

Sulodexida: potencial tratamiento contra el daño endotelial provocado por toxinas urémicas.

Paloma de Heras Pino^{1, a}, Matilde Alique Aguilar^{1, 2, b}, Andrea Figuer Rubio^{1, 2, c}

1. Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. 2. Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), 28034, Madrid, España.

a. palumica@gmail.com b. matilde.aliq@uah.es c. andrea.figuer@edu.uah.es

Palabras clave: endotelio; estrés oxidativo; glicocálix; indoxil sulfato; inflamación; sulodexida

Resumen

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de mortalidad en la enfermedad renal crónica (ERC). El desarrollo de ECV es consecuencia del daño endotelial provocado por la acumulación de toxinas urémicas, como el indoxil sulfato (IS) causado por la pérdida de la función renal. Las toxinas urémicas degradan el glicocálix endotelial, barrera fundamental que asegura la permeabilidad selectiva del endotelio. Su daño provoca la activación de una serie de vías oxidativas, proinflamatorias y, finalmente, la senescencia celular. La sulodexida (SDX) es un fármaco compuesto de glucosaminoglucanos que reparan el glicocálix. El objetivo fue evaluar el posible papel preventivo de la SDX sobre la disfunción endotelial inducida por IS. Se planteó un modelo *in vitro* de ERC con células endoteliales pretratadas con de SDX (0,5 ULP/mL), 48 horas y posteriormente, se indujo daño con IS (250 µM) a diferentes tiempos. Se valoró el espesor del glicocálix con WGA (*Wheat Germ Agglutinin*) y midiendo los niveles de expresión proteica y génica de sindecan-1. El estrés oxidativo se determinó valorando la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante la sonda DCFDA/H2DCFDA y la expresión proteica de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa 1 (SOD1) y catalasa. La inflamación se evaluó valorando la fosforilación de p65 y midiendo la expresión de MCP-1, IL-6 e ICAM-1. La senescencia celular se determinó midiendo la actividad β-galactosidasa y por Western blot de p53. La SDX evitó el daño en el glicocálix producido por IS aunque sin diferencias significativas en sindecan-1. Además, tuvo lugar una reducción de la producción de ROS, sin observar cambios en SOD1 y catalasa. También el IS indujo un fenotipo proinflamatorio, así como senescencia celular, la cual parecía ser frenada por la SDX. Por tanto, se concluye que la SDX tiene potencial como tratamiento preventivo del daño endotelial asociado a la ERC.

Cita: de Heras Pino, Paloma; Alique Aguilar, Matilde; Figuer Rubio, Andrea (2024) Sulodexida: potencial tratamiento contra el daño endotelial provocado por toxinas urémicas. *dianas* 13 (2): e202409fp03. ISSN 1886-8746 (electronic) journal.dianas.e202409fp03 <https://dianas.web.uah.es/journal/e202409fp03>. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Copyright: © de-Heras-Pino P, Alique-Aguilar M, Figuer-Rubio A. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Introducción

La enfermedad renal crónica (ERC) es una patología silente y progresiva causada por el deterioro de la función renal [1]. La ERC se define clínicamente como un daño renal persistente durante más de 3 meses y/o con un descenso de la tasa de filtración glomerular ($< 60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$) [2, 3]. Actualmente hay 4 millones de españoles que padecen ERC [2]. Según datos recogidos por la *Global Burden of Disease* entre los años 2006 al 2016, en España, la ERC constituye la 8ª causa de muerte y ha sido la patología con mayor tendencia al alza con respecto a su morbilidad, sólo por detrás de la enfermedad de Alzheimer [2]. La elevada mortalidad principalmente se debe al desarrollo de enfermedades cardiovasculares (ECV) asociadas al daño endotelial [1], como aterosclerosis, infartos de miocardio e hipertrofia ventricular izquierda [4].

Uno de los factores de riesgo en el desarrollo de ECV asociado a la ERC son las toxinas urémicas (TU) [5], moléculas que se van acumulando progresivamente con el debilitamiento de la función renal [3]. Las más importantes son el p-cresol y el indoxil sulfato (IS), ya que son las más abundantes y su eliminación por diálisis es complicada debido a su alta afinidad con proteínas [6]. El IS procede de la sulfatación hepática del indol reabsorbido en el intestino procedente del metabolismo del triptófano de las bacterias intestinales [7]. Debido al daño renal por diversas causas (vejez, obesidad, diabetes, hipertensión...) [1, 4], la función detoxificadora renal se ve comprometida. De esta forma, las TU se irán acumulando en la circulación sanguínea provocando daño del endotelio vascular y el desarrollo de ECV [1, 4, 8].

El endotelio vascular es una monocapa de células que recubren la cara luminal de los vasos sanguíneos. Posee multitud de funciones [1]: transporte de gases y nutrientes, regular el tono de la musculatura vascular, la cascada inflamatoria y coagulación plaquetaria, el flujo sistémico sanguíneo y la expresión de citoquinas

proinflamatorias y moléculas de adhesión [1, 9, 10]. Si resultase dañado se comprometería su función, desarrollando un fenotipo proinflamatorio, protrombótico, aterosclerótico e hiperplásico [11].

