioso y renal, participando en el desarrollo de hipertensión, proteinuria (Lohia *et al.*, 2022), uremia,

cambios metabólicos, enfermedad renal, enfermedad cardiovascular (Bhargava *et al.*, 2022), procesos aterotrombóticos (Violi *et al.*, 2023), inflamación intestinal, diabetes mellitus, obesidad, ERA (Lee *et al.*, 2020), alergias, asma y cáncer (Nallu *et al.*, 2017). En la ERC, la acumulación de toxinas afecta negativamente a la microbiota, mientras que la disbiosis genera un desequilibrio inmune e inflamación que acelera la progresión de la enfermedad (Li *et al.*, 2023), es decir, existe una relación bidireccional que se retroalimenta (Lohia *et al.*, 2022; Wehedy *et al.*, 2022).

Los dos principales filos de bacterias en la microbiota intestinal son **Firmicutes**, con géneros como *Ruminococcus*, *Lactobacillus*, *Eubacteria*, *Faecalibacterium*, *Clostridium* y *Roseburia*, y **Bacteroidetes**, con géneros como *Bacteroides*, *Prevotella* y *Xylabacter* (Sabatino *et al.*, 2015; Bhargava *et al.*, 2022). Aunque estos dos filos engloben el 90% de la microbiota (Zaky *et al.*, 2021), también están representados los filos Actinobacteria, Fusobacteria, Proteobacteria y Verrucomicrobia (Zaky *et al.*, 2021; Wehedy *et al.*, 2022). Los Firmicutes son Gram positivos que fermentan carbohidratos generando metabolitos como acetato, lactato o butirato, y los Bacteroidetes son Gram negativos que también fermentan carbohidratos (Bhargava *et al.*, 2022). La proporción Firmicutes/Bacteroidetes (F/B) es clave en la homeostasis. Una proporción baja se puede relacionar con la enfermedad inflamatoria intestinal o envejecimiento y una alta con obesidad o ERC (Nallu *et al.*, 2017; Bhargava *et al.*, 2022).

En la ERC, la disbiosis intestinal disminuye y altera la diversidad microbiana, genera inflamación, altera la permeabilidad intestinal y promueve translocación de LPS. Respecto a las bacterias, se incrementan **Proteobacteria**, como *E. coli*, *Shigella* o los Enterobacteriaceae; en **Bacteroidetes** aumentan bacterias como *Bacteroides* y disminuyen otras como *Prevotella*; en **Firmicutes** se reduce *Lactobacillus*, *Roseburia*, *Clostridium* y *Faecalibacterium*, pero aumenta *Streptococcus* y *Ruminococcus*; y en **Actinobacteria**, aumenta *Actinomyces* y disminuye *Bifidobacterium* (Bhargava *et al.*, 2022; Lohia *et al.*, 2022). A su vez, mediante métodos de aleatorización mendeliana se ha relacionado la clase Bacteroidia del filo Bacteroidetes con menor TFG y el filo Actinobacteria con pacientes que necesitan de diálisis (Li *et al.*, 2023).

Al final, la microbiota presenta un ambiente extremadamente complejo y no siempre se sabe por qué varían ciertos grupos taxonómicos, pero en general en el intestino disbiótico se reducen las bacterias sacarolíticas y aumentan las proteolíticas (Bhargava *et al.*, 2022) y su fermentación con la generación de amonio, de fenoles, de aminos, de indoles y de tioles (Nallu *et al.*, 2017). Las bacterias intestinales usan los carbohidratos como su principal fuente de energía y proteínas para crecer. Por lo tanto, la falta de carbohidratos hace que las bacterias proteolíticas utilicen la

energía de las proteínas, produciendo metabolitos tóxicos y proinflamatorios que se deben excretar en las heces o en la orina (Sabatino *et al.*, 2015). Además, en la disbiosis existe asociada una digestión y asimilación deteriorada de proteínas, tránsito ralentizado por el bajo consumo de fibra en estos pacientes, hipoclorhidria, más bacterias en el intestino delgado y alteraciones pancreáticas, llegando más proteína disponible a la microbiota (Sabatino *et al.*, 2015; Rysz *et al.*, 2021).

1.2.2. Barrera intestinal

De forma natural puede existir un paso limitado de endotoxinas al hospedador a través de quilomicrones (Violi *et al.*, 2023), pero el paso de bacterias, endotoxinas y metabolitos exacerbado en la ERC solo es posible al existir un daño estructural y funcional de la barrera intestinal (Sabatino *et al.*, 2015). La barrera intestinal aísla el ecosistema intestinal del hospedador en primer lugar con los enterocitos. Estas células se encuentran ensambladas por uniones estrechas, formadas por claudinas y ocludinas, con la función de impermeabilidad, junto a la *zónula ocludens* unida al citoesqueleto, ajustando la unión y controlando la permeabilidad paracelular. También estas células presentan uniones adherentes, uniones gap y desmosomas. A su vez, se secreta moco y existe una inmunidad adaptativa local basada en inmunoglobulinas (Ig) A, β -defensinas, células Treg y otros componentes que mantienen la microbiota en el lumen (Sabatino *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 2021; Violi *et al.*, 2023). Las IgA evitan la invasión bacteriana al impedir su adhesión y marcar para fagocitosis, presentación por células dendríticas, neutralizar toxinas y adquirir tolerancia (Scheithauer *et al.*, 2020). Por último, antes del flujo sanguíneo encontramos la barrera vascular intestinal (Violi *et al.*, 2023). La permeabilidad está regulada por factores intrínsecos y extrínsecos. Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), el indol, metabolitos de ácidos biliares y otros productos de la microbiota tienen un efecto protector en la barrera (Violi *et al.*, 2023). La bacteria *Akkermansia muciniphila*, reducida en el intestino disbiótico, es una bacteria Gram negativa perteneciente al filo Verrucomicrobia con función degradadora de moco, se ha relacionado con una buena integridad intestinal, mantenimiento del moco, efecto antiinflamatorio, detoxificante y ayuda al crecimiento de bacterias productoras de AGCC (Bhargava *et al.*, 2022). El LPS al unirse a TLR4 en las células epiteliales genera inflamación y regula negativamente las uniones estrechas, aunque en condiciones fisiológicas la tolerancia y la presencia en el intestino de fosfatasa alcalina, que desfosforila el lípido A, y lipoproteínas de alta densidad que secuestran al LPS, evitan la activación de TLR4 (Violi *et al.*, 2023). La zonulina inducida por la disbiosis (Violi *et al.*, 2023), el amonio, las toxinas urémicas (Rysz *et al.*, 2021), una dieta rica en grasas

o la hiperglicemia también favorecen la eliminación de las uniones estrechas (Scheithauer *et al.*, 2020). En un modelo murino, el consumo de AGEs como componente de una dieta tratada térmicamente, incrementa la permeabilidad intestinal y activa el sistema inmune innato, incrementándose las anafilotoxinas (Lohia *et al.*, 2022). La dieta de pacientes con ERC es pobre en frutas y vegetales, para reducir la ingesta de potasio, implicada en arritmias. Sin embargo, la falta de fibra es negativa para la microbiota y la permeabilidad intestinal (Lohia *et al.*, 2022). Incluso la hemodiálisis genera un estrés circulatorio con episodios de edemas, hipervolemia o isquemias, que incrementa la permeabilidad y translocación de endotoxinas (Rysz *et al.*, 2021; Bhargava *et al.*, 2022).

Al no poder eliminarse por el riñón en la ERC, la urea se excreta al tracto gastrointestinal, donde de forma espontánea, o por acción de la enzima ureasa de ciertas bacterias, genera amoniaco. Esto conlleva un aumento del pH intestinal, generando irritación en la mucosa, inflamación sistémica, endotoxemia, incrementando la disbiosis y erosionando la pared intestinal al neutralizar el pH ácido del moco, romper las uniones estrechas del epitelio y reducir resistencia eléctrica (Sabatino *et al.*, 2015; Nallu *et al.*, 2017; Rysz *et al.*, 2021; Bhargava *et al.*, 2022; Lohia *et al.*, 2022). En la ERC encontramos una barrera intestinal dañada con el sistema inmune activado y niveles considerablemente disminuidos de uniones estrechas (Sabatino *et al.*, 2015). Se piensa que la baja TFG y la disbiosis conducen a la acumulación de metabolitos que altera la barrera epitelial e incrementa su permeabilidad, facilitando la entrada de endotoxinas como LPS que suponen un riesgo (Tang *et al.*, 2021; Bhargava *et al.*, 2022).

