

## TESIS DOCTORAL

*Implicación de los receptores TLR4 y  
NLRP3 en las complicaciones  
cardiovasculares en dos modelos  
experimentales: tratamiento crónico por  
Cisplatino y Síndrome Metabólico por  
dieta. Efecto de su modulación*

**Autor:**

***Antonio González Ruiz***

**Directoras:**

***Visitación López-Miranda González  
Esperanza Milagrosa Herradón Pliego***

**Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud**

**Escuela Internacional de Doctorado**

2023



## TESIS DOCTORAL

*Implicación de los receptores TLR4 y  
NLRP3 en las complicaciones  
cardiovasculares en dos modelos  
experimentales: tratamiento crónico por  
Cisplatino y Síndrome Metabólico por  
dieta. Efecto de su modulación*

**Autor:**

***Antonio González Ruiz***

**Directoras:**

***Visitación López-Miranda González  
Esperanza Milagrosa Herradón Pliego***

**Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud**

**Escuela Internacional de Doctorado**

2023

Este trabajo ha formado parte de dos proyectos  
“Neuropatías secundarias: ¿Un problema con mil caras y abordaje terapéutico común”  
Ministerio de Ciencia e Innovación  
“Focalizados en la inmunoinflamación: Los receptores TLR y TRP como dianas farmacológicas  
para el Síndrome Metabólico, la artrósis y sus complicaciones” Proyecto propio Universidad  
Rey Juan Carlos



# Índice

## Resumen

1.	Introducción	
1.1.	Sistema cardiovascular	1
1.1.1.	Estructura y función cardíaca .....	1
1.1.2.	Estructura y función de las arterias .....	5
1.2.	Enfermedades cardiovasculares	8
1.2.1.	Insuficiencia cardíaca.....	9
1.2.2.	Aterosclerosis y disfunción endotelial.....	10
1.2.3.	Disfunción autonómica cardiovascular .....	13
1.2.4.	Función renal y desarrollo de enfermedades cardiovasculares. ....	15
1.3.	Alteraciones cardiovasculares ocasionadas por el tratamiento con Cisplatino	16
1.4.	Alteraciones cardiovasculares asociadas al Síndrome Metabólico	20
1.5.	El papel de la inflamación crónica de bajo grado en la aparición y desarrollo de las alteraciones cardiovasculares	23
1.5.1.	Inflamación crónica de bajo grado.....	24
1.5.2.	Activación de los receptores de reconocimiento de patrón.....	25
1.5.3.	Mediadores solubles de la respuesta inflamatoria: Citoquinas proinflamatorias.....	32
1.6.	Inhibidores de los receptores TLR como nuevas estrategias terapéuticas en enfermedades de base inflamatoria.	36
1.6.1.	Inhibición mediante fármacos de pequeño peso molecular .....	36
1.6.2.	Anticuerpos anti-TLR .....	38
1.6.3.	Oligonucleótidos .....	39
1.6.4.	Análogos del Lípido A .....	40
1.6.5.	Inhibidores miRNA .....	41
1.6.6.	Nano-antagonistas TLR .....	42
2.	Hipótesis y Objetivos	45
3.	Material y Métodos	49
3.1.	Modelos experimentales: desarrollo, protocolo experimental y tratamientos	50
3.1.1.	Modelo experimental de desarrollo de complicaciones cardiovasculares por administración crónica de Cisplatino .....	50
3.1.1.1.	Desarrollo del modelo experimental .....	50
3.1.1.2.	Protocolo experimental .....	51
3.1.1.3.	Tratamientos realizados.....	52

3.1.2.	Modelo experimental de desarrollo de complicaciones cardiovasculares por Síndrome Metabólico (SM) por dieta .....	54
3.1.2.1.	Desarrollo del modelo experimental .....	54
3.1.2.2.	Protocolo experimental .....	54
3.1.2.3.	Tratamiento realizado .....	56
3.2.	Valoración de parámetros generales de antropometría y comportamiento alimentario en los modelos experimentales desarrollados y sus tratamientos	57
3.2.1.	Peso.....	57
3.2.2.	Ingesta sólida.....	57
3.2.3.	Ingesta líquida.....	58
3.2.4.	Antropometría .....	58
3.3.	Valoración de marcadores plasmáticos en los modelos experimentales desarrollados y sus tratamientos	58
3.3.1.	Determinación niveles plasmáticos de Malondialdehído (MDA) .....	59
3.3.2.	Determinación de niveles plasmáticos de citoquinas proinflamatorias	60
3.3.3.	Determinación niveles plasmáticos de glucosa, lípidos, lipoproteínas y creatinina.....	60
3.3.4.	Determinación niveles plasmáticos de insulina .....	61
3.3.5.	Determinación de índice HOMA-IR y HOMA-β.....	61
3.4.	Valoración de la función cardiovascular en los modelos experimentales desarrollados y sus tratamientos	62
3.4.1.	Determinación de la presión arterial directa .....	62
3.4.2.	Determinación de la función cardiaca basal. Preparación de corazón aislado y perfundido de rata (preparación de Langendorff).....	62
3.4.3.	Índice de masas.....	64
3.5.	Determinación de la función vascular en territorio de conductancia. Preparación de aorta aislada de rata	64
3.6.	Determinación de la función vascular en territorio de resistencia. Preparación de lecho mesentérico aislado y perfundido. Preparación de arteria mesentérica aislada	66
3.6.1.	Preparación de lecho mesentérico aislado y perfundido.....	67
3.6.2.	Preparación de arteria mesentérica aislada .....	68
3.7.	Determinación de la expresión de proteínas en los tejidos cardiaco, vascular y renal en los modelos experimentales desarrollados y sus tratamientos	69
3.8.	Inmunohistoquímica en arteria mesentérica	71
3.9.	Fármacos y soluciones utilizados	72
3.9.1.	Fármacos utilizados .....	73
3.9.2.	Disolución de los fármacos. Vehículos utilizados .....	73
3.9.3.	Soluciones nutricias .....	74
3.9.3.1.	Solución de Krebs-Henseleit .....	74

3.9.3.2.	Solución de Krebs-Henseleit modificada para corazón .....	74
3.9.3.3.	Solución de Krebs-Henseleit modificada utilizada en los experimentos de la preparación de arteria mesentérica aislada .....	76
3.9.3.4.	Soluciones utilizadas para Western-Blot .....	77
3.9.4.	Unidades de medida y análisis estadístico .....	77
4.	Resultados .....	80
4.1.	Modelo administración crónica de Cisplatino. Desarrollo de complicaciones cardiovasculares .....	82
4.1.1.	Parámetros generales .....	82
4.1.1.1.	Evolución del peso corporal de los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg) .....	82
4.1.1.2.	Evolución de la ingesta sólida de los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg) .....	83
4.1.2.	Marcadores plasmáticos .....	84
4.1.2.1.	Niveles plasmáticos de MDA en los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg) .....	84
4.1.2.2.	Niveles plasmáticos de Creatinina en los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg).....	85
4.1.2.3.	Niveles plasmáticos de citoquinas en los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg).....	86
4.1.3.	Parámetros cardiovasculares .....	87
4.1.3.1.	Presión arterial y frecuencia cardiaca en los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg).....	87
4.1.3.2.	Función cardiaca basal en los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg) .....	88
4.1.3.3.	Índices cardiacos en los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg).....	90
4.1.3.4.	Reactividad vascular en aorta en los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg) .....	91
4.1.3.5.	Reactividad vascular en lecho mesentérico en los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg).....	94
4.1.4.	Expresión proteica .....	95
4.1.4.1.	Expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3 en el ventrículo izquierdo de los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg) .....	95
4.1.4.2.	Expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3 en la aorta de los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg) .....	98
4.1.4.3.	Expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3 en el tejido renal de los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg) .....	100

4.1.4.4.	Expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3 en la arteria mesentérica de los animales tratados durante 5 semanas con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg).....	102
4.2.	Efecto de la administración de TLR4-PA1 en el modelo de administración crónica de cisplatino	104
4.2.1.	Parámetros generales.....	104
4.2.1.1.	Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, en la ganancia de peso de los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg) .....	104
4.2.1.2.	Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, en la ingesta sólida de los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg) .....	106
4.2.2.	Marcadores plasmáticos .....	107
4.2.2.1.	Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, en los niveles plasmáticos de MDA de los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg).....	107
4.2.3.	Parámetros cardiovasculares.....	109
4.2.3.1.	Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, en los niveles de presión arterial y frecuencia cardíaca de los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg) .....	109
4.2.3.2.	Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, en la funcionalidad cardíaca de los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg).....	112
4.2.3.3.	Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, sobre los índices cardíacos de los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg).....	115
4.2.3.4.	Efecto de la administración de TLR4-PA1 10 mg/Kg sobre la reactividad de la aorta de los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg).....	116
4.2.3.5.	Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, sobre la reactividad del lecho mesentérico de los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg) .....	121
4.2.4.	Expresión proteica .....	125
4.2.4.1.	Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, sobre la expresión proteica en el ventrículo izquierdo de los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg) .....	125
4.2.4.2.	Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, sobre la expresión proteica en la aorta de los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg).....	129
4.2.4.3.	Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, sobre la expresión proteica en el tejido renal de los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg).....	133
4.3.	Modelo de Síndrome Metabólico por dieta. Complicaciones cardiovasculares	137

4.3.1.	Parámetros generales.....	137
4.3.1.1.	Evolución del peso corporal y de la ganancia de peso de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta.....	137
4.3.1.2.	Evolución de la Ingesta Sólida, Ingesta Líquida e Ingesta Calórica de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta .....	138
4.3.1.3.	Índice de Masa Corporal y Perímetro Abdominal de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta .....	140
4.3.2.	Marcadores plasmáticos .....	141
4.3.2.1.	Biomarcadores del metabolismo de la glucosa de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta .....	141
4.3.2.2.	Biomarcadores del metabolismo lipídico de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta.....	142
4.3.2.3.	Niveles plasmáticos de MDA de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta.....	144
4.3.2.4.	Niveles plasmáticos de Creatinina de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta.....	145
4.3.2.5.	Niveles plasmáticos de citoquinas de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta.....	146
4.3.3.	Parámetros cardiovasculares.....	147
4.3.3.1.	Presión arterial y frecuencia cardiaca de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta.....	147
4.3.3.2.	Función cardiaca basal de los animales con Síndrome Metabólico por dieta	148
4.3.3.3.	Índices cardiacos de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta	149
4.3.3.4.	Evaluación de la reactividad vascular de la aorta de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta .....	150
4.3.3.5.	Evaluación de la reactividad vascular de la arteria de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta .....	152
4.3.4.	Expresión proteica .....	154
4.3.4.1.	Expresión del TLR4, MyD88 y NLRP3 en el ventrículo izquierdo de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta .....	154
4.3.4.2.	Expresión del TLR4, MyD88 y NLRP3 en la aorta de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta .....	156
4.3.4.3.	Expresión del TLR4, MyD88 Y NLRP3 en la arteria mesentérica de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta .....	158
4.3.4.4.	Expresión del TLR4, MyD88 y NLRP3 en el tejido renal de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta.....	160
4.4.	Efecto de la administración de TLR4-PA1 en el modelo de Síndrome Metabólico por dieta	162
4.4.1.	Parámetros generales.....	162

4.4.1.1. Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, en el peso corporal y la ganancia de peso de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta .....	162
4.4.1.2. Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, en el comportamiento alimentario e ingesta calórica de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta.....	163
4.4.1.3. Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, en los parámetros antropométricos de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta ...	164
4.4.2. Marcadores plasmáticos .....	165
4.4.2.1. Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, en los niveles plasmáticos de biomarcadores del metabolismo de la glucosa de los animales con síndrome Metabólico (SM) por dieta .....	165
4.4.2.2. Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, en los niveles plasmáticos de biomarcadores del metabolismo lipídico de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta .....	167
4.4.2.3. Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg en los niveles plasmáticos de Malondialdehído (MDA) de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta.....	168
4.4.2.4. Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg en los niveles plasmáticos de Creatinina de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta	169
4.4.3. Parámetros cardiovasculares .....	170
4.4.3.1. Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, en los niveles de presión arterial y frecuencia cardiaca de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta.....	170
4.4.3.2. Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, en la funcionalidad cardiaca de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta.....	171
4.4.3.3. Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, sobre los índices cardiacos de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta .....	172
4.4.3.4. Efecto de la administración de TLR4-PA1 10 mg/Kg sobre la reactividad de la aorta de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta .....	173
4.4.3.5. Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, sobre la reactividad de la arteria mesentérica de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta.....	176
4.4.4. Expresión proteica .....	178
4.4.4.1. Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, sobre la expresión del TLR4, MyD88 y NLRP3 en el ventrículo izquierdo de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta .....	178
4.4.4.2. Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, sobre la expresión del TLR4, MyD88 y NLRP3 en la aorta de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta.....	180
4.4.4.3. Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, sobre la expresión del TLR4, MyD88 y NLRP3 en el tejido renal de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta.....	182

5.	Discusión	184
5.1.	Alteraciones cardiovasculares inducidas por la administración crónica de Cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y CPT 3 (mg/Kg). Implicación del eje TLR4/MyD88/NLRP3.	187
5.2.	Efecto de la administración de TLR4-PA1 en las alteraciones cardiovasculares inducidas por la administración crónica de Cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y CPT 3 (mg/Kg).	194
5.3.	Alteraciones cardiovasculares inducidas por una dieta hipergrasa e hipercalórica, modelo de Síndrome Metabólico por dieta. Implicación del eje TLR4/MyD88/NLRP3.	201
5.4.	Efecto de la administración de TLR4-PA1 en las alteraciones cardiovasculares inducidas en el modelo de Síndrome Metabólico por dieta. Implicación del eje TLR4/MyD88/NLRP3	211
6.	Conclusiones	220
7.	Bibliografía	223

# **Abreviaturas**

**ABC:** Área bajo la curva

**ACh:** Acetilcolina

**ASC:** *Adaptor apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*

**Ca<sup>2+</sup>:** Calcio

**Ca:** Carbacol

**CaCl<sub>2</sub>:** Cloruro cálcico

**CD14:** Cluster of differentiation 14

**CO<sub>2</sub>:** Dióxido carbono

**CPT:** Cisplatino

**dL:** Decilitro

**DAMPs:** *Danger-Associated Molecular Patterns*

**Dea-NO:** NONOato de dietamina

**DM:** Diabetes mellitus

**EEM:** Error estándar de la media

**ERO:** Especies reactivas de oxígeno

**Fe:** Fenilefrina

**g:** gramo

**GAPDH:** Gliceraldehido Fosfato Deshidrogenasa

**IFN:** Interferón

**IC:** Ingesta calórica

**IL:** Ingesta líquida

**IL-:** Interleuquina

**IS:** Ingesta sólida

**IMC:** Índice de Masa Corporal

**IMc:** Índice de Masa cardiaco

**IMVI:** Índice de Masa del Ventrículo Izquierdo

**i.p.:** intraperitoneal

**K<sup>+</sup>:** Potasio

**KCl:** Cloruro potásico

**Kg:** Kilogramo

**L:** litro

**l.p.m.:** latidos por minuto

**LPS:** lipopolisacárido

**M:** Molar

**MAPK:** *Mitogen-activated protein kinase*

**MCP-1:** *Monocyte Chemoattractant Protein-1*

**MDA:** Malondialdehído

**MD2:** *Myeloid differentiation factor 2*

**mg:** miligramo

**min:** minuto

**mL:** mililitro

**mmHg:** milímetros de Mercurio

**mm:** milímetro

**mM:** milimolar

**MIP:** Macrophage Inflammatory Protein

**MyD88:** *Myeloid differentiation factor 88*

**NAC:** Neuropatía autonómica cardiovascular

**NaCl:** Cloruro sódico

**NaHCO<sub>3</sub>:** Hidrogeno carbonato de sódio

**NF-κβ:** *Nuclear factor-κβ*

**NLRP3:** *Nucleotide-binding and oligomerization domain, leucine-rich-containing family domain-containing-3LRR-and pyrin domain-containing protein 3*

**NSP:** Nitroprusiato sódico

**O<sub>2</sub>:** oxígeno

**OMS:** Organización mundial de la Salud

**°C:** Grado centígrado

**PAD:** Presión Arterial Diastólica

**PAS:** Presión Arterial Sistólica

**PDF:** Presión diastólica final

**PDVI:** Presión Desarrollada por el Ventrículo Izquierdo

**pg:** picogramo

**PPC:** Presión perfusión de las Coronarias

**PRRs:** *Pattern recognition receptors*

**r.p.m:** Revoluciones por minuto

**TAP:** Tejido adiposo cardiovascular

**TBA:** Ácido tiobarbiturico

**TLR4:** *"Toll-Like receptor 4"*

**TTBS:** *Buffer tris-salino/Tween 20*

**SKH:** Solución Krebs Henseleit

**SM:** Síndrome Metabólico

**SNA:** Sistema nervioso autónomo

**U.A.:** Unidades Arbitarias

**VEGF:** *Vascular endothelial grow factor*

**µg:** Microgramo

**µL:** Microlitro

**µM:** Micromolar

# Resumen

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte tanto en países desarrollados como en los que están en vías de desarrollo. Se estima que cada año 17,9 millones de personas mueren debido a este grupo de enfermedades. Por ello, su control y tratamiento suponen un desafío para la sociedad actual, ya que la mortalidad y las comorbilidades asociadas a estas enfermedades requieren de una elevada atención primaria, presentan una alta tasa de admisiones hospitalarias y elevadas ratios de mortalidad, generando así una alta carga socio-económica.

La eficacia cada vez mayor de las terapias antitumorales ha mejorado las cifras de mortalidad por cáncer, sin embargo, ha puesto de manifiesto efectos del tratamiento del cáncer que se manifiestan clínicamente años o décadas después del fin de la terapia antitumoral. Así hoy, las enfermedades cardiovasculares se han convertido en la segunda causa de muerte en pacientes que han superado la enfermedad. Las complicaciones cardiovasculares dependen del propio antitumoral, de la dosis administrada en cada ciclo, de la dosis acumulada total, de la terapia combinada, o de la concurrencia de una patología cardiovascular previa, entre otros. En la actualidad, el conocimiento, tratamiento y prevención de estas complicaciones cardiovasculares causadas por fármacos antitumorales suponen un nuevo reto en la terapéutica del cáncer.

La Organización Mundial de la Salud define el Síndrome Metabólico (SM) como un conjunto de factores de riesgo cardiovascular representado por la obesidad central, las dislipemias, las anormalidades en el metabolismo de la glucosa y la hipertensión arterial. Todo este conjunto de factores está estrechamente asociado a la aparición de enfermedades cardiovasculares. Así, los individuos que presentan SM tienen mayor susceptibilidad de sufrir enfermedades cardiovasculares y mayor riesgo de mortalidad, inclusive sin padecer enfermedades cardiovasculares previas. Los factores genéticos y/o ambientales, entre los que se encuentra el estilo de vida y la alimentación no saludables constituyen importantes factores para el desarrollo de SM.

La respuesta inflamatoria causada por el receptor TLR4 a través de la cadena de señalización MyD88 se ha asociado con la aparición y desarrollo de muchas enfermedades en las que la inflamación tiene un papel central (Di et al., 2016; Dugbartey et al., 2016; Vázquez-Carballo et al., 2021; Yu Wang et al., 2016a; Yu & Feng, 2018b), entre ellas las complicaciones cardiovasculares que aparecen con la terapéutica antitumoral y el SM. Así, se ha demostrado que el receptor TLR4 juega un papel importante en el desarrollo de la patogénesis de enfermedades cardiovasculares como miocarditis, infarto de miocardio, daño por isquemia-reperusión, fallo cardiaco, alteraciones en las válvulas aórticas, aterosclerosis e hipertensión, e hipertrofia cardiaca, participando también en la aparición y desarrollo de la disfunción endotelial que subyace en muchas de estas patologías. Por todo ello, en los últimos años se están realizando múltiples esfuerzos para desarrollar antagonistas de los receptores, TLR, y concretamente de los receptores TLR4 y sus cadenas de señalización, con el fin de diseñar nuevas herramientas terapéuticas para el tratamiento de estas enfermedades. Sin embargo, sólo unos pocos de estos antagonistas están disponibles para su posible uso en clínica, ya que la mayoría de los antagonistas o inhibidores no se han evaluado en estudios clínicos o bien no han pasado esta evaluación. Estos aspectos hacen que sea necesario continuar con la búsqueda de posibles fármacos que modulen esta diana farmacología y constituyan la base para el desarrollo de nuevos tratamientos

prometedores, reduciendo la polifarmacia y repercutiendo probablemente en el uso de medicamentos en numerosas patologías.

Por todo lo expuesto anteriormente, los objetivos principales de esta Tesis Doctoral han sido:

1) Evaluar la existencia complicaciones cardiovasculares y renales en dos modelos experimentales: administración crónica de Cisplatino y SM por dieta; 2) Evaluar si la modificación de la expresión de receptores TLR4 y/o su proteína de señalización MyD88, así como la expresión de NLRP3 puede estar involucrada en las alteraciones cardiovasculares y renales inducidas en los dos modelos experimentales señalados; 3) Evaluar si la modulación de los receptores TLR4, con un fármaco antagonista TLR4 de nueva síntesis, TLR4-PA1, puede mejorar las alteraciones cardiovasculares y renales inducidas en los dos modelos experimentales señalados.

Para ello, se han llevado a cabo dos modelos experimentales: a) modelo de administración crónica de dos dosis de Cisplatino, 2 mg/Kg y 3 mg/Kg, con pauta semanal de administración durante 5 semanas, b) modelo de SM por dieta, alimentando a los animales durante 20 semanas con una dieta hipercalórica e hipergrasa. En estos modelos se han evaluado la presión arterial y frecuencia cardiaca de los animales, la función cardiaca basal, la reactividad vascular, así como la función renal. Además, se ha analizado el estado de estrés oxidativo, el estado inflamatorio, así como cuando correspondía, las alteraciones en el comportamiento alimentario, parámetros antropométricos y metabolismo glucídico y lipídico. Finalmente se ha evaluado también la expresión de proteínas del eje TLR4/MyD88/NLRP3 a nivel cardiaco, vascular y renal. Por último, en ambos modelos experimentales se ha llevado a cabo un tratamiento durante 2 semanas con un antagonista de receptores TLR4, TRR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, analizando de nuevo todos los parámetros mencionados anteriormente en los animales.

Los principales resultados de esta Tesis Doctoral son:

1. Los resultados obtenidos en el modelo de administración crónica de cisplatino demuestran que el tratamiento con este antitumoral ocasiona alteraciones cardiovasculares, dosis-dependientes, que afectan de manera diferente a los distintos territorios cardiovasculares. La toxicidad vascular y renal se inicia a dosis más bajas que las alteraciones cardiacas o sistémicas, y afecta en mayor medida a los vasos de conductancia que a los de resistencia. Cuando el antitumoral se administra a dosis elevadas, la toxicidad vascular se agrava, se produce una disfunción ventricular izquierda y se ocasionan cambios en la presión arterial. Por otra parte, el tratamiento crónico con este antitumoral provoca una situación de estrés oxidativo generalizado, así como un aumento en los niveles plasmáticos de algunas citoquinas proinflamatorias compatible con un estado de inflamación de bajo grado. Por último, los resultados obtenidos señalan que el tratamiento crónico con cisplatino provoca cambios en la expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3 a nivel cardiovascular y renal. El eje TLR4/MyD88/NLRP3 parece jugar un papel más importante en el desarrollo de la toxicidad renal que, en la toxicidad cardiovascular, siendo la expresión de NLRP3 la más afectada en todos los tejidos analizados. Estos cambios se correlacionan con las alteraciones funcionales cardiovasculares y renales desencadenadas por el tratamiento crónico con cisplatino. El tratamiento con

el antagonista de receptores TLR4, TLR4-PA1, mejora las alteraciones cardiovasculares provocadas por el tratamiento con cisplatino, no modificando el estado generalizado de estrés oxidativo. La modificación en la expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3 no parece estar relacionada con su efecto vascular, pero la disminución en la expresión de NLRP3 a nivel cardiaco y la de TLR4 y NLRP3 a nivel renal si podrían relacionarse con la mejora en la función de estos tejidos.

2. En el modelo de SM por dieta, los animales han desarrollado los principales factores que caracterizan esta patología metabólica: obesidad central, dislipemias y alteraciones en el metabolismo de la glucosa. Sin embargo, los animales con SM por dieta no han desarrollado hipertensión, sino todo lo contrario, una hipotensión que podría ser debida a la neuropatía autonómica cardiovascular que se desarrolla en las etapas iniciales de esta patología. Además, los resultados de este modelo experimental indican también que las alteraciones a nivel vascular son previas a las alteraciones cardiacas, siendo los vasos de resistencia los que se afectan en primer lugar, desarrollando una disfunción endotelial. El daño renal en este modelo también se desarrolla desde etapas tempranas y antes que las alteraciones cardiovasculares sean generalizadas. Por otra parte, este modelo también ha reproducido el estado de estrés oxidativo generalizado en los animales, así como un aumento en los niveles plasmáticos de citoquinas proinflamatorias compatible con un estado de inflamación de bajo grado. Por último, los resultados obtenidos señalan que en las etapas iniciales de daño cardiovascular y renal en el modelo de SM por dieta no hay grandes alteraciones en la expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3, siendo los vasos de conductancia los primeros tejidos en los que se aprecian estas modificaciones. El tratamiento con el antagonista de receptores TLR4, TLR4-PA1, es capaz de mejorar las alteraciones metabólicas, cardiovasculares y renales provocadas por el SM inducido por dieta, disminuyendo también el estado generalizado de estrés oxidativo en los animales. Este antagonista, no parece tener efectos importantes sobre la expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3 en el tejido cardiovascular, pero sí ocasiona cambios en la expresión de MyD88 y NLRP3 a nivel renal que requieren un estudio más profundo para identificar su implicación en las complicaciones renales en este modelo experimental.