En la anatomía del endotelio vascular, el glicocálix es una estructura con suma importancia. Consiste en una matriz de proteoglicanos con glucosaminoglucanos intercalados o unidos entre sí que recubren la cara luminal endotelial [10, 11]. Actúa como barrera pasiva, sensor de tensiones mecánicas, regula funciones endoteliales (adhesión, migración, inflamación, coagulación y metabolismo lipídico), participa en la producción del NO y otorga permeabilidad selectiva al impedir la sobreactivación de los receptores de membrana [11, 12]. Sin embargo, es una estructura sumamente vulnerable [12]; puede degradarse si entra en contacto con elementos endógenos o exógenos dañinos, tales como endotoxinas o especies reactivas de oxígeno (ROS) [1, 12]. Dentro de estos elementos lesivos que propician el desarrollo de ECV asociadas a ERC, destacan las TU como el IS [1, 8, 13]. Debido a su capacidad oxidante, son capaces no solo de inducir la producción de ROS [1, 7, 13], sino también de inactivar los mecanismos detoxificadores como enzimas antioxidantes que se encargan de su eliminación [6]. Como consecuencia, se dañaría la estructura del glicocálix, perdiendo así muchas de sus funciones como su permeabilidad selectiva [10, 11]. La disminución del espesor del glicocálix favorece la activación de vías de señalización proinflamatorias, como NF- κ B, la cual induce y promueve la producción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias [10, 13, 14]. Este círculo vicioso se retroalimentaría a sí mismo, haciendo que las células adquieran un estado activo, proinflamatorio y secretor [15] que desembocaría en la aparición de senescencia celular. Se ha observado que, acompañado de esta senescencia, las células adquieren un fenotipo secretor conocido como *Senescence-Associated Secretory Phenotype* (SASP). Este se produce debido a daños asociados con el envejecimiento, tales como el acortamiento telomérico, la producción de ROS y moléculas proinflamatorias. En el caso del fenotipo secretor asociado a la senescencia prematura ocasionada por un agente lesivo, se acuñó el término *Stress-Induced Premature Senescence* (SIPS) y se caracteriza por la producción de estrés oxidativo, la producción de citoquinas proinflamatorias y la disfunción endotelial [5]. En el caso de la ERC, las células adoptarían el fenotipo SIPS debido al estrés inducido por la acción de las TU [3, 5]. Como resultado, se alteraría la función vascular y se producirían eventos cardiovasculares [4].

Actualmente, el único tratamiento eficaz contra la ERC es el trasplante renal [1, 2] ya que se ha comprobado que la diálisis no es tan eficaz en la eliminación de las TU [1, 6, 13, 14]. Sin embargo, no siempre es posible disponer de órganos óptimos para el trasplante y pueden generarse problemas en cuanto a su compatibilidad que finalicen en su rechazo [1]. En los últimos años y debido a la alta prevalencia del ERC, se han estudiado tratamientos que no sólo sean capaces de revertir esta situación, sino también de prevenirla.

La sulodexida (SDX) es un fármaco compuesto por una mezcla de glucosaminoglucanos. Concretamente se presenta un 80% de iduronilglucosaminoglucano sulfato (también llamado *fast-moving heparin*) y un 20% de dermatán sulfato [9-12]. Actualmente, se emplea como tratamiento profiláctico contra la enfermedad venosa crónica [9], pero se ha comprobado en multitud de estudios su capacidad terapéutica sobre otras patologías como la diabetes mellitus tipo II, nefropatías diabéticas o el síndrome post-trombótico [9, 10, 12]. Es multifuncional [12] y ya ha demostrado ser antioxidante, antiinflamatoria, anticoagulante, antiaterosclerótica, profibrinolítica o precursora de la reparación y deposición del glicocálix [8, 11, 12, 16].

El objetivo de nuestro estudio fue valorar el potencial papel terapéutico de la SDX para prevenir el desarrollo de ECV asociadas a la ERC. En concreto, se valoró el efecto de la SDX previniendo el daño endotelial generado por IS al observar la degradación del glicocálix, la generación de estrés oxidativo, la producción de inflamación y, finalmente, la aparición de senescencia.

Métodos

Cultivo celular y tratamientos realizados

Se cultivaron células endoteliales HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cell*; ATCC, PC5 100 010) entre los pases 2 y 8. Se mantuvieron a 37 °C y 5% de CO₂ en medio *Epithelial cell Basal Medium* (EBM; Lonza, CC-3121), suplementado con *EGM SingleQuots* (Lonza, CC-4133) y FBS al 10% (Sigma-Aldrich, F7524, lote 0001660077). En base a estudios previos [8, 16], se pretrataron las células 48 horas con SDX a una concentración final de 0,5 unidades lipasémicas (UPL) /mL (Aterina, AlfaSigma, 23330419). El IS (Sigma-Aldrich, I3875) se disolvió en dimetil sulfoxido (DMSO; Corning, 25-950-CQC) a una concentración de 0,5 M y fue preservado a -20°C. Las células fueron tratadas a una concentración final de IS de 250 μ M similar a las altas dosis observadas en pacientes en diálisis (249-557 μ M) [14, 15, 17].

Cuantificación del glicocálix

Se sembraron 4000 células por pocillo en placas μ -Slide 8 Well Grid-500 (Ibidi, 80826-G500) y se trataron con IS durante 48 horas, con duplicados de cada condición. Tras el tratamiento, se lavó las células con *Hanks Balanced Salt Solution* (HBSS; Gibco, 14175-095) y se incubaron con *Wheat Germ Agglutinin* (WGA, Invitrogen, W21405) a una concentración de 5 μ g/mL durante 10 minutos a 37 °C. Se lavaron 2

veces con HBSS (Gibco, 14175-095), se fijaron y se neutralizaron incubando 10 minutos a temperatura ambiente con una solución de glicina 100 mM (PanReac Applichem, 141340.1211) disuelta en TBS 1X. Se lavaron 2 veces con TBS 1X, se permeabilizaron las células con una solución al 0,1% tritón 100X (Sigma-Aldrich, T8787-100 ML) diluido en TBS 1X durante 1 minuto y a temperatura ambiente y se volvieron a lavar. Después se añadió a cada pocillo una solución compuesta por faloidina 488 1X (Abcam, ab176753), *Bovine Serum Albumin* (BSA; Sigma-Aldrich, A9647-100G) y TBS 1X, incubándose 1 hora en oscuridad y a temperatura ambiente. Se lavaron e incubaron con una solución de Hoechst 3342 (Life Technologies™, H3570) diluido en TBS 1x durante 7 minutos y a temperatura ambiente. Las imágenes se obtuvieron con el microscopio Leica DMi8 (Leica Microsystems) capturando 5 fotos por pocillo a 10 aumentos y 6 fotos por pocillo a 40 aumentos. Las imágenes se procesaron con el programa informático ImageJ (NIH).

Valoración del estrés oxidativo

Se empleó *DCFDA/H2DCFDA Cellular ROS Assay Kit* (Abcam, ab113851), siguiendo las indicaciones del fabricante. Se emplearon placas de 96 pocillos negras de fondo plano transparente y se sembraron 2000 células por pocillo con medio EBM sin rojo fenol (Lonza, CC-3129). Se trataron con IS por 30 minutos, 3 y 5 horas, con duplicados para todas las condiciones. La sonda sensible al peróxido DCFDA (2',7'-diclorofluoresceína diacetato) se inoculó cuando quedaban 45 minutos de la finalización del tratamiento con IS a una concentración final de 30 μ M por pocillo. Posteriormente se cuantificaron los niveles de ROS midiendo la fluorescencia en el lector de placa *FLUOstar Omega*, de BMG LABTECH (excitación, 485 nm; emisión, 535 nm). Se realizó la media de los duplicados, se corrigió restándoles la autofluorescencia y se normalizaron usando como control células sin tratar.