1.3. TLR4

1.3.1. Estructura y función

Los TLRs son una familia de 10 receptores en humanos del sistema inmune innato. Reconocen patrones moleculares conservados (Vázquez-Carballo *et al.*, 2021). El más estudiado es TLR4 que puede ser activado por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), en particular el lipopolisacárido (LPS), o por patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). La presencia de TLR4 destaca en las células inmunes mieloides, principalmente monocitos, macrófagos y células dendríticas. Sin embargo, es ampliamente conocido que el TLR4 se expresa en mayor o menor medida en prácticamente todos los tipos celulares (Ciesielska *et al.*, 2021), como en las células endoteliales e intestinales (Płóciennikowska *et al.*, 2015) o en el caso del riñón en las células tubulares, podocitos, células mesangiales y células endoteliales peritubulares (Vázquez-Carballo *et al.*, 2021). La función de TLR4 consiste en detectar señales de peligro o daño, pudiendo generar una rápida respuesta inflamatoria que permita contener una infección

o reparar un daño. A su vez, este receptor colabora en la maduración de las células dendríticas que permitirá la activación de los linfocitos T y B, formando un puente entre el sistema inmune innato y adaptativo (Zamyatina *et al.*, 2020; Ciesielska *et al.*, 2021). TLR4 es una proteína transmembrana de tipo I que presenta un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular con un receptor citosólico Toll-IL-1 (TIR) (Płóciennikowska *et al.*, 2015; Zamyatina *et al.*, 2020). TLR4 se encuentra en los *rafts*, microdominios que favorecen la entrada de proteínas con lípidos saturados como el clúster de diferenciación (CD) 14 y la interacción de LPS con CD14 y TLR4 (Płóciennikowska *et al.*, 2015). En condiciones fisiológicas, existe poca expresión de TLR4 en el riñón, pero cuando hay una infección o daño como los producidos por isquemia/reperfusión, sepsis, nefrotoxicidad, nefritis lúpica, obstrucción uretral, diabetes, microangiopatía trombótica, etc., aumentan significativamente los niveles en la superficie celular (Vázquez-Carballo *et al.*, 2021).

Vía de TLR4: el LPS libre con ayuda de la proteína de unión a LPS y CD14, interacciona con el complejo formado por el factor 2 de diferenciación mielóide (MD-2) y TLR4, conduciendo a la dimerización de dos complejos MD-2/TLR4. Esto supone un cambio conformacional en el dominio TIR que desemboca en la vía dependiente o independiente del factor de diferenciación mielóide 88 (MyD88) (Ciesielska *et al.*, 2021). En la vía dependiente de MyD88 se desencadena una cascada de señalización que conduce a la activación del factor de transcripción NF- κ B y a través de la vía de las MAPK, a la activación de otros factores de transcripción. La activación de los factores de transcripción induce la expresión de mediadores proinflamatorios tales como TNF- α , IL-6, COX-2 y IFN λ 1/2, y de los precursores pro-NLRP3, pro-IL-1 β y pro-IL-18 (Ciesielska *et al.*, 2021; Vázquez-Carballo *et al.*, 2021). La vía independiente de MyD88 se produce a continuación de la anterior, donde se internaliza TLR4 y acaba expresando IFN- α , quimiocina CCL5. Esta es la vía responsable de la respuesta a IFN y, en fases tardías, por esta vía también se puede activar NF- κ B. Tras esta vía, TLR4 se degrada lisosomalmente o se recicla (Ciesielska *et al.*, 2021; Vázquez-Carballo *et al.*, 2021). La activación de TLR4 junto con otros estímulos celulares conducen a la formación del inflamasoma NLRP3. La caspasa-1 del complejo genera IL-1 β e IL-18 a partir de sus precursores y activa la gasdermina D, la cual conduce a la piroptosis (Zamyatina *et al.*, 2020; Ciesielska *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2021b).

1.3.2. Regulación de TLR4

Es necesario una regulación muy estricta de TLR4 ya que su descontrol puede llevar a una inflamación crónica que produciría daño en tejidos y órganos. Esta regulación se realiza mediante múltiples estrategias: formas solubles de TLR4 como secuestro de los ligandos,

inhibidores de reclutamiento de proteínas adaptadoras o desestabilización de proteínas adaptadoras, tráfico celular, ubiquitinación y desfosforilación, regulación transcripcional y retroalimentación negativa (Vázquez-Carballo *et al.*, 2021), donde participa la activación de otros TLRs (Bolourani *et al.*, 2021). La internalización de TLR4, controlada principalmente por CD14, permite la señalización independiente de MyD88, regular el tiempo en que TLR4/LPS está presente en la membrana y la degradación de TLR4. En cuanto al tráfico intracelular de TLR4, existe una intensa regulación ya que tiene suma importancia el tráfico endo-lisosomal en el desarrollo de patologías. Al final de la respuesta, es imprescindible eliminar el LPS para terminar con la inflamación. Esto se puede realizar vía extracelular, con proteínas neutralizantes o eliminándose en la bilis, o vía intracelular, inactivando por deacilación enzimática el LPS, aunque es un proceso lento y de poco impacto (Ciesielska *et al.*, 2021).

1.3.3. Los PAMPs y los DAMPs

Los PAMPs reconocidos por TLR4 son el LPS (Kuzmich *et al.*, 2017), glicanos anfífilos presentes en la pared bacteriana de Gram negativas. El LPS está constituido por el lípido A, muy conservado y anclado a la membrana, un núcleo de oligosacáridos y el antígeno O, que es muy variable. La parte endotóxica corresponde al lípido A, la cual activa el sistema inmune innato a través de TLR4/MD-2 o de caspasas citosólicas, desde concentraciones muy bajas (Zamyatina *et al.*, 2020). El lípido A está formado por un esqueleto polar de diglucosaminas fosfatadas, que presenta unidos ácidos grasos formando una parte hidrofóbica, los cuales se pueden acomodar por interacciones iónicas a la cavidad de unión N-terminal hidrofóbica de CD-14 y MD-2. En ambos casos se acoplan 5 acilos a la cavidad y queda uno libre que junto a los grupos fosfato permite las interacciones entre CD14 y MD-2 y la dimerización de dos complejos MD-2/TLR4. Por esto, los LPS más potentes son los hexacilados y difosforilados. Las variaciones en el número de cadenas o su orientación lo pueden volver poco activo o inactivo, como es el caso de ciertos microorganismos intestinales (Zamyatina *et al.*, 2020; Ciesielska *et al.*, 2021).

Los DAMPs son componentes endógenos originados por muerte o daño celular que activan a TLR4. Entre los DAMPs más importantes se encuentran: las proteínas de choque térmico (Hsp), proteína de caja 1 del grupo de alta movilidad, fibronectinas, ciertos ácidos grasos, heparán sulfato, fibrinógeno, proteoglicanos y otros elementos de daño (De Batista *et al.*, 2014; Kuzmich *et al.*, 2017; Sato *et al.*, 2018; Vázquez-Carballo *et al.*, 2021; Nakamura *et al.*, 2022). La inflamación, el EO o el posible daño que pueda generar la respuesta inmune, puede promover la muerte de otras células, que liberan más DAMPs y producen más inflamación,

generando un ciclo vicioso de retroalimentación positiva. Esto sucede, por ejemplo, en la hipertensión, en la fibrosis pulmonar o en la enfermedad pulmonar aguda (Hernanz *et al.*, 2015; Sato *et al.*, 2018; Bolourani *et al.*, 2021; Tang *et al.*, 2021).

2. Hipótesis y objetivos

En la ERC encontramos una microbiota alterada y una barrera intestinal disfuncional, permitiendo la entrada de LPS y toxinas urémicas, y una disminución de AGCC, situación que puede mejorarse mediante tratamientos enfocados hacia la modulación de la microbiota intestinal. El LPS, que alcanzan la circulación sistémica y que interactúan con los TLR4, junto con las toxinas urémicas, la falta de AGCC y otras patologías y factores de riesgo, originan un estado proinflamatorio, prooxidativo y profibrótico que favorece el desarrollo de ERC, pudiendo terminar en la muerte (Figura 2).