Podemos concluir que los resultados de esta Tesis Doctoral muestran la existencia de alteraciones cardiovasculares tanto tras la administración crónica de cisplatino como tras el desarrollo de SM por dieta desde sus etapas iniciales, y que estas alteraciones cardiovasculares no aparecen todas a la vez y afectan de forma distinta a los diferentes territorios. Además, en el desarrollo de estas alteraciones están involucrados tanto el estrés oxidativo como la inflamación de bajo grado que subyace en ambos modelos. Sin embargo, la implicación en el desarrollo de las alteraciones cardiovasculares, de la activación del eje TLR4/MyD88/NLRP3 es diferente en ambos modelos, siendo más importante en el caso del modelo de cisplatino. El tratamiento con el antagonista TLR4-PA1 es capaz de corregir las alteraciones cardiovasculares en los dos modelos experimentales desarrollados, pero los mecanismos por los que este antagonista ejerce estos efectos también son diferentes en ambos modelos experimentales.

# **1. Introducción**

## **1.1. Sistema cardiovascular**

El sistema cardiovascular comprende el corazón, el sistema arterial y el sistema venoso. Se trata de un circuito doble cerrado, con un sistema de células endoteliales que coordinan su funcionamiento.

El principal objetivo del sistema cardiovascular es transportar la sangre y los nutrientes a los tejidos, llevando la sangre desde el corazón hasta los capilares arteriales que irrigan los órganos. Posteriormente, el sistema cardiovascular también es el encargado de evacuar los desechos celulares (CO<sub>2</sub>, lactatos) de los tejidos, desde los capilares venosos hasta el corazón. Por otra parte, el sistema cardiovascular también está implicado en la regulación de la temperatura corporal, del pH sanguíneo, del volumen de agua o de los niveles de sales minerales en el organismo, entre otros (Barral & Croibier, 2011; Schultz & Bader, 2017).

Como se ha mencionado anteriormente, el sistema cardiovascular se puede subdividir en dos grandes partes: el corazón y el árbol vascular. El corazón es un órgano que bombea la sangre a través de los vasos sanguíneos a todo el cuerpo. La parte izquierda del corazón impulsa la sangre a alta presión a través de los vasos sanguíneos al todo el organismo, mientras que la parte derecha bombea la sangre a baja presión a través de los vasos sanguíneos a los pulmones (Barral & Croibier, 2011; Schultz & Bader, 2017). Estos dos circuitos forman, como se ha comentado, un sistema circulatorio doble: la circulación pulmonar y la circulación sistémica. La circulación pulmonar lleva la sangre a los pulmones para que se oxigene, mientras que la circulación sistémica distribuye la sangre oxigenada a los tejidos del cuerpo a través de la aorta y sus ramificaciones.

Dado que los experimentos realizados en esta Tesis Doctoral se llevan a cabo en corazón y arterias de la circulación sistémica, a continuación, se desarrolla con más detalle la estructura y función cardíaca y el sistema arterial.

### **1.1.1. Estructura y función cardíaca**

El corazón está situado entre los pulmones, en el espacio mediastínico de la cavidad intratorácica, en un saco denominado pericardio. Está sostenido por los grandes vasos y tiene una disposición oblicua, con su cara más ancha hacia arriba y su punta hacia abajo adelante y a la izquierda. La pared del corazón está constituida por un epicarpio externo; el miocardio o capa muscular, y el endocardio que tapiza las cámaras cardíacas. Los tabiques interauricular e interventricular dividen al corazón en una bomba derecha y una bomba izquierda, cada una compuesta por dos cavidades musculares: una aurícula de pared delgada que funciona como reservorio de la sangre que ingresa en el corazón; y un ventrículo de pared gruesa que bombea la sangre fuera del corazón (Grossman & Porth, 2014; Silverthorn, 2019).

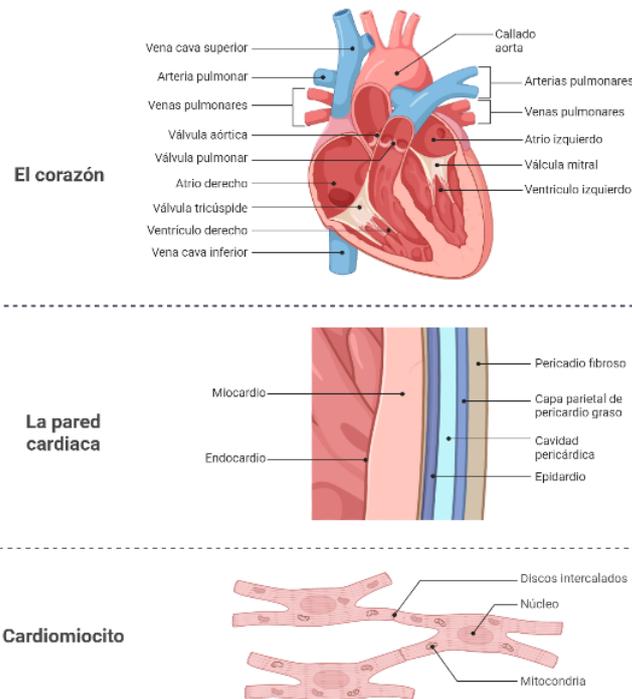
El pericardio forma una cubierta fibrosa alrededor del corazón y mantiene su posición fija en el tórax, constituyendo una protección física y una barrera contra las

infecciones. Está formado por una capa externa fibrosa y una capa serosa interna delgada (Grossman & Porth, 2014; Silverthorn, 2019).

El miocardio o porción muscular del corazón forma la pared de las aurículas y los ventrículos. Las fibras musculares del corazón, conocidas como miocitos cardiacos, se organizan en estructuras llamadas sarcómeros. En estos sarcómeros, se encuentran filamentos gruesos, principalmente miosina, y filamentos finos y proteínas reguladoras, principalmente actina. La contracción del corazón ocurre cuando los filamentos de miosina atraen los filamentos de actina adyacentes hacia el centro, lo que causa una reducción en la longitud de los sarcómeros y, por ende, una contracción colectiva de los miocitos. Las fibras musculares esqueléticas cardiacas están dispuestas con un enrejado intercomunicado en el que las fibras se dividen se recombinan y se vuelven a dividir. Estas fibras están separadas de otras células musculares cardiacas por estructuras densas denominadas discos intercalados. La matriz extracelular del músculo cardiaco está formada por tejido conectivo laxo que contiene numerosos capilares que mantienen las funciones de las células musculares contráctiles (Grossman & Porth, 2014; Silverthorn, 2019).

Endocardio: Es una capa interna delgada que recubre todas las cavidades del corazón y se encuentra en continuidad con el endotelio de los vasos. Esta membrana permite que la sangre circule con fluidez por el interior del corazón. Está compuesta por tres capas: la capa más interna constituida por células endoteliales lisas, sostenidas por una capa delgada de tejido conectivo; la capa media formada por tejido conectivo y fibras elásticas y, la capa externa con células conectivas dispuestas de forma irregular que contienen vasos sanguíneos y ramas del sistema de conducción cardiaco (Grossman & Porth, 2014; Silverthorn, 2019).

Además, el corazón posee cuatro válvulas que permiten su buen funcionamiento: mitral, tricúspide, pulmonar y aortica. Estas válvulas son las encargadas de mantener el flujo unidireccional de sangre. La función valvular depende de la movilidad, la flexibilidad y la integridad estructural de estas válvulas. Las válvulas cardiacas están revestidas de endotelio y comparten una arquitectura similar en tres capas (Barral & Croibier, 2011; Drewnowski & Shultz, 2001): un núcleo de colágeno denso, en la superficie de flujo de salida, conectado a las estructuras de soporte valvulares; un núcleo central de tejido conjuntivo laxo; una capa rica en elastina, en la superficie del flujo de entrada (Grossman & Porth, 2014; Silverthorn, 2019).



**Ilustración 1: Estructura del corazón. Modificada de BioRender.com.**

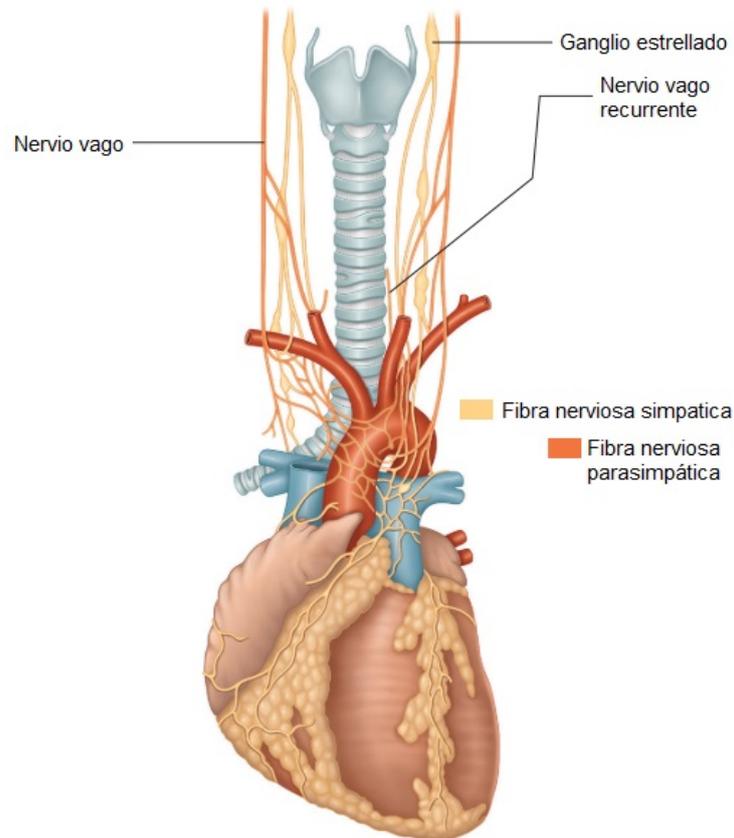
Sistema de conducción cardíaca: El corazón es un órgano autónomo capaz de contraerse de manera rítmica y espontánea sin necesidad de estímulo externo del sistema nervioso. Por ello, la señal para la contracción del miocardio no proviene del sistema nervioso sino de células miocárdicas especializadas conocidas como células autoarrítmicas o marcapasos, que regulan la frecuencia del latido cardíaco. Desde el punto de vista anatómico son distintas de las células contráctiles ya que son más pequeñas y no contienen sarcómeros organizados, por lo que no contribuyen a la fuerza contráctil del corazón. Además de estas células autoarrítmicas, el sistema de conducción cardíaco está constituido por cuatro estructuras principales en las que se genera y transmite el estímulo eléctrico que permite la contracción cardíaca. Estas estructuras son: el nodo sinusal, el nodo auriculoventricular (nodo AV), el haz de His y las fibras de Purkinje (Grossman & Porth, 2014; Silverthorn, 2019).

Como se ha mencionado anteriormente, la circulación sistémica se inicia en la parte izquierda del corazón con el bombeo de la sangre desde el ventrículo izquierdo hacia la aorta. En el ventrículo izquierdo, se genera una eficaz onda coordinada de contracción para impulsar la sangre, gracias a que en esta cámara cardíaca los miocitos están dispuestos en sentido circunferencial, con una orientación en espiral que ayuda a generar una onda coordinada de contracción, que se extiende desde la punta hasta la base del corazón (Barral & Croibier, 2011; Schultz & Bader, 2017). La contracción depende de la propagación de los impulsos eléctricos que comienzan en el nodo sinoauricular, que es el marcapasos del corazón. Desde aquí, se transmiten los impulsos eléctricos generados a través de fibras internodales hasta el nodo AV, localizado cerca del suelo de la aurícula derecha. Desde el nodo AV, la despolarización se mueve hacia los ventrículos con suma rapidez por el haz de His en el tabique interventricular, para continuar por las ramas izquierda y derecha de este haz hasta el vértice del corazón. En

este vértice, las fibras de Purkinje son más pequeñas y se extienden hacia afuera entre las células contráctiles. Las fibras de Purkinje transmiten impulsos con mucha rapidez, de manera que todas las células contráctiles del vértice se contraen de manera casi simultánea (Kumar et al., 2021; Schultz & Bader, 2017).

Como se ha podido deducir de los párrafos anteriores, la contracción rítmica del corazón requiere una estrecha coordinación entre el sistema contráctil del corazón y el sistema de conducción eléctrica del mismo. Esta coordinación es necesaria para que los miocitos cardiacos se contraigan en el momento adecuado y en el orden correcto. El sistema de conducción eléctrica del corazón es responsable de propagar los impulsos eléctricos a través de los miocitos excitadores y conductores, los cuales regulan la frecuencia y el ritmo cardiacos. Además, la contracción coordinada de los miocitos cardiacos también depende de uniones intercelulares especializadas que permiten el acoplamiento mecánico y eléctrico célula a célula, lo que asegura que las células del corazón se contraigan de manera sincronizada (Barral & Croibier, 2011; Kumar et al., 2021; Schultz & Bader, 2017).

La frecuencia de los impulsos eléctricos que viajan a través del sistema de conducción del corazón puede ser afectada por diferentes factores. Por ejemplo, el Sistema Nervioso Autónomo (SNA) puede aumentar la frecuencia cardíaca en cuestión de segundos, lo que es importante para responder a una mayor demanda de oxígeno por parte del cuerpo. Además, los agentes adrenérgicos, la hipoxia y la concentración de potasio también pueden influir en la frecuencia de los impulsos eléctricos (Barral & Croibier, 2011; Kumar et al., 2021; Schultz & Bader, 2017). Los responsables de estos cambios son los nervios cardiacos eferentes, simpáticos y parasimpáticos. Las fibras simpáticas cardiacas derivan de sistema simpático cervical. Este sistema está en contacto con el corazón a través de tres pares de nervios cardiacos: superior, medio e inferior (izquierdo y derecho). Después de su paso por el plexo cardíaco, las fibras simpáticas se distribuyen a todos los nodos y tejido miocárdico, innervando todas las regiones del corazón: nodo sinoauricular, nodo AV, miocardio auricular y ventricular (particularmente el izquierdo) y las arterias coronarias (Barral & Croibier, 2011). La actividad de las fibras simpáticas postganglionares está mediada por el neurotransmisor noradrenalina, que interactúa con los adrenoreceptores de tipo  $\beta_1$ , que representan el 80% de todos los receptores cardiacos. La estimulación de estos receptores adrenérgicos ocasiona: un aumento del gasto cardíaco, un aumento de la frecuencia cardíaca, un aumento de la contracción ventricular, aumento del tono cardíaco y vascular, un aumento de la velocidad de relajación del músculo cardíaco tras su contracción y, un aumento de la excitabilidad cardíaca (Barral & Croibier, 2011). En el caso de las fibras parasimpáticas, éstas innervan el nódulo sinoauricular, el nódulo AV y el miocardio auricular, mientras que no hay innervación parasimpática en los ventrículos. El principal neurotransmisor de las fibras postganglionares parasimpáticas es la acetilcolina, y los receptores cardiacos para la acetilcolina son de tipo muscarínico. A diferencia del sistema simpático, los efectos del sistema parasimpático son opuestos y mucho más limitados (Barral & Croibier, 2011). La estimulación del sistema parasimpático a nivel cardíaco produce: disminución de la frecuencia cardíaca, a través de las fibras vagales, disminución de la conducción cardíaca y reducción de la fuerza de contracción del corazón.



**Ilustración 2: Inervación autónoma del corazón. Tomada y modificada de Barral & Croibier, 2011.**

Por último, para que los miocitos del corazón obtengan la energía necesaria para su funcionamiento, dependen principalmente del proceso de fosforilación oxidativa, que se lleva a cabo en las mitocondrias. Debido a esta alta demanda energética, el corazón necesita un suministro constante de sangre oxigenada para funcionar correctamente. Este suministro se realiza a través de las arterias coronarias, que se originan inmediatamente después de la válvula aórtica. Estas arterias discurren en la superficie del corazón (arterias pericárdicas) y luego penetran en el tejido del miocardio, ramificándose en arteriolas que forman una red vascular muy densa (arterias intramurales) que rodea cada miocito con alrededor de tres capilares. La circulación sanguínea en el corazón ocurre durante la diástole ventricular, cuando el corazón se relaja y la microcirculación no está comprimida por la contracción del corazón (Barral & Croibier, 2011; Schultz & Bader, 2017).

### 1.1.2. Estructura y función de las arterias

La principal función del árbol arterial es distribuir la sangre procedente del corazón a los órganos del cuerpo. Dado que el volumen del sistema cardiovascular es mucho mayor que el volumen de sangre que hay en el cuerpo humano, el cuerpo recibe información de donde es necesaria más sangre en determinados momentos, por lo que

el árbol arterial responde mediante la dilatación (vasodilatación) o contracción (vasoconstricción) específica de los vasos sanguíneos para que la sangre llegue al punto necesario (Schultz & Bader, 2017).

Aunque, la arquitectura general y la composición celular de los vasos sanguíneos son similares en todo el aparato cardiovascular, se observan diversas especializaciones que reflejan diferencias funcionales por cada tipo de vaso. De hecho, esta estructura puede diferir incluso entre vasos del mismo tipo (Barral & Croibier, 2011; Kumar et al., 2015).

Las arterias, se diferencian en tres tipos, según su tamaño y sus características estructurales:

- Arterias grandes, elásticas o de conductancia: que comprenden la aorta, sus ramas principales (el tronco braquiocefálico y las arterias subclavia, carótida primitiva e iliaca) y las arterias pulmonares.
- Arterias de tamaño medio, musculares o de distribución: Incluyen las ramas menores de la aorta. Por ejemplo, las arterias coronarias y renales. La principal función de las arterias musculares es la de regular de manera selectiva la distribución del flujo sanguíneo.
- Arterias pequeñas y arteriolas o arterias de resistencia: Su función principal es irrigar los tejidos y órganos mediante la dilatación y la contracción. Cuando se contraen, la sangre se desvía de los tejidos, y cuando se dilatan el flujo sanguíneo en los capilares locales aumenta considerablemente, produciendo una perfusión selectiva. Son los principales puntos de resistencia al flujo sanguíneo y pequeñas disminuciones en el tamaño de la luz, pueden tener importantes efectos en la presión arterial.

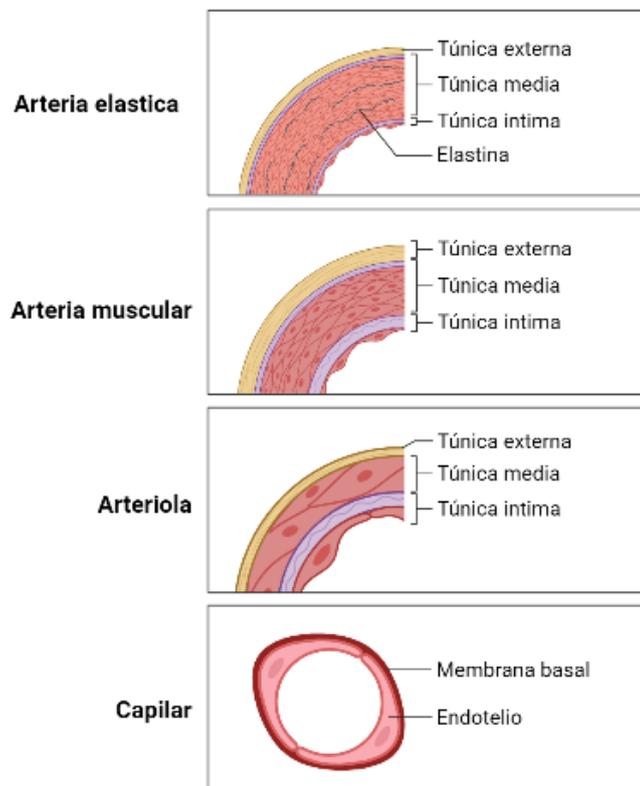
Los constituyentes básicos de las paredes de las arterias son células endoteliales y células musculares lisas, entremezcladas con una serie de componentes de la matriz extracelular, como elastina, colágeno y glucosaminoglucanos. La cantidad relativa y la configuración de estos componentes son diferentes en los distintos puntos del árbol arterial, en función de las adaptaciones locales a las necesidades mecánicas o metabólicas.

En las arterias, estos constituyentes se organizan en tres capas concéntricas (túnicas): íntima, media y adventicia (Barral & Croibier, 2011; Kumar et al., 2015).

- Túnica íntima: Consta de una sola capa de células endoteliales (endotelio) que se asientan, de manera longitudinal sobre una membrana basal, situada sobre una fina capa de matriz extracelular. La túnica íntima está separada de la túnica media por la lámina elástica interna.
- Túnica media: Presenta una estructura variable en función de los requerimientos funcionales de los vasos.
  - En las arterias elásticas, la capa media presenta un alto contenido en elastina, lo que permite que estos vasos se expandan durante la sístole y se contraigan durante la diástole, lo que les sirve para propulsar la sangre hacia los tejidos.
  - En las arterias musculares, la capa media está compuesta predominantemente por células musculares lisas, orientadas

circunferencialmente. La contracción (vasoconstricción) o relajación (vasodilatación) de las células de musculo liso arterial están reguladas por estímulos procedentes del sistema nervioso autónomo y por factores metabólicos locales. Estas respuestas modifican el tamaño de la luz y, en consecuencia, regulan el flujo sanguíneo regional y la presión arterial.

- En las arterias de resistencia que desembocan en los lechos capilares que irrigan los tejidos constan de una sola capa de células musculares lisas, alrededor del endotelio en espiral, mientras que las más grandes están dotadas de tres túnicas. En todos los tipos de arteriolas, la adventicia es muy reducida.
- **Túnica adventicia:** Esta capa se sitúa en el exterior de la media y, en muchas arterias, está separada de ella por una lámina elástica externa bien definida. La túnica adventicia está formada por tejido conjuntivo laxo, que contiene fibras nerviosas y vasos vasculares, *vasa vasorum*, que son pequeñas arteriolas responsables del aporte a la parte externa de la media de las grandes arterias de oxígeno y nutrientes (Kumar et al., 2015).



**Ilustración 3: Estructura básica de la pared arterial. Modificada de BioRender.com**

Como se ha comentado anteriormente, las células endoteliales y las células musculares lisas son los componentes principales de los vasos sanguíneos que participan en su funcionamiento.

**Las células endoteliales** forman un revestimiento especializado en el interior de los vasos sanguíneos, conocido como endotelio. Estas células tienen funciones esenciales para mantener el equilibrio y función del sistema circulatorio. Mantienen la

sangre en estado líquido, regulan la resistencia vascular, metabolizan hormonas y regulan la inflamación. También tienen la capacidad de ajustar sus funciones en respuesta a diferentes estímulos, lo que se llama activación endotelial. Esta activación puede ser inducida por varios factores, como citoquinas, productos bacterianos, virus, hipoxia, tensión hemodinámica y productos finales de la glicación avanzada. (Krüger-Genge et al., 2019; Kumar et al., 2021). Así, las células endoteliales, en función del estímulo recibido, influyen en la vasorreactividad de las células musculares lisas subyacentes, mediante la síntesis de factores vasodilatadores (óxido nítrico) o vasoconstrictores (endotelina). Por otra parte, las células endoteliales también expresan otros productos biológicamente activos como, citoquinas, moléculas de adhesión, factores de crecimiento, factores procoagulantes y anticoagulantes (Kumar et al., 2021).

**Las células musculares lisas vasculares** son el elemento celular predominante en la túnica media de los vasos y, a partir de los estímulos recibidos desde el sistema nervioso y las células endoteliales, regulan el flujo sanguíneo corporal y la presión arterial, a través de su contracción y relajación. También desempeñan funciones en la reparación vascular, a través de la síntesis de colágeno, elastina, proteoglicanos y factores de crecimiento. Están también involucradas en la respuesta inflamatoria del sistema circulatorio mediante la síntesis de citoquinas. En algunos casos las células musculares lisas pueden migrar y proliferar en la capa interna de los vasos sanguíneos, lo que contribuye a la formación de placas de aterosclerosis (Kumar et al., 2021).

## 1.2. Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte tanto en países desarrollados como en los que están en vías de desarrollo (Pavillard et al., 2018; Sjögren et al., 2015). Se estima que cada año 17,9 millones de personas mueren debido a este grupo de enfermedades que abarcan el corazón y los vasos sanguíneos (Organización mundial de la Salud (OMS), 2023). Además, se espera que en 2030 la mortalidad debida a estas enfermedades aumente hasta los 23,6 millones de personas (Sjögren et al., 2015). Por ello, su control y tratamiento suponen un desafío para la sociedad actual, ya que la mortalidad y las comorbilidades asociadas a estas enfermedades requieren de una elevada atención primaria, presentan una alta tasa de admisiones hospitalarias y elevadas ratios de mortalidad, generando así una alta carga socio-económica (Flora & Nayak, 2019; Frantz et al., 2018).

El desarrollo de enfermedades cardiovasculares está asociado a variables que suponen factores de riesgo para su desarrollo. Así, una dieta rica en grasas saturadas, cereales refinados, y bajo consumo de frutas, verduras y fibra, consumo de tabaco y un consumo elevado de alcohol, predisponen al desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Diab et al., 2023). Es importante mencionar que la prevalencia de la mayoría de las alteraciones cardiovasculares aumenta con cada década de edad, en consecuencia, a medida que la población envejece, las alteraciones cardiovasculares también aumentan (Mazurek & Jessup, 2017).