Extracción de ARN, proteínas y cuantificación proteica

Para la extracción de proteínas y ARN se empleó el kit *mirVana Paris Protein and RNA isolation system* (Invitrogen, AM1556), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó una centrifugación posterior al extracto de proteínas de 18200 xg a 4 °C por 30 minutos, recogiendo el sobrenadante. El ARN fue eludido en agua *RT-PCR Grade Water Ready for RT-PCR* (Invitrogen, AM9935). La concentración y pureza del ARN fue medida con el espectrofotómetro/fluorímetro DS-11 (DeNovix). En el caso de la concentración proteica, se evaluó con el *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific, 2322), usando como patrón el *Quick Start™ BSA Standard Set* (BIO-RAD, #500-0207), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incubó a 37°C y en oscuridad por 20-30 minutos y se midió la absorbancia a 562 nm en el *FLUOstar Omega* (BMG LABTECH).

RT-PCR y PCR cuantitativa

Las células sembradas se trataron con IS por 24 horas para evaluar moléculas implicadas en inflamación, como la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1), interleucina-6 (IL-6) y la proteína quimioatrayente de monocitos y macrófagos 1 (MCP-1) y 48 horas para valorar la expresión de componentes del glicocáliz como sindecan-1 (SYND1).

La RT-PCR fue realizada con el kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Thermo Fisher Scientific, 4368814), siguiendo las instrucciones del fabricante, con 1 μ g del ARN total y usando cebadores hexámeros aleatorios. En la PCR cuantitativa (q-PCR) se empleó el kit comercial *TaqMan™ Universal Master Mix II, no UNG* (Thermo Fisher Scientific, 4440040), siguiendo las instrucciones del fabricante, y se realizó en *QuantStudio™ 12K Flex* (Applied Biosystems). Las sondas empleadas (Thermo Fisher Scientific) reconocían y amplificaban *SYND1* (Hs00896423_m1), *ICAM-1* (Hs00164932_m1), *IL-6* (Hs00174131_m1), *MCP1* (Hs00234140_m1) y el control endógeno hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferasa 1 (*HPRT1*, Hs02800695_m1). Todas las condiciones se midieron por duplicado. Los datos se analizaron con QuantStudio DA2 (Applied Biosystems). Se normalizaron en función de los niveles de expresión de *HPRT1* y se evaluó los niveles de expresión mediante el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, usando como control las células sin tratar.

Western Blot

Se realizó Western blot (WB) de proteínas extraídas de cultivos celulares tratados con IS durante 24 horas para determinar: proteínas implicadas en la inflamación como fosfo-p65 y proteínas antioxidantes como la superóxido dismutasa 1 (SOD1) y catalasa (CAT). También se emplearon células tratadas durante 48 horas con IS para determinar los niveles de expresión de proteínas del glicocáliz como SYND1 y durante 72 horas para valorar marcadores de senescencia como p53. Se emplearon como controles de carga gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y β -actina.

Se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida al 7% SDS-PAGE con *TGX™ FastCast™ Acrylamide, 7%* (BIO-RAD, #161-0171) y al 10% SDS-PAGE con *TGX™ FastCast™ Acrylamide, 10%* (BIO-RAD, #1610173), con *Running buffer*, compuesto de TGS 1X (BIO-RAD, 161-0772). Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,2 μ m con el *Trans-Blot® Turbo™ RTA Transfer Kit*,

Nitrocellulose (BIO-RAD, #1704271), usando *Trans-Blot Turbo Transfer System* (Biorad) a 25V y 2,5 mA por 10 minutos. La membrana se bloqueó con una solución de leche desnatada al 5% disuelta en TTBS 1X y se incubó a temperatura ambiente con agitación por 1 hora. La membrana fue incubada con anticuerpos primarios a 4 °C durante toda la noche: anti-fosfo-p65 y anti-p53 (Cell Signaling Technology, CST#3031 y CST#9282S respectivamente) a 1:500, anti-SYND1, anti-CAT y anti-SOD1 (Abcam, ab128936, ab16731, ab16831 respectivamente) a 1:2000 y anti-GAPDH (Millipore, MAB374) y anti- β -actina (SCBT, sc-47778) a 1:3000. En el caso de fosfo-p65, se realizó la dilución del anticuerpo primario con 3% de BSA (Sigma-Aldrich, A9647-100G). Se lavaron las membranas con TTBS 1X y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo (Invitrogen, A16096) por 1 hora a temperatura ambiente, exceptuando GAPDH y β -actina que es anti-ratón (Invitrogen, A16072). Se lavaron las membranas y se revelaron con *SuperSignalTM West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate* (Thermo Fisher Scientific, 34580) en el medidor de quimioluminiscencia Fusion Solo 3S, con el programa Vision Capt. (Vilber). Se cuantificó la intensidad de las bandas con ImageJ (NIH).

Evaluación de la senescencia mediante la valoración de la actividad β -galactosidasa lisosomal

Se sembraron 1000 células por pocillo en placas p6 y se trataron con IS por 72 horas. Se empleó el *Senescence Detection Kit* (Abcam, ab65351) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, las células se lavaron, fijaron y tiñeron con 500 μ L por pocillo de una solución con X-gal. Se dejaron incubando en oscuridad, ausencia de CO₂ y a 37 °C toda la noche. Se tomaron 6 fotos por pocillo con el microscopio de luz transmitida Mateo TL (Leica Microsystems). Se normalizaron los resultados en función del número de células senescentes en el pocillo sin tratamiento.

Análisis estadístico

El análisis estadístico y la representación gráfica de los resultados se realizó usando GraphPad Prism 5 8.0.2. Se comprobó la normalidad con el test Shapiro-Wilk. Al obtener distribuciones normales, se realizó el test ANOVA seguido del test de Tukey para comparaciones múltiples. En el caso del WB de p53, no se observó distribución normal, por lo que se empleó el test no paramétrico de Friedman y, posteriormente, el test de Dunn. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando el p-valor (p) < 0,05.