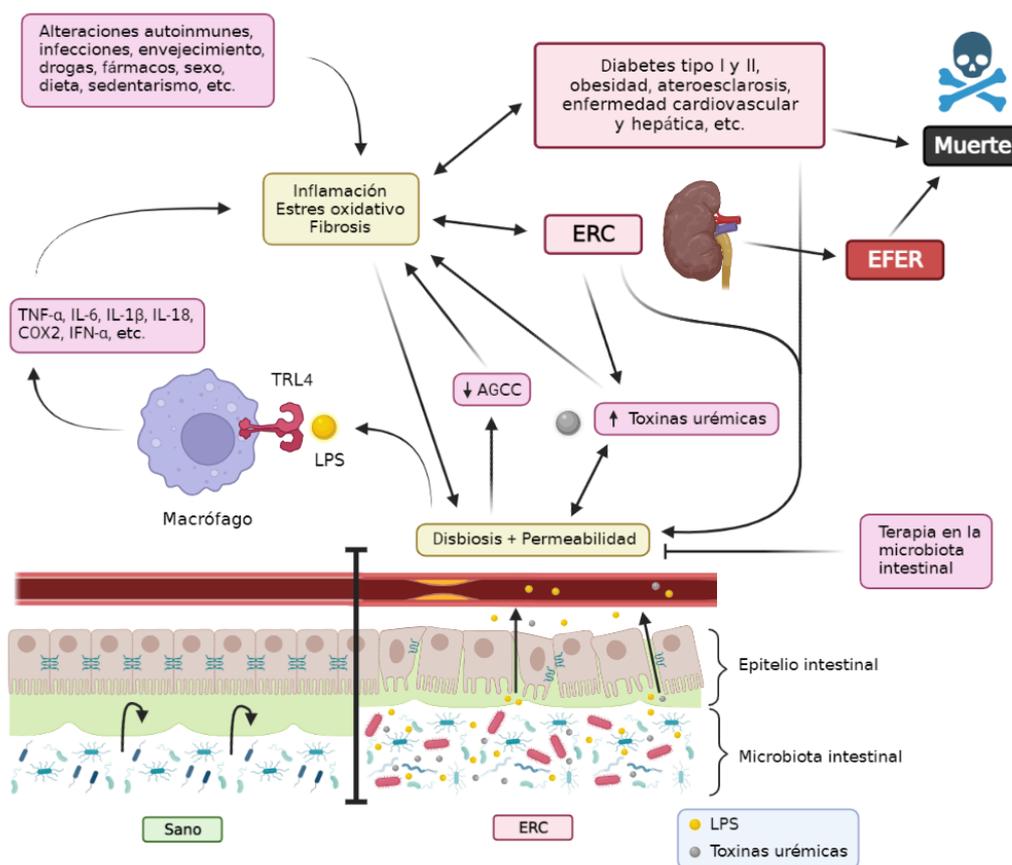


Figura 2: Representación de la hipótesis de trabajo. En la enfermedad renal crónica (ERC) encontramos una microbiota y barrera intestinal alteradas que permiten el paso de LPS y toxinas al hospedador, que junto a la falta de ácidos grasos de cadena corta y otros factores llevan al desarrollo de ERC. Creado con BioRender.

Objetivos

El objetivo de este trabajo es proporcionar información actualizada y fiable acerca del estado del arte sobre el papel de la microbiota intestinal en la enfermedad renal crónica. Los objetivos específicos son:

- Explorar el papel del eje microbiota intestinal/TLR4 en la enfermedad renal crónica.
- Explorar la importancia de la barrera intestinal en la enfermedad renal crónica.
- Explorar el papel de la disbiosis, así como el efecto de la suplementación relacionada con la microbiota en la enfermedad renal crónica.

3. Métodos

Para llevar a cabo estos objetivos, se ha realizado una revisión de estudios científicos y revisiones sobre el tema a tratar. Para la búsqueda bibliográfica se ha utilizado principalmente el buscador de la base de datos MEDLINE *PubMed*, con ayuda muy ocasional de servicios bibliotecarios en línea. Las palabras clave usadas han sido “*TLR4*”, “*Chronic kidney disease*”, “*kidney*”, “*LPS*”, “*microbiota*”, “*inflammation*”, “*fibrosis*”, “*oxidative*”, “*toxin*”, “*barrier*”, “*diabetes*” y “*hypertension*”. Estas se han buscado de forma individual, en parejas o en tríos en *PubMed* con su localización en el título o el resumen. De las búsquedas se han extraído los artículos relacionados con el tema a tratar, revisando brevemente el título y resumen. Los artículos obtenidos se han filtrado por los siguientes criterios de inclusión:

- Indicios de calidad: artículos situados en el primer cuartil de su campo, o como máximo el segundo cuartil en artículos de especial interés.
- Fecha de publicación: se ha incorporado bibliografía actual de no más de 10 años de antigüedad.

De los cientos de artículos revisados, por su interés con el tema se han extraído 155 artículos y 2 libros. De estos, al aplicar los criterios de inclusión, el número de artículos se ha reducido a 67 artículos y 2 libros (Figura 3). El 91,3% de los artículos se encuentran en el cuartil 1 y el 8,7% en el cuartil 2. A su vez, el 59,4% de las referencias se localizan entre 2020 y 2023, y las referencias más antiguas son del año 2014. Esta búsqueda en ciertos puntos es subjetiva según el criterio del autor, por lo que puede verse sometida a sesgos cognitivos.



Figura 3: Diagrama de flujo de la selección de artículos y libros. Creado con BioRender.

4. Resultados

4.1. Microbiota: fisiología y patofisiología en la enfermedad renal crónica

4.1.1. Toxinas urémicas

Las toxinas urémicas pueden producir alteraciones en la mecánica gastrointestinal y el tránsito (Lohia *et al.*, 2022), aumentar la permeabilidad intestinal y la translocación de microorganismo y metabolitos de la microbiota (Nallu *et al.*, 2017), donde se pueden acumular hasta 150 solutos urémicos en el hospedador por la enfermedad renal (Rysz *et al.*, 2021). En la disbiosis se altera el perfil metabólico urémico (Bhargava *et al.*, 2022), aumentando la producción de metabolitos dañinos como el sulfato de indoxilo (SI), sulfato de p-cresilo (SpC), ácido 3-indolacético (IAA), TMAO, fenilacetilglutamina, ácido hipicúrico, ácido fenilacético y se reduce la producción de AGCC, contribuyendo a la toxicidad urémica (Nallu *et al.*, 2017; Rysz *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2023). En la EFER, por la disbiosis y la reducción de la función renal, se produce una acumulación en sangre de algunos de los metabolitos mencionados anteriormente (Wang *et al.*, 2020; Lohia *et al.*, 2022), además de proteínas asociadas con la inflamación, mientras que en la microbiota aumentan las bacterias con ureasa, uricasa y enzimas formadoras de indol, p-cresol (Rysz *et al.*, 2021; Zaky *et al.*, 2021), ácido hipicúrico, fenilacetilglutamina, etc., cuyos productos llegan a la sangre por la alteración de la barrera intestinal (Wang *et al.*, 2020). Algunos de estos metabolitos urémicos, destacando SI y SpC, no se suelen eliminar bien por diálisis (Wang *et al.*, 2020; Rysz *et al.*, 2021), eliminándose menos del 10% de lo que se eliminaría normalmente en los riñones (Sabatino *et al.*, 2015). La acumulación de las toxinas urémicas producidas por la microbiota, en la ERC se compensa por su eliminación en el tracto gastrointestinal, lo que empeora la disbiosis, generando un círculo vicioso (Li *et al.*, 2023).

Los metabolitos microbianos en la ERC pueden causar daño intestinal, cardíaco, hepático, renal e incluso en el sistema nervioso autónomo al excitar los nervios simpáticos (Li *et al.*, 2023), debido a que producen un incremento de la inflamación, del EO, una menor biodisponibilidad de NO, una disfunción endotelial (Sabatino *et al.*, 2015) y un aumento de la fibrosis renal con disminución de la TFG (Wehedy *et al.*, 2022). A pesar de este ambiente tan complejo, se ha podido relacionar una reducción del daño renal con metabolitos como AGCC, ácidos biliares y derivados indólicos, mientras que metabolitos como TMAO, SI, SpC (Wehedy *et al.*, 2022) o la dimetilarginina se han asociado como promotores del daño renal (Bhargava *et al.*, 2022).

En primer lugar, la acumulación de dimetilarginina, un análogo de la L-arginina (sustrato de NOS), inhibe la eNOS, lo que favorece la disfunción endotelial (Duni *et al.*, 2019). Posteriormente, del metabolismo del triptófano en la microbiota con la triptofanasa se obtiene

el indol y sus derivados como IAA (Liu *et al.*, 2021a), por bacterias del género *Enterobacterium* (Holle *et al.*, 2022), *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Ruminococcus* o *E. coli* entre otras. Para detoxificarlo se absorbe y metaboliza en SI en el hígado, que se excreta por la orina (Nallu *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2021a). El SI incrementa el EO en las células endoteliales, produce alteraciones en la coagulación, al inhibir la activación del plasminógeno, y disfunción endotelial, media en la fibrosis por inducción de TGF- β 1 e induce inflamación por macrófagos y en células tubulares proximales al estimular NF- κ B, potenciando la respuesta inmune a LPS (Nallu *et al.*, 2017; Rysz *et al.*, 2021; Bhargava *et al.*, 2022).

El p-cresol es producido a partir de fenilalanina y tirosina por bacterias anaerobias pertenecientes a los filos Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes o Fusobacteriota (Bhargava *et al.*, 2022). Se absorbe, se metaboliza en SpC y se elimina por la orina, por lo que en la ERC se acumula. Ambos, SI y SpC son potentes inhibidores de algunas funciones biológicas (Rysz *et al.*, 2021). Incrementan la permeabilidad intestinal, la inflamación sistémica, la disfunción endotelial, la resistencia a insulina (Li *et al.*, 2023), fomentan la expresión de α -actina en el músculo liso, la fibrosis intersticial y la glomeruloesclerosis vía TGF/Smad, activan el RAAS y potencian el EO, generando daño tubular (Nallu *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2020; Rysz *et al.*, 2021) y calcificación de la aorta y vasos periféricos que dan lugar a cristales calciprotéicos que contienen LPS e inducen inflamación y disfunción vascular (Lohia *et al.*, 2022).