El término enfermedades cardiovasculares hace referencia a todo el conjunto de enfermedades que involucran a los vasos sanguíneos y el corazón. Entre estas enfermedades se incluyen: isquemia cardiaca, enfermedad coronaria, enfermedad cerebrovascular, enfermedad arterial periférica, enfermedades cardiacas congénitas,

trombosis venosas y embolismo pulmonar, entre otras (Haybar et al., 2019; Sjögren et al., 2015).

La mayoría de las alteraciones cardiovasculares son consecuencia de una interacción compleja de factores genéticos y ambientales que ocasionan alteraciones en la función tanto del corazón como de los vasos sanguíneos.

Entre los diferentes mecanismos involucrados en el desarrollo de alteraciones cardíacas que pueden desencadenar complicaciones cardiovasculares se han descrito los siguientes (Kumar et al., 2021):

- Insuficiencia en el bombeo: se puede producir dos situaciones: a) cuando el miocardio se contrae débilmente durante la sístole, con lo que el gasto cardíaco es inadecuado; b) cuando el miocardio no se relaja lo suficiente para permitir el llenado ventricular correcto.
- Obstrucción del flujo: aparecen lesiones que pueden obstruir el flujo a través de un vaso, que impiden la apertura de las válvulas o que, por diversos medios, elevan la presión de la cavidad ventricular.
- Regurgitación del flujo: una parte del volumen expulsado en cada contracción retrocede a través de una válvula disfuncional, añadiendo sobrecarga de volumen a las aurículas o ventrículos afectados.
- Flujo derivado: la sangre es desviada de una parte del corazón a otra, a través de comunicaciones congénitas o adquiridas.
- Trastornos de la conducción cardíaca: las alteraciones de la conducción o las arritmias debidas a descoordinación en la generación o transmisión de impulsos provocan contracciones miocárdicas no uniformes e ineficaces, potencialmente mortales.
- Rotura del corazón o un gran vaso: en estas circunstancias, se produce una exanguinación masiva a cavidades corporales o al exterior.

Por otra parte, los mecanismos básicos de las patologías vasculares que pueden desencadenar alteraciones cardiovasculares son:

- El estrechamiento u obstrucción completa de la luz vascular, ya sea esta obstrucción de carácter progresivo (aterosclerosis) o de naturaleza repentina (trombosis o embolia).
- El debilitamiento de las paredes vasculares que causa dilatación o rotura.
- La existencia de una disfunción endotelial.

Dado que, en esta Tesis Doctoral, los mecanismos más relacionados con las alteraciones cardiovasculares encontradas son los que afectan al funcionamiento del ventrículo izquierdo, a alteraciones en el funcionamiento vascular y al control por el sistema nervioso autónomo del sistema cardiovascular, se explicarán, a continuación, con mayor profundidad los mecanismos establecidos en la insuficiencia cardíaca, aterosclerosis y la disfunción endotelial y la neuropatía autonómica cardiovascular.

### 1.2.1. Insuficiencia cardíaca

La insuficiencia cardíaca, también conocida como insuficiencia cardíaca congestiva, es un trastorno común, que afecta a 20 millones de personas mundialmente,

y se espera que la prevalencia aumente un 25% en el año 2030. Esta enfermedad se produce cuando el corazón no es capaz de bombear sangre con una velocidad suficiente para satisfacer las demandas metabólicas de los tejidos o cuando solo puede hacerlo con presiones altas de llenado. Habitualmente, la insuficiencia cardiaca comienza con una alteración en la función o estructura del miocardio. Esta disfunción, cardiomiopatía, puede ser producto de múltiples causas, la mayoría de las cuales hoy en día no se conocen. Actualmente, se acepta que la insuficiencia cardiaca comienza debido a un evento en el organismo que produce una disfunción ventricular y finalmente una insuficiencia y fallo cardiaco. Este acontecimiento puede deberse a un factor puntual como un infarto de miocardio o una miocarditis viral, o puede desarrollarse de manera gradual a lo largo del tiempo como la hipertrofia del ventrículo izquierdo debida los efectos adversos de un tratamiento farmacológico (Mazurek & Jessup, 2017).

Inicialmente, solo las alteraciones en la contracción del ventrículo izquierdo se consideraban relevantes para establecer la diagnosis de la insuficiencia cardiaca. Sin embargo, hoy en día se ha observado que la mortalidad entre las personas que sufren una remodelación del ventrículo izquierdo y, tienen la fracción de eyección preservada, es muy similar a la de la población que tiene la fracción de eyección reducida. En una revisión reciente, se recogen diferentes estudios del papel de la disfunción endotelial del lecho coronario y la insuficiencia cardiaca tanto con fracción preservada como reducida (Zuchi et al., 2020).

Tras el establecimiento de la insuficiencia cardiaca, se establecen mecanismos compensatorios que en un principio permiten mantener un adecuado funcionamiento cardiaco aumentando la frecuencia cardiaca y el volumen de eyección, debido a la disfunción del ventrículo izquierdo. Específicamente, el sistema nervioso simpático y las diferentes rutas neurohumorales (sistema renina-angiotensina-aldosterona, endotelina y varias citoquinas proinflamatorias) se sobreexpresan para poder establecer estos mecanismos compensatorios. Sin embargo, esta sobreactivación neurohormonal produce efectos negativos, incluyendo la hipertrofia del ventrículo izquierdo y su remodelación, una vasoconstricción excesiva y edema pulmonar, que aumentan la velocidad de progresión de la insuficiencia. En esta situación, los niveles de péptidos endógenos vasodilatadores, prostaglandinas y óxido nítrico están aumentados, para contrarrestar los efectos vasoconstrictores, pero suelen ser insuficientes. Otras alteraciones que se observan son: señalización intercelular incorrecta, aumento de la apoptosis de miocitos, fibrosis, necrosis e inflamación (Kumar et al., 2021; Mazurek & Jessup, 2017).

### 1.2.2. Aterosclerosis y disfunción endotelial

Como se ha comentado anteriormente, las enfermedades cardiovasculares pueden estar causadas o involucrar alteraciones a nivel de los vasos sanguíneos. Los daños vasculares que causan las alteraciones cardiovasculares pueden darse tanto a nivel macro como microvascular, siendo las lesiones arteriales las que revisten mayor importancia clínica (Daiber et al., 2017; Kumar et al., 2015; Rizzoni et al., 2019).

Por otra parte, se sabe que el funcionamiento integrado de las células endoteliales y las células musculares lisas, influye de manera directa en el desarrollo de

los mecanismos vasculares involucrados en las enfermedades cardiovasculares (Kumar et al., 2015). Así, dos de los principales procesos del deterioro cardiovascular en las arterias son la arterioesclerosis y la disfunción endotelial, siendo el primero principalmente mediado por cambios estructurales de las arterias y el segundo por alteraciones en las rutas de transmisión endocrinas (Daiber et al., 2017; Rizzoni et al., 2019).

El término arterioesclerosis es una denominación genérica aplicada al engrosamiento de la pared arterial, con la consiguiente pérdida de elasticidad (Kumar et al., 2015). La aterosclerosis, es el tipo de arteriosclerosis que se observa con mayor frecuencia en pacientes. Esta enfermedad es la base de la patología de las enfermedades coronaria, cerebral y vascular periférica, y en el mundo occidental, y una de las mayores causa de morbimortalidad, superando a la causada por cualquier otro trastorno (Kumar et al., 2015).

El desarrollo de aterosclerosis está determinado por una combinación de factores de riesgo, tanto hereditarios, como adquiridos por el individuo, y por tanto modificables, como son el consumo de tabaco, la existencia de hiperlipidemia, principalmente hipercolesterolemia, la presencia de diabetes mellitus o la presencia de hipertensión, entre otras, aunque en los últimos años, también se ha implicado que el desarrollo de una inflamación crónica contribuye al inicio y progresión de las lesiones ateroscleróticas. Si se reúnen los factores adecuados, se producen lesiones en la túnica íntima llamadas ateromas, que protuyen hacia la luz vascular. Estos ateromas obstruyen y alteran el flujo sanguíneo. En caso de romperse pueden producir una trombosis vascular obstructiva, que puede ser de extrema gravedad (Krüger-Genge et al., 2019; Kumar et al., 2021). Tanto la rigidez arterial como la disfunción endotelial juegan un papel importante en el desarrollo de esta patología y las consecuentes enfermedades cardiovasculares asociadas (Kumar et al., 2015; Daiber et al., 2017).

La rigidez arterial juega un papel muy importante en la fisiopatología del sistema cardiovascular y en el desarrollo de la aterosclerosis, ya que la homeostasis de la hemodinámica permite a las arterias grandes, transformar la presión pulsátil y fluir en el continuo arterial con una mínima disipación de energía en la pared vascular. Además, el correcto funcionamiento arterial, favorece el funcionamiento del ventrículo izquierdo y reduce su carga de trabajo. Además mejora la perfusión diastólica, crucial para la entrada de sangre en el miocardio, a través de los vasos coronarios (Lacolley et al., 2017; Rizzoni et al., 2019). La capacidad de las arterias largas para distenderse cuando almacenan la sangre que sale bombeada del corazón, disminuye a media que aumenta la presión sanguínea. Esta capacidad de distensión, a su vez, depende del grosor arterial y de la geometría arterial. Durante el envejecimiento vascular, en las arterias de conductancia se produce un aumento de la rigidez, observándose un aumento del grosor medio de la túnica íntima y un aumento del diámetro del lumen. Sin embargo, este envejecimiento vascular, en el caso de los vasos más pequeños provoca un aumento del grosor de la túnica media, lo que produce una disminución del diámetro del lumen. Este envejecimiento vascular puede ser acelerado debido a múltiples mecanismos, siendo comunes el estrés oxidativo, la inflamación, la proliferación de células del músculo liso o la disfunción endotelial (Regnault et al., 2021; Rizzoni et al., 2019).

Así, por ejemplo, el desarrollo de la arteriosclerosis, durante el envejecimiento vascular contribuye al desarrollo de alteraciones cardíacas. Además de aumentar la

presión sistólica en la aorta, la descompensación en la reflexión de la Velocidad de Onda de Pulso aumenta la carga ventricular en la sístole ventricular, lo que puede causar la remodelación del ventrículo izquierdo y disfunción miocárdica. Estudios recientes, parecen indicar que el aumento de la masa del ventrículo izquierdo, que se produce durante la hipertrofia del mismo, está estrechamente relacionado con el aumento de la Velocidad de Onda de Pulso, más que con la presión arterial media (Miyoshi & Ito, 2021).

Se ha establecido que la **disfunción endotelial** tiene un papel muy importante en el inicio y desarrollo de la aterosclerosis, debido a que, en la actualidad, la aterosclerosis se contempla como una respuesta inflamatoria y de cicatrización crónica de la pared arterial tras una lesión endotelial. La progresión de la lesión ocurre por interacción de las lipoproteínas modificadas, los macrófagos derivados de monocitos y los linfocitos T con las células endoteliales y musculares lisas de la pared arterial (Haybar et al., 2019; Kumar et al., 2021; Zuchi et al., 2020).

El desarrollo de la disfunción endotelial vascular es un proceso complejo y multifactorial, que se caracteriza por una alteración entre las acciones vasoconstrictoras y vasodilatadoras mediadas por el endotelio. Esto tiene como consecuencia una reducción de la vasodilatación y, por tanto, del flujo sanguíneo mediado por ella, así como un aumento de la vasoconstricción en presencia de agonistas muscarínicos como la acetilcolina, que en condiciones fisiológicas producirían el efecto contrario. La disfunción endotelial también puede causar otros efectos a nivel vascular, incluyendo la reducción de las propiedades anticoagulantes, aumento de la expresión de moléculas de adhesión y un aumento de la liberación de quimiocinas y citoquinas a nivel endotelial (Daiber et al., 2017; Kumar et al., 2015; S. Xu et al., 2021; Zuchi et al., 2020). Durante el desarrollo de la disfunción endotelial, también se observa un aumento del estrés oxidativo, la presencia de inflamación crónica, un aumento de la adhesión de leucocitos, hiperpermeabilidad y senescencia de las células endoteliales (Daiber et al., 2017; S. Xu et al., 2021). Se sabe también que la reducción en la síntesis o el aumento de la inactivación del óxido nítrico juega un papel central en el desarrollo de la disfunción endotelial (Haybar et al., 2019; Z. Peng et al., 2019; J. B. Su, 2015).

Por otra parte, la disfunción endotelial también ha sido implicada en el desarrollo de patologías cardíacas. Así, en pacientes con insuficiencia cardíaca existe una disfunción endotelial en el lecho coronario. Esta disfunción está mediada por un aumento en la formación de radicales superóxidos y otras especies oxidantes a nivel vascular. Esta generación de radicales libres ocurre tanto en el endotelio como en los miocitos. Estos radicales y sus metabolitos pueden reducir rápidamente los sustratos de las enzimas que sintetizan óxido nítrico, produciendo así una disminución de la relajación mediada por el endotelio. Además, pueden interactuar con el óxido nítrico, produciendo peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), que a altas concentraciones en el corazón también puede producir una alteración en la contracción. Es importante señalar también, que la reducción de la biodisponibilidad del óxido nítrico favorece la aparición de fibroblastos, miofibroblastos y deposición de colágeno a nivel cardíaco, lo que empeora la función a este nivel (Zuchi et al., 2020).

### **1.2.3. Disfunción autonómica cardiovascular**

Como se ha explicado anteriormente en esta Tesis Doctoral, la regulación del sistema cardiovascular está controlada por el SNA que ejerce este control de las funciones biológicas mediante los sistemas simpático y parasimpático

El control autónomo del corazón se lleva a cabo principalmente a través de impulsos que se transmiten desde el corazón mediante neuronas aferentes, hasta neuronas intrínsecas del corazón, ganglios extra-cardíacos intratorácicos, la médula espinal y el tallo cerebral. En este último centro del sistema nervioso central se procesan las señales para regular la función cardíaca a través de nervios simpáticos y parasimpáticos (vías eferentes). Otro sistema de control de la función cardiovascular incluye los baroreceptores, que se encuentran en la túnica adventicia de la pared aórtica y el seno carotídeo. Estos receptores detectan las fluctuaciones de la presión sanguínea, para adaptar la misma, así como la frecuencia cardíaca (Goldberger et al., 2019).

Dada la cantidad de funciones fisiológicas que son controladas por el sistema nervioso autónomo, las alteraciones en este sistema se manifiestan con multitud de síntomas: hipotensión ortostática, taquicardia, hinchazón del estómago, anorexia, constipación, disfunción eréctil, incontinencia, alteraciones en la sudoración, visión borrosa, fotosensibilidad entre otros (Kaur et al., 2021; E. A. Rocha et al., 2021). Es importante señalar que la alteración en el funcionamiento de una o varias de las subdivisiones del sistema nervioso autónomo, cuando acompaña a otras enfermedades como las alteraciones cardiovasculares, está asociado a un avance más rápido de las enfermedades y una mayor gravedad de la sintomatología clínica (Sánchez-Manso et al., 2021).

El término Neuropatía Autonómica Cardiovascular (NAC) es el término utilizado de forma más habitual para definir una alteración entre los sistemas simpático y parasimpático del sistema autónomo cardiovascular.

Esta alteración se puede clasificar en función varios criterios (E. A. Rocha et al., 2021):

- De su origen y zona del sistema donde se produce el daño:
  - a) Idiopática o aguda: Se produce una atrofia multisistémica o un fallo autonómico puro. Se produce en condiciones como síndrome paraneoplásicos, infecciones víricas o la administración de fármacos quimioterapéuticos.
  - b) Crónica: Aparece durante el desarrollo de patologías sistémicas como la diabetes mellitus o el SM.
- De las neuronas autonómicas afectadas:
  - a) Centrales: Son afectadas neuronas preganglionares.
  - b) Periféricas: Son afectadas neuronas de los ganglios o postganglionares.
- Del neurotransmisor deficitario:
  - a) Puramente colinérgicas.
  - b) Puramente adrenérgicas.

- c) Y mixtas, cuando tanto la neurotransmisión colinérgica y adrenérgica es deficiente.

Asimismo, la neuropatía autonómica también puede ser un síndrome clínico en sí mismo, pudiendo ser clasificada como (Goldberger et al., 2019):

- **Disfunción primaria:** Incluye un grupo de enfermedades neurodegenerativas en las que las neuronas autonómicas centrales, periféricas, o ambas, mueren. Se producen alteraciones en los nervios autonómicos de pacientes que sufren enfermedades crónicas. Los mecanismos que producen estas alteraciones todavía no han sido dilucidados.
- **Disfunción secundaria:** Se producen por daño en los nervios autonómicos, derivados de una isquemia, como en un infarto de miocardio, o disfunción endotelial. Esto a su vez produce una respuesta del SNA para mantener la homeostasis. En esta disfunción, el problema surge cuando el daño es eliminado, pero la alteración en el SNA persiste porque se mantiene la estimulación de las neuronas aferentes, a través de otros mecanismos, como las citoquinas generadas durante el estado patológico. Esto puede producir una retroalimentación positiva, lo que a su vez aumenta el daño.

En base a lo expuesto anteriormente, se puede concluir que la fisiopatología del sistema nervioso autónomo depende del área afectada, y puede afectar tanto a áreas aisladas, como áreas relacionadas entre sí.

Una de las principales características de la presencia de una disfunción autonómica cardiovascular es la presencia del síndrome de taquicardia ortostática, la hipotensión ortostática con hipertensión supina y reflejos cardiovasculares. En esta situación son habituales los mareos, los vértigos, visión borrosa o en túnel, dolor de cabeza, dolor de cuello y hombros, náuseas y fatiga. En base a esto una de las primeras pruebas de elección para valorar la existencia de una neuropatía autonómica cardiovascular es la medida de la presión arterial ortostática y la frecuencia cardíaca, en decúbito supino y después de tres minutos de pie (Sánchez-Manso et al., 2021)..

#### **1.2.4. Función renal y desarrollo de enfermedades cardiovasculares.**

Por último, no podemos dejar de mencionar la importancia que el sistema renal tiene en el control del funcionamiento del sistema cardiovascular. De hecho, algunas alteraciones en la función renal son un importante factor de riesgo en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Kunz et al., 2022; Schuett et al., 2023).

Los riñones son órganos vitales. Como parte de su función, los riñones filtran y reabsorben sustancias esenciales (electrolitos principalmente), que son necesarias para mantener la composición normal de los líquidos del cuerpo. Las sustancias que no son necesarias para este propósito o que se hayan en exceso en el organismo, pasan a la orina. Además de su función reguladora de los líquidos y los electrolitos corporales, los riñones funcionan como un órgano endocrino. Así, los riñones participan en la regulación de la presión arterial por medio del mecanismo del sistema renina-angiotensina-aldosterona (Grossman & Porth, 2014).

La insuficiencia renal se produce cuando los riñones no son capaces de eliminar los productos finales del metabolismo presentes en la sangre y de regular el equilibrio electrolítico y el estado ácido-base de los líquidos extracelulares. La causa subyacente puede ser una nefropatía, una enfermedad sistémica o trastornos de origen no renal. La insuficiencia renal puede ser aguda o crónica. La insuficiencia renal aguda, comienza de forma abrupta y, a menudo, es reversible si se detecta de forma temprana y se trata de manera apropiada. En cambio, la insuficiencia renal crónica es el resultado final de la lesión irreparable de los riñones y se desarrolla con lentitud, teniendo un tratamiento mucho más complejo.

Se sabe que los pacientes con insuficiencia renal crónica presentan un riesgo elevado de enfermedad cardiovascular. Además, la mortalidad cardiovascular representa entre el 40% y el 50% de todas las muertes en pacientes con insuficiencia renal crónica avanzada (Kunz et al., 2022; Schuett et al., 2023).

Entre los trastornos cardiovasculares relacionados con el desarrollo de insuficiencia renal crónica están: la hipertensión arterial, la cardiopatía isquémica, la insuficiencia cardíaca congestiva o la pericarditis. La hipertensión arterial suele ser una manifestación temprana de la insuficiencia renal crónica. Los mecanismos que producen la hipertensión arterial en estas circunstancias son muchos, siendo los más importantes el aumento en el volumen plasmático y la resistencia vascular periférica, la disminución de la concentración de prostaglandinas renales vasodilatadoras y el incremento de la actividad del sistema de renina-angiotensina (Nguyen & Schulze, 2023). La insuficiencia cardíaca congestiva y el edema pulmonar aparecen en los estadios más avanzados de la insuficiencia renal crónica, y las condiciones identificadas como factores contribuyentes para el desarrollo de esta enfermedad son, además de esa insuficiencia renal, la hipertensión, la anemia, la diabetes mellitus, las dislipemias y la existencia de coagulopatía. Los pacientes con insuficiencia renal tienden también a presentar una mayor prevalencia de disfunción ventricular izquierda (Kunz et al., 2022; Schuett et al., 2023).

### **1.3. Alteraciones cardiovasculares ocasionadas por el tratamiento con Cisplatino**

Aunque el cáncer sigue constituyendo una de las principales causas de mortalidad del mundo, en las últimas décadas, se ha logrado una mejora en la supervivencia de los pacientes con tumores debido a las actividades preventivas, las campañas de diagnóstico precoz y a los avances terapéuticos, entre otros (Bychowski & Sobiczewski, 2023; Malvezzi et al., 2019).

La eficacia de los antitumorales ha contribuido a la disminución de la mortalidad por cáncer, sin embargo, el aumento del periodo de supervivencia de los pacientes, han puesto de manifiesto efectos del tratamiento del cáncer que se manifiestan clínicamente años o décadas después del fin de la terapia (Curigliano et al., 2016). Así, hoy día, las enfermedades cardiovasculares se han convertido en la segunda causa de muerte en pacientes que han superado un cáncer (Bradshaw et al., 2016; Bychowski & Sobiczewski, 2023; Florido et al., 2022). Las complicaciones cardiovasculares dependen del propio antitumoral, de la dosis administrada en cada ciclo, de la dosis acumulada total, de la terapia combinada, o de la concurrencia de una patología cardiovascular previa, entre otros (Curigliano et al., 2016; Lenneman & Sawyer, 2016). En la actualidad, el conocimiento, tratamiento y prevención de estas complicaciones cardiovasculares causadas por fármacos antitumorales suponen un nuevo reto en la terapéutica del cáncer, proponiéndose desde hace unos años la necesidad de hacer prevención cardiológica en todos los pacientes sometidos a quimioterapia (Lyon et al., 2022).

Por otra parte, los efectos cardiotóxicos producidos por el tratamiento con antineoplásicos puede ser permanente o reversible, y pueden inducirse en distintos niveles e intensidades (Madeddu et al., 2016). En términos de intensidad esta toxicidad se puede desarrollar de manera aguda (desde el inicio de la terapia antitumoral hasta dos semanas después de su administración), de manera crónica (después de la administración de la última dosis hasta un año más tarde de la finalización de la quimioterapia), o de manera tardía (más de 1 año después de la quimioterapia) (Herrmann et al., 2014).

Entre los problemas cardiacos asociados con la quimioterapia se encuentran: infarto de miocardio, angina de pecho, accidentes cerebrovasculares, arritmias, miocarditis, pericarditis o disfunción ventricular izquierda (Madeddu et al., 2016). Los mecanismos por los que los antitumorales producen cardiotoxicidad no están claramente definidos y pueden no ser los mismos en todos los casos. Se han propuesto dos grandes hipótesis: una es el efecto directo de los antitumorales, o sus metabolitos, en el tejido cardiaco y/o vascular, y la otra es el efecto indirecto por la neuropatía autonómica que producen (Bychowski & Sobiczewski, 2023).

Según su efecto cardiotóxico, los quimioterapéuticos pueden clasificarse en dos tipos: Antineoplásicos Tipo I, que producen un daño miocárdico irreversible y dosis dependiente, mientras que los Tipo II generan un daño reversible y, en la mayoría de los casos, no dependen de su dosis acumulada (Velásquez et al., 2016). La toxicidad cardiaca más evaluada ha sido y sigue siendo la producida por las antraciclinas

(Cardinale et al., 2020; Curigliano et al., 2016; Volkova & Russell, 2011). Sin embargo, desde hace unos años, múltiples estudios han analizado los mecanismos que producen cardiotoxicidad en otros grupos de antitumorales. En el caso de los agentes alquilantes se ha demostrado que producen daño endotelial directo, estrés oxidativo y daño mitocondrial (Conklin et al., 2015; Sayed-Ahmed et al., 2014; Souid et al., 2003). En el grupo de los antimetabolitos, producen trombosis coronaria, arteritis, vasoespasmo, estrés oxidativo en cardiomiocitos y células endoteliales y alteraciones en el ciclo de Krebs (de Forni et al., 1992; Eskandari et al., 2015; Hemalatha et al., 2010; Saif et al., 2009). En el grupo de los antibióticos, los mecanismos caracterizados han sido el estrés oxidativo y alteraciones en el metabolismo energético (Menna et al., 2008; Rossato et al., 2013, 2014). Por último, en el grupo de agentes antimicrotubulares, los mecanismos descritos han sido el daño al sistema de Purkinje, o en el control autónomo del corazón, o la inducción de liberación de histamina, entre otros (Ai et al., 2014; Biganzoli et al., 2003; Rowinsky et al., 1991).

En relación a la toxicidad vascular relacionada con la terapia del cáncer, dos recientes revisiones (Cameron et al., 2016; Herrmann, 2020) han señalado que los principales mecanismos de toxicidad endotelial de las terapias anticancerígenas son: muerte directa de la célula endotelial, proliferación y migración de las células endoteliales, alteraciones en la vasodilatación dependiente de endotelio, el estrés oxidativo, la inflamación, y las alteraciones en la coagulación.