Resultados

Sulodexida evita la pérdida del glicocálix originado por indoxil sulfato

En primer lugar, se ha valorado si la SDX fue capaz de revertir el daño en el glicocálix endotelial causado por IS. Para ello, se empleó el marcaje con WGA tras el tratamiento con IS durante 48 horas (Figuras 1A y 1B). Se observó una disminución significativa del espesor del glicocálix (p = 0,04, Figura 1C), mientras que el pretratamiento con SDX tendía a evitar el daño originado por IS, regresando a niveles similares a los fisiológicos iniciales, aunque de forma no significativa (p = 0,16, Figura 1C). El tratamiento sólo con SDX mantenía un espesor del glicocálix similar al control. También se comprobó los niveles de expresión de una de las proteínas principales del glicocálix, SYND1. Sin embargo, no se encontraron cambios ni en la expresión del ARN mensajero (ARNm) ni de la proteína (Figura 1D).

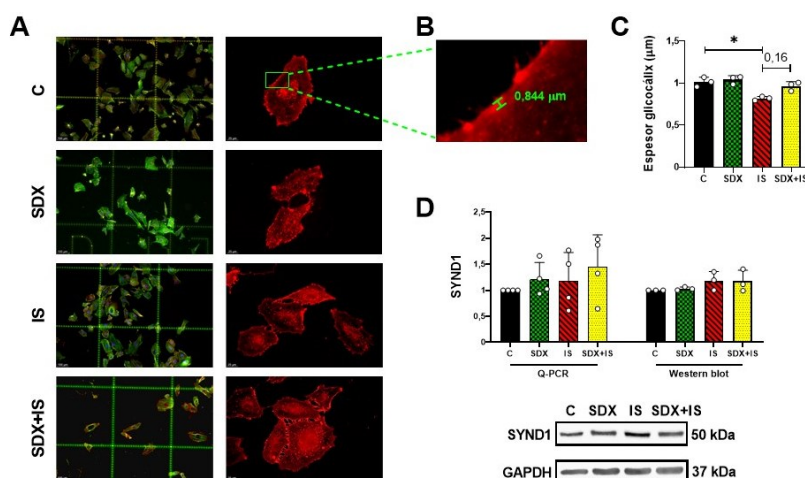


Figura 1: Glicocálix en HUVEC. (A) Fotografías a la izquierda (10x) muestran la distribución de las células por pocillo, marcándose de azul (Hoescht 3342) los núcleos, de rojo (WGA) el glicocálix y de verde (Faloidina 488) el citoesqueleto. Fotografías a la derecha (40x) muestran el glicocálix (WGA). (B) Ejemplo medición del espesor del glicocálix. (C) Espesor del glicocálix medido por WGA (n = 3). (D) Resultados de la q-PCR (n = 4) y WB (n = 3) de sindecan-1 (SYND1). *p-valor < 0,05. C = control, SDX = pretratamiento con sulodexida 48 horas, IS = indoxil sulfato 250 μ M 48 horas, SDX + IS = pretratamiento con sulodexida 48 horas y tratamiento con IS.

La sulodexida previene el aumento del estrés oxidativo causado por indoxil sulfato

En cuanto al estrés oxidativo, se observó una reducción generalizada de los niveles de ROS tras el pretratamiento con SDX en comparación con los controles ($p = 0,0048$, Figura 2A). También se observó un descenso de los niveles de ROS en las células pretratadas con SDX y posteriormente con IS si se comparaba con los controles ($p = 0,0023$ tras 30 minutos de tratamiento y $p = 0,013$ a las 3 horas, Figura 2A) o con células tratadas sólo con IS ($p = 0,005$ en el tratamiento de 30 minutos y $p = 0,017$ en el tratamiento de 3 horas, Figura 2A). No se observaron diferencias significativas a las 5 horas del tratamiento.

Por último, se valoró la capacidad antioxidante celular midiendo la expresión proteica de SOD1 y CAT, pero no se observaron diferencias significativas (Figura 2B).

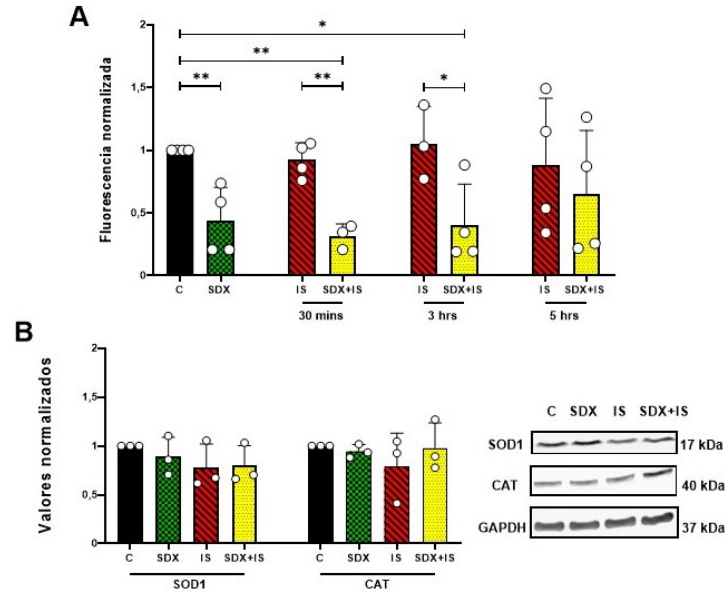


Figura 2: Estrés oxidativo en HUVEC. (A) Evaluación de los niveles de ROS a 30 minutos, 3 y 5 horas con la sonda DCFDA/H2DCFDA y normalizados con su respectivo control ($n = 4$). (B) WB de SOD1 y CAT a 24 horas de IS ($n = 3$). * p -valor $< 0,05$; ** p -valor $< 0,005$. C = control, SDX = pretratamiento con sulodexida 48 horas, IS = indoxil sulfato 250 μ M 48 horas, SDX + IS = pretratamiento con sulodexida 48 horas y tratamiento con IS.