La fosfatidilcolina, la betaina y la L-carnitina se metaboliza por la microbiota intestinal en trimetilamina (TMA), por bacterias como *Anaerococcus hydrogenalis* (Firmicutes) o *Clostridium asparagiforme* (Proteobacteria). El TMA se absorbe, se oxida en el hígado en TMAO y finalmente se excreta en un 95% por la orina, un 4% en las heces y un 1% por respiración (Rysz *et al.*, 2021; Zixin *et al.*, 2022). El TMAO, en pacientes sin ERC se ha relacionado con riesgo cardiovascular y aterosclerosis (Tang *et al.*, 2015), mientras que en pacientes con ERC altera el metabolismo lipídico, biliar y mitocondrial; genera EO e inflamación vía inflamasoma NLRP3 y reducción de la producción de NO, mediando disfunción endotelial; enfermedad cardiovascular y renal; DT2; cáncer; fibrosis tubulointersticial y deposición de colágeno, relacionándose con el avance de la ERC, aunque el TMAO no se elimina mal por hemodiálisis (Tang *et al.*, 2015; Rysz *et al.*, 2021; Bhargava *et al.*, 2022; Wehedy *et al.*, 2022; Zixin *et al.*, 2022).

Uno de los principales mecanismos por los que causan daño las toxinas urémicas es a través de receptores de hidrocarburos de arilo (AHR), tradicionalmente considerado un receptor de xenobióticos, actúa como factor de transcripción de enzimas del metabolismo de fase I como

citocromo P450, además puede interactuar con factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 y NF- κ B potenciando la respuesta inflamatoria y otras moléculas como Smad, β -catenina, NOX o MAPK, que pueden agravar la patología de la ERC (Liu *et al.*, 2021a). El SI, el IAA y las toxinas derivadas del triptófano se pueden unir al AHR de forma directa o indirecta (Holle *et al.*, 2022), aumentando el daño renal generando glomeruloesclerosis y fibrosis al expresar citocromo P450, que metaboliza sustancias precancerosas exógenas causando mutagénesis, genotoxicidad, EO e inflamación, y aumentando la expresión de COX2, enzima clave en la síntesis de prostaglandinas, generando disfunción vascular (Liu *et al.*, 2021a).

4.1.2. Ácidos grasos de cadena corta

El acetato, el propionato y el butirato son AGCC obtenidos de la fermentación de los polisacáridos de la dieta por bacterias anaerobias. En la disbiosis se disminuye la fermentación de carbohidratos y por tanto la producción de AGCC, debido a la reducción de bacterias pertenecientes a las familias Prevotellaceae y Lactobacillaceae (Rysz *et al.*, 2021) o los géneros *Bifidobacterium*, *Fusicatenibacter* y *Subdoligranulum*, típicamente reducidos en la ERC (Holle *et al.*, 2022). Los AGCC son utilizados como fuente energética por las células epiteliales del colon (Sabatino *et al.*, 2015), y constituyen entre el 6 y el 10% de la energía usada por el cuerpo (Zaky *et al.*, 2021). Lo que no se metaboliza va al hígado, al tejido adiposo y a los riñones, donde interactúa con receptores acoplados a las proteínas G (GPR) o con receptores olfatorios (Olf). La activación de GPR41 y GPR43 induce adipogénesis, suprime la síntesis de colesterol y de ácidos grasos, y regula la obesidad. Asimismo, el GPR41 regula la presión sanguínea y el 43 potencia el sistema inmune. El GPR109A limita la inflamación al inhibir NF- κ B, y Olf78 participa en la regulación hormonal, como la secreción de renina. Todos se expresan en el riñón, lo que demuestra su importancia en la salud del órgano (Zaky *et al.*, 2021).

Los AGCC mejoran el daño renal, mediante un efecto antiinflamatorio y antifibrótico al reducir la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF- α inducidas por LPS; estimulan la producción de IL-10; mejoran la integridad de la barrera intestinal al regular la vía de MAPK y TLR4 y al fomenta la producción de mucina y las uniones estrechas; normalizan la apoptosis y la autofagia; reducen los niveles de colesterol y la presión sanguínea, minimizando el riesgo cardiovascular y cerebral en pacientes con ERC (Lee *et al.*, 2020; Zaky *et al.*, 2021; Bhargava *et al.*, 2022); proporcionan energía mejorando la homeostasis de la glucosa y previniendo la obesidad al regular las hormonas anorexigénicas (Bhargava *et al.*, 2022); reducen la diferenciación de Th17 al disminuir los niveles de IL-1 β e IL-6 (Avery *et al.*, 2022); y potencian la función supresora de la células Treg (Holle *et al.*, 2022).

La hipertensión es el principal riesgo mundial en enfermedades no transmisibles y también presenta una reducción de la diversidad bacteriana y de sus metabolitos. Aumenta el ratio F/B y disminuyen los productores de AGCC (Zaky *et al.*, 2021; Avery *et al.*, 2022). Los ratones libres de microorganismos, a diferencia de los colonizados, tienen más daño debido a la hipertensión inducida por AngII, siendo el daño renal más pronunciado que el daño cardíaco. Esto también ocurre en la ERC. Se piensa que la producción de AGCC, tiene un efecto más beneficioso que el daño causado por otros metabolitos microbianos acumulados en la ERC, aunque existe controversia (Avery *et al.*, 2022).

4.1.3. *Relación de la microbiota con la inflamación, estrés oxidativo y fibrosis*

La disbiosis y el aumento de la permeabilidad intestinal producen una llegada de mayor cantidad de material bacteriano, endotoxinas, como LPS, peptidoglicanos, proteínas de membrana, metabolitos y ADN bacteriano a la sangre, al atravesar la barrera intestinal. A su vez, los macrófagos intestinales fagocitan bacterias que se han traslocado, liberando posteriormente en el torrente sanguíneo los productos de desecho y endotoxinas. El LPS puede activar los monocitos y macrófagos generando inflamación sistémica, lo cual debilita también la integridad de la barrera intestinal y acelera el avance de la ERC. La uremia, junto el ADN bacteriano, incrementan la permeabilidad y la liberación de citoquinas proinflamatorias. Por otro lado, los peptidoglicanos activan NF- κ B a través del receptor NOD1. El desequilibrio de ciertas bacterias se relaciona con la diferenciación de células Treg hacia células Th17, causando la reducción de los niveles de IL-10. A todo esto hay que añadir el daño causado por las toxinas urémicas previamente mencionado (Bhargava *et al.*, 2022).

Al final, se genera un estado inflamatorio y de inmunosupresión por una respuesta donde participan las células Th1, Th17, dendríticas y macrófagos e IgG, donde el LPS induce INF- β , IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6, e IL-12. En condiciones fisiológicas los receptores de patrones moleculares detectan elementos de los microorganismos, siendo los TLRs y su activación controlada el principal mecanismo de tolerancia hacia la microbiota. La exposición continua y controlada de LPS desensibiliza el epitelio, genera una respuesta atenuada, el sistema innato induce inmunoreguladores y mantiene las uniones estrechas. Sin embargo, la estimulación exacerbada de LPS, añadida a la inflamación, acaba generando síndrome compensatorio antiinflamatorio o parálisis inmune, lo que inhibe parcialmente el sistema inmune, aumentando el riesgo de infección secundaria (Sabatino *et al.*, 2015).

En cuanto a otras patologías relacionados con la etiología de la ERC, la diabetes mellitus tipo 1 (DT1) tiene un componente ambiental muy importante en el que destaca el desequilibrio de

la microbiota intestinal. En general, estos pacientes presentan una reducción del ratio F/B y de bacterias productoras de butirato; unos niveles incrementados de citoquinas inflamatorias como IL-6 y un aumento de expresión de los receptores TLR4 y TLR2; además de autoanticuerpos anti-celulas β (Zaky *et al.*, 2021; Bielka *et al.*, 2022). La DT2 y aterosclerosis también tienen asociada una disbiosis intestinal, siendo un fuerte factor de riesgo el aumento de endotoxinas. En otros estudios se ha relacionado la toxicidad urémica con enfermedad ósea, depresión o Kwashiorkor (Nallu *et al.*, 2017). En la DT2 se ha observado un incremento de endotoxinas y cambios en la permeabilidad intestinal, debido a la disminución de la diversidad microbiana, destacando una reducción en el ratio F/B y de bacterias productoras de butirato (Zaky *et al.*, 2021; Bielka *et al.*, 2022). La aterosclerosis es una enfermedad de causa multifactorial, donde la inflamación crónica está mediada por acumulación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en las arterias. En esta patología existe disbiosis intestinal donde son clave los LPS y su efecto proinflamatorio y protrombótico vía TLR4. Un desequilibrio en la entrada natural de LPS y su eliminación, o la permeabilidad de la barrera intestinal facilita su acumulación en sangre, generando un estado de **endotoxemia de bajo grado**. El problema en la aterosclerosis es que los LPS quedan atrapados en la capa subendotelial junto a las LDL e induce NOX2, IL-8, INF- α , leucotrienos, trombina y autoanticuerpos anti-LDL oxidado favoreciendo la inflamación, el estrés oxidativo, y la necrosis generando un fenotipo protrombótico (Violi *et al.*, 2023). En la obesidad también se observan cambios en la composición bacteriana del intestino relacionados con su papel en la modulación energética. Análogamente a lo observado en ERC, en esta enfermedad aumenta el ratio F/B y la cantidad de Proteobacterias y se reduce la producción de butirato (Zaky *et al.*, 2021).