Desde su descubrimiento, el **Cisplatino** es un fármaco quimioterapéutico utilizado ampliamente, bien solo o bien en combinación, para el tratamiento de diversos tipos de cáncer como los de cabeza, cuello esófago, pulmón, ovario, cérvix, pecho, testículos, pene o endometrio, entre otros (Dasari & Bernard Tchounwou, 2014). Sin embargo, a pesar de su efectividad, su uso en dosis elevadas se ve limitado principalmente por la aparición de toxicidad renal y cardiovascular, así como neuropatía periférica.

A pesar de su eficacia, se ha señalado que el uso de Cisplatino en terapias de dosis altas está limitado por su toxicidad renal y cardíaca, que además, comparten mecanismos celulares y moleculares similares (Dugbartey et al., 2016). Por ello, la comprensión de los mecanismos por los que ambas toxicidades son inducidas puede ayudar a proporcionar un mejor tratamiento y estrategias preventivas.

La excreción renal es la principal vía de eliminación del Cisplatino del organismo, tanto en humanos como animales (Dugbartey et al., 2016). Sin embargo, se ha demostrado, que la aparición de nefrotoxicidad se debe a que el Cisplatino se acumula en concentraciones hasta 5 veces superiores en las células epiteliales de los túbulos renales, en relación a la concentración detectada en sangre, lo que conduce a una grave disfunción renal, que aumenta a medida que la dosis de Cisplatino administrada aumenta, pudiendo llegar a suponer la interrupción del tratamiento (Volarevic et al., 2019) La toxicidad renal inducida por el Cisplatino aparece aproximadamente a los 10 días del tratamiento con el fármaco, pudiendo llegar a producir un fallo renal agudo (Sánchez-González et al., 2011).

Sin embargo, hay que señalar que la etiología de la nefrotoxicidad inducida por el Cisplatino es compleja y abarca diversos factores y rutas de señalización (X. Ma et al., 2017). Los estudios en animales tratados con Cisplatino han demostrado que su

metabolización comienza con la unión del antitumoral a la molécula antioxidante glutatión, seguido de varias metabolizaciones hasta que se convierte en tioles de cisteína. La unión de estos tioles a proteínas esenciales en las células de los túbulos proximales es lo que provoca la nefrotoxicidad (Dasari & Bernard Tchounwou, 2014). Además, el Cisplatino se une al ADN mitocondrial, bloquea su transcripción, disminuye la expresión de las proteínas de la cadena de transporte de electrones, altera la respiración celular y aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). Este aumento de las ERO promueve la muerte celular y puede dar lugar a neoplasias secundarias (Alexandre et al., 2018b; Chowdhury et al., 2016; Dasari y Bernard Tchounwou, 2014; Kursunluoglu, Taskiran y Kayali, 2018; Volarevic et al., 2019).

Por último, estudios recientes han demostrado que en el efecto nefrotóxico del Cisplatino está involucrado también un proceso de inmunoinflamación. Así, la lesión celular inducida por Cisplatino a nivel renal origina que las células epiteliales renales liberen moléculas asociadas a daño celular, ocasionando la activación del receptor Toll-like receptor 4, TLR4, y la consecuente producción de Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) que se une a sus receptores activando la génesis de factores inflamatorios y el reclutamiento de células inmunes como los neutrófilos y los macrófagos (X. Ma et al., 2017; Michel & Menze, 2019; B. Zhang et al., 2008). Así, las citoquinas, quimiocinas y también las ERO producidas por estas células inmunes aumentan el efecto citotóxico del Cisplatino y, con el paso del tiempo, producen la pérdida de la función renal (Dugbartey et al., 2016).

Se han propuesto diferentes abordajes para evitar la aparición de nefrotoxicidad derivada del Cisplatino. Uno de los más utilizados es la terapia con productos diuréticos y fluidos para disminuir el tiempo que pasa el fármaco en el riñón. Sin embargo, a pesar del uso de estas terapias, el daño producido en el órgano debido al tratamiento sigue siendo relevante (Gómez-Sierra et al., 2018; Volarevic et al., 2019). Otro de los abordajes utilizados para evitar la aparición de un daño agudo renal es administrar múltiples dosis de Cisplatino a lo largo del tiempo. Sin embargo, recientemente se ha comprobado que esta manera de administrar el fármaco puede favorecer la aparición de un daño renal crónico, ya que después de cada administración de Cisplatino, el daño renal aumenta, lo que lleva a un aumento progresivo de la inflamación, y finalmente desemboca en el daño renal crónico (Gómez-Sierra et al., 2018; Volarevic et al., 2019).

En relación con la toxicidad cardiovascular producida por Cisplatino, aunque en un principio fue considerada un efecto adverso raro, hoy en día, se sabe que este antitumoral produce una toxicidad cardiovascular, aunque aún no se conocen con exactitud los mecanismos que la producen. Al igual que se ha comentado en el caso de la toxicidad renal, la toxicidad cardiovascular producida por el Cisplatino es dependiente de la dosis utilizada, la pauta de administración y la dosis total administrada.

Los pacientes tratados con Cisplatino pueden experimentar diversos trastornos cardíacos, incluyendo cambios electrocardiográficos, anginas, arritmias, miocarditis, cardiomiopatía, fallo cardíaco congestivo, infarto agudo de miocardio, hipertensión e hipotensión y, aumento de eventos protrombóticos (El-Awady et al., 2011; Madeddu et al., 2016). A largo plazo, los efectos secundarios más comunes son isquemia miocárdica, tromboembolismo y enfermedades cerebrovasculares (Rosic et al. 2015). A pesar de que la toxicidad cardíaca producida por el Cisplatino no está totalmente definida, se han observado diferentes mecanismos que pueden inducir esta toxicidad.

Estos mecanismos son: el aumento de radicales libres, inducción de disfunción mitocondrial, daños en el núcleo, activación de vías apoptóticas, e inflamación de los tejidos cardíacos (Dugbartey et al., 2016; Topal et al., 2018). Estudios en corazones aislados de ratas tratadas con Cisplatino, han demostrado que la disminución del flujo coronario y el aumento de enzimas cardíacas en el suero sanguíneo está acompañada de un aumento en las concentraciones de ERO y de la peroxidación lipídica. Además, la disfunción cardíaca inducida por el Cisplatino está relacionada con la despolarización de la membrana mitocondrial y alteraciones estructurales en la misma (Chowdhury et al., 2016; Rosic et al., 2016, 2018). Otros estudios experimentales muestran que la disminución de la presión arterial y la frecuencia cardíaca provocada por el tratamiento con Cisplatino se debe al efecto que este antitumoral produce sobre el nódulo sinoatrial., ya que debido al elevado número de mitocondrias en las células cardíacas y la acumulación del Cisplatino en dichas mitocondrias, podría inducir un daño en el ADN mitocondrial, contribuyendo a estas alteraciones (El-Hawwary & Omar, 2019; H. Ma et al., 2010).

La toxicidad vascular inducida por el Cisplatino está menos estudiada, sin embargo, puede ser responsable del aumento de la mortalidad y morbilidad derivada del tratamiento e incluso limitar la efectividad de las terapias de cáncer. Así, se ha descrito que el tratamiento con Cisplatino puede producir hipertensión o hipotensión, la inducción de un vasoespasmo coronario y daño endotelial vascular (Cameron et al., 2016). Algunos de los mecanismos implicados en esta toxicidad inducida por el Cisplatino en las células endoteliales se han relacionado con el aumento de partículas pro-coagulantes y radicales libres (Herrmann, 2020). Además, la vasodilatación dependiente de óxido nítrico, se ve comprometida en pacientes que superan el tratamiento con el antitumoral en un periodo largo de tiempo (Di Lisi et al., 2017).

La neurotoxicidad más frecuente producida por el Cisplatino es la sensorial, que se caracteriza por hiperalgesias, disestesias, parestesias en manos y pies, e incluso dolor neuropático severo. Sin embargo, además de los cambios sensoriales, esta neurotoxicidad también puede afectar al sistema motor y al vegetativo, provocando alteraciones funcionales que pueden afectar a múltiples órganos y sistemas, entre los que se incluye el sistema cardiovascular (P. Gupta et al., 2022; Maihöfner et al., 2021); ; López-Tofiño et al., 2021; Paniagua et al., 2019; Vera et al., 2011).

La neuropatía periférica inducida por Cisplatino ocurre frecuentemente en pacientes que reciben una dosis de Cisplatino mayor de 300 mg/m<sup>2</sup>. Los síntomas crónicos de la neuropatía inducida por Cisplatino, que puede continuar meses después de la finalización del tratamiento, pueden deberse a la acumulación de los compuestos de platino en la raíz dorsal ganglionar (Seto et al., 2016). Estudios llevados a cabo recientemente, han demostrado que la inflamación y el estrés oxidativo tienen un papel principal en el desarrollo de la neurotoxicidad tras el tratamiento con Cisplatino (Abdel-Wahab & Moussa, 2019; P. Gupta et al., 2022).

En conjunto la toxicidad renal, cardíaca y vascular pueden suponer la interrupción del tratamiento con Cisplatino y los consecuentes problemas derivados de ello. En caso de que no se suspenda el tratamiento, estos efectos también pueden suponer que el riesgo de sufrir un accidente cardiovascular sea más elevado que el propio cáncer que se esté tratando. Además, diferentes estudios sugieren que la toxicidad renal y cardiovascular comparten mecanismos celulares y moleculares,

aunque éstos no están todavía claramente identificados (Varga et al., 2015). Comprender los mecanismos que inducen la toxicidad renal y cardiovascular causada por Cisplatino puede ayudar a diseñar mejores estrategias preventivas o tratamientos que ayuden a evitar la aparición de estas y otras toxicidades (Dugbartey et al., 2016; X. Ma et al., 2017).

### **1.4. Alteraciones cardiovasculares asociadas al Síndrome Metabólico**

La OMS define el Síndrome Metabólico (SM) como un conjunto de factores de riesgo cardiovascular representados por la obesidad central, las dislipemias, las anomalías en el metabolismo de la glucosa y la hipertensión arterial. Todo este conjunto de factores están estrechamente asociados a la resistencia a la insulina, a la diabetes mellitus tipo 2 y a las enfermedades cardiovasculares (Alberti & Zimmet, 1998; Gonzalez-Chávez et al., 2018; Watanabe et al., 2018).

En la actualidad, aún no se conoce bien la etiología del SM y la mayoría de los estudios gravitan sobre tres ejes: la obesidad central, la resistencia a la insulina y los factores genéticos y/o ambientales que individualmente predisponen o precipitan la presencia de SM. La obesidad central está definida por la acumulación excesiva de tejido adiposo a nivel subcutáneo abdominal y visceral. El tejido adiposo es uno de los principales depósitos de reserva energética para el organismo. Este tejido tiene la capacidad de acumular grasa cuando el aporte energético es excesivo, y de catabolizarla cuando el organismo requiere energía. La resistencia a la insulina se define como una disminución en la capacidad funcional de la insulina para el mantenimiento de la homeostasis de la glucemia, provocando a medio plazo un aumento de la insulina basal e hiperglucemia (Fernández-Bergés et al., 2012). Los factores genéticos y/o ambientales, entre los que se encuentra el estilo de vida y la alimentación no saludables constituyen también importantes factores para el desarrollo de SM (Hayden, 2023). Así, los individuos que presentan SM tienen mayor susceptibilidad de sufrir enfermedades cardiovasculares y mayor riesgo de mortalidad, inclusive sin padecer enfermedades cardiovasculares previas (Berwick et al., 2012; Ren & Xu, 2015b).

Entre los factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares presentes en el SM, la diabetes mellitus tipo 2 ha recibido una atención considerable (Janssen, 2023a). La diabetes mellitus tipo 2 afecta a diferentes sistemas orgánicos y es un iniciador de la disfunción cardíaca y endotelial que causan las alteraciones cardiovasculares más importantes en los pacientes con SM (Muller et al., 2021; F. Wang et al., 2017).

La cardiomiopatía diabética está asociada con defectos estructurales en el músculo cardíaco que alteran la función ventricular, lo que finaliza en un fallo cardíaco. La definición más aceptada de la cardiomiopatía diabética se refiere a la disfunción cardíaca en pacientes diabéticos que ocurre en ausencia de enfermedades de las arterias coronarias, hipertensión descontrolada, alteraciones en las válvulas cardíacas y enfermedades congénitas cardíacas. El fenotipo típico de la cardiomiopatía cardíaca está caracterizado por hipertrofia del ventrículo izquierdo y disfunción diastólica

(Rabinovich-Nikitin et al., 2019). Se distinguen dos etapas en la cardiomiopatía diabética (Gargiulo et al., 2020):

- Etapa inicial: caracterizada por una hipertrofia ventricular concéntrica, aumento de la rigidez miocárdica, aumento de las presiones de llenado, función diastólica disminuida.
- Etapa final: Se produce fibrosis cardíaca, aumento de las alteraciones en la función diastólica, y disfunción sistólica

Se sabe también que las alteraciones en el control del flujo sanguíneo en el lecho coronario se encuentran detrás del aumento de la morbilidad y mortalidad que se producen en el SM. Como ya hemos comentado en párrafos anteriores, la regulación del envío del oxígeno al miocardio es esencial para mantener la función cardíaca. El SM altera la habilidad del lecho coronario de regular la resistencia vascular y distribuir el oxígeno. La disfunción de la microvasculatura coronaria se traduce en una disminución de la vasodilatación dependiente del endotelio, atenuándose en esta situación endocrino-metabólica la respuesta del flujo coronario a compuestos vasodilatadores como la acetilcolina y adenosina. Estos cambios, ocurren de manera previa a la enfermedad aterosclerótica y han sido asociados con alteraciones en la función cardíaca del ventrículo izquierdo, y la función contráctil diastólica, tanto en modelos animales de SM como en estudios clínicos (Berwick et al., 2012).

La rigidez arterial es un factor de riesgo independiente que contribuye al desarrollo y la progresión de la enfermedad cardiovascular en el SM. El consumo de una dieta rica en grasas saturadas y carbohidratos refinados y un estilo de vida sedentario son los principales factores que explican el aumento de la rigidez arterial en situaciones de SM y obesidad, ocasionando cambios estructurales y funcionales en las capas íntima, media y adventicia de la vasculatura (Topouchian et al., 2018; Townsend et al., 2015; Aroor et al., 2018).

Asimismo, la expansión del tejido adiposo, que ocurre en situaciones de obesidad o SM, conlleva la infiltración de células inmunes y promueve la inflamación en el tejido adiposo, incluyendo el tejido adiposo perivascular (TAP). En situaciones no patológicas, el TAP atenúa la vasoconstricción mediante la liberación de factores de relajación derivados de los adipocitos, y promueve la relajación en respuesta a la excitación perivascular nerviosa, derivada de los factores de contracción. Sin embargo, en la obesidad y el SM, este tejido también sufre una hipertrofia excesiva, produciéndose un cambio a un fenotipo más inflamatorio, atrayendo macrófagos hacia sí. Esto, a su vez, produce una disminución de los mecanismos vasodilatadores mediados por el TAP. Todo este proceso promueve la alteración de las respuestas vasodilatadoras mediadas por la insulina, y la remodelación vascular. Por último, el aumento de la liberación de citoquinas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$ , y ácidos grasos libres, modifica el TAP a un fenotipo de vasoconstricción (Engin, 2017).

Las alteraciones endocrino-metabólicas, producidas durante el SM, así como el estado inflamatorio generalizado que se produce en esta patología, también producen daño estructural o funcional en el endotelio, ocasionándose una disfunción endotelial (Engin, 2017). La disfunción endotelial, predispone a la vasculatura a un estado contráctil, debido a un desajuste entre los factores vasodilatadores y vasoconstrictores. Este cambio, es fundamental en el SM para producir un estado disfuncional, que

involucra tanto al sistema inmune innato como a las especies reactivas de oxígeno (Tran et al., 2020). De hecho, el aumento en la producción de ERO es una característica de las enfermedades cardiovasculares, y también se asocia con la aterosclerosis, la resistencia a la insulina y la diabetes. En las células endoteliales, las ERO, tienen además un efecto citotóxico directo, ya que reaccionan con el óxido nítrico, para disminuir su biodisponibilidad y forman aniones de peroxinitrito, que son oxidantes muy potentes (Engin, 2017). La disfunción endotelial, provocada por estas ERO, juega un papel importante en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, incluyendo aterosclerosis, hipertensión, hipercolesterolemia, fallo cardíaco, infarto e isquemia cerebral (Lund 2017; Dubnika et al. 2018).

Por otra parte, en situaciones de prediabetes y SM, múltiples factores pueden contribuir a la presencia de una disfunción autonómica, que puede manifestarse bien como depresión parasimpática, bien como sobreactividad o predominio simpático (Spallone, 2019).

La neuropatía autonómica diabética se definió en el consenso de Toronto como “desorden del sistema nervioso autónomo en el desarrollo de la diabetes o de alteraciones metabólicas de la prediabetes, después de la exclusión de otras causas” (Spallone, 2019). Aunque la neuropatía periférica más importante y frecuente en la diabetes es la neuropatía sensorial (Bodman & Varacallo, 2023), en los pacientes diabéticos también se puede desarrollar una neuropatía autonómica cardiovascular. De hecho, se ha descrito que la neuropatía autonómica cardíaca es una de las primeras manifestaciones de la diabetes de tipo 2, y que aparece antes que las alteraciones metabólicas en esta patología, sugiriéndose que se establece en fases tempranas de la enfermedad, posiblemente durante la prediabetes (Bakkar et al., 2020). Dado que la neuropatía autonómica cardiovascular en la diabetes ocurre también en las fibras nerviosas más largas, las manifestaciones iniciales de la misma también incluyen cambios en la frecuencia cardíaca y en el tono vascular que derivan en la dificultad de regular la presión arterial, lo que causa síntomas presincoales, intolerancia al ejercicio y palpitaciones (Williams et al., 2019).

El aumento de la morbilidad y mortalidad cardiovascular asociada con la neuropatía cardíaca autonómica se ha establecido en numerosos estudios epidemiológicos. Sin embargo, esta neuropatía está empezando a ser reconocida en sujetos con prediabetes y SM con la prevalencia del 11% y 24%, respectivamente. La neuropatía autonómica prediabética está asociada con componentes del SM, incluyendo hipertensión, obesidad e hiperglicemia. La etiología de esta neuropatía cardiovascular es multifactorial y hay una relación recíproca entre la resistencia a la insulina y el SM. Además, está relacionada de manera independiente con la isquemia miocárdica silenciosa, eventos cardiovasculares mayores, disfunción miocárdica y mortalidad cardiovascular (Williams et al. 2019).

Por último, hay que mencionar que, en el SM, en las etapas más avanzadas, también se produce una neuropatía autonómica, pero en este caso, con hiperactividad del sistema nervioso autónomo simpático. Se ha demostrado que, en esta situación metabólica, hay un aumento de las catecolaminas plasmáticas y urinarias, actividad del sistema nervioso simpático y actividad cardíaca autónoma. La activación simpática, tiene importantes efectos en la circulación coronaria, a través de efectos directos en los adrenoreceptores  $\alpha$  y  $\beta$ . Además, produce una liberación de vasodilatadores locales,

que producen un aumento de la contractibilidad, frecuencia cardiaca y presión arterial (Berwick et al., 2012). Estudios recientes, sugieren también que hay una relación entre la hiperactividad del sistema nervioso autónomo simpático, y la resistencia vascular periférica (Rodrigues et al., 2017).

En resumen, el SM es un conjunto de factores de riesgo que, por sí solos o en sinergia, están relacionados con la resistencia a la insulina, la inflamación de bajo grado, el estrés oxidativo y la disfunción de la adiposidad. Todos estos factores se asocian a largo plazo con el padecimiento en estos pacientes de enfermedades cardiovasculares y renales entre otras. Además, la neuropatía autonómica cardiovascular presente desde las etapas iniciales en el SM puede también jugar un papel importante en el deterioro del sistema cardiovascular (Gonzalez-Chávez et al., 2018; Spallone, 2019).

### **1.5. El papel de la inflamación crónica de bajo grado en la aparición y desarrollo de las alteraciones cardiovasculares**

Todas las formas de enfermedad comienzan debido a la aparición de alteraciones moleculares o estructurales en células. Una célula normal está limitada a un espectro de función y estructura restringido, dependiendo de su estado de metabolismo, grado de diferenciación y especialización, condicionantes impuestos por las células vecinas, y la mayor o menor disponibilidad de sustratos metabólicos. No obstante, dicha célula es capaz de satisfacer las demandas fisiológicas manteniendo un estado de equilibrio, llamado homeostasia. Cuando se producen cambios en el estado fisiológico o hay estímulos patológicos que alteran esa homeostasis, las células son capaces de adaptarse con respuestas adaptativas, tanto funcionales como estructurales, para poder sobrevivir y mantener su función. La respuesta adaptativa puede consistir en el aumento del tamaño de las células (hipertrofia) y de la actividad funcional, el incremento de su número (hiperplasia), la disminución de su tamaño y su actividad metabólica (atrofia), o el cambio en el fenotipo de dichas células (metaplasia). Es posible que, cuando la agresión sea eliminada, la célula recupere su estado original sin sufrir consecuencias perjudiciales (Kumar et al., 2015). En estos casos, se habla de una lesión celular reversible que se caracteriza por alteraciones funcionales y estructurales en estadios iniciales o formas de lesión, que son corregibles si se elimina el estímulo dañino (Kumar et al., 2015). Sin embargo, si el daño es excesivo o permanece en el tiempo, las células evolucionan hasta una lesión celular irreversible y la muerte de la misma, bien por necrosis, bien por apoptosis (Kumar et al., 2015).

Por último, el punto de no retorno, a partir del cual el daño es irreversible, es impreciso, y no hay correlaciones morfológicas o bioquímicas fiables que definan la irreversibilidad. Los dos fenómenos asociados a la muerte celular son: incapacidad para revertir la disfunción mitocondrial, y los trastornos pronunciados de la función de las membranas ((Kumar et al., 2015).

**La adaptación, la lesión reversible y la muerte celular** pueden ser etapas de un deterioro progresivo que sucede a diferentes tipos de enfermedades. Las consecuencias finales de los cambios genéticos, bioquímicos y estructurales en células y tejidos son anomalías funcionales que generan las manifestaciones clínicas de la

enfermedad (síntomas y signos) y condicionan su progresión (evolución clínica y pronóstico). Así pues, las correlaciones clínico-patológicas son fundamentales en el estudio de la enfermedad (Kumar et al., 2015). Por ejemplo, en respuesta a un incremento de las cargas hemodinámicas, el músculo cardíaco aumenta de tamaño, como forma de adaptación, y puede resultar lesionado como consecuencia de ello. Si la irrigación del miocardio se ve afectada o es inadecuada, en primer lugar, el músculo sufre una lesión reversible, manifestada por ciertos cambios citoplasmáticos. Sin embargo, con el tiempo, las células experimentan una lesión irreversible y mueren (Kumar et al., 2015).

### 1.5.1. Inflamación crónica de bajo grado

En los últimos años, los estudios que han analizado el proceso inflamatorio han permitido comenzar a caracterizar la denominada inflamación estéril. Este tipo de inflamación se produce en ausencia de infección, tras situaciones de lesión o muerte celulares. Las moléculas liberadas por la rotura de las estructuras celulares producen una reacción inflamatoria similar a la producida durante una infección, incluyendo el reclutamiento de neutrófilos, macrófagos, citoquinas y quimiocinas proinflamatorias, y la inducción de la respuesta inmune adaptativa mediada por linfocitos T (Van Linthout & Tschöpe, 2017).

Por otra parte, desde hace relativamente poco tiempo, se ha acuñado el término de para-inflamación, para hacer referencia a un tipo de inflamación estéril caracterizada por no producir un daño muy grave en los tejidos y desarrollar una actividad inflamatoria limitada. Este tipo de inflamación también se denomina meta-inflamación o **inflamación crónica de bajo grado** (Van Linthout & Tschöpe, 2017). Hay que recordar que la inflamación crónica es un término que se utiliza en el caso de que la respuesta inflamatoria tenga una duración prolongada (semanas o meses) y, en la que la lesión de los tejidos y los intentos de reparación coexisten, con combinaciones variables. Puede suceder a la inflamación aguda, o presentarse como una respuesta progresiva de bajo nivel, sin manifestaciones de reacción aguda previa (Kumar et al., 2015). Esta forma de inflamación crónica de bajo grado suele estar presente en situaciones como la obesidad, SM, aterosclerosis, senescencia celular y otras enfermedades donde la inflamación tiene un papel importante. Así mismo, también se sabe que este tipo de inflamación está modulado por factores ambientales como la ingesta calórica excesiva, y la inactividad física (Francisqueti et al., 2017). Más aún, estudios recientes también han señalado la relación entre la inflamación estéril y las alteraciones cardiovasculares ocasionadas por la administración de antitumorales (El-Awady et al., 2011; Rosic et al., 2015, 2018), y en particular del Cisplatino (Dugbartey et al., 2016; Perše & Večerić-Haler, 2018).

En la actualidad, se han descrito tres mecanismos involucrados en la inflamación crónica de bajo grado (Van Linthout & Tschöpe, 2017): a) la activación de los receptores de reconocimiento de patrón; b) la liberación de citoquinas proinflamatorias que activan las vías de los receptores de reconocimiento de patrón; y, c) la activación de receptores que no están relacionados con el reconocimiento de los patrones, como el receptor para productos de la glicación avanzada.

A continuación, se describen más detalladamente los dos primeros de estos mecanismos por ser los más relacionados con las alteraciones cardiovasculares en los que está centrada la investigación llevada a cabo en esta Tesis Doctoral.