Aumento de marcadores típicos de la inflamación con el tratamiento de IS en HUVEC

NF- κ B es un factor transcripcional que consta de una estructura dimérica y entre sus monómeros está p65. La fosforilación de p65 propicia su entrada en el núcleo y la activación de vías de señalización que promueven el desarrollo de la inflamación. No se obtuvieron resultados significativos, solamente se observó que los niveles de su expresión proteica tendieron a decrecer tras el tratamiento con SDX en comparación con el control ($p = 0,05$, Figura 3A). También valoramos la expresión de algunos ARNm que se transcriben como consecuencia de la fosforilación de p65 y con función proinflamatoria. Concretamente, *MCP-1*, *IL-6* e *ICAM-1* tras el tratamiento con IS durante 24 horas.

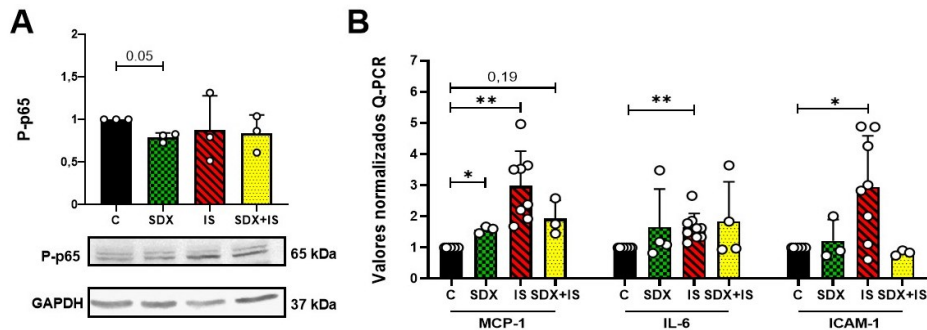


Figura 3: Marcadores de inflamación. (A) Análisis de WB de fosfo-p65 a 24 horas de IS ($n = 3$). (B) q-PCR de *MCP-1*, *IL-6* e *ICAM-1* a 24 horas de IS usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (*ICAM-1* $n = 8$; *MCP-1* e *IL-6* $n = 9$). * p -valor $< 0,05$; ** p -valor $< 0,005$. C = control, SDX = pretratamiento con sulodexida 48 horas, IS = indoxil sulfato 250 μ M 48 horas, SDX + IS = pretratamiento con sulodexida 48 horas y tratamiento con IS.

Se observó un aumento significativo de *MCP-1* tras el tratamiento con SDX ($p = 0,01$, Figura 3B) al igual que tras el tratamiento con IS ($p = 0,006$, Figura 3B) al comparar ambos con el control. Además, se observó una tendencia al alza de los niveles del ARNm tras el tratamiento con SDX e IS ($p = 0,19$, Figura 3B). En

el caso de *IL-6* e *ICAM-1*, solamente se observó un aumento significativo con IS ($p = 0,009$ para *IL-6* y $p = 0,04$ para *ICAM-1*, Figura 3B) comparándolo con los controles.

La sulodexida amortigua la senescencia endotelial que induce el indoxil sulfato

Se valoró la senescencia inducida por IS a tiempos más largos (72 horas) para comprobar si la SDX era capaz de evitar la entrada en senescencia. La valoración de la senescencia con X-gal (Figura 4A) no mostró significación, pero sí una serie de tendencias al alza en el caso del tratamiento con IS ($p = 0,08$, Figura 4B) y el tratamiento con SDX e IS ($p = 0,14$, Figura 4B) comparado con el control. También la SDX tiende a reducir la senescencia cuando las células son tratadas con IS ($p = 0,05$, Figura 4B). También se estudió los niveles de expresión proteica de p53, el cual es un factor transcripcional implicado en el ciclo celular y se encarga de impedir la conversión tumoral de las células. Sin embargo, el WB de p53 no mostró diferencias significativas (Figura 4C).

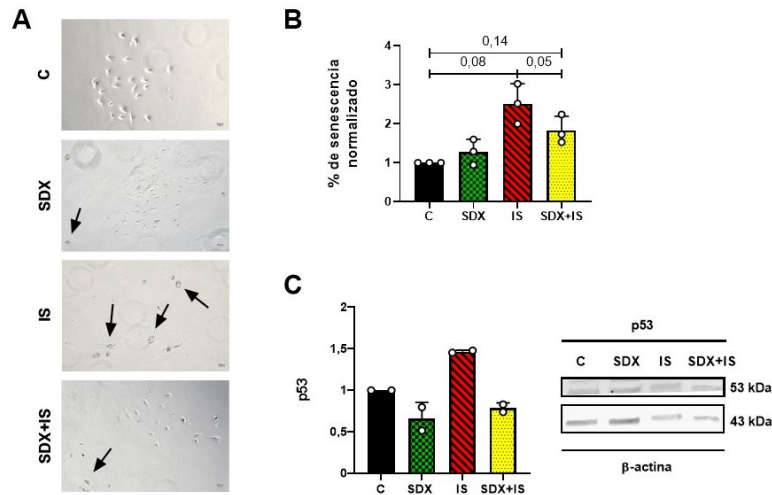


Figura 4: Evaluación de la senescencia. (A) Ejemplos de fotografías obtenidas por microscopía óptica observando células con coloración verde-azulada (flechas), que corresponde a células senescentes. (B) Valoración de la senescencia celular con X-gal, datos normalizados según el número de células senescentes en controles ($n = 3$). (C) WB de p53 a 72 horas de IS ($n = 2$). C = control, SDX = pretratamiento con sulodexida 48 horas, IS = indoxil sulfato 250 μ M 48 horas, SDX + IS = pretratamiento con sulodexida 48 horas y tratamiento con IS.

Discusión

El estudio de las enfermedades renales ha cobrado una gran importancia en los últimos años. Este creciente interés se debe al incremento de la prevalencia de la ERC [1], en parte debido al aumento de sus factores de riesgo relacionados, tales como los nuevos hábitos de vida (sedentarismo, tabaquismo) o patologías asociadas como diabetes mellitus tipo II, obesidad e hipertensión [1, 4]. Además, al tratarse de una patología crónica, su tratamiento supone un elevado coste económico que repercute sobre el sistema sanitario [2]. Asociada a la ERC aparecen comúnmente ECV, que suponen la principal causa de mortalidad en los pacientes con ERC [2]. Por todo esto, actualmente el estudio y prevención de la ECV asociadas a ERC es de vital importancia.