Los niños, a diferencia de los adultos, no suelen presentar diabetes, obesidad o SMet, por lo que si desarrollan ERC se debe a anomalías congénitas. A pesar de la etiología, niños con ERC de entre 3 y 18 años presentan un desequilibrio microbiano, incremento de enfermedad cardiovascular e hipertensión, e inflamación sistémica con altos niveles de TNF- α . Una disfunción de la barrera intestinal permite la entrada de LPS a la circulación, metabolitos del triptófano y la falta de AGCC incrementa la inflamación y disfunción endotelial, es decir, la microbiota se considera un punto clave de la inflamación persistente (Holle *et al.*, 2022). El contacto materno-fetal de la microbiota en ratas, puede conducir a patologías en la vida adulta del descendiente, por lo que una disbiosis puede transmitir problemas de una generación a la siguiente. Por ejemplo, una disbiosis materna relacionada con la ERC puede conducir a hipertensión en los descendientes. Terapias con propionato durante el embarazo y lactancia

previenen la hipertensión en la descendencia, lo cual se acompaña de una reorganización de la microbiota de las ratas tratadas, aumento del receptor GRP41 y reducción de IL-1 α , IL-2 e IL-6 (Tain *et al.*, 2022).

4.1.4. Intervenciones dirigidas a modular la microbiota intestinal

Asumiendo la relación entre la microbiota y la ERC, se ha observado que ciertas bacterias al controlar la inflamación tienen efectos positivos en la fisiopatología. Así, *Cordyceps militaris* y la producción de cordicepina previene el avance de la ERC mediante efectos antiinflamatorios por la reducción de la expresión de IL-1 β , TLR4, TNF- α , NF- κ B y COX2 (Sum *et al.*, 2019). La administración de *Lactobacillus salivarius* BP121, bacteria productora de propionato y butirato, en modelos de ratas con ERA inducido por cisplatino, estimula la proteína quinasa activada por adenosina monofosfato cíclico, lo que reduce la producción de SI y SpC al mejorarse las uniones estrechas y regular el microambiente (Lee *et al.*, 2020). Por ello, recientemente se ha pensado en la microbiota intestinal como posible diana para el tratamiento de la ERC. Sin embargo, debido a que la microbiota es específica de cada persona es difícil predecir el efecto de estas terapias (Rysz *et al.*, 2021).

Se han abordado estas terapias desde muchas direcciones, cada una con sus ventajas e inconvenientes. Una **dieta** baja en proteína, alta en fibra y baja en grasas mejora el perfil metabólico y bacteriano (Wehedy *et al.*, 2022), como por ejemplo la dieta mediterránea que incrementa los AGCC y reduce LPS (Violi *et al.*, 2023). Las dietas no son muy efectivas por la baja tasa de adherencia y las variaciones individuales (Scheithauer *et al.*, 2020). Los **prebióticos** son ingredientes no digeribles como la inulina, fructooligosacáridos, pirodexas, etc., beneficiosos por su estimulación selectiva del crecimiento o activación de ciertas bacterias en el colón (Nallu *et al.*, 2017), que pueden fermentarse en AGCC (Scheithauer *et al.*, 2020). Algunos estudios indican que los prebióticos mejoran la microbiota de la ERC, aunque otros dicen que no es significativo. Son estudios heterogéneos, lo que dificulta las conclusiones (Wehedy *et al.*, 2022). Los **probióticos** son microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas suponen un beneficio para la salud del hospedador. Para la ERC ciertos microorganismos beneficiosos en la regulación de la microbiota e inflamación son *Bifidobacteria*, *Lactobacilli* o *Streptococci* (Nallu *et al.*, 2017; Rysz *et al.*, 2021). Los simbióticos son la combinación de probióticos y prebióticos y se ha demostrado que alteran la microbiota y sus metabolitos en pacientes con ERC, con efecto renoprotector, aumentando *Bifidobacterium* y reduciendo Ruminococcaceae. (Rysz *et al.*, 2021). Sin embargo, los

prebióticos y los probióticos requieren de más investigación para validar su uso *in vivo* (Zixin *et al.*, 2022).

Surgió la idea de bacterias modificadas genéticamente que proporcionan moléculas terapéuticas en la eliminación de toxinas urémicas, con mecanismos de autoexterminación para reducir los riesgos, aunque todavía está en etapas muy tempranas de desarrollo (Nallu *et al.*, 2017). Otra opción explorada fue actuar sobre las vías productoras de metabolitos, como la vía de producción de TMAO, aunque no es viable porque una acumulación de TMA causa el síndrome del mal olor a pescado (Zixin *et al.*, 2022). En países como Japón se usa AST-120, un absorbente carbonado que reduce la acumulación de toxinas urémicas al absorber indol, p-cresol y sulfato de fenilo, mejorando la uremia, endotoxemia, inflamación, uniones estrechas, función renal y niveles de hemoglobina, y reduce a largo plazo el riesgo de diálisis, mortalidad y eventos cardiovasculares (Sabatino *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2020; Rysz *et al.*, 2021). También se han probado ciertos fármacos como la ranitidina, meldonium, aspirina o ciertos productos naturales que remodelan la microbiota, como el resveratrol, con una buena perspectiva de futuro (Zixin *et al.*, 2022). Por último, el trasplante fecal de microbiota fecal muestra una notoria mejora de la disbiosis e inhibición de la vía TLR4/NF- κ B, llegando a ser aplicado en clínica (Tang *et al.*, 2021).

4.2. Relación de TLR4 con la inflamación, el estrés oxidativo y la fibrosis

Aunque el TLR4 tiene una función protectora, este puede estar implicado en el desarrollo de enfermedades inflamatorias por la liberación de citoquinas proinflamatorias y quimiocinas que reclutan células del sistema inmune innato, potenciando la inflamación, el EO y la fibrosis. Un TLR4 descontrolado puede alterar la permeabilidad vascular y la homeostasis redox renal, produciendo acumulación de ERO y ERN, y puede aumentar la presencia de moléculas de adhesión en el endotelio vascular, generando alteraciones como disfunción endotelial, hiperpermeabilidad, proteinuria, apoptosis, sepsis, esteatosis, fibrosis o fallo hepático (Chen *et al.*, 2021; Vázquez-Carballo *et al.*, 2021). A su vez, una activación muy prolongada puede conducir o participar en el desarrollo de enfermedades degenerativas o neurodegenerativas (enfermedad de Alzheimer o de Parkinson), enfermedades autoinmunes (enfermedad de Crohn, asma, DT1, alergias o ciertas esclerosis), cáncer, fibrosis quística, etc. Además de que fallos en la regulación de TLR4 pueden causar, entre otros: síndrome de artrogriposis, disfunción renal y colestasis, generado por un fallo en la degradación de TLR4, o el síndrome Chediak-Hisashi, generado por alteración del tráfico endo-lisosomal de TLR4 (Ciesielska *et al.*, 2021).

La sepsis es la patología más grave causada por TLR4. La sepsis activa una respuesta inmune exacerbada y descontrolada frente una infección con presencia de LPS, lo que genera citoquinas inflamatorias, coagulación, productos de degradación de fibrinógeno, hipertensión pulmonar, hipotensión sistémica, etc., que puede desembocar en un fallo orgánico múltiple (Kuzmich *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2021). El hígado resulta especialmente dañado en la sepsis por su papel en la detoxificación (Chen *et al.*, 2021). De igual forma, la traslocación de LPS del intestino al pulmón puede activar también la vía TLR4/MyD88 generando daño pulmonar que puede causar hipoxemia, edema pulmonar y acumulación de neutrófilos. Este proceso se origina en la enfermedad pulmonar aguda, donde destaca el papel de TNF- α dañando las células endoteliales, activando neutrófilos, inhibiendo la producción de surfactante en el pulmón y causando parálisis diafragmática (Tang *et al.*, 2021). En los pulmones también se puede desencadenar fibrosis, ya que un daño mecánico, químico, patogénico o patológico, en el epitelio pulmonar causa la liberación de DAMPs que activarán a TLR4 generando inflamación, regulando negativamente el pseudoreceptor de TGF- β 1 y potenciando la liberación de TGF- β 1 principalmente en los macrófagos (Bolourani *et al.*, 2021). Los DAMPs son especialmente notorios en el infarto de miocardio, donde las células necrosadas van a activar TLR4/MyD88 en macrófagos, células dendríticas, endoteliales y epiteliales, produciendo un daño adicional al del infarto. Esto produce el reclutamiento de células mieloides para producir inflamación, diferenciación de fibroblastos promoviendo angiogénesis, hipertrofia y supervivencia celular para intentar resolver el daño cardíaco. Sin embargo, se acentúa el daño producido por el infarto (Zhang *et al.*, 2022).