### 1.5.2. Activación de los receptores de reconocimiento de patrón.

Como se ha comentado en párrafos anteriores, el proceso inflamatorio causado por la lesión y/o muerte celular es similar al desarrollado por una infección. Así, esta respuesta inflamatoria estéril también se puede dividir en tres fases: aguda, proliferativa y madurativa. El control del tiempo, la duración y la magnitud de la respuesta inflamatoria es crucial para la correcta reparación de la lesión tisular. Una infraactivación de las respuestas inflamatorias puede producir la persistencia del estímulo lesivo, mientras que un tiempo excesivo de resolución puede ampliar la lesión tisular (Thomas & Grisanti, 2020). Además, el grado de inflamación depende de la intensidad del estímulo lesivo y la susceptibilidad del huésped, e involucran múltiples órganos y sistemas (Yue Li et al., 2020; Varela et al., 2018).

Los desencadenantes de la inflamación estéril son los patrones de reconocimiento del daño, *Damage-Associated Molecular Patterns*, (DAMPs), que son las moléculas que se liberan cuando la membrana celular del huésped resulta dañada, y el contenido intracelular se libera al espacio extracelular (Kumar et al., 2015; Varela et al., 2018).

En caso de que se produzca el daño o muerte celular, la primera línea de defensa es el sistema inmune innato. Este sistema, reconoce las sustancias liberadas al plasma durante la muerte celular e induce una potente respuesta inflamatoria para eliminar el factor agresor. Los principales componentes de la inmunidad innata son receptores celulares, denominados **receptores de reconocimiento del patrón** (*Pattern recognition receptors, PRRs*), que reconocen los DAMPs. Los PRRs son numerosos y están expresados en un amplio rango de células inmunes y no inmunes, incluyendo tejidos del sistema cardiovascular. Además, estos receptores se expresan en todos los compartimentos celulares: membrana plasmática, endosómicos y citosólicos (Goulopoulou et al., 2016; Kumar et al., 2015).

Se han identificado varias clases de receptores de reconocimiento de patrón, los cuales, según su importancia en el sistema inmune innato, son: a) Receptores tipo señuelo (receptores *Toll-Like*, TLR, *Toll-like receptors*), b) Receptores de tipo “*nucleotide-binding and oligomerization domain*” (NOD) y el inflamasoma; c) Otros receptores para los productos microbianos (Kumar et al., 2015).

Se describen, a continuación, con más detalle, los procesos involucrados en la activación de los receptores TLR y tipo NOD, así como su participación en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares por estar más relacionados con la investigación llevada a cabo en esta Tesis Doctoral.

Los receptores de reconocimiento del patrón más conocidos son los **TLRs**. Los TLRs son glicoproteínas transmembrana tipo I responsables de reconocer e iniciar respuestas inflamatorias a un amplio rango de ligandos endógenos y exógenos y constituyen el mayor subgrupo de PRRs. Se identificaron por primera vez en 1996, en

moscas mutantes de la especie *Drosophila melanogaster*, las cuales mostraban una mayor sensibilidad a infecciones fúngicas. Posteriormente, se identificaron sus homólogos en murinos y humanos demostrando que también tenían un rol esencial mediando la respuesta inmune contra el lipopolisacárido bacteriano (LPS). Actualmente se han identificado hasta 13 TLR distintos en los mamíferos (Acheke et al., 2016).

**Tabla 1 Receptores TLR. Localización, ligandos, análogos sintéticos, adaptador de señal, productos. Adaptada de Acheke et al., 2016**

TLRs	Localización	DAMPs	Análogo sintético	Adaptado	Producción
TLR2-1	Plasma Membrana	ND	Lipopéptidos triacilados	MAL/MyD88	Citoquinas proinflamatorias
TLR2-6	Plasma Membrana	Proteínas de choque térmico, HMGB1, versicana, ácido hialurónico	Lipopéptidos triacilados	MAL/MyD88	
TLR3	Membrana endosomal	mRNA	Poli (I:C), Poly(I:C12U)	TRAM/TRIF	Citoquinas proinflamatorias
TLR4	Plasma membrana/ membrana endosomal	Proteínas de choque térmico, HMGB1, $\beta$ -defensina 2, dominio extra A de fibronectina, ácido hialurónico, heparán sulfato, proteína A surfactante del fibrinógeno, fosfolípidos oxidados	Miméticos del lípido A (lípido A monofosforilado, aminoalquilglucosamina 4-fosfato) E6020, E5531, E5564)	MAL/MyD88 TRAM/TRIF	Citoquinas proinflamatorias, IFNs tipo I
TLR5	Plasma Membrana	ND	Péptido discontinuo de 13 aminoácidos CBLB502	MyD88	Citoquinas proinflamatorias
TLR7	Membrana endosomal	ssRNA (complejo inmune)	Oligonucleótidos, imidazoquinolina, nucleótidos de guanosina, bropirimina	MYD88	Citoquinas proinflamatorias, IFNs tipo I
TLR8	Membrana endosomal	ssRNA (complejo inmune)	Imidazoquinolinas (Resiquimod)	MYD88	Citoquinas proinflamatorias, IFNs tipo I
TLR9	Membrana endosomal	Complejo de cromatina igG	Oligodesoxinucleótidos CpG	MyD88	Citoquinas proinflamatorias, IFNs tipo I
TLR10	Plasma Membrana	ND	ND	MyD88	Citoquinas proinflamatorias
TLR11	Membrana endosomal	ND	ND	MyD88	Citoquinas proinflamatorias
TLR12	Membrana endosomal	ND	ND	MyD88	Citoquinas proinflamatorias
TLR13	Membrana endosomal	ND	ND	MyD88	Citoquinas proinflamatorias

ND, no determinado; ssRNA, RNA de cadena sencilla; mRNA, RNA mensajero; rRNA, RNA ribosomal; HMGB1, proteína 1 del grupo de alta movilidad; MyD88, respuesta primaria de diferenciación mielode 88; TRIF, interferón- $\beta$  inductor de adaptador que contiene el dominio TIR; TRAM, molécula adaptadora relacionada con TRIF

Los TLR están ampliamente expresados en el organismo (células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, monocitos, linfocitos, fibroblastos, células epiteliales, endoteliales y neuronales) teniendo cada célula un set específico de TLR que tiene distintas funciones de reconocimiento DAMP específicos. La localización del receptor en la célula depende del ligando que reconozcan. Así, si reconocen componentes de la membrana celular estos se expresan en las superficies celulares (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 y TLR6) en cambio si reconocen los ácidos nucleicos se expresan en los endosomas, lisosomas, endolisosomas y retículo endoplasmático (TLR11, TLR12 y TLR13, TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9) (Goulopoulou et al., 2016; Parizadeh et al., 2018; Roshan et al., 2016a; Yu Wang et al., 2016a).

La activación de los TLRs induce una cadena de señalizaciones que involucran la producción de moléculas proinflamatorias como las citoquinas, la activación del sistema del complemento y el reclutamiento de células fagocíticas y células presentadoras de antígenos en el sitio de la invasión de patógenos (Goulopoulou et al., 2016; S. Sharma et al., 2016b). Estos receptores tienen de dos dominios principales: la

porción extracelular que contiene unas repeticiones ricas en leucina y detecta los DAMPs del medio extracelular; y una porción intracelular que contiene un dominio conocido como receptor Toll/IL-1 (TIR) y que presenta diferentes moléculas adaptativas según la vía de señalización del receptor que active. En la actualidad, se han caracterizado cuatro adaptadores principales que contienen dominios TIR: factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88), proteína adaptativa contenida en el dominio TIR (TIRAP), adaptador contenido en el dominio TIR inductor del interferón  $\beta$  (TRIF) y molécula adaptativa relacionada con el TRIF (TRAM) (Parizadeh et al., 2018). Tras el reclutamiento de distintas moléculas adaptadoras, la señalización de los TLR puede dividirse en dos vías diferentes (Mishra & Pathak, 2019). La primera conocida como “*Myddosome*”, es la vía dependiente del MyD88, y se inicia tras la activación del receptor TLR en la membrana celular. Esta vía es la que tiene mayor importancia en la señalización, ya que todos los TLR, excepto el TLR3, utilizan este mecanismo de señalización. La segunda vía, conocida como “*Trifosome*”, es minoritaria y se inicia una vez que el receptor es introducido dentro de la célula por endocitosis., y no es usada por todos los TLR.

Debido a que esta Tesis Doctoral se centra, entre otros, en el estudio de los cambios de expresión en el receptor TLR4 en las alteraciones cardiovasculares en dos modelos experimentales, a continuación, se detallará la activación de este receptor y la cascada de señalización involucrada en su efecto.

El receptor **TLR4**, fue el primer TLR caracterizado en mamíferos y se encuentra expresado principalmente en las células de sistema inmune innato (monocitos, macrófagos y células dendríticas) y en células del sistema cardiovascular como las células endoteliales y células musculares lisas. El receptor TLR4 se localiza en la membrana celular, donde responde a sus ligandos específicos y activa una serie de vías de señalización inflamatoria, siendo el único receptor TLR en el que convergen las dos vías de señalización mencionadas anteriormente, “*Myddosome*” y “*Trifosome*” (Bomfim et al., 2015).

Para que se produzca la activación del receptor TLR4, los DAMPs se unen, en primer lugar, a la proteína de unión del LPS (LBP) que se sitúa en la membrana plasmática colocalizada con el receptor TLR4. A continuación, el complejo DAMPS-LPB se une a otra proteína conocida como “*cluster of differentiation 14*” (CD14), que cataliza la transferencia del DAMPS a un complejo preformado por el TLR4 y su correceptor “*myeloid differentiation protein 2*” (MD2). Esta reacción forma, finalmente el complejo DAMPS/TLR4/MD2 que inicia una serie de señales intracelulares que desembocan en el inicio de un proceso inflamatorio (Z. Xiao et al., 2020).

El complejo anterior recluta y activa la proteína adaptadora MyD88, y se inicia la señal de transducción con la activación de las vías del “*nuclear factor- $\kappa$ B*” (NF- $\kappa$ B) y “*mitogen-activated protein kinase*” (MAPK). Finalmente, toda esta cadena de señalización intracelular induce la transcripción del factor NF- $\kappa$ B, la proteína activadora 1 (AP-1), la producción de diferentes citoquinas y quimiocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, MCP-1 y la generación de especies reactivas de oxígeno (Bomfim et al., 2015; Di et al., 2016; Molteni et al., 2018; S. Sharma et al., 2016a).

En los últimos años, el papel del receptor TLR4 en las respuestas inmunes y patológicas ha sido estudiado ampliamente (Lucas & Maes, 2013b). Esto, en parte, se

debe a que exhibe múltiples particularidades. Así, se expresa tanto en la membrana celular como en la endosómica, puede activar rutas de señalización dependientes e independientes de MyD88, y puede reconocer un amplio rango de DAMPS (Mishra & Pathak, 2019).

Además, se ha demostrado que el receptor TLR4 juega un papel importante en el desarrollo de la patogénesis de enfermedades cardiovasculares como miocarditis, infarto de miocardio, daño por isquemia-reperfusión, fallo cardíaco, alteraciones en las válvulas aórticas, aterosclerosis e hipertensión (Yu & Feng, 2018c). También se ha sugerido que el TLR4, el MyD88 y la posterior respuesta inflamatoria juegan un papel esencial en la progresión de la hipertrofia cardíaca. El TLR4 y la cascada de señalización se encuentran sobreexpresados tanto en las zonas infartadas como en zonas lejanas a la zona dañada, después del infarto de miocardio (Adamczak et al., 2017; Z. Xiao et al., 2020; Y. Yang et al., 2016). Igualmente, se ha propuesto que la alteración en la onda de pulso sanguíneo que se produce en la hipertensión arterial genera daños en los vasos sanguíneos que activan el TLR4 y su cascada de señalización, produciendo la liberación de citoquinas proinflamatorias, que regulan la respuesta inflamatoria y la progresión de la cardiopatía hipertensiva (Z. Xiao et al., 2020).

En el sistema vascular, el TLR4 expresado en el endotelio también juega un papel crucial en el desarrollo de la disfunción endotelial. Se ha demostrado que ratones que carecen de TLR4, están protegidos frente a la disfunción endotelial inducida por la obesidad (Yu Wang et al., 2016a). Además, este receptor también se encuentra involucrado en el desarrollo de la placa aterosclerótica, ya que las LDL oxidadas tiene la capacidad de activar este receptor y además está involucrado la remodelación de la capa exterior de las arterias (Roshan et al., 2016b; Yu Wang et al., 2016a). Se ha demostrado también que el bloqueo de estos receptores y sus cadenas de señalización disminuyen la respuesta inflamatoria y daño adicional en distintas patologías cardiovasculares como se señalará posteriormente en la discusión de los resultados de esta Tesis Doctoral (Yu Wang et al., 2016a; Y. Yang et al., 2016).

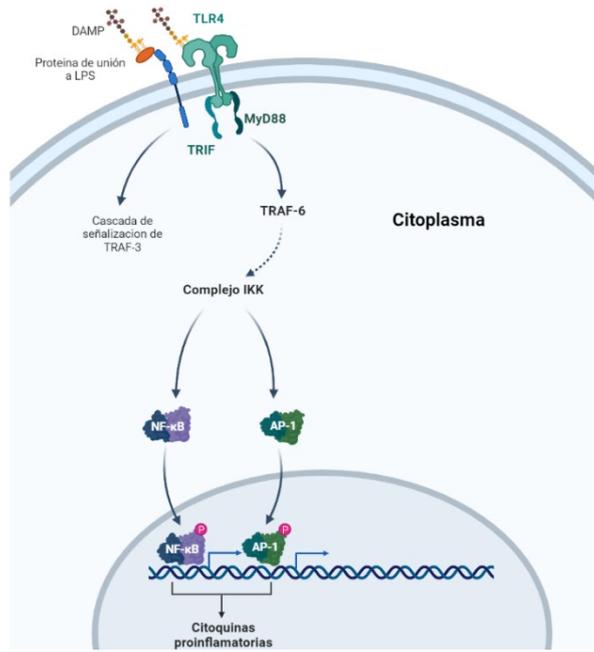


Ilustración 4: Esquema de la cadena de activación de TLR4 a través de la vía de señalización de MyD88. Modificada de BioRender.com

**Receptores de tipo NOD y el inflamasoma.** Los receptores de tipo NOD (NLR) son receptores citosólicos y reconocen una amplia variedad de sustratos como los productos de las células necrosadas, iones y algunos productos microbianos. Hoy día, no se conocen con exactitud los mecanismos a través de los cuales esta familia de receptores consigue detectar tantos signos y tan diversos de daño o peligro. Se han descrito 7 receptores de la familia NLR que se clasifican como: NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRP6, NLRP7, NLRP12, NLRC4. Los NLR envían señales a través de un complejo multiproteínico citosólico llamado inflamasoma, que activa una cadena de señalización intracelular que desencadena también el proceso inflamatorio (Kumar et al., 2015; Ozaki et al., 2015).

Desde la década pasada, los estudios sobre el papel del inflamasoma en la inmunidad innata han ido en aumentando, mostrando que tienen un papel central en la respuesta inmune. Los inflasomas son complejos supramoleculares intracelulares, compuestos por una molécula sensor "*nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)-like receptor*" (NLR), una proteína adaptadora "*adaptor apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*" (ASC), y una proteína efectora, pro-caspasa 1. Después de la activación de la molécula sensor del inflamasoma (NLR), el ASC se autoasocia a él en una molécula llamada piroptosoma, que actúa como una plataforma molecular para la activación de la pro-caspasa 1, que se transforma en caspasa 1 madura e inicia la activación y liberación de proteínas de la familia Interleuquina 1 (Karan, 2018; Mangan et al., 2018).

El inflamasoma del "*nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3*" (NLRP3), es el inflamasoma más estudiado (de Zoete et al., 2014).

Debido a que esta Tesis Doctoral se centra, entre otros, en el estudio del papel que puedan tener los cambios de expresión en el NLRP3 en las alteraciones cardiovasculares en dos modelos experimentales, a continuación, se detallará la activación y la cascada de señalización llevada a cabo por el NLRP3.

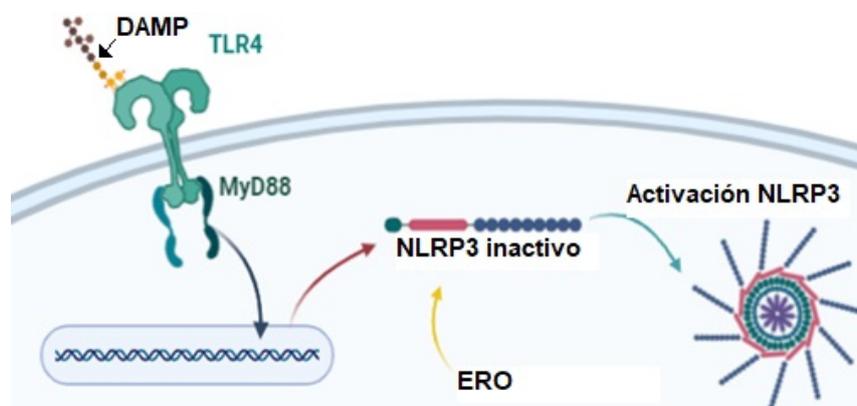
El **NLRP3** es un complejo de tres moléculas, NLRP3, la proteína adaptativa ASC y la proteasa pro-caspasa-1. De forma general, la activación del NLRP3 produce un aumento en el reclutamiento de ASC, que en consecuencia recluta pro-caspasa-1. Esta pasa a su forma activa, caspasa-1. En su forma activa, esta enzima activa las pro-IL-1 $\beta$  y pro-IL-18, en sus formas maduras. La activación del inflamasoma NLRP3 causa piroptosis, una muerte celular de tipo inflamatorio (Ozaki et al., 2015; Pinar et al., 2020a).

De forma más detallada, la activación del inflamasoma NLRP3 es un proceso que consta de dos etapas:

- La primera etapa es conocida como "*Priming*" en la que se produce un aumento de la expresión de los componentes del inflamasoma mencionados anteriormente. Este aumento de la expresión puede ser inducida a través de los TLRs y citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ . Es importante señalar, que aunque hay mucha información acerca de las señales que aumentan la expresión de los componentes del NLRP3, muchas de las rutas están

interrelacionadas y sobrepuestas y la información es, en ocasiones, difícil de interpretar (Swanson et al., 2019). Algunos autores señalan que los agonistas del receptor TLR4 y ciertas citoquinas proinflamatorias aumentan los niveles de ARN mensajero de NLRP3, IL-1 $\beta$  e IL-18 (Ozaki et al., 2015; Pinar et al., 2020b; Suetomi et al., 2018; Swanson et al., 2019).

- La segunda etapa es la etapa de activación. Una vez producidos los componentes del inflamasoma, estos se deben ensamblar para formar la molécula. Esta activación se produce cuando la célula es sometida a un estímulo activador. El inflamasoma del NLRP3 es activado en infecciones bacterianas, víricas y fúngicas, así como en la inflamación estéril mediada por DAMPs o la exposición a irritantes medioambientales. El factor común en todos estos activadores es que todos ellos inducen estrés celular, siendo este estrés celular detectado por el NLRP3 (Mangan et al., 2018; Swanson et al., 2019).



**Ilustración 5: Esquema de la activación del NLRP3 a través de la vía TLR4/MyD88. Elaborada y modificada con BioRender.com**

En la actualidad, se sigue estudiando qué vías celulares están involucradas en la activación del NLRP3, y, actualmente, no hay todavía un consenso en el modo de activación del NLRP3. Sin embargo, se han propuesto varias señales activadoras como cambios en los flujos celulares de potasio, cloro y calcio, disrupción lisosomal, disfunción mitocondrial o cambios metabólicos (Swanson et al., 2019).

La activación de NLRP3 está involucrada en las enfermedades cardiovasculares, incluyendo el fallo cardíaco, y la isquemia miocárdica (Pinar et al., 2020b; Suetomi et al., 2018). Así, se sabe que el NLRP3, ASC, Caspasa-1, IL-1 $\beta$ , e IL-18 se expresan y están liberadas en el medio extracelular en el miocardio dañado (Pinar et al., 2020a; Zeng et al., 2019). Otros estudios han establecido una fuerte relación entre la activación del inflamasoma NLRP3 y la remodelación adversa tras el fallo cardíaco (Pinar et al., 2020b), e incluso estudios con ratones Knock-out tanto para la proteína ASC como para la caspasa-1, mostraron una disminución significativa en la zona infartada, y en la fibrosis, así como una mejor función cardíaca mejorada después del daño por isquemia/reperfusión (Jahng et al., 2016; Pinar et al., 2020<sup>a</sup>; Zeng et al., 2019). Estudios con tejidos humanos han demostrado también que los niveles de proteínas y ARN mensajero del inflamasoma del NLRP3 en las células periféricas mononucleares sanguíneas son superiores en pacientes con alteraciones en las arterias coronarias, especialmente en los que tenían un síndrome coronario agudo (Hoseini et al., 2018; Z.

Wang et al., 2018). Además, la producción de IL-1 $\beta$  e IL-18, puede intensificar la inflamación cardíaca y la formación de la placa de ateroma, a través del aumento de otras citoquinas y quimiocinas. Se ha descrito que el aumento de IL-1 $\beta$ , aumenta la producción de la quimiocina “*monocyte chemo-attractant protein-1*” (MCP-1) y “*vascular cell molecule 1*” (VCAM-1) que participan en la adhesión de los leucocitos al endotelio (Thomas & Grisanti, 2020).

En cuanto a los principales activadores del NLRP3 relacionados con el fallo cardíaco, se ha propuesto que altos niveles de ATP, activan los receptores purinérgicos P2X<sub>7</sub> para causar un cambio en el flujo de potasio, promoviendo el ensamblamiento del NLRP3 y el ASC. Además, también se ha asociado que la translocación del ADN mitocondrial al citosol con una activación del inflamasoma y se ha sugerido que la disfunción mitocondrial y el ADN mitocondrial oxidado podrían actuar como activadores del inflamasoma (Jahng et al., 2016; Pinar et al., 2020b).

Por otra parte, es importante señalar, que gran parte de los mecanismos asociados con la activación del NLRP3, también son mecanismos que participan en el desarrollo de la aterosclerosis (Hoseini et al., 2018). En un estudio llevado a cabo en humanos se observó que los niveles de ARN mensajero de NLRP3 aumentaban significativamente en las placas ateroscleróticas, en comparación a vasos no ateroscleróticos, siendo particularmente alta la expresión de NLRP3 en las zonas con lesiones sintomáticas (Suetomi et al., 2018) Además el aumento de la expresión del inflamasoma del NLRP3 predispone a la ruptura de la placa, ya que disminuye la expresión de células musculares lisas vasculares y colágeno, y aumenta la expresión de macrófagos y lípidos (Hoseini et al., 2018).

Otros estudios también han mostrado que en ratones a los que se les había eliminado el gen del NLRP3, estaban protegidos de daño inflamatorio vascular y la disfunción endotelial asociadas a la diabetes (C. A. Pereira et al., 2020).

### 1.5.3. Mediadores solubles de la respuesta inflamatoria: Citoquinas proinflamatorias

Dentro de los mediadores solubles de la inflamación, los más conocidos y estudiados son las citoquinas y quimiocinas, ya que representan el principal mecanismo de comunicación celular entre las diferentes ramas del sistema inmune (Goldberger et al. 2019, Bartekova et al. 2018<sup>a</sup>).

Las quimiocinas son citoquinas quimiotácticas, que controlan la migración y posicionamiento celular, a través del crecimiento, homeostasis y la inflamación. Las quimiocinas no solo guían a las células efectoras a los sitios de infección o inflamación, también coordinan la interacción entre las diferentes células inmunes. Al hacer esto, las quimiocinas promueve la interacción entre el sistema inmune y el sistema adaptativo, para ofrecer una respuesta inmune óptima (Sokol & Luster, 2015). Las quimiocinas inflamatorias aumentan su expresión en tejidos dañados y son mediadores clave en las reacciones inflamatorias, controlando la activación y el tráfico de los leucocitos (B. Chen & Frangogiannis, 2020). La mayoría de las quimiocinas son secretadas en el espacio

extracelular, donde permanecen en un estado soluble o están unidas a componentes de la matriz extracelular, por ello las quimiocinas o sus gradientes, son detectadas por las células a través de receptores celulares (Sokol & Luster, 2015).

Las citoquinas son glicoproteínas, de bajo peso molecular, secretadas por diferentes tipos de células. Se definen como transmisores químicos, que median la respuesta inflamatoria desde el lugar donde se ha producido la inflamación al resto del cuerpo. Principalmente reclutando células, como neutrófilos y monocitos, hacia el sitio de inflamación. También, estimulan la división, diferenciación y proliferación celular (Amin et al., 2020; B. Chen & Frangogiannis, 2020). Las citoquinas proinflamatorias son las responsables de la inflamación aguda y las que están envueltas en la inflamación crónica, sin embargo los estudios indican que diversas citoquinas tienen un papel tanto en la inflamación aguda como en la inflamación crónica (Amin et al., 2020).

Las quimiocinas y citoquinas son mediadores del proceso inflamatorio muy relacionadas entre sí. De hecho, hay autores que no hacen tal diferenciación, refiriéndose a todas ellas como citoquinas. En esta Tesis Doctoral, utilizaremos el término de citoquina para referirnos a todos estos mediadores solubles de la inflamación.