Existe una creciente evidencia de que las TU, entre ellas el IS, dañan el glicocálix endotelial [9, 12], aunque se desconocen con exactitud los mecanismos implicados. Incluso en pacientes con ERC se ha descrito el aumento de componentes del glicocálix en plasma a consecuencia de su escisión provocada por la situación de uremia [10]. Por esta razón, nos propusimos valorar el potencial efecto terapéutico de la SDX, fármaco que promueve la reparación y deposición del glicocálix, aunque los mecanismos por los que lo hace no se conocen completamente. Se observó que el IS inducía un descenso en el espesor del glicocálix, mientras que el pretratamiento con SDX prevenía este daño, demostrando así su papel en la protección del glicocálix. Con respecto al estudio de los niveles génicos y proteicos de SYND1, no se observaron diferencias significativas. Aunque ambas técnicas se emplean para valorar la integridad del glicocálix, la lecitina WGA marca la parte glicada, mientras que el WB y q-PCR marcan la parte proteica de SYND1. En el caso de nuestro estudio, lo que nos compete es observar y demostrar la pérdida de la parte glicada, en el caso de IS, y la ganancia de la misma gracias a la SDX.

El glicocálix es una barrera fundamental que protege al endotelio, no sólo de elementos exógenos dañinos, sino también de interaccionar de forma aleatoria y patológica con elementos endógenos, tales como células inmunitarias [12]. Es decir, mantiene y permite que el endotelio tenga permeabilidad selectiva [11, 12]. De esta forma, si resulta dañado se comprometerían esta y otras funciones, desembocando en su activación errática y patológica. Una de las primeras consecuencias sería la activación de vías implicadas en la generación de estrés oxidativo y producción de moléculas proinflamatorias [1, 4, 5, 16]. Por ello se decidió

estudiar la capacidad antioxidante, observándose que era capaz de reducir la producción de ROS tanto en ausencia como en presencia de IS. Este hecho se evidenció a tiempos de 30 minutos y 3 horas de IS, mientras que a las 5 horas su eficacia descendió. El IS también es capaz de inhibir la actividad detoxificadora de mecanismos celulares implicados en la eliminación de ROS [1, 7, 13]. Las proteínas más importantes implicadas en este proceso son la SOD1 y CAT [6, 17]. Ambas desarrollan una actividad conjunta en la eliminación de ROS, siendo SOD1 la encargada de convertir el anión superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular, mientras que la CAT es capaz de convertir el peróxido en agua y oxígeno molecular. En estudios previos [16], la SDX ha demostrado ser capaz de activar la expresión de estas proteínas, aunque los mecanismos por los cuales lo realiza no han sido completamente esclarecidos. Los ensayos de WB de SOD1 y CAT no indicaron que hubiera diferencias significativas en los niveles de expresión de ambas proteínas. Por ello, se plantea para estudios posteriores la posibilidad de realizar estudios de actividad enzimática, como un mejor enfoque en el estudio de la actividad antioxidante.

Otro de los actores implicados serían las vías de señalización proinflamatorias, tales como NF- κ B [1, 3, 14]. Esta vía de señalización es ubicua e inducible, es decir, no está constitutivamente activa. Las señales que propician su activación son, entre otras, citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, así como el estrés oxidativo. NF- κ B consiste en un factor transcripcional con estructura dimérica capaz de formar hasta 15 combinaciones con sus 5 monómeros. En el caso de la proteína p65, suele formar dímeros con el monómero p50. Ambos están inactivos en el citosol celular debido a la unión de la proteína inhibidora I κ B. Sin embargo, si I κ B resulta fosforilada y ubiquitinada, permitirá la liberación del dímero y su posterior fosforilación, la cual es esencial para su traslocación nuclear. El IS, debido a la activación de vías que producen estrés oxidativo, es capaz de promover la fosforilación y activación de p65 [14, 18], aunque los mecanismos por los cuales lo realiza no están del todo claros. Por el contrario, estudios previos demuestran la capacidad de la SDX para inhibir la vía proinflamatoria NF- κ B [9, 10] y los procesos protrombóticos, procoagulantes y proinflamatorios de la formación de la placa de ateroma [19]. En este estudio, no se lograron observar el aumento de fosfo-p65 esperada tras el tratamiento con IS, aunque sí que se observó una tendencia a la baja con el pretratamiento de SDX. Dentro del núcleo, fosfo-p65 es capaz de interactuar con sitios de unión al ADN y regular la expresión de ciertas proteínas como SOD1 [16], la producción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias como IL-6 y MCP-1 [14, 18], así como moléculas de adhesión celular como ICAM-1 [1, 13, 14]. A parte de moléculas proinflamatorias, tanto en el SAPS como en el SIPS se producen enzimas como las metaloproteasas 1 de leucocitos (MMP-1). Estas degradan el glicocáliz, liberándose con ello fragmentos que actúan como DAMPs (Patrones Moleculares Asociados al Daño) y que son reconocidos por sus respectivos receptores, generando inflamación y contribuyendo aún más al círculo vicioso. En el caso de las q-PCR de *MCP-1*, *IL-6* e *ICAM-1*, se observaron en todos los casos un aumento significativo de su expresión génica con el tratamiento de IS durante 24 horas. Observamos que la SDX no parece tener efecto sobre el fenotipo proinflamatorio adquirido a consecuencia del IS. No solo no hubo diferencias significativas en los niveles de fosfo-p65 sino que, además, provocó el aumento de los niveles de MCP-1 en células tratadas con SDX en comparación con los controles. En otros estudios que se centran en valorar la respuesta inflamatoria inducida por TU, emplean tiempos de tratamiento con IS más reducidos, concretamente de 3, 5, 10, 20, 30, 45 y 60 minutos [14, 18], aunque también hay evidencia de que el IS induce la inflamación de forma significativa con el tiempo de tratamiento seleccionado en este estudio (24 horas) [14, 18]. También, se ha demostrado que la SDX, gracias a su parte de dermatán sulfato, es capaz de inhibir la actividad de las MMP-1 al unirse a su centro activo [12]. Por lo tanto, en próximas investigaciones se podría realizar el estudio de la expresión de fosfo-p65, *MCP-1*, *IL-6* e *ICAM-1* a tiempos más reducidos.