Desde 2014 se conoce el papel de TLR2, de TLR4 y del inflammasoma NLRP3 en el desarrollo de disfunción endotelial en la ERC (Martín-Rodríguez *et al.*, 2014), siendo la eNOS desacoplada y la falta de NO las principales causas de la **disfunción endotelial** (Daenen *et al.*, 2018). En la hipertensión, la sobreactivación del RAAS y la inflamación renal mediada por la infiltración de linfocitos y macrófagos, promueven la producción de AngII que contribuye al aumento de la expresión y de la activación de TLR4 en células endoteliales, células musculares lisas vasculares e inmunes (De Batista *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2021). Recientemente se está responsabilizando a la filtración de LPS, desde la luz intestinal al torrente sanguíneo, como colaborador del desarrollo de hipertensión, ya que la activación de TLR4 induce NOX, que produce EROs que interfieren con la producción de NO generando disfunción endotelial. Además, se activa la vía NF- κ B y p38 MAPK que libera citoquinas y moléculas de adhesión generando inflamación vascular (Grylls *et al.*, 2021). Esta respuesta genera apoptosis de células

mesangiales, diferenciación de fibroblastos, alteración de la matriz extracelular, oxidación de metaloproteasas de matriz, proliferación de las células de músculo liso vascular y engrosamiento vascular (De Batista *et al.*, 2014; Hernanz *et al.*, 2015), disminución del flujo de sangre medular y reducción de la excreción de sodio, contribuyendo al desarrollo y el mantenimiento de la hipertensión (Zhang *et al.*, 2021). En el SMet, también estimulan RAAS, y como en el caso anterior aumentan los niveles de TLR4, fomentando la inflamación y el EO. La concurrencia de estas alteraciones causa un daño renal severo, generando hipertrofia renal, daño microvascular, vasoconstricción cortical, hipertensión glomerular o degeneración de células tubulares epiteliales (El-Domiaty *et al.*, 2022).

La activación del receptor mineralocorticoide produce un aumento de la expresión de proteoglicanos que se pueden acumular en áreas con fibrosis tubulointersticial y en los glomérulos del riñón. Estos son capaces de actuar como ligando de TLR4 y estimular el daño renal (Nakamura *et al.*, 2022). La hiperglicemia característica de la diabetes, y la hiperuricemia, generan EO persistente e inflamación en el riñón. Se produce un daño en los capilares del glomérulo que afecta a la función renal y evolucionará a una ERD (Liu *et al.*, 2021b). En estos procesos y en la obesidad, predomina una infiltración de macrófagos y células T que potencian la inflamación sistémica de bajo grado y la fibrosis en islotes pancreáticos, tejido adiposo, hígado y riñón. La clave se encuentra en la activación de TLR2, TLR4 y el inflamasoma NLRP3 y un exceso de sus ligandos, aunque también pueden participar otros receptores como TLR5, NOD1 o los inflamasomas NLRP6 y NLRP12 (Wada y Makino, 2015; Scheithauer *et al.*, 2020; Tang y Yiu *et al.*, 2020).

Desde TLR1 hasta TLR9 pueden estar implicados en enfermedades renales como ERA, lupus nefrítico, ERD, nefrotoxicidad por drogas, infecciones renales, etc., pero el papel de TLR4 es dominante en ciertas patologías como la ERC (Liu y Zen, 2021). La ERC se ha estudiado con modelos animales como son la nefrectomía 5/6 (5/6-Nx) o el modelo de sobrecarga de adenina (Fanelli *et al.*, 2017). Son modelos con una producción masiva de citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento, e infiltración de células del sistema inmune innato y del adaptativo teniendo estas últimas especial importancia en etapas tempranas de la enfermedad (Fanelli *et al.*, 2017). Recientemente se ha comprobado que un modelo que combina una dieta alta en sales junto con la inhibición de la síntesis de NO es un buen modelo de ERC (Zambon *et al.*, 2019). Puesto que el TLR4 y su vía es una diana muy interesante para controlar la inflamación, se han intentado desarrollar una gran cantidad de antagonistas. Podemos diferenciar antagonistas naturales de TLR4 procedentes del metabolismo secundario de plantas, por ejemplo: artesunato

o ácido clorogénico, y los antagonistas sintéticos de TLR4 que tienen mayor importancia. Algún ejemplo de antagonista sintético es: TAK-242, que se une al dominio intracelular de TLR4, o el eritoran, que mimetiza una forma inactiva del lípido A. Sin embargo, ninguno de estos antagonistas sintéticos ha conseguido ser aprobado al no ser capaz de reducir la mortalidad en pacientes humanos con sepsis, aunque de forma general estas terapias sí disminuyen los niveles de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IFN- γ (Kuzmich *et al.*, 2017).

5. Discusión

La ERD (Alicic *et al.*, 2017) y la hipertensión son las principales causas de ERC (Foreman *et al.*, 2018). Sin embargo, ninguno de los dos son condición indispensable para que se produzca la enfermedad, ya que existen muchas otras causas. Por ejemplo, en niños no están presentes estas complicaciones y se desarrolla igualmente la enfermedad (Holle *et al.*, 2022), ya que otros factores como la toxicidad urémica (Lohia *et al.*, 2022), alteraciones inmunes o congénitas o infecciones (Vanholder *et al.*, 2022), también participan en el desarrollo de la enfermedad. En cualquier caso, ambos, hipertensión y diabetes tienen elementos comunes con ERC (Daenen *et al.*, 2018; Panizo *et al.*, 2021). Son enfermedades caracterizadas por un bajo grado de inflamación en las que se ha observado una contribución de la microbiota y de la activación de TLR4 (De Batista *et al.*, 2014; Wada y Makino, 2015; Scheithauer *et al.*, 2020; Tang y Yiu *et al.*, 2020; Grylls *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021). La existencia de disbiosis en ERC está ampliamente documentada (Sabatino *et al.*, 2015; Nallu *et al.*, 2017; Zaky *et al.*, 2021; Bhargava *et al.*, 2022; Holle *et al.*, 2022; Lohia *et al.*, 2022; Wehedy *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2023) y la activación de TLR4, aunque en menor medida, también ha sido descrita (Martin-Rodríguez *et al.*, 2014; Fanelli *et al.*, 2017; He *et al.*, 2017; Kuzmich *et al.*, 2017; Sato *et al.*, 2018; Zambon *et al.*, 2019; Liu y Zen, 2021; Nakamura *et al.*, 2022).

En general, parece estar bastante claro que la microbiota es clave en la patogénesis de enfermedades inflamatorias crónicas, aunque todavía no se conoce al completo el complejo patrón microbiano de la enfermedad renal (Rysz *et al.*, 2021) y no está claro si la disbiosis es la causa o la consecuencia en la ERC (Zaky *et al.*, 2021). Ciertos autores proponen que existe una relación bidireccional que se retroalimenta entre la disbiosis y la ERC (Lohia *et al.*, 2022; Wehedy *et al.*, 2022). Además, estas patologías también tienen en común la disfunción de la barrera intestinal, por lo que este puede ser un punto importante en la contribución de la microbiota en la inflamación crónica. Para entender esto solo hay que analizar lo que hemos expuesto sobre toxinas urémicas y endotoxinas, componentes que se filtrarán al torrente sanguíneo con relativa facilidad ante un aumento de la permeabilidad intestinal. Muchos

estudios relacionan la ERC con los metabolitos urémicos y la disbiosis intestinal, pero no hablan de los mecanismos por los cuales se produce el avance de la ERC (Bhargava *et al.*, 2022). En este sentido, la activación del AHR producida por toxinas urémicas podría tener un papel importante (Liu *et al.*, 2021a), sin olvidarnos de la inflamación producida por el LPS (Tang *et al.*, 2015). Estos dos mecanismos contribuyen a la inflamación crónica y la alteración en el microambiente de los tejidos renales afecta de forma indirecta al riesgo cardiovascular y alteraciones vasculares estructurales y funcionales en la ERC, como el desarrollo de disfunción endotelial, calcificación vascular (He *et al.*, 2017; Holle *et al.*, 2022). A diferencia de la ERC, en otras patologías relacionadas con disbiosis se le otorga más importancia a la endotoxemia que a las toxinas urémicas (Nallu *et al.*, 2017; Castellano *et al.*, 2019; Violi *et al.*, 2023). Esto parece ser consecuencia de que, aunque las toxinas urémicas también supongan un riesgo para patologías tales como la DT2, aterosclerosis (Nallu *et al.*, 2017) o enfermedad cardiovascular (Tang *et al.*, 2015), en la ERC, la baja TFG provoca una fuerte acumulación de estas toxinas haciendo mucho más notable su efecto (Rysz *et al.*, 2021). En cualquier caso, puede existir un escenario en el que TLR4 esté participando en el desarrollo de la ERC sin la participación de LPS y de las toxinas urémicas. Como se ha mencionado, existen ligandos endógenos, DAMPs, que pueden activar TLR4 en ausencia de LPS produciendo daño renal (Nakamura *et al.*, 2022). Sin embargo, por la situación disbiótica y de permeabilidad intestinal en la ERC, con la consecuente entrada de LPS a la sangre (Tang *et al.*, 2022), es más plausible pensar que la activación de TLR4 (Liu y Zen, 2021) es causa del LPS infiltrado. Sin embargo, esto no elimina la posibilidad de que el daño producido por TLR4 en la ERC permita la liberación de DAMPs y estos activen TLR4 (Hernanz *et al.*, 2015).