**Tabla 2: Familias de citoquinas. Adaptada de Achek et al., 2016**

Familia de citoquinas	Tipos
Interleuquinas, Citoquinas	IL-1 a IL-38
	Subfamilia CXC
	Subfamilia CC
	Subfamilia CX3C
	Subfamilia XC
Interferones (IFN)	Tipo I: IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\epsilon$ , IFN- $\kappa$ , IFN- $\omega$
	Tipo II: IFN- $\gamma$
Familia del factor de necrosis tumoral (TNF)	IL-1 a IL-5
	IFN- $\gamma$
	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF)
	Preproencefalina
Linfocinas	TNF- $\alpha$
	Linfotoxina- $\alpha$ (LT- $\alpha$ )
	CD70
	Ligando FAS (FasL)
	CD30L, CD40L, 4-1BBL

Tras la activación de los PRRs, las células liberan citoquinas proinflamatorias. La producción de citoquinas, promueve la entrada de células innatas efectoras como los neutrófilos y monocitos, así como la diferenciación de estos últimos a macrófagos (Sokol & Luster, 2015). Este mecanismo permite la rápida amplificación de la respuesta inflamatoria y a su vez, la modulación de la respuesta del sistema inmune (Sokol & Luster, 2015). El equilibrio entre la producción de una respuesta inmune efectiva y el daño a los tejidos depende de una cuidadosa regulación de estos intermediarios. De

hecho, las citoquinas tienen una vida media corta, lo que sugiere que en condiciones normales la mayor parte de estos mediadores son rápidamente eliminados. Sin embargo, en determinadas condiciones, las citoquinas se pueden liberar en tal cantidad que producen efectos sistémicos, produciendo lo que se conoce como “tormenta de citoquinas” (Goldberger et al., 2019; Varela et al., 2018).

Múltiples autores han incidido en el papel perjudicial que tiene la persistente presencia de estos mediadores químicos en el organismo, ya que favorece la ampliación y gravedad del daño en los tejidos (de Zoete et al., 2014; L. Li et al., 2019; Yu Wang et al., 2016b). Los mediadores más importantes de la inflamación aguda son las aminas vasoactivas, productos lipídicos (prostaglandinas y leucotrienos), citoquinas, y productos de la activación del complemento. Estos mediadores producen una potente respuesta inflamatoria a través de diversos mecanismos (Kumar et al., 2015). Así mismo, se ha asociado a estos mediadores con el desarrollo de diferentes enfermedades cardiovasculares como las enfermedades coronarias, el desarrollo de la placa aterosclerótica y cardiopatías, entre otras (Mann, 2015).

Las citoquinas proinflamatorias fueron las primeras moléculas relacionadas con el desarrollo una disfunción del ventrículo izquierdo, durante la inflamación sistémica que se produce durante la sepsis (Etchecopar-Chevreuril et al., 2008; Briasoulis et al., 2016). Este daño cardiovascular ha sido posteriormente confirmado con numerosos estudios, implicándose la existencia de niveles elevados de citoquinas proinflamatorias con la disfunción cardíaca en daños por isquemia reperusión, infarto de miocardio, miocarditis (Segiet et al., 2019), así como en la remodelación cardíaca (Hanna & Frangogiannis, 2020; Thomas & Grisanti, 2020). Más aun, también se ha descrito que las citoquinas proinflamatorias, promueven alteraciones estructurales y eléctricas en la zona del atrio cardíaco, a través de cambios en las diferentes conexinas y la activación de los fibroblastos, lo que finalmente produce alteraciones en la contracción cardíaca y degenera en una contracción y conducción deficiente de los impulsos eléctricos (Van Linthout & Tschöpe, 2017). De manera particular, las citoquinas IL-1 $\beta$  e IL-18 han sido involucradas en el daño miocárdico. En el caso de la IL-1 $\beta$ , esta citoquina produce un aumento de la expresión de la óxido nítrico sintasa, inicia la migración y maduración de los leucocitos al lugar donde se ha producido el daño, y estimula la síntesis de otras citoquinas proinflamatorias. Además, se le ha implicado en la remodelación cardíaca después de sufrir una isquemia, y cambios en la contractilidad y relajación del ventrículo izquierdo. También se ha observado que la inhibición de esta citoquina suprime la progresión del fallo cardíaco (Mann, 2015). El aumento en los niveles de IL-18 también se ha documentado en el plasma de pacientes que han sufrido un infarto agudo de miocardio, o tienen síndromes agudos coronarios (Gullestad et al., 2012) y en animales a los que se les ha inducido un daño en el miocardio (Bartekova et al., 2018). Hay autores que, además, han relacionado el aumento de la IL-18 con disfunción diastólica y taquicardia ventricular (A. Gupta et al., 2021). Otros estudios han observado que el aumento significativo de esta citoquina, tras el estímulo cardíaco de receptores adrenérgicos, se correlaciona con el inicio de la inflamación cardíaca, todo ello mediado por el inflamasoma del NLRP3 (H. Xiao et al., 2018; Xin et al., 2020). De la misma manera, se ha propuesto que la IL-1 $\alpha$ , producida por el inflamasoma NLRP3 en cardiomiocitos necróticos, puede estimular la síntesis de quimiocinas en macrófagos, células vasculares y fibroblastos a través de una vía de señalización dependiente del MyD88 (B. Chen & Frangogiannis, 2020; Hanna & Frangogiannis, 2020). La citoquina,

MCP-1 ha llamado la atención porque su expresión aumenta en modelos de fallo, remodelación y daño cardíaco y que su modulación atenúa el desarrollo de la disfunción diastólica y la fibrosis cardíaca (Haixia Zhang et al., 2022). Según la literatura existente, la IL-6 también está asociada a diversos tipos de enfermedades cardiovasculares, incluyendo el infarto agudo de miocardio y cardiomiopatías de diferentes orígenes (Gui & Rabkin, 2023; Liao et al., 2018). Sin embargo, también se ha sugerido que esta citoquina tiene un papel importante en la reparación de los tejidos después de un infarto de miocardio, así como un efecto cardioprotector en el preconditionamiento isquémico (Bartekova et al., 2018). Las citoquinas MIP-1 $\alpha$ , RANTES y MCP-1 también están aumentadas en lesiones ateroscleróticas, como respuesta a un estímulo inflamatorio (de Jager et al., 2012; Sokol & Luster, 2015).

Por último, las citoquinas también tienen la capacidad de estimular la disfunción microvascular, como en el caso de la disfunción del lecho coronario (Amin et al., 2020), ya que en las células endoteliales cardíacas las citoquinas proinflamatorias producen su activación, y posteriormente su apoptosis mediante el aumento de EROs (Van Linthout & Tschöpe, 2017).

Sin embargo, y a pesar de los múltiples estudios al respecto, hay que señalar que, actualmente, se desconocen los mecanismos exactos por los que las citoquinas proinflamatorias desarrollan los daños cardíacos y vasculares, ya que todos los tipos de células presentes en el corazón tienen la capacidad de producir un amplio rango de citoquinas y quimiocinas que modulan el fenotipo y función de todas las células miocárdicas. Esto, a su vez, dificulta la implementación de estrategias terapéuticas.

Si bien los mecanismos que inician la respuesta inflamatoria están bien caracterizados, la resolución de la inflamación no es un proceso bien caracterizado. Una vez que el daño inicial se ha eliminado, la fase inflamatoria aguda finaliza y se inicia la fase proliferativa. En la actualidad, se ha caracterizado que, tras la respuesta inicial, los neutrófilos reclutados son eliminados a través de la apoptosis o necrosis, lo que libera mediadores como las lipoxinas y resolvinas. La eliminación de este tipo de células produce la activación del fenotipo M2 en los macrófagos, estos macrófagos secretan mediadores como el "*Transforming growth factor-B*" (TGF- $\beta$ ), e IL-10. Estos mediadores favorecen la reparación del tejido dañado y la supresión de la respuesta inflamatoria.

Asimismo, durante la fase proliferativa hay una abundante infiltración de fibroblastos y células vasculares, debido a la supresión de la señalización de la IL-1 $\beta$ . Los fibroblastos son un tipo de células que deben migrar a los sitios donde se ha producido la muerte de los miocitos cardíacos, la proliferación de estas células es muy importante en esta etapa inflamatoria, dado que posteriormente se diferencian a miofibroblastos, que se caracterizan por la expresión de proteínas contráctiles y la habilidad para secretar grandes cantidades de proteínas de matriz, para la formación de la cicatriz fibrótica.

La respuesta inflamatoria, finaliza con la fase madurativa, en la que se produce una cicatriz fibrótica madura. Sin embargo, hoy en día los mecanismos detrás de este proceso no se conocen.

## 1.6. Inhibidores de los receptores TLR como nuevas estrategias terapéuticas en enfermedades de base inflamatoria.

Como se ha comentado en apartados anteriores de esta Introducción, la sobreactivación de las vías de los receptores TLR se ha vinculado a la patogénesis de muchas enfermedades crónicas de base inflamatoria que conllevan complicaciones cardiovasculares. Por tanto, la inhibición de las vías de señalización mediadas por TLR comienza a considerarse una estrategia terapéutica eficaz para suprimir esta respuesta inflamatoria y, por ello, ser útil para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares asociadas a las mismas.

En general, la inhibición de los receptores TLR puede lograrse mediante dos estrategias principales. La primera es bloquear la unión de los ligandos TLR al receptor, y la segunda consiste en interferir en las vías de señalización intracelular.

A continuación, se describen brevemente los principales grupos de antagonistas de los receptores TLR y sus posibles aplicaciones tanto a nivel experimental como clínico. Se hará hincapié en aquellos que bloquean el receptor TLR4, dado que son los más relacionados con esta Tesis Doctoral.

### 1.6.1. Inhibición mediante fármacos de pequeño peso molecular

Los inhibidores de pequeño peso molecular (*small molecules*, según su denominación en inglés) son fármacos, sintéticos o de origen natural, caracterizados por su pequeño tamaño comparado con las macromoléculas (anticuerpos, proteínas), que tienen actividad inhibitoria de la señal de traducción de receptores TLR. Sus propiedades farmacocinéticas y sus limitadas dimensiones les permiten atravesar las membranas celulares y actuar sobre proteínas adaptadoras intracelulares u otros mediadores de las vías de señalización de la activación de los receptores TLR. Suelen tener una buena biodisponibilidad, pero poca especificidad.

Estas moléculas son bases débiles y tienden a acumularse en los compartimentos intracelulares ácidos como endosomas y lisosomas, siendo capaces de modular el pH en estas vesículas. La modulación del pH puede conducir a la supresión en la presentación de autoantígenos, el bloqueo de la señalización por la activación de receptores TLR endosómicos (TLR7, TLR8 y TLR9) y a la disminución de la producción de citoquinas (Fox, 1996; Kuznik et al., 2011; Wozniacka et al., 2008). Otros mecanismos propuestos en la acción de estas moléculas incluyen la inhibición de la señalización MAPK y de la fosfolipasa A2, así como la reducción de la matriz metaloproteínasa-9 (MMP-9) (Kim et al., 2006; Lesiak et al., 2010; Löffler et al., 1985; Weber et al., 2002; Wozniacka et al., 2008). Todos estos mecanismos de acción les confieren su actividad antiinflamatoria e inmunosupresora.

Dentro de este grupo de antagonistas de receptores TLR tenemos las siguientes moléculas: Cloroquina, hidroxiclороquina, quinacrina, CpG-52364, SM934, ST2825, TAK-242, valsartán, candesartán, fluvastatina, simvastatina y atorvastatina.

Los inhibidores de pequeño peso molecular han demostrado utilidad en distintas enfermedades autoinmunes e inflamatorias. En cuanto a enfermedades cardiovasculares, la cloroquina ha sido útil para reducir el riesgo de insuficiencia renal inducida por sepsis (Yasuda et al., 2008), y, en estudios preclínicos, el pretratamiento con este inhibidor ha demostrado mejorar los síntomas de la isquemia cerebral global transitoria (Cui et al., 2013). Por otra parte, se ha observado que, a largo plazo, la hidroxicloroquina mejora la hipertensión y los síntomas de la disfunción endotelial aórtica en un modelo animal de lupus (Gómez-Guzmán et al., 2014).

En los últimos años, se han desarrollado nuevos fármacos inhibidores dirigidos a la señalización endosomal de la activación de los receptores TLR7, TLR8 y TLR9. Entre las nuevas moléculas desarrolladas se encuentra CpG-52364 que es un derivado de la quinacrina (W. Gao et al., 2017). Esta molécula presenta una mayor eficacia que las anteriores y ha mostrado menos efectos secundarios, e incluso llegó a evaluarse en un ensayo clínico de fase I (Hou et al., 2011; D. Hu et al., 2015).

Otra molécula interesante desarrollada dentro de este grupo de fármacos es SM934, un nuevo análogo de la artemisinina, dirigido contra TLR7 y TLR9. Los estudios han demostrado los efectos antiinflamatorios e inmunosupresores de SM934 administrado por vía oral en modelos experimentales de lupus (Hou et al., 2011; Wu et al., 2016).

El agente ST2825 es un compuesto peptidomimético con una actividad inhibidora sobre la dimerización de MyD88 y el reclutamiento de la quinasa asociada al receptor de interleuquina-1 (IRAK1) e IRAK4 (Loiarro et al., 2007). Esta nueva molécula suprime la proliferación y diferenciación de células B inducida por TLR9 y su diferenciación en células plasmáticas, así como, así como la producción de autoanticuerpos (Capolunghi et al., 2010). Aunque ST2825 se utiliza principalmente como agente experimental, proporciona evidencia de que inhibe MyD88 (el adaptador universal utilizado por TLR (excepto TLR3) como posible diana terapéutica para tratar a pacientes con lupus eritematoso y otras posibles enfermedades autoinmunes.

Por otra parte, además de la modulación de la señalización intracelular, los receptores TLR2 y TLR4 son otras dos dianas importantes para el posible efecto terapéutico de los inhibidores de pequeñas moléculas.

TAK-242, también conocido como Resatorvid es un inhibidor dirigido a las vías de señalización del receptor TLR4 (Matsunaga et al., 2011). Este compuesto se une a la cisteína 747 en el dominio TIR intracelular del receptor TLR4, bloqueando su interacción con las proteínas adaptadoras TIR y TRIF. El TAK-242 llegó a evaluarse en clínica, desarrollándose dos ensayos clínicos de fase III NCT00143611 para la sepsis grave y NCT00633477 para la insuficiencia cardiovascular y respiratoria inducida por sepsis. En el primer ensayo, aunque el fármaco fue bien tolerado, no se logró con su administración suprimirlos niveles séricos de citocinas (IL-6, IL-8 y TNF $\alpha$ ) en los pacientes con sepsis (Rice et al., 2010). El segundo ensayo se interrumpió por motivos comerciales. No se han llevado a cabo más estudios clínicos con este inhibidor desde entonces.

En los últimos años, los antagonistas de los receptores de la angiotensina II (ARA-II) y las estatinas han mostrado su actividad inhibidora sobre la señalización de

las vías de los receptores TLR2 y TLR4. Así, valsartán puede disminuir la liberación de citocinas proinflamatorias y el tamaño del infarto al inhibir la señalización de TLR4 (J. Yang et al., 2009), mientras que candesartán puede suprimir la señalización de la activación de las vías de los receptores TLR2 y TLR4 inducidas por sepsis (Dasu et al., 2009).

Las estatinas, son una clase de fármacos hipolipemiantes de amplia utilidad desde hace años. Entre ellas, fluvastatina, simvastatina y atorvastatina han demostrado potente actividad inhibitoria sobre la vía del receptor TLR4 siendo estos fármacos de utilidad para reducir la inflamación a nivel vascular (Fang et al., 2014; Földes et al., 2008; Methe et al., 2005).

### 1.6.2. Anticuerpos anti-TLR

Debido a su alta especificidad, los anticuerpos se han utilizado ampliamente como herramientas biológicas para sondear con precisión determinadas moléculas. En aplicaciones terapéuticas, pueden diseñarse para neutralizar efectores solubles, bloquear la unión de receptores para detener la transducción de señales o inducir citotoxicidad selectiva (Suzuki et al., 2015). La característica más atractiva de los anticuerpos terapéuticos es su mayor especificidad frente a las dianas farmacológicas en comparación con otro tipo de fármacos, por lo que hoy en día están recibiendo una gran atención, especialmente para la inmunoterapia. Sin embargo, el principal problema de estas moléculas sigue siendo su dificultad de fabricación y vehiculización, su escasa penetración celular y tisular, y los riesgos de inmunogenicidad (Chames et al., 2009).

En cuanto a la inhibición de la señalización de las vías TLR, los anticuerpos están diseñados como antagonistas, con el objeto de bloquear la unión de los ligandos a sus receptores TLR específicos.

Dentro de este grupo de antagonistas de receptores TLR tenemos las siguientes moléculas: OPN-305, T2.5, NI-0101 Y 1A6.

Un avance prometedor es OPN-305, es el primer anticuerpo monoclonal IgG4 totalmente humanizado específico para el receptor TLR2. Los estudios preclínicos han demostrado la potencia de este compuesto para bloquear la producción de citocinas proinflamatorias mediadas por la activación del receptor TLR2 in vitro y en modelos de isquemia-reperfusión renal y cardíaca (Arslan et al., 2012; Farrar et al., 2012).. Además, los datos de un estudio de fase I con OPN-305 sugieren que esta molécula es un tratamiento eficaz y bien tolerado para la prevención de lesiones por isquemia-reperfusión en trasplantes de órganos sólidos (Reilly et al., 2013).

T2.5 es otro anticuerpo anti-TLR2 con potencial terapéutico, capaz de aumentar la supervivencia de los animales en un modelo de síndrome de shock severo por endotoxemia (G. Meng et al., 2004). Una terapia combinada de T2.5 con 1A6 (un

anticuerpo anti-TLR4) ha demostrado también efectos beneficiosos en un modelo de ratón con sepsis (Spiller et al., 2008). Además de los modelos de sepsis, el tratamiento con T2.5 disminuye la muerte neuronal y las respuestas inflamatorias en un modelo de isquemia cerebral transitoria (Ziegler et al., 2011), y es capaz también de prevenir la fibrosis cardiaca inducida por angiotensina II mediante la supresión del reclutamiento de macrófagos y la inflamación a ese nivel (Wang et al., 2014). De momento, T2.5 no ha tenido desarrollo clínico, pero sigue siendo una buena herramienta experimental.

NI-0101 es el primer anticuerpo monoclonal para el receptor TLR4 que ha entrado en desarrollo clínico. Puede inhibir potentemente la señalización de la vía del receptor TLR4, independientemente del ligando que la estimule (Monnet et al., 2015). NI-0101 ha tenido resultados prometedores en un ensayo clínico de fase I (NCT01808469) en prevenir los síntomas gripales tras la administración de LPS, siendo bien tolerado a varias dosis ensayadas, y bloqueando con eficacia la liberación de citoquinas tanto in vivo como in vitro (Monnet et al., 2015). Datos recientes también han demostrado que este anticuerpo anti-TLR4 mejora la sintomatología en artritis reumatoide (Hatterer et al., 2016), estando en este momento en marcha un ensayo clínico de fase II en pacientes con esta patología.

Otro anticuerpo monoclonal anti-TLR4 es 1A6, que se dirige a la porción del factor 2 extracelular de diferenciación mielóide TLR4 (MD2) (Spiller et al., 2008). En un estudio preclínico, 1A6 mostró un efecto protector en el shock séptico (Lima et al., 2015; Spiller et al., 2008). Además, en un modelo experimental de colitis ulcerosa 1A6 mejoró la inflamación y previno la progresión de la inflamación intestinal (Ungaro et al., 2009).

### 1.6.3. Oligonucleótidos

Dado que los receptores TLR endosomales reconocen principalmente estructuras de ácidos nucleicos, los oligonucleótidos frente a determinadas secuencias podrían bloquear estos receptores TLR endosomales. Estos oligonucleótidos podrían interferir en la unión de los ligandos con el receptor TLR endosomal y, por lo tanto, bloquear la transducción de la señal.

Se han desarrollado varios antagonistas de los TLR basados en oligonucleótidos: IRS-954, DV-1179, IMO-3100, IMO-8400, IMO-9200, IHN-ODN 2088 Y IHN-ODN-24888.

IRS-954 se desarrolló a partir de dos moléculas diseñadas previamente, IRS-661 (específico de receptor TLR7) e IRS-869 (específico de receptor TLR9), con el fin de diseñar una molécula antagonista doble para el tratamiento del Lupus eritematoso (Barrat et al., 2005). Este oligonucleótido, IRS-954 ha resultado eficaz en estudios preclínicos para mejorar la producción de IFN- $\alpha$ , de autoanticuerpos y de mejora de la

sintomatología en modelos de lupus eritematoso (Barrat et al., 2007), siendo también capaz de reducir la resistencia a los glucocorticoides mediada por la activación de las vías de los receptores TLR7 y TLR9 en esta enfermedad (Guiducci et al., 2010). Aunque el IRS-954 ha mostrado una prometedora eficacia terapéutica preclínica, hasta la fecha no se han documentado avances en su desarrollo clínico. Otro antagonista dual de receptores TLR7 y TLR9 desarrollado, el DV-1179, ha sido ensayado en un estudio de fase Ib/IIa para comprobar su seguridad tanto en voluntarios sanos como en pacientes con lupus eritematoso activo (W. Gao et al., 2017b) pero, aunque fue bien tolerado por los pacientes, no logró reducir los niveles de IFN- $\alpha$  de la manera esperada.

El compuesto IMO-3100 es también un antagonista dual de receptores TLR7 y TLR9. En estudios preclínicos en un modelo de ratón de psoriasis inducida por IL-23, IMO-3100 fue capaz de reducir la expresión de genes inflamatorios (Suárez-Farinas et al., 2013). En este momento este compuesto está en fase de ensayos clínicos (NCT01622348).

IMO-8400 e IMO-9200 son capaces de inhibir los receptores TLR7, TLR8 y TLR9 y son compuestos actualmente en fases de desarrollo. Además, IMO-8400 ha sido eficaz en la prevención de la inflamación y el desarrollo de la enfermedad en modelos de ratón de lupus y psoriasis (Jiang et al., 2012; Zhu et al., 2012; Suárez-Farinas et al. et al., 2013). En la actualidad se están llevando a cabo con él dos ensayos clínicos de fase II para el tratamiento de la psoriasis en placas (NCT01899729) y la dermatomiositis (NCT02612857).

Hay otros oligonucleótidos inmunorreguladores en fase de desarrollo preclínico. Así, el oligonucleótido inhibidor IHNODN 2088 es un potente antagonista de TLR9, y en ratas SHR ha sido capaz de reducir la presión arterial sistólica (McCarthy et al., 2015). El INH-ODN-24888, antagonista de receptores TLR7 y TLR9 ha mostrado un efecto beneficioso en el lupus eritematoso (Römmeler et al., 2015).

#### 1.6.4. Análogos del Lípido A

Un grupo especial de antagonistas de TLR son los análogos del lípido A, dirigidos específicamente contra el receptor TLR4. El lípido A es un componente lipídico del LPS que contribuye a su toxicidad. Dado que la estructura del lípido A está muy conservada en endotoxinas, es un motivo estructural reconocido específicamente por TLR4 y se ha convertido en una atractiva diana terapéutica para regular la activación de este receptor (Rietschel et al., 1994).

Dentro de este grupo de antagonistas, se han desarrollado diferentes fármacos, entre los que destaca eritoran, un análogo sintético del lípido A. Es probablemente el desarrollo clínico más prometedor, aunque a la vez también decepcionante, de un antagonista de receptores TLR4 (Rietschel et al., 1994).

La base de la actividad de este tipo de derivados se sustenta en su capacidad de unión competitiva al correceptor MD2 debido a su similitud estructural con el ligando natural, lípido A, lo que a su vez impide la unión del LPS y bloquea la inducción de la señalización del receptor TLR4 (Park et al., 2009). Eritoran es la segunda generación de su clase, un compuesto de mayor potencia debido a una mayor duración de acción, mayor solubilidad en agua y mejor estabilidad química, unido a una síntesis química más sencilla. Estudios preclínicos indicaron que eritorán reducía la activación del NF- $\kappa$ B inducida por el LPS, inhibiendo así la producción de citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8) in vitro y en modelos animales (Mullarkey et al., 2003). En un estudio clínico de fase I en voluntarios sanos, el tratamiento con eritorán disminuyó eficazmente los niveles de TNF- $\alpha$  e IL-6 en sangre, redujo los recuentos de glóbulos blancos, los niveles de proteína C reactiva, y disminuyó los síntomas clínicos asociados a la sepsis. (Rossignol et al., 2004, 2008). Posteriormente, se sometió a un estudio aleatorizado doble ciego, multicéntrico de fase II (NCT00046072) para tratar a pacientes sépticos en estado crítico con alto riesgo previsto de mortalidad; los resultados fueron positivos, ya que el tratamiento intravenoso de eritorán a la dosis de 105 mg condujo a una tendencia hacia una menor mortalidad (Tidswell et al., 2010). Lamentablemente, el ensayo de fase III (ACCESS, NCT00334828) de eritorán en pacientes con sepsis grave fracasó ya que este fármaco no redujo la mortalidad de los pacientes (Opal et al., 2013). En consecuencia, la compañía decidió renunciar a lanzar el fármaco al mercado.

Aparte del tratamiento de la sepsis, otros estudios han indicado que el eritorán podría ser terapéuticamente beneficioso para otras enfermedades inflamatorias. De hecho, un estudio ha demostrado que el eritorán podría prevenir la muerte inducida por la gripe en un modelo de ratón, en el que mejoró los síntomas clínicos e inhibía la producción de citoquinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CXCL1 e IL-6) y redujo la carga viral (Shirey et al., 2013). Otros estudios han demostrado la eficacia terapéutica del eritorán en varios modelos de enfermedades cardiovasculares. Por ejemplo, el eritorán pudo reducir la hipertrofia cardíaca en un modelo de ratón de constricción aortica (Ehrentraut et al., 2011), y atenuar la producción de citoquinas la producción de citoquinas inflamatorias y la lesión miocárdica por isquemia-reperfusión en un modelo de rata (Shimamoto et al., 2006). Además, el eritorán también podría efectos protectores sobre la lesión renal por isquemia-reperfusión (Liu et al., 2010).