En los pacientes con ERC, se ha observado que las TU como el IS, gracias a todas estas vías de señalización que activan mecanismos oxidativos y proinflamatorios, desembocarían en la activación patológica del endotelio. La acumulación de este daño provoca que la célula adquiera un fenotipo secretor y proinflamatorio, conociéndose este proceso como conversión gerogénica o geroconversión [5]. Se define como el cambio del arresto del ciclo celular de ser reversible a irreversible [5]. De esta forma, las células normales y sanas pasarían a tener un perfil senescente, caracterizado por ser hipersecretor, proinflamatorio e inmunogénico [5, 19, 20]. Este cambio fenotípico se denomina SIPS y se produce como consecuencia de desbalances en mecanismos fisiológicos celulares, principalmente aquellos detoxificadores, debido a la acción de agentes lesivos [5]. A parte de la producción de moléculas proinflamatorias que propician la aparición de senescencia, también se ven alterados factores transcripcionales implicados en el desarrollo y progresión del ciclo celular. Uno de los marcadores más importantes que se estudian en la senescencia es la proteína p53 [20], conocido popularmente como “el guardián del genoma”. Es un factor transcripcional supresor de tumores el cual, en el caso de daño celular en el ADN, activará a p21 [21]. Esta activación es esencial para inhibir la progresión del ciclo celular, la reparación del ADN o, en el caso de que no se pueda reparar, la inducción hacia la apoptosis. Aunque los mecanismos de su activación no están del todo claros, el IS ha demostrado ser capaz de aumentar su expresión [5, 13, 20]. Esta adquisición de un fenotipo senescente a causa del daño originado por IS la podemos empezar a atisbar tras 72 horas de tratamiento en nuestro modelo comparándolo con el control. En células tratadas con IS, la SDX tendía a reducir la senescencia. En el caso de p53, no se observaron diferencias significativas, aunque esto se debió a la

dispersión de los datos y el bajo número de repeticiones. Por ello, se plantea el incremento del número de experimentos para aumentar la evidencia estadística y extraer información más significativa y fiable.

A modo de resumen, el IS se produce como consecuencia de la sulfatación hepática del indol producido por las bacterias intestinales en el metabolismo del triptófano (Figura 5A). El IS, debido al malfuncionamiento renal en pacientes con ERC (Figura 5A), no sería eliminado y dañaría el endotelio vascular, causando lesiones en el glicocálix y, por lo tanto, la pérdida de su permeabilidad selectiva (Figura 5B). De esta forma se activarían vías de señalización implicadas en la generación de estrés oxidativo, inflamación y senescencia (Figura 5C), desembocando en la aparición de eventos cardiovasculares. La SDX es capaz de prevenir este daño, no solo a nivel del glicocálix, sino también a nivel de las vías comentadas anteriormente gracias a su capacidad antioxidante y antiinflamatoria (Figura 5C).

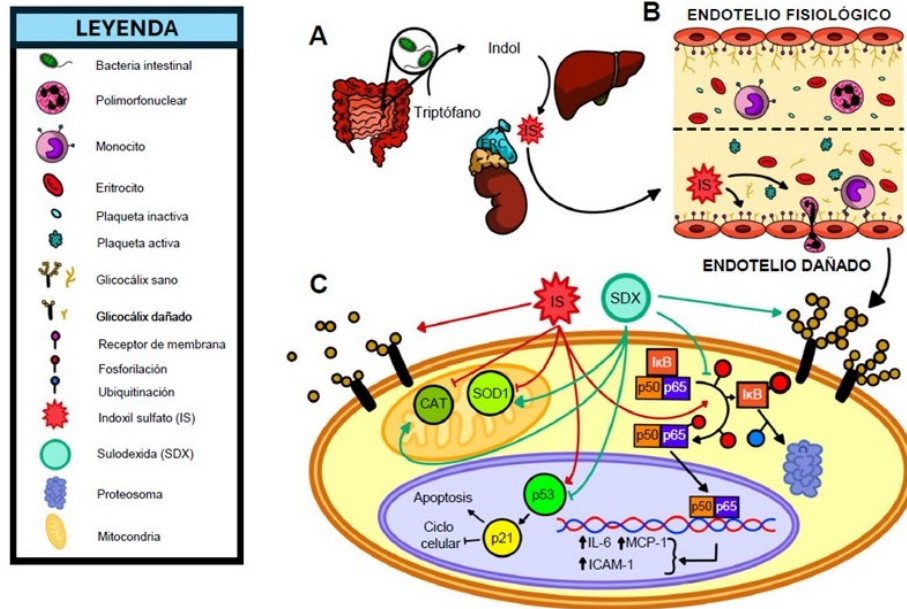


Figura 5: Resumen del papel del IS y SDX en ERC. (A) Producción del IS. (B) Comparativa de un endotelio fisiológico o sano con un endotelio lesionado por la acción del IS. (C) Esquema de las rutas en las que interaccionan el IS y la SDX.

En conclusión, la SDX ha demostrado su papel en la prevención del daño del glicocálix endotelial, permitiendo mantener así la permeabilidad selectiva que caracteriza al endotelio vascular. Gracias a esto y a su capacidad antioxidante y antiinflamatoria, evitaría la activación de vías de señalización implicadas en la generación de estrés oxidativo e inflamación. Al frenar este círculo vicioso, evitaría la conversión de las células hacia un fenotipo senescente y, por lo tanto, el malfuncionamiento de la estructura vascular. De esta forma, se abre aún más el camino al desarrollo y estudio de fármacos efectivos contra la disfunción endotelial, permitiendo así mejorar la esperanza y calidad de vida de estos pacientes.

Agradecimientos

Financiado por el Instituto de Salud Carlos III y cofundado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional: “PI19/00240” y el contrato “FI20/00018”. También “Ayuda de la Línea de Actuación Excelencia para el Profesorado Universitario de la UAH” EPU-INV-UAH/2022/001.