El hecho de que la microbiota sea tan característica en la ERC, hace que surja otro potencial uso de la microbiota en ERC: el uso como biomarcadores. El análisis de ciertos microorganismos se podría utilizar para el diagnóstico de la ERC (Bhargava *et al.*, 2022). Por ejemplo, el N-óxido de trimetilamina (TMAO) producido por la microbiota se puede detectar eficazmente en plasma, orina y heces con espectrometría de masas, por lo que puede ser un potencial biomarcador de apoyo en etapas tempranas de la ERC, que además está relacionado con el avance de la enfermedad (Zixin *et al.*, 2022), o el LPS puede servir como marcador de la permeabilidad intestinal (Violi *et al.*, 2023).

6. Conclusiones

Con todo lo expuesto, podemos concluir que la infiltración de LPS al hospedador desde la microbiota intestinal por la combinación de una disbiosis intestinal y una alteración de la barrera

intestinal puede contribuir al desarrollo de la enfermedad renal crónica por la activación de TLR4. A diferencia de otras patologías como la hipertensión, la diabetes, la obesidad o la aterosclerosis, en la enfermedad renal crónica, el empeoramiento de la función renal puede retroalimentar la disbiosis a causa del defecto de filtrado de desechos metabólicos y toxinas urémicas.

Actualmente hay una gran cantidad de estudios que analizan el papel de la microbiota intestinal en patologías muy diversas que van desde trastornos en el propio tracto digestivo, como la enfermedad de Crohn, hasta trastornos del sistema nervioso, como el alzhéimer. El estudio de la microbiota es todavía un campo con mucho margen de desarrollo que puede mejorar los resultados de los tratamientos de muchos pacientes con diversas patologías.

7. Referencias

- Alicic, R. Z., Rooney, M. T. y Tuttle, K. R. (2017) “Diabetic kidney disease: challenges, progress, and possibilities”, *Clinical journal of the american society of nephrology*, 12(12), p. 2032-2045.
- Ames, M. K., Atkins, C. E. y Pitt, B. (2018) “The renin-aldosterone system and its suppression”, *Journal of veterinary internal medicine*, 33, pp. 363-382.
- Andrade-Olivera, V., Foresto-Neto, O., Watanabe, I. K. M., Zatz, R. *et al.* (2019) “Inflammation in renal diseases: new and old players”, *Frontiers in pharmacology*, 10:1192.
- Arroyo, J. P. y Gamba, G. (2014) “Introducción a la función renal: anatomía, histología y funciones básicas de la nefrona”, en Morales Saavedra, J. L. y Torres Rodríguez, V. B. (eds.) *Fisiología cardiovascular, renal y respiratoria*. 1.ª ed. México: El Manual Moderno, pp. 151-157.
- Avery, E. G., Bartolomaeus, H., Rauch, A., Chen C. Y. *et al.* (2022) “Quantifying the impact of gut microbiota on inflammation and hypertensive organ damage”, *Cardiovascular research*, 119(6), pp. 1441-1452.
- Bhargava, S., Merckelbach, E., Noels, H., Vohra, A. *et al.* (2022) “Homeostasis in the gut microbiota in chronic kidney disease”, *Toxins*, 14(10): 648.
- Bielka, W., Przekaz, A. y Pawlik, A. (2022) “The role of the gut microbiota in the pathogenesis of diabetes”, *International journal of molecular science*, 23: 480.
- Bolourani, S., Brenner, M. y Wang, P. (2021) “The interplay of DAMPs, TLR4, and proinflammatory cytokines in pulmonary fibrosis”, *Journal of molecular medicine*, 99, pp. 1373-1384.
- Castellano, G., Statsi, A., Franzin, R., Sallutio, F. *et al.* (2019) “LPS-binding protein modulates acute renal fibrosis by inducing pericyte-to-myofibroblast trans-differentiation through TLR-4 signaling”, *International journal of molecular sciences*, 20: 3682.
- Chen, S., Tan, Y., Xiao, X., Li, Q. *et al.* (2021) “Deletion of TLR4 attenuates lipopolysaccharide-induced acute liver injury by inhibiting inflammation and apoptosis”, *Nature*, 42, pp. 1610-1619.
- Ciesielska, A., Matyjek, M. y Kwiatkowska, K. (2021) “TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling”, *Cellular and molecular life sciences*, 78, pp. 1233-1261.
- Daenen, K., Andries, A., Mekahli, D., Van Schepdael, A. *et al.* (2018) “Oxidative stress in chronic kidney disease”, *Pediatric nephrology*, 34, pp. 975-991.
- De Batista, P. R., Palacios, R., Martín, A., Hernanz, R. *et al.* (2014) “Toll-like receptor 4 upregulation by angiotensin ii contributes to hypertension and vascular dysfunction through reactive oxygen species production”, *Plos one*, 9(8): e104020.
- Duni, A., Liakopoulos, V., Roumeliotis, S., Peschos, D. *et al.* (2019) “Oxidative stress in the pathogenesis and evolution of chronic kidney disease: untangling uriadne’s thread”, *International journal of molecular sciences*, 20(15): 3711.

- El-Domiati, H. F., Sweed, E., Kora, M. A., Zaki, N. G. *et al.* (2022) “Activation of angiotensin-converting enzyme 2 ameliorates metabolic syndrome-induced renal damage in rats by renal TLR4 and nuclear transcription factor κ B downregulation”, *Frontiers in medicine*, 9: 904756.
- Fanelli, C., Arias, S. C. A., Machado, F. G., Okuma, J. K. *et al.* (2017) “Innate and adaptive immunity are progressively activated in parallel with renal injury in the 5/6 renal ablation model”, *Scientific reports*, 7: 3192.
- Filippatos, G., Anker, S. D., Agarwal, R., Pitt, B. *et al.* (2022) “Finerenone and cardiovascular outcomes in patients with chronic kidney disease and type 2 diabetes”, *Circulation*, 142, pp. 540-552.
- Foreman, K. J., Marquez, N., Dolgert, A., Fukutaki, K. *et al.* (2018) “Forecasting life expectancy, years of life lost, and all-cause and cause-specific mortality for 250 causes of death: reference and alternative scenarios for 2016–40 for 195 countries and territories”, *Lancet*, 392, pp. 2052-2090.
- Glasscock, R. J. y Rule, A. D. (2016) “Aging and the kidneys: anatomy, physiology and consequences for defining chronic kidney disease”, *Nephron*, 134, pp. 25-29.
- Global Burden of Disease Chronic Kidney Disease Collaboration (2020) “Global, regional, and national burden of chronic disease, 1990-2017: a systematic analysis for the global burden of disease study 2017”, *Lancet*, 395, pp. 709-733.
- Gorostidi, M., Sánchez-Martínez, M., Ruilope, L. M., Graciani, A. (2018) “Prevalencia de enfermedad renal crónica en España: impacto de la acumulación de factores de riesgo cardiovascular”, *Nefrología*, 38(6), pp. 606-615.
- Grylls, A., Seidler, K. y Neil, J. (2021) “Link between microbiota and hypertension: focus on LPS/TLR4 pathway in endothelial dysfunction and vascular inflammation, and therapeutic implication of probiotics”, *Biomedicine & pharmacotherapy*, 137: 111334.
- He, L., Wei, Q., Liu, J., Yi, M. *et al.* (2017) “AKI on CKD: heightened injury, suppressed repair, and the underlying mechanisms”, *Kidney international*, 92(5), pp. 1071-1083.
- Hernanz, R., Martínez-Revelles, S., Palacios, R., Martín, A. *et al.* (2015) “Toll-like receptor 4 contributes to vascular remodelling and endothelial dysfunction in angiotensin II-induced hypertension”, *British journal of pharmacology*, 172, pp. 3159-3176.
- Holle, J., Bartolomaeus, H., Löber, U., Behrens, F. *et al.* (2022) “Inflammation in children with chronic kidney disease linked to gut dysbiosis and metabolite imbalance”, *Medrxiv*, 33(12), pp. 2259-2275.
- Jansen, J., Reimer, K. C., Nagai, J. S., Varghese, F. S. *et al.* (2022) “SARS-CoV-2 infects the human kidney and drives fibrosis in kidney organoids”, *Cell stem cell*, 29, pp. 217-231.
- Jung, S. W., Kim, S. M., Kim, Y. G., Lee, S. H. *et al.* (2020) “Uric acid and inflammation in kidney disease”, *American journal of physiology-renal physiology*, 318, pp. F1327-F1340.
- Kimura, T., Isaka, Y. y Yoshimori, T. (2017) “Autophagy and kidney inflammation”, *Autophagy*, 13(6), pp. 997-1003.
- Kovesdy, C. P. (2022) “Epidemiology of chronic kidney disease: an update 2022”, *Kidney international supplements*, 12, pp. 7-11.
- Kuppe, C., Ibrahim, M. M., Kranz, J., Zhang, X. *et al.* (2020) “Decoding myofibroblast origins in human kidney fibrosis”, *Nature*, 589, pp. 281-286.
- Kuzmich, N. N., Sivak, K. V., Chubarev, V. N., Porozov, Y. B. *et al.* (2017) “TLR4 signaling pathway modulators as potential therapeutics in inflammation and sepsis”, *Vaccines*, 5(4): 34.
- Lee, T. H., Park, D., Kim, Y. J., Lee, I. *et al.* (2020) “*Lactobacillus salivarius* BP121 prevents cisplatin-induced acute kidney injury by inhibition of uremic toxins such as indoxyl sulfate and p-cresol sulfate via alleviating dysbiosis”, *International journal of molecular medicine*, 45, pp. 1130-1140.
- Li, N., Wang, Y., Wei, P., Min, Y. *et al.* (2023) “Causal effects of specific gut microbiota on chronic kidney diseases and renal function—a two-sample mendelian randomization study”, *Nutrient*, 15(2): 360.
- Liu, J. R., Miao, H., Deng, D. Q., Vaziri, N. D. *et al.* (2021a) “Gut microbiota-derived tryptophan metabolism mediates renal fibrosis by aryl hydrocarbon receptor signaling activation”, *Cellular and molecular life sciences*, 78, pp. 909-922.
- Liu, M. y Zen, K. (2021) “Toll-like receptor regulate the development and progresión of renal diseases”, *Kidney diseases*, 7, pp. 14-23.