### 1.6.5. Inhibidores miRNA

Los microARNs (miARNs) son pequeños fragmentos de ARN endógeno (~22 nucleótidos), no codificantes, con funciones reguladoras postranscripcionales para ajustar con precisión la expresión génica (Bartel, 2009). Dado que los miARN intervienen en la regulación de diversos procesos biológicos y se asocian a la patogénesis de muchas enfermedades, han surgido como nuevas herramientas terapéuticas.

Hasta la fecha, se han identificado unos 20 miRNAs implicados en la regulación de las vías de señalización de receptores TLR (He et al., 2014). Entre ellos, miR-146a, miR-155, y miR-21 son los tres miRNAs que han recibido gran atención por sus funciones reguladoras en la señalización de las vías de los receptores TLR (Quinn & O'Neill, 2011; N. Shen et al., 2012).

MiR-146a inhibía la traducción de los genes TRAF6 y de IRAK1, ambos en la vía de señalización intracelular del TLR4 (Taganov et al., 2006). Otros estudios han demostrado que miR-146a podría desempeñar un papel beneficioso en el lupus eritematoso, e incluso en la artritis reumatoide debido a su efecto inmunosupresor (Boldin et al., 2011; Pan et al., 2012).

Tanto miR-21 como miR-155 se identificaron originalmente como "onco-miR", pero más tarde se descubrió que tenían una nueva función en la regulación de la señalización TLR y la inflamación (O'Connell et al., 2007; Sheedy et al., 2010). En concreto miR-21 podría aumentar la producción de la citoquina antiinflamatoria IL-10 mediante la reducción de la expresión del gen de la muerte celular programada 4 (PDCD4), actuando como regulador negativo de la respuesta inflamatoria (Sheedy et al., 2010).

Por último, miR-155 parece tener funciones controvertidas en el control de la inflamación, ya que estudios preclínicos han mostrado tanto su efecto antiinflamatorio (Tili et al., 2007), como riesgo de inmunogenicidad con su administración (O'Connell et al., 2010).

### 1.6.6. Nano-antagonistas TLR

En la actualidad los nano-moléculas están emergiendo como una nueva clase de potentes inhibidores de receptores TLR que pueden dirigirse a una o varias vías de señalización de estos receptores. Una característica distintiva de estas moléculas es que la bioactividad procede de sus propiedades intrínsecas, y no de transportar un agente terapéutico, por lo que pueden adaptarse a las diferentes necesidades clínicas. Esta característica, convierte a los nano antagonistas de receptores TLR en una clase especial de fármacos (o "nanofármacos") como nanoterapéuticos de nueva generación. Debido a esto, en la actualidad se encuentran en fase de investigación preclínica muchos de estos prototipos, donde se está evaluando su farmacocinética y farmacodinamia. Se espera que estos nuevos inhibidores tengan una mejor biodistribución, para conseguir el perfil farmacocinético y farmacodinámico deseado.

Dentro de este grupo de nano-antagonistas, se han desarrollado varias moléculas: NAHNP (nanopartícula de heparina no anticoagulante conjugada con lípidos), HDL-Like NP (nanopartícula similar a la lipoproteína de alta densidad, HDL), Bare GNP (nanopartícula de oro no recubierta), 11-NP (nanopartícula de oro recubierta de glicolípidos), P12 (nanopartícula de oro recubierta de péptidos).

NAHNP es la nanopartícula de heparina no anticoagulante conjugada con lípidos (Babazada et al., 2014). Además de su conocida función anticoagulante, la heparina tiene una actividad antiinflamatoria reconocida por su capacidad para unirse e inhibir diversas citoquinas, factores de crecimiento y enzimas que intervienen en la inflamación. Estas nanopartículas suprimen la activación de NF- $\kappa$ B dependiente de MyD88 e inhiben la producción de citoquinas en macrófagos de ratón (Babazada et al., 2014).

HDL-Like NP ha sido desarrollado como un antagonista de receptores TLR4 y ha sido capaz de reducir la inflamación en modelos de sepsis (L. Guo et al., 2013; Pajkr et al., 1996).

Las nanopartículas de oro (GNP) han llamado mucho la atención en nanomedicina, debido a su facilidad de fabricación y funcionalización, estabilidad química, excelentes propiedades físicas fototérmicas y buena biocompatibilidad (Pedrosa et al., 2015). Un avance interesante en este campo ha sido el desarrollo de "nanoinhibidores" para la señalización de receptores TLR basados en GNP. Estas nuevas moléculas han sido capaces de mejorar la respuesta inflamatoria ocular inducida por LPS y reducir el daño oxidativo en el iris (D. V. Pereira et al., 2012). En otro estudio, se desarrolló un sistema GNP catiónico recubierto de glicolípidos como nuevo antagonista de receptores TLR4 (Rodríguez Lavado et al., 2014) capaz de mejorar la respuesta inflamatoria en modelos preclínicos de sepsis.

Por último, se ha desarrollado un nuevo sistema híbrido de nanopartículas de oro recubiertas con una capa de hexapéptido para mejorar la estabilidad fisiológica, cambiar las características fisicoquímicas de la superficie y permitir la actividad biológica (H. Yang et al., 2011, 2013). Así, se ha desarrollado un potente inhibidor multi-TLRs, que no solo inhibe las dos vías de señalización de la activación del receptor TLR4, sino que también inhibe las vías de activación de los receptores TLR2, TLR3 y TLR5 (Yang et al., 2015). Esta nanopartícula ejerce su acción antiinflamatoria, reduciendo la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-12p40, MCP-1, e IFN- $\gamma$ ), y aumentando la citoquina antiinflamatoria IL-1RA, tras una sepsis. La eficacia in vivo de P12 también se ha investigado con un modelo murino de inflamación intestinal; donde se descubrió que el tratamiento con P12 podía reducir la pérdida de peso de los animales, mejorar el índice de actividad de la enfermedad y mejorar la inflamación del colon (H. Yang et al., 2016).

Para finalizar, hay que señalar que, aunque estas nanopartículas de oro son prometedoras como nuevos fármacos, no son biodegradables, con lo que todavía su empleo es una preocupación por la seguridad de su uso a largo plazo.

Como se deduce de lo expuesto en este apartado, en los últimos años se están realizando múltiples esfuerzos para desarrollar antagonistas de los receptores TLR, y concretamente de los receptores TLR4 y sus cadenas de señalización (S. Sharma et al., 2016b). Sin embargo, solo unos pocos de estos antagonistas están disponibles para su posible uso en clínica, ya que la mayoría de los antagonistas o inhibidores no se han evaluado en estudios clínicos o bien no han superado estas fases (W. Gao et al., 2017b; Miguel M Garcia et al., 2020). Por ello, es de interés continuar con la búsqueda de posibles fármacos que modulen esta diana farmacología y constituyan la base para el desarrollo de nuevos tratamientos prometedores, reduciendo la polifarmacia y repercutiendo probablemente en el uso de medicamentos en numerosas patologías.

Para la inhibición de receptores TLR4 se ha utilizado el agente denominado TLR4-PA1 (yoduro de N-(3,4-bis-tetradeciloxi-bencil)-N-ciclopentil-N,N-dimetil amonio (CAS 1202208-36-3). Se trata de un compuesto sintético descrito originalmente por

Francesco Peri (Piazza et al., 2009), siendo una sal de becilamonio de naturaleza anfífila que mimetiza fragmentos moleculares claves del PAMP natural, lípido-A, siendo reconocido en el proceso de activación de TLR4 por la proteína correceptora CD14 asociada a dicho receptor (Arroyo-Espliguero et al., 2004), ejerciendo un efecto antagonista (Peri & Piazza, 2012). Para el desarrollo de los experimentos el compuesto fue proporcionado por el Dr. Ernesto Quesada (IQM-CSIC). La identidad estructural y la pureza del compuesto fueron determinadas mediante resonancia magnética nuclear (RMN) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El compuesto TLR4-A1 ya ha sido probado con anterioridad en diversos estudios realizados por nuestro grupo en modelos animales donde esta pauta de administración ha sido eficaz en reducir diversos signos nociceptivos (Ferreira-Gomes et al., 2021; M M Garcia et al., 2017).

## **2. Hipótesis y Objetivos**

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de defunción en el mundo y se cobran 17,9 millones de vidas cada año. En la actualidad, la prevalencia de estas enfermedades aumenta tanto en los países desarrollados, como en los países en vías de desarrollo, por lo que su control y tratamiento siguen suponiendo un desafío tanto para la ciencia como para las instituciones sanitarias.

Las mejoras en el tratamiento del cáncer han mejorado la tasa de supervivencia de los pacientes que reciben estos tratamientos, sin embargo, se están descubriendo nuevos efectos secundarios a medio y largo plazo del tratamiento con estos fármacos desconocidos hasta ahora. En la actualidad, el conocimiento, tratamiento y prevención de las complicaciones cardiovasculares causadas por fármacos antitumorales suponen un nuevo reto, ya que en la actualidad la mayoría los grupos de antitumorales producen efectos adversos sobre el sistema cardiovascular, lo que ha obliga a buscar terapias que puedan ayudar a limitar estos efectos secundarios en los pacientes que tienen que reciben un tratamiento quimioterapéutico.

En España, la prevalencia del SM oscila entre el 22,7% y el 31%). Esto significa que entre un cuarto y un tercio de la población española padece esta patología, siendo las complicaciones cardiovasculares asociadas a este síndrome una de las mayores causas de morbimortalidad en estos pacientes, que conlleva un empeoramiento definitivo de la calidad de vida, y supone un importante consumo de recursos sanitarios.

La respuesta inflamatoria causada por el receptor TLR4 a través de la cadena de señalización MyD88 se ha asociado con la aparición y desarrollo de muchas enfermedades en las que la inflamación tiene un papel central, entre ellas las complicaciones cardiovasculares que aparecen con la terapéutica antitumoral y con enfermedades endocrinometabólicas, como el SM. Por ello, en los últimos años se están realizando múltiples esfuerzos en la búsqueda de posibles fármacos que modulen esta diana farmacología y constituyan la base para el desarrollo de nuevos tratamientos prometedores, reduciendo la polifarmacia y repercutiendo probablemente en el uso de medicamentos en estas patologías.

Por lo tanto, los objetivos generales (OG) y específicos (OE) de esta Tesis Doctoral son:

- **OG 1:** Evaluar la existencia complicaciones cardiovasculares y renales en dos modelos experimentales: administración crónica de Cisplatino y SM por dieta.

**OE 1.1:** Analizar si la administración crónica de Cisplatino en ciclos a dos dosis diferentes, 2 mg/Kg y 3 mg/Kg, altera la presión arterial y la frecuencia cardiaca, la función cardiaca basal, la reactividad en vasos de conductancia y de resistencia, así como la función renal.

**OE 1.2:** Analizar si la administración crónica de Cisplatino en ciclos a dos dosis diferentes, 2 mg/Kg y 3 mg/Kg, produce un estado de estrés oxidativo e inflamación generalizados.

**OE 1.3:** Analizar si el desarrollo de SM, con una dieta hipercalórica a hipergrasa, produce obesidad abdominal, un estado de estrés oxidativo e inflamación generalizados, y altera la homeostasis glucídica y lipídica.

**OE 1.4:** Analizar si el desarrollo de SM, con una dieta hipercalórica a hipergrasa, altera la presión arterial y la frecuencia cardíaca, la función cardíaca basal, la reactividad en vasos de conductancia y de resistencia, así como la función renal.

- **OG 2:** Evaluar si la modificación de la expresión de los receptores TLR4 y/o su proteína de señalización MyD88, así como la expresión de NLRP3 puede estar involucrada en las alteraciones cardiovasculares y renales inducidas en los dos modelos experimentales señalados: administración crónica de Cisplatino y SM por dieta.

**OE 2.1:** Analizar si la administración crónica de Cisplatino en ciclos a dos dosis diferentes, 2 mg/kg y 3 mg/kg, modifica la expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3 en el ventrículo izquierdo, aorta, arteria mesentérica y riñón.

**OE 2.2:** Analizar si el desarrollo de SM, con una dieta hipercalórica a hipergrasa, modifica la expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3 en el ventrículo izquierdo, aorta, arteria mesentérica y riñón.

- **OG 3:** Evaluar si la modulación de los receptores TLR4, con un fármaco antagonista TLR4 de nueva síntesis, TLR4-PA1, puede mejorar las alteraciones cardiovasculares y renales inducidas en los dos modelos experimentales señalados: administración crónica de Cisplatino y SM por dieta.

**OE 3.1:** Analizar si la administración del antagonista de TLR4, TLR4-PA1, modifica las alteraciones en la presión arterial y la frecuencia cardíaca, en la función cardíaca basal, en la reactividad en vasos de conductancia y de resistencia, y en la función renal tras la administración crónica de Cisplatino.

**OE 3.2:** Analizar si la administración del antagonista de TLR4, TLR4-PA1, modifica el estado de estrés oxidativo e inflamatorio, tras la administración crónica de Cisplatino.

**OE 3.3:** Analizar si la administración del antagonista de TLR4, TLR4-PA1 modifica las alteraciones en la expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3 en el ventrículo izquierdo, aorta, mesentérica y riñón, tras la administración crónica de Cisplatino.

**OE 3.4:** Analizar si la administración del antagonista de TLR4, TLR4-PA1, modifica las alteraciones antropométricas, en el estado de estrés

oxidativo e inflamatorio, y en la homeostasis glucídica y lipídica, producidas por el desarrollo de SM por dieta.

**OE 3.5:** Analizar si la administración del antagonista de TLR4, TLR4-PA1, modifica las alteraciones en la presión arterial y la frecuencia cardiaca, la función cardiaca basal, la reactividad en vasos de conductancia y de resistencia, y en la función renal producidas por el desarrollo de SM por dieta.

**OE 3.6** Analizar si la administración del antagonista de TLR4, TLR4-PA1 modifica las alteraciones en la expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3 en el ventrículo izquierdo, aorta, mesentérica y riñón, producidas por el desarrollo de SM por dieta.

# **3. Material y Métodos**

Este apartado detalla la metodología seguida en esta Tesis Doctoral. En primer lugar, se expondrá el desarrollo de los modelos animales, así como los protocolos experimentales correspondientes y tratamientos utilizados; en segundo lugar, se especificarán los parámetros evaluados y las técnicas y preparaciones empleadas; y, por último, se explicará el análisis estadístico seguido.

Todos los procedimientos experimentales con animales fueron aprobados por el Comité de Ética de la Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid y la Dirección General de Medio Ambiente de la Comunidad de Madrid, España (ref 270920143613 PROEX 146/19). El cuidado y uso de los animales se ajustó a la Política Española de Protección Animal RD 53/2013, que cumple con la Directiva de la Unión Europea 2010/63/UE relativa a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Todos animales fueron obtenidos y mantenidos en el Animalario de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Rey Juan Carlos (URJC) (número de registro ES280920000023).

### **3.1. Modelos experimentales: desarrollo, protocolo experimental y tratamientos**

#### 3.1.1. Modelo experimental de desarrollo de complicaciones cardiovasculares por administración crónica de Cisplatino

##### 3.1.1.1. Desarrollo del modelo experimental

Se utilizaron ratas Wistar macho adultas con una edad de 8 semanas de vida y un peso comprendido entre 270 y 300 g procedentes del animalario de la Universidad Rey Juan Carlos/ Harlan-Ibérica (Barcelona, España).

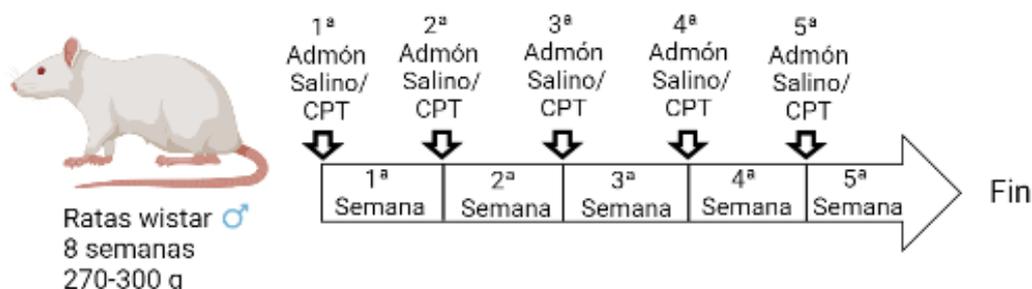
Los animales se distribuyeron en jaulas transparentes, en grupos de 4-6 animales por jaula, con un lecho de serrín que fue reemplazado cada semana. Las condiciones ambientales fueron: temperatura de 20°C, humedad ambiental del 60% ciclos de luz/oscuridad de 12 horas de duración respectivamente. Estas fueron controladas a lo largo de todo el periodo experimental. Los animales se alimentaron *ad libitum* con una dieta estándar de laboratorio SAFE D40 (Safe, Francia) y agua corriente filtrada.

Para llevar a cabo el desarrollo de alteraciones cardiovasculares por administración de Cisplatino se empleó una pauta de administración de Cisplatino ya utilizada por otros investigadores de nuestro laboratorio con la que habían observado la presencia de neuropatía periférica sensorial y alteraciones autonómicas gastrointestinales (López-Tofiño et al., 2021; Paniagua et al., 2019; Vera et al., 2006a). Este modelo consiste en la administración semanal del antitumoral durante 5 semanas, simulando ciclos de tratamiento.

Para el desarrollo de este modelo experimental, los animales se dividieron aleatoriamente en los siguientes grupos experimentales de 8-10 animales/grupo: **1) Control (Salino):** animales que recibieron una inyección intraperitoneal de solución salina (NaCl 0.9%), una vez a la semana durante 5 semanas; **2) Cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg):** animales que recibieron una inyección intraperitoneal de Cisplatino a la dosis de 2 mg/Kg una vez a la semana durante 5 semanas. Este tratamiento supone una dosis acumulada de antitumoral de 10 mg; **3) Cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg):** animales que recibieron una inyección intraperitoneal de Cisplatino a la dosis de 3 mg/Kg una vez a la semana durante 5 semanas. Este tratamiento supone una dosis acumulada de antitumoral de 15 mg.

En todos los grupos experimentales anteriores, se administraron 2 mL de solución de suero salino (NaCl 0,9%), vía subcutánea, antes de la administración del Cisplatino/salino, para disminuir la nefrotoxicidad derivada de la administración de ciclos de Cisplatino.

En la Ilustración 6 se muestra el esquema del modelo experimental del desarrollo de complicaciones cardiovasculares por administración crónica de Cisplatino.



**Ilustración 6: Esquema del desarrollo del modelo experimental de complicaciones cardiovasculares ocasionadas por la administración crónica de Cisplatino (CPT). Admón: administración. Imagen elaborada con BioRender.com.**

### 3.1.1.2. Protocolo experimental

En los animales de los diferentes grupos experimentales se lleva a cabo un seguimiento semanal del peso y la ingesta sólida durante todo el periodo de experimentación.

Tras este periodo experimental de 5 semanas, los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (50 mg/Kg i.p.). Una vez que los animales estuvieron anestesiados, se procedió a la evaluación de la presión arterial y la frecuencia cardiaca, a través de la cateterización de la arteria carótida derecha. Estos parámetros se monitorizaron durante 10 minutos.

Tras esta monitorización, se procedió al sacrificio del animal, mediante exanguinación. En este momento se recogió la sangre, en un tubo con heparina de litio.

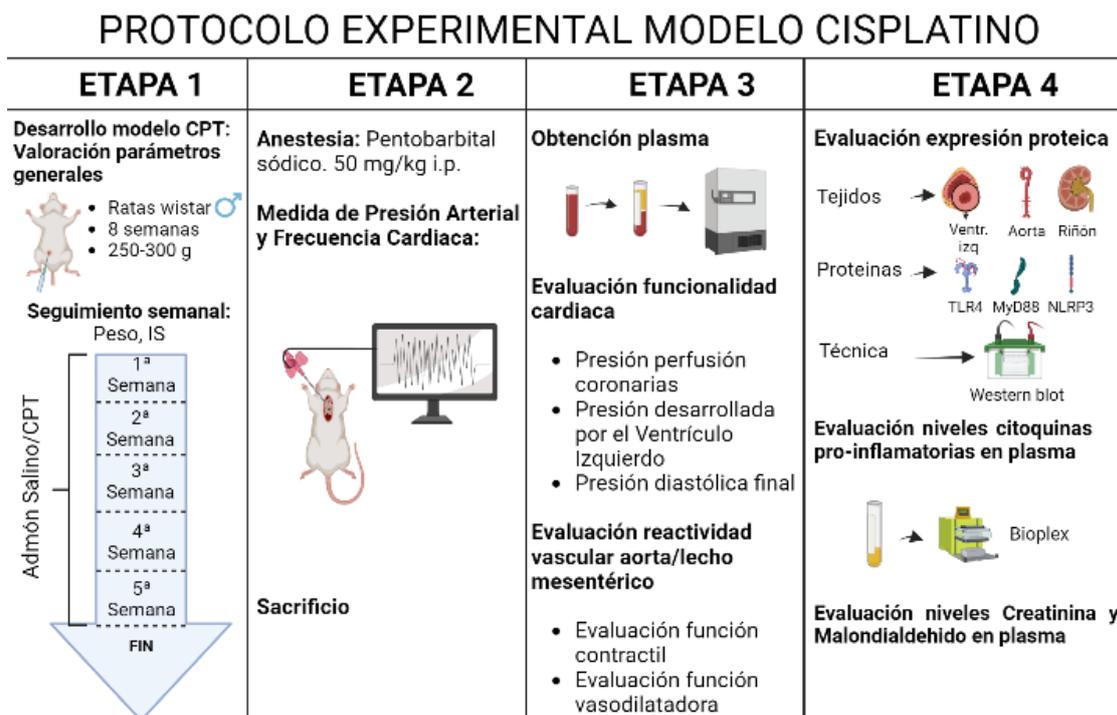
Esta sangre se centrifugó inmediatamente para obtener el plasma sanguíneo, el cual se congeló a -80°C para realizar los posteriores análisis bioquímicos (ver apartado 3.3).

Posteriormente, se procedió a la extracción del corazón, la aorta y el lecho mesentérico, para llevar a cabo los estudios de funcionalidad cardiaca y reactividad vascular. Además, también se obtuvieron muestras de tejidos cardíaco, vascular y renal que se conservaron a -80°C y en formaldehído para los posteriores análisis de expresión de proteínas e inmunohistológicos (ver apartado 3.7).

En este modelo se estudió, si el receptor extracelular TLR4 y su cadena de señalización, MyD88, así como el receptor intracelular NLRP3, están implicados en las alteraciones cardiovasculares causadas por la administración crónica de Cisplatino.

La metodología experimental seguida para la evaluación de los diferentes parámetros se detalla en los apartados siguientes de esta Tesis Doctoral (ver apartados 3.1.1.1, 3.1.1.2, 3.1.1.3).

En la Ilustración 7 se muestra el protocolo experimental seguido en el modelo de desarrollo de complicaciones cardiovasculares por administración crónica de Cisplatino.



**Ilustración 7: Esquema del protocolo experimental seguido en el modelo de administración crónica de Cisplatino 2 y 3 mg/Kg. CPT: Cisplatino; IS: Ingesta sólida; Vent. izq.: ventrículo izquierdo. Imagen elaborada con BioRender.com.**

### 3.1.1.3. Tratamientos realizados

Una vez establecido el modelo experimental de tratamiento crónico de Cisplatino, valorados el desarrollo de complicaciones cardiovasculares y los cambios en la expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3. Se analizó, si el tratamiento con un antagonista

de receptor TLR4, TLR4-PA1, podría afectar tanto a los parámetros cardiovasculares estudiados como a los marcadores plasmáticos y la expresión de proteínas analizada.

Para ello, los animales se dividieron aleatoriamente en los siguientes grupos experimentales, con 8-10 animales/grupo: **1) Cisplatino 2 mg/Kg + (Hidroxiopropil)metilcelulosa (HPMC) (CPT 2mg/Kg+HPMC)**: El Cisplatino se inyectó vía intraperitoneal, a la dosis de 2 mg/Kg, una vez a la semana, durante 5 semanas. Durante las últimas dos semanas de tratamiento con el antitumoral recibieron una inyección intraperitoneal diaria del vehículo utilizado, HPMC, para disolver el antagonista del receptor TLR4, TLR4-PA1. Este vehículo se administró en una concentración del 0,5% (peso/vol); **2) Cisplatino 2 mg/Kg + TLR4-PA1 (CPT 2mg/Kg+TLR4-PA1)**: El Cisplatino se inyectó vía intraperitoneal, a la dosis de 2 mg/Kg, una vez a la semana, durante 5 semanas. Durante las últimas dos semanas de tratamiento con el antitumoral recibieron una inyección intraperitoneal diaria del antagonista del receptor TLR4, TLR4-PA1 a una dosis de 10 mg/Kg; **3) Cisplatino 3 mg/Kg + (Hidroxiopropil)metilcelulosa (HPMC) (CPT 3mg/Kg+HPMC)**: El Cisplatino se inyectó vía intraperitoneal, a la dosis de 3 mg/Kg, una vez a la semana, durante 5 semanas. Durante las últimas dos semanas de tratamiento con el antitumoral recibieron una inyección intraperitoneal diaria del vehículo utilizado, HPMC, para disolver el antagonista del receptor TLR4, TLR4-PA1. Este vehículo se administró en una concentración del 0,5% (peso/vol); **4) Cisplatino 3 mg/Kg + TLR4-PA1 (CPT 3mg/Kg+TLR4-PA1)**: El Cisplatino se inyectó vía intraperitoneal, a la dosis de 3 mg/Kg, una vez a la semana, durante 5 semanas. Durante las últimas dos semanas de tratamiento con el antitumoral recibieron una inyección intraperitoneal diaria antagonista del receptor TLR4, TLR4-PA1, a una dosis de 10 mg/Kg.