Referencias

1. Figuer, A., Alique, M., Valera, G., Serroukh, N., Ceprián, N., de Sequera, P., Morales, E., Carracedo, J., Ramírez, R. and G. Bodega. 2023. Nuevos mecanismos implicados en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular en la enfermedad renal crónica. *Nefrología* 43 (1): 63–80
2. Ortiz, A., Sanchez-Niño, M.D., Crespo-Barrio, M., De-Sequera-Ortiz, P., Fernández-Giráldez, E., García-Maset, R., Macía-Heras, M., Pérez-Fontán, M., Rodríguez-Portillo, M., Salgueira-Lazo, M., Sánchez-Álvarez, E., Santamaría-Olmo, R., Simal-Blanco, F. and M. Pino-Pino. 2019. The Spanish Society of Nephrology (SENEFRO) commentary to the Spain GBD 2016 report: Keeping chronic kidney disease out of sight of health authorities will only magnify the problem. *Nefrología* 39 (1): 29–34
3. Figuer, A., Bodega, G., Tato, P., Valera, G., Serroukh, N. Ceprian, N., de Sequera, P., Morales, E., Carracedo, J., Ramírez, R., and M. Alique. 2021. Premature aging in chronic kidney disease: The outcome of persistent inflammation beyond the bounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 18 (15): 8044

4. Liu, M., Li, X.C., Lu, L., Cao, Y., Sun, R.R., Chen, S. and P.Y. Zhang. 2014. Cardiovascular disease and its relationship with chronic kidney disease. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 18 (19): 2918–2926
5. Alique, M., Ramírez-Carracedo, R., Bodega, G., Carracedo, J. and R. Ramírez. 2018. Senescent microvesicles: A novel advance in molecular mechanisms of atherosclerotic calcification. *International Journal of Molecular Sciences* 19 (7): 2003
6. Pieniazek, A., Kopera, M., Gwozdziński, L. and K. Gwozdziński. 2022. Indoxyl Sulfate Induces Oxidative Changes in Plasma and Hemolysate. *Molecules* 27 (12): 3848
7. Yu, M., Kim, Y.J. and D.H. Kang. 2011. Indoxyl sulfate-induced endothelial dysfunction in patients with chronic kidney disease via an induction of oxidative stress. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 6 (1): 30–39
8. Sosinska-Zawierucha, P., Mackowiak, B. and A. Breborowicz. 2019. N-Acetylcysteine and Sulodexide Reduce the Prothrombotic Effect of Uremic Serum on the Venous Endothelial Cells. *Kidney and Blood Pressure Research* 44 (2): 277–285
9. De Felice, F., Megiorni, F., Pietrantonio, I., Tini, P., Lessiani, G., Mastroiacovo, D., Mattana, P., Antinozzi, C., Di Luigi, L., Delle Monache, S., Angelucci, A., Festuccia, C., Fanzani, A., Maggio, R., Tombolini, V., Gravina, G. and F. Marampon. 2019. Sulodexide counteracts endothelial dysfunction induced by metabolic or non-metabolic stresses through activation of the autophagic program. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 23 (6): 2669–2680
10. Ying, J., Zhang, C., Wang, Y., Liu, T., Yu, Z., Wang, K., Chen, W., Zhou, Y. and G. Lu. 2023. Sulodexide improves vascular permeability via glycocalyx remodelling in endothelial cells during sepsis. *Frontiers in Immunology* 14: 1172892
11. Li, T., Liu, X., Zhao, Z., Ni, L. and C. Liu. 2017. Sulodexide recovers endothelial function through reconstructing glycocalyx in the balloon-injury rat carotid artery model. *Oncotarget* 8 (53): 91350–91361
12. Song, J.W., Zullo, J.A., Liveris, D., Dragovich, M., Zhang, X.F. and M.S. Goligorsky. 2017. Therapeutic restoration of endothelial glycocalyx in sepsis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 361 (1): 115–121
13. Lim, Y.J., Sidor, N.A., Tonial, N.C., Che, A. and B.L. Urquhart. 2021. Uremic Toxins in the Progression of Chronic Kidney Disease and Cardiovascular Disease: Mechanisms and Therapeutic Targets. *Toxins* 13 (2): 142
14. Tumor, Z., Shimizu, H., Enomoto, A., Miyazaki, H. and T. Niwa. 2010. Indoxyl sulfate upregulates expression of ICAM-1 and MCP-1 by oxidative stress-induced NF- κ B activation. *American Journal of Nephrology* 31 (5): 435–441
15. Guerrero, F., Carmona, A., Jimenez, M.J., Obrero, T., Pulido, V., Moreno, J.A., Soriano, S., Martín-Malo, A. and P. Aljama. 2021. Passage number-induced replicative senescence modulates the endothelial cell response to protein-bound uremic toxins. *Toxins* 13 (10): 738
16. Gabryel, B., Jarzabek, K., Machnik, G., Adamczyk, J., Belowski, D., Obuchowicz, E. and T. Urbanek. 2016. Superoxide dismutase 1 and glutathione peroxidase 1 are involved in the protective effect of sulodexide on vascular endothelial cells exposed to oxygen–glucose deprivation. *Microvascular Research* 103: 26–35
17. Monteiro, E.B., Soares, E. dos R., Trindade, P.L., de Bem, G.F., Resende, A. de C., Passos, M.M.C. da F., Soulage, C.O. and J.B. Daleprane. 2020. Uraemic toxin-induced inflammation and oxidative stress in human endothelial cells: protective effect of polyphenol-rich extract from açai. *Experimental Physiology* 105 (3): 542–551
18. Masai, N., Tatebe, J., Yoshino, G. and T. Morita. 2010. Indoxyl sulfate stimulates monocyte chemoattractant protein-1 expression in human umbilical vein endothelial cells by inducing oxidative stress through activation of the NADPH oxidase-nuclear factor- κ B pathway. *Circulation Journal* 74 (10): 2216–2224
19. Suminska-Jasinska, K., Polubinska, A., Ciszewicz, M., Mikstacki, A., Antoniewicz, A. and A. Breborowicz. 2011. Sulodexide reduces senescence-related changes in human endothelial cells. *Medical Science Monitor* 17 (4): 222–226
20. Freund, A., Laberge, R.M., Demaria, M. and J. Campisi. 2012. Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Molecular Biology of the Cell* 23 (11): 2066–2075
21. Alique, M., Bodega, G., Giannarelli, C., Carracedo, J. and R. Ramírez. 2019. MicroRNA-126 regulates Hypoxia-Inducible Factor-1 α which inhibited migration, proliferation, and angiogenesis in replicative endothelial senescence. *Scientific Reports* 9 (1): 7381