- Liu, P., Zhang, Z. y Li, Y. (2021b) “Relevance of the pyroptosis-related inflammasome pathway in the pathogenesis of diabetic kidney disease”, *Frontiers in immunology*, 12: 603416.
- Lohia, S., Vlahou, A. y Zoidakis, J. (2022) “Microbiome in chronic kidney disease (ckd): an omics perspective”, *Toxins*, 14(3): 176.
- Martin-Rodríguez, S., Caballo, C., Gutiérrez, G., Vera, M., *et al.* (2014) “TLR4 and NLRP3 inflammasome in the development of endothelial dysfunction in uremia”, *European journal of clinical investigation*, 45(2), pp. 160-169.
- Nakamura, T., Bonnard, B., Palacios-Ramírez, R., Fernández-Celis, A. *et al.* (2022) “Biglycan is a novel mineralocorticoid receptor target involved in aldosterone/salt-induced glomerular injury”, *International journal of molecular science*, 23(12): 6680.
- Nallu, A., Sharma, S., Ramezani, A., Muralidharan, J. *et al.* (2017) “Gut Microbiome in CKD: challenges and opportunities”, *Translational research*, 179, pp. 24-37.
- Palacios-Ramírez, R., Lima-Posada, I., Bonnard, B., Genty, M. *et al.* (2022) “Mineralocorticoid receptor antagonism prevents the synergistic effect of metabolic challenge and chronic kidney disease on renal fibrosis and inflammation in mice”, *Frontiers in physiology*, 13: 859812.
- Panizo, S., Martínez-Arias, L., Alonso-Montes, C., Cannata, P. *et al.* (2021) “Fibrosis in chronic kidney disease: pathogenesis and consequences”, *International journal of molecular sciences*, 22(1): 408.
- Patel, S., Raud, A., Khan, H. y Abu-Izneid, T. (2017) “Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): the ubiquitous system for homeostasis and pathologies”, *Biomedicine & pharmacotherapy*, 94, pp. 317-325.
- Plóciennikowska, A., Hromada-Judycka, A., Borzęcka, K. y Kwiatkowska, K. (2015) “Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling”, *Cellular and molecular life sciences*, 72, pp. 557-581.
- Reiss, A. B., Miyawaki, N., Moon, J., Kasselmann, L. J., *et al.* (2018) “CKD, arterial calcification, atherosclerosis and bone health: interrelationships and controversies”, *Atherosclerosis*, 278, pp. 49-59.
- Rysz, J., Fraczyk, B., Ławinski, J., Olszewki, R. *et al.* (2021) “The impact of CKD on uremic toxins and gut microbiota”, *Toxins*, 13(4): 252.
- Sabatino, A., Regolisti, G., Brusasco, I., Cabassi, A. *et al.* (2015) “Alterations of intestinal barrier and microbiota in chronic kidney disease”, *Nephrology, dialysis, transplantation*, 30, pp. 924-933.
- Sato, Y. y Yanagita, M. (2018) “Immune cells and inflammation in AKI to CKD progression”, *American journal of physiology renal physiology*, 315, pp. F1501-F1512.
- Scheithauer, T. P. M., Rampanelli, E., Nieuwdorp, M., Vallance, B. A. *et al.* (2020) “Gut microbiota as a trigger for metabolic inflammation in obesity and type 2 diabetes”, *Frontiers in immunology*, 11: 571731.
- Sum, T., Dong, W., Jiang, G., Yang, J. *et al.* (2019) “*Cordyceps militaris* improves chronic kidney disease by affecting TLR4/Nf-κB redox signaling pathway”, *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019: 7850863.
- Tain, Y. L., Hou, C. Y., Chang-Chien, G. P., Lin, S. F. *et al.* (2022) “Perinatal propionate supplementation protects adult male offspring from maternal chronic kidney disease-induced hypertension”, *Nutrients*, 14(16): 3435.
- Tang, W. H., Wang, Z., Kennedy, D. J., Wu, Y. *et al.* (2015) “Gut microbiota-dependent trimethylamine n-oxide (TMAO) pathway contributes to both development of renal insufficiency and mortality risk in chronic kidney disease”, *Circulation research*, 116(3), pp. 448-455.
- Tang, J., Xu, L., Zeng, Y. y Gong, F. (2021) “Effect of gut microbiota on LPS-induced acute lung injury by regulating the TLR4/NF-κB signaling pathway”, *International immunopharmacology*, 91: 107272.
- Tang, S. C. W. y Yiu, W. H. (2020) “Innate immunity in diabetic kidney disease”, *Nature reviews nephrology*, 16, pp. 206-222.
- Tungsanga, S., Udompornpitak, K., Worasilchai, J., Ratana-Aneckchai, T. *et al.* (2022) “*Candida* administration in 5/6 nephrectomized mice enhanced fibrosis in internal organs: an impact of lipopolysaccharide and (1→3)-β-D-glucan from leaky gut”, *International journal of molecular science*, 23: 15987.
- Vanholder, R., Conway, P. T., Gallego, D., Scheres, E. *et al.* (2022) “The european kidney health alliance (ekha) and the decade of the kidney[™]”, *Nephrology dialysis transplantation*, gfac211.
- Vázquez-Carballo, C., Guerrero-Hue, M., García-Caballero, C., Rayego-Mateos, S. *et al.* (2021) “Toll-like receptors in acute kidney injury”, *International journal of molecular sciences*, 22(2): 816.

- Vidal Riella, L., Vidal Riella, C. y Carlos Riella, M. (2016) “Nociones de anatomía y fisiología renales”, en Carlos Riella, M. y Martins, C. (eds.) *Nutrición y riñón*. 2.^a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana, pp. 3-24.
- Violi, F., Cammisotto, V., Bartimoccia, S., Pignatelli, P. *et al.* (2023) “Gut-derived low-grade endotoxaemia, atherothrombosis and cardiovascular disease”, *Nature reviews cardiology*, 20, pp. 24-37.
- Wada, J. y Makino, H. (2015) “Innate immunity in diabetes and diabetic nephropathy”, *Nature reviews nephrology*, 12, pp. 13-26.
- Wang, T., Fu, X., Chen, Q., Kumar Patra, J. *et al.* (2019) “Arachidonic acid metabolism and kidney inflammation”, *International Journal of molecular sciences*, 20(15): 3683.
- Wang, B., Li, Z. L., Zhang, Y. L., Wen, Y. *et al.* (2022) “Hypoxia and chronic kidney disease”, *EBioMedicine*, 77: 103942.
- Wang, X., Yang, S., Li, S., Zhao, L. *et al.* (2020) “Aberrant gut microbiota alters host metabolome and impacts renal failure in humans and rodents”, *Gut*, 69(12), pp. 2131-2142.
- Wehedy, E., Shatat, I. F. y Al Khodor, S. (2022) “The human microbiome in chronic kidney disease: a double-edged sword”, *Frontiers in medicine*, 8: 790783.
- Zaky, A., Glastrass, S. J., Wong, M. Y. W., Pollock, C. A. *et al.* (2021) “The role of the gut microbiome in diabetes and obesity-related kidney disease”, *International journal of molecular science*, 22: 9641.
- Zambom, F. F. F., Oliveira, K. C., Foresto-Neto, O., Faustino, V. D. *et al.* (2019) “LPS-binding protein modulates acute renal fibrosis by inducing pericyte to myofibroblast trans-differentiation through TLR-4 signaling”, *American journal of physiology renal physiology*, 317, F1058-F1067.
- Zamyatina, A. y Heine, H. (2020) “Lipopolysaccharide recognition in the crossroads of tlr4 and caspase-4/11 mediated inflammatory pathways”, *Frontiers in immunology*, 11: 585146.
- Zhang, R. M., McNerney, K. P., Riek, A. E. y Bernal-Mizrachi, C. (2021) “Immunity and hypertension”, *Acta physiologica (Oxford, England)*, 231(1): e13487.
- Zhang, Q., Wang, L., Wang, S., Cheng, H. *et al.* (2022) “Signaling pathways and targeted therapy for myocardial infarction”, *Nature*, 7: 78.
- Zixin, Y., Lulu, C., Xiangchang, Z., Qing, F. *et al.* (2022) “TMAO as a potential biomarker and therapeutic target for chronic kidney disease: a review”, *Frontiers in pharmacology*, 13: 929262.