Hay que señalar que la administración del vehículo o del antagonista TLR4-PA1 se hizo media hora después de la administración del antitumoral.

En todos los grupos experimentales descritos anteriormente, se siguió el mismo protocolo experimental descrito en la sección 10.1.2 para los animales sin tratamiento.

### 3.1.2. Modelo experimental de desarrollo de complicaciones cardiovasculares por Síndrome Metabólico (SM) por dieta

#### 3.1.2.1. Desarrollo del modelo experimental

Se utilizaron ratas Wistar macho adultas, procedentes del animalario de la Universidad Rey Juan Carlos, con 8 semanas de vida y un peso entre 270-300 g, Los animales se mantuvieron en estabulación en el animalario de la Universidad Rey Juan Carlos.

Los animales se distribuyeron en jaulas transparentes, en grupos de 4-6 animales por jaula, con un lecho de serrín que fue reemplazado cada semana. Las condiciones ambientales fueron: temperatura de 20°C, humedad ambiental del 60% ciclos de luz/oscuridad de 12 horas de duración respectivamente. Estas fueron controladas a lo largo de todo el periodo experimental.

Para el desarrollo del SM por dieta se siguió un modelo experimental en el que lo animales seguían una pauta de alimentación con una dieta hiperglucídica e hipergrasa similar a la descrita por otros autores (Poudyal et al., 2010, 2012)

Para llevar a cabo el desarrollo de este modelo experimental, los animales se dividieron aleatoriamente en los siguientes grupos experimentales, con 8-10 animales/grupo: **1) Control:** animales alimentados durante 20 semanas con una dieta estándar normocalórica y normograsa (8,6% grasa, 73,1% carbohidratos y 18,2% proteínas), SAFE D40 (Safe, Francia) y agua corriente filtrada. Los animales tuvieron libre acceso a la comida y la bebida durante todo el periodo experimental; **2) Síndrome Metabólico (SM):** animales alimentados durante 20 semanas con una dieta hipercalórica e hipergrasa (22,9% grasa, 46% carbohidratos y 28% proteínas), SAFE 235 HF (Safe, Francia) y agua filtrada con un 25% de dextrosa. Los animales tuvieron *ad libitum* acceso a la comida y la bebida durante todo el periodo experimental. Estos animales, a las 8 semanas de empezar con este tipo de alimentación desarrollan alteraciones endocrino-metabólicas típicas del SM, tales como hiperglucemia, insulino-resistencia, obesidad, dislipemia, hipertensión, así como una neuropatía autonómica cardiovascular (Poudyal et al., 2010, 2012).

El protocolo experimental en los dos grupos experimentales duró 20 semanas. Por lo que al final del periodo experimental los animales tenían una edad de 28 semanas.

#### 3.1.2.2. Protocolo experimental

En los animales de los diferentes grupos experimentales, se lleva a cabo un seguimiento semanal de comportamiento alimentario y peso durante todo el periodo de experimentación.

Además, con el fin de determinar el desarrollo de SM, se evaluaron, en los grupos experimentales, los siguientes parámetros bioquímicos en plasma: Glucosa, Triglicéridos, Colesterol total, Lipoproteína de alta densidad (HDL) y Lipoproteína de baja densidad (LDL). Estos parámetros se evaluaron a las 8 semanas de vida de los animales (previo a la alimentación con dieta hipercalórica e hipergrasa), en un punto

intermedio del tratamiento dietético (tras 12 semanas de alimentación con dieta hipercalórica e hipergrasa), realizando también una nueva determinación en el momento del sacrificio de los animales (20 semanas de alimentación con dicha dieta). La sangre se obtuvo mediante una venopunción en la cola del animal.

Tras el periodo experimental de tratamiento dietético de 20 semanas, se administró pentobarbital sódico (50 mg/Kg) vía intraperitoneal. Una vez que los animales estuvieron profundamente anestesiados, se procedió a la evaluación de la presión arterial y la frecuencia cardiaca, a través de la cateterización de la arteria carótida derecha. Estos parámetros se monitorizaron durante 10 minutos.

Tras esta monitorización, se procedió al sacrificio del animal, mediante exanguinación. En este momento se recogió la sangre, en un tubo con heparina de litio. Esta sangre se centrifugó inmediatamente para obtener el plasma sanguíneo, el cual se congeló a -80°C para realizar los posteriores análisis bioquímicos (ver apartado 12).

Posteriormente, se procedió a la extracción del corazón, la aorta y la arteria mesentérica para llevar a cabo los estudios de funcionalidad cardiaca y reactividad vascular. Además, también se obtuvieron muestras de tejidos cardiaco, vascular y renal que se conservaron a -80°C y en formaldehído para los posteriores análisis de expresión de proteínas e inmunohistoquímicos (ver apartados 3.7 y 3.8).

En este modelo se estudió, la existencia de alteraciones cardiovasculares, además de si el receptor extracelular TLR4 y su cadena de señalización, MyD88, así como el receptor intracelular NLRP3, están implicados en las alteraciones cardiovasculares causadas por el desarrollo de SM por dieta.

La metodología experimental seguida para la evaluación de los diferentes parámetros se detalla en los apartados siguientes de esta Tesis Doctoral (ver apartados 3.1.1.1, 3.1.1.2, 3.1.1.3).

En la Ilustración 8 se muestra el protocolo experimental seguido en el modelo de desarrollo de complicaciones cardiovasculares por SM por dieta.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL MODELO SINDROME METABÓLICO

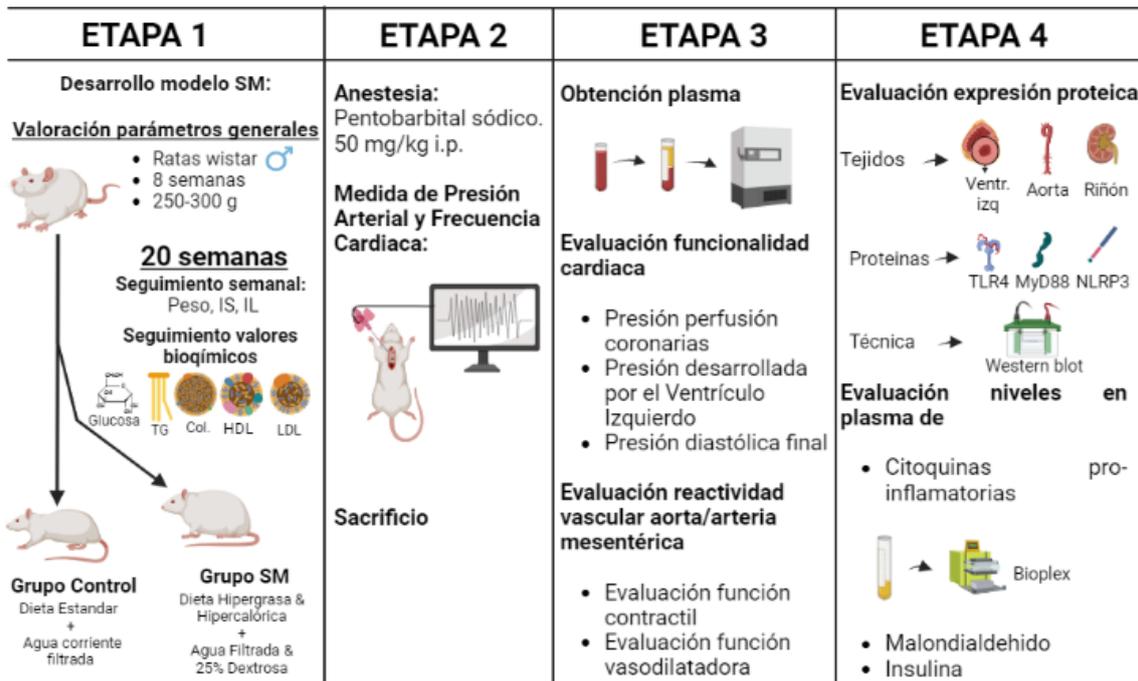


Ilustración 8 Esquema del protocolo experimental seguido en el modelo de Síndrome Metabólico (SM) por dieta. IS: Ingesta sólida; IL: Ingesta Líquida; Ventr. Izq.: ventrículo izquierdo. Imagen elaborada con BioRender.com.

3.1.2.3. Tratamiento realizado

Una vez establecido el modelo experimental de Síndrome Metabólico por dieta y, valorados el desarrollo de complicaciones cardiovasculares y los cambios en la expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3. Se analizó, si el tratamiento con un antagonista de receptores TLR4, TLR4-PA1, podría afectar tanto a los parámetros cardiovasculares estudiados, como a los marcadores plasmáticos y la expresión de proteínas analizada.

- Para ello, los animales se dividieron aleatoria mente en los siguientes grupos experimentales, con 8-10 animales/grupo experimental: **1) Grupo SM + (Hidroxipropil) metilcelulosa (HPMC) (SM+HPMC):** ratas Wistar macho adultas que durante un periodo de 20 semanas fueron alimentadas con una dieta hipercalórica e hipergasa (22,9% grasa, 46% hidratos de carbono y 28% proteínas), SAFE 235 HF (Safe, Francia) y agua filtrada con un 25% de dextrosa. Durante las últimas dos semanas de alimentación con dieta hipercalórica e hipergasa recibieron una inyección intraperitoneal diaria del vehículo, HPMC, utilizado para disolver el antagonista del receptor TLR4, TLR4-PA1. Este vehículo se administró en una concentración del 0,5% (peso/vol); **2) Grupo SM + TLR4-PA1 (SM+TLR4-PA1):** ratas Wistar macho adultas que durante un periodo de 20 semanas fueron alimentadas con una dieta hipercalórica e hipergasa (22,9% grasa, 46% hidratos de carbono y 28% proteínas), SAFE 235 HF (Safe, Francia) y agua filtrada con un 25% de dextrosa. Durante las últimas

dos semanas de alimentación con dieta hipercalórica e hipergrasa recibieron una inyección intraperitoneal diaria del antagonista del receptor TLR4, TLR4-PA1, a una dosis de 10 mg/Kg.

En los grupos experimentales descritos anteriormente, se siguió el mismo protocolo experimental descrito en la sección 10.2.2. para los animales sin tratamiento.

### **3.2. Valoración de parámetros generales de antropometría y comportamiento alimentario en los modelos experimentales desarrollados y sus tratamientos**

En distintos puntos temporales del periodo experimental en los dos modelos animales y sus respectivos tratamientos, se evaluaron diferentes parámetros de comportamiento alimentario y antropometría para evaluar el estado general de los animales.

#### **3.2.1. Peso**

En el **modelo experimental de Cisplatino**, se valoró semanalmente el peso de los animales. El procedimiento consistió en valorar el peso de manera previa al inicio de la administración de los ciclos de Cisplatino. Posteriormente hasta el final del tratamiento, se valoraba este parámetro una vez a la semana, siempre antes de la administración del fármaco antitumoral.

En el **modelo de SM por dieta** también se llevó a cabo un seguimiento semanal del peso de los animales durante todo el periodo experimental.

En los grupos experimentales de animales que recibían el tratamiento con el antagonista TLR4-PA1, la valoración del peso corporal se hizo también semanalmente y durante todo el periodo de tratamiento.

#### **3.2.2. Ingesta sólida**

En el **modelo experimental de Cisplatino** y en el **modelo de SM por dieta** se llevó a cabo el seguimiento semanal del patrón de ingesta de comida.

En los grupos experimentales de animales que recibían el tratamiento con el antagonista TLR4-PA1, la valoración de la ingesta de comida se hizo también semanalmente y durante todo el periodo de tratamiento.

Para el cálculo del valor promedio de la ingesta de comida en los diferentes grupos experimentales, se utilizó la Ecuación 1:

**Ecuación 1: Fórmula para la valoración de la ingesta sólida (IS).**

$$(IS) = \frac{[(\sum \text{comida añadida}) - (\sum \text{comida restante})]}{\frac{n^{\circ} \text{ animales jaula}}{n^{\circ} \text{ días}}}$$

### 3.2.3. Ingesta líquida

En el **modelo experimental de SM por dieta** se llevó a cabo el seguimiento semanal del patrón de ingesta de bebida. En los grupos experimentales de animales que recibía el tratamiento con el antagonista TLR4-PA1, la valoración de la ingesta de bebida se hizo también semanalmente y durante todo el periodo de tratamiento. Para el cálculo del valor promedio de la ingesta de bebida en los diferentes grupos experimentales, se utilizó la Ecuación 2:

**Ecuación 2: Fórmula utilizada para la valoración de la ingesta líquida (IL)**

$$(IL) = \frac{[(\sum \text{bebida añadida}) - (\sum \text{bebida restante})]}{\frac{n^{\circ} \text{ animales jaula}}{n^{\circ} \text{ días}}}$$

### 3.2.4. Antropometría

En el **modelo experimental de SM por dieta**, una vez completadas las 20 semanas de alimentación con dieta hipercalórica e hipergrasa se midieron, en centímetros, la **longitud del animal (hocico-ano)** y el **perímetro abdominal** (Novelli et al., 2007). En los grupos experimentales de animales de este modelo experimental que recibían el tratamiento con el antagonista TLR4-PA1, la valoración de los parámetros antropométricos se realizó también al final del periodo de tratamiento.

Posteriormente, también se calculó el **Índice de Masa Corporal** utilizando la (Ecuación 3):

**Ecuación 3: Fórmula utilizada para el cálculo del Índice de Masa Corporal (IMC)**

$$IMC = \frac{\text{Circunferencia abdominal (cm)}}{\text{peso}^2 \text{ (g)}}$$

## 3.3. **Valoración de marcadores plasmáticos en los modelos experimentales desarrollados y sus tratamientos**

En diferentes puntos temporales a lo largo del desarrollo de los modelos experimentales utilizados en esta Tesis Doctoral, se llevaron a cabo distintas determinaciones bioquímicas en el plasma de los animales.

En el modelo experimental de administración crónica de Cisplatino se determinaron los niveles de Malondialdehído (MDA), citoquinas proinflamatorias y creatinina. En el modelo experimental de SM por dieta, además de estos parámetros se determinaron los niveles plasmáticos de glucosa, triglicéridos, colesterol, LDL, HDL e insulina, así como los índices de resistencia y sensibilidad a la insulina (HOMA-IR y HOMA-β).

### **3.3.1. Determinación niveles plasmáticos de Malondialdehído (MDA)**

La determinación plasmática de MDA se realizó al finalizar el periodo experimental en **ambos modelos animales (Cisplatino y SM por dieta)** y tras el correspondiente tratamiento con el antagonista TLR4-PA1 TLR4-PA1.

**En el modelo experimental de Cisplatino**, los niveles plasmáticos de MDA se evaluaron a través de la reacción con Ácido Tiobarbitúrico (TBA) (Sigma Aldrich, Madrid, España) (Álvarez et al., 2007). Con el fin de eliminar las interferencias, las proteínas presentes en las muestras de plasma se desnaturalizaron y precipitaron, mediante la mezcla con ácido tricloacético en una proporción 1:1 (Sigma Aldrich, Madrid, España) 0.6M en HCL (Pancreac, Barcelona, España) y su colocación en un recipiente con hielo por un periodo de 20 minutos. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron (1500 g, 15 minutos). Seguidamente se recogió el sobrenadante, y se mezcló con TBA 120 mM disuelto en tampón Tris 260 mM (Biorad, España) a pH 7, en una proporción 5:1 (Sobrenadante:TBA). Esta mezcla se calentó a 97°C, manteniendo esta temperatura 30 minutos para que se produjera la reacción MDA-TBA. Posteriormente añaden 190 µl de la mezcla resultante en placas de 96 pocillos y se midió la absorbancia de la solución en un espectrofotómetro (SPECTROstar Omega, BMG Labtech, Alemania). La concentración de MDA se calculó a través de la ley Lambert-Beer (Ecuación 4), analizando todas las muestras por duplicado.

#### **Ecuación 4: Ecuación de la Ley Lambert-Beer**

$$A = C \times a \times b$$

Donde:

- A = absorbancia
- C = concentración MDA
- a = coeficiente de absorción molar:  $1,56 \times 10^5$  Mxcm a 535 nm
- b = paso óptico de la muestra (en 190 µl corresponde con 0,6 cm)

**En el modelo experimental de SM por dieta**, los niveles plasmáticos de MDA se midieron mediante un kit comercial (Abcam, ab233471 (Abcam, España). Los niveles de MDA se midieron utilizando el espectrofotómetro, SPECTROstar Omega (BMG Labtech, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante (Pauletto et al., 2020). Para la cuantificación del MDA se utilizó el programa MARS, el cual interpoló

automáticamente los valores de las absorbancias obtenidas de las muestras en la recta de calibrado. Todas las muestras se analizaron por duplicado.

### 3.3.2. Determinación de niveles plasmáticos de citoquinas proinflamatorias

En los **modelos experimentales de Cisplatino y en el modelo de SM por dieta**, los niveles plasmáticos de citoquinas se midieron al final del periodo experimental.

Estos niveles se detectaron utilizando el kit: Bio-Plex Pro™ Rat Cytokine 23-Plex Assay (BioRad, España, #12005641) con el que se pueden determinar los niveles de las siguientes 23 moléculas: Factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de granulocitos-macrófagos (GM)-CSF, Ligando de quimiocinas 1 (GRO/KC), Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), Interleuquina (IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-18, Factor estimulante de crecimiento de macrófagos (M-CSF), proteína quimio-atrayente de monocitos-1 (MCP-1), proteína inflamatoria macrofágica (MIP) 1- $\alpha$ , MIP 3- $\alpha$ , ligando de quimiocina 5 con motivo C-C (RANTES), Factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

El ensayo fue realizado utilizando el citómetro de flujo *Bio-Plex 3D systems* (BioRad, España), siguiendo las indicaciones y el protocolo facilitado por la casa comercial. Todas las muestras se analizaron por duplicado (Xiaowei Huo et al., 2019).

### 3.3.3. Determinación niveles plasmáticos de glucosa, lípidos, lipoproteínas y creatinina

En el **modelo de SM por dieta**, se determinaron los niveles de glucemia y perfil lipídico (triglicéridos, colesterol total, HDL y LDL) al finalizar el periodo experimental. Todas estas determinaciones se hicieron tras un periodo de ayuno de 12 horas y la sangre para la obtención del plasma se obtuvo mediante un cateterismo en la vena lateral de la cola del animal.

La sangre se recogió en tubos heparinizados. Posteriormente estas muestras de sangre se centrifugaron 20 minutos a 3600 rpm a 4°C, obteniéndose el plasma. Este se almacenó a -80°C hasta su utilización en los distintos análisis bioquímicos que se llevaron a cabo.

La determinación de los marcadores analíticos en plasma glucosa, triglicéridos, colesterol total y HDL se hizo utilizando el analizador FUJI DRI-CHEM NX500i (FUJIFILM España, Barcelona, España) que requiere pequeñas cantidades de plasma (10  $\mu$ L) y realiza las determinaciones utilizando una tira reactiva, dependiente del analito. La intensidad reflejada se extrapola en una curva de calibración específica de ese lote de la tira reactiva.

Para la determinación de los niveles de LDL en plasma se utilizó la (Ecuación 5) (Ahmadi et al., 2008; Atabi & Mohammadi, 2020):

**Ecuación 5: Fórmula utilizada para calcular los niveles de LDL en plasma**

$$\text{LDL} = \left( \frac{[\text{Colesterol}]}{1.19} \right) + \left( \frac{[\text{Trigliceridos}]}{1.9} \right) - \left( \frac{[\text{HDL}]}{1.1} \right) - 38$$

La determinación de los niveles plasmáticos de **Creatinina** se realizó al finalizar el periodo experimental en ambos **modelos animales**. Para sus determinaciones se utilizó también el analizador FUJI DRI-CHEM NX500i (FUJIFILM España. Barcelona, España) y la tira reactiva correspondiente.

Para las determinaciones señaladas anteriormente en los grupos experimentales de animales que recibían el tratamiento con el antagonista TLR4-PA1, la valoración de los niveles se hizo de la misma manera, y también al finalizar el periodo experimental.

### 3.3.4. Determinación niveles plasmáticos de insulina

En el **modelo de SM por dieta** se determinaron los niveles de insulina en plasma al final del periodo experimental. En los grupos experimentales de animales que recibían el tratamiento con el antagonista TLR4-PA1, la determinación de los niveles de insulina se hizo de la misma manera.

Estos niveles se evaluaron utilizando el kit *mercodia rat insulin* ELISA (10-1250-01) (Mercodia AB, Uppsala, Suecia) siguiendo las instrucciones del fabricante (Ghofran et al., 2019).

### 3.3.5. Determinación de índice HOMA-IR y HOMA-β

En el **modelo de SM por dieta** se determinaron los índices HOMA-IR (Ecuación 6) y HOMA-β (Ecuación 7) relacionados con la homeostasis de la glucosa al finalizar el periodo experimental (Akcilar et al., 2016). En los grupos experimentales de animales que recibían el tratamiento con el antagonista TLR4-PA1, la determinación de ambos índices se hizo de la misma manera.

**Ecuación 6: Fórmula utilizada para determinar el índice HOMA-IR**

$$\text{HOMA} - \text{IR} = \frac{[\text{Glucosa}] \left( \frac{\text{mmol}}{\text{L}} \right) \times [\text{Insulina}] \left( \frac{\text{mmol}}{\text{L}} \right)}{22.5}$$

**Ecuación 7: Fórmula utilizada para determinar el índice HOMA-β**

$$\text{HOMA} - \beta = \frac{[\text{Insulina}] \left( \frac{\text{U}}{\text{L}} \right) \times 20}{[\text{glucosa}] \left( \frac{\text{mmol}}{\text{L}} \right)}$$

### **3.4. Valoración de la función cardiovascular en los modelos experimentales desarrollados y sus tratamientos**

Al finalizar el periodo experimental en los dos modelos animales llevados a cabo en esta Tesis Doctoral y tras los correspondientes grupos de tratamiento con el antagonista TLR4-PA1, se desarrollaron ensayos para evaluar la función cardiovascular en los animales con el fin de establecer la existencia de alteraciones cardíacas y vasculares en los mismos.

#### **3.4.1. Determinación de la presión arterial directa**

Para la medición de la presión arterial y frecuencia cardíaca, se procedió a anestesiarse a los animales mediante la administración intraperitoneal de pentobarbital sódico a la dosis de 50 mg/Kg. A continuación, se procedió a colocar a los animales en una posición de decúbito supino en una cama de metacrilato adaptada para medida de presión arterial *in vivo*. Posteriormente, se separó y cortó la piel en la zona ventromedial del cuello, dejando un área de trabajo lo suficientemente amplia para separar los paquetes musculares y acceder a la arteria carótida.

Una vez aislada la arteria carótida, se inmovilizó la arteria mediante el uso de un hilo, con el fin de poder llevar a cabo una incisión a través de la cual se introdujo una cánula (Herradón et al., 2017) conectada a un transductor de presión (Cibertec, S.A., Madrid, España), que a su vez, se acopla a un sistema de registro PowerLab 8/35 (PanLab S.A., Barcelona, España) formado por una unidad de amplificación y filtrado de señal conectada a un ordenador que permite el registro de la presión arterial y la frecuencia cardíaca.

La cánula mantuvo en el interior de la arteria un periodo de 10 minutos, registrando los parámetros: Presión Arterial Sistólica (PAS), Presión Arterial Diastólica (PAD), Frecuencia cardíaca (Fc).

#### **3.4.2. Determinación de la función cardíaca basal. Preparación de corazón aislado y perfundido de rata (preparación de Langendorff)**

Para la evaluación de la funcionalidad del corazón aislado de rata se utilizó el sistema de Langendorff. Esta técnica consiste en perfundir de manera retrógrada el territorio coronario a través de la aorta, utilizando una solución nutritiva de Krebs-Henseleit modificada (SKH-M), a una temperatura de 37°C y saturada con gas carbógeno para oxigenarla, asegurando que el músculo cardíaco queda correctamente nutrido y oxigenado.

Para extraer el corazón, se llevó a cabo la retirada del esternón exponiendo la cavidad torácica y extrayendo la preparación rápidamente, sumergiéndola en SKH-M a 4°C.

El frío permite detener momentáneamente el metabolismo del corazón, protegiéndolo de daños isquémicos que puedan alterar la funcionalidad de la preparación. El periodo de tiempo máximo de tiempo para evitar la aparición de estos daños es de tres minutos, debiendo llevarse a cabo la extracción y el montaje de la preparación en este periodo de tiempo (González et al., 2011).

El corazón se montó en el sistema a través de la inserción de una cánula de acero inoxidable en el interior de la aorta, posteriormente se fijó mediante un nudo con un hilo en la zona de contacto con la cánula de acero y se perfundió retrógradamente con SKH-M. Una vez que la preparación estuvo perfundida, se introdujo el balón de látex en el ventrículo izquierdo, atravesando la válvula mitral a través del orificio de la vena pulmonar (González et al., 2011). Se utilizaron un volumen y flujo de perfusión constantes de 20 mL/min, para para obtener los valores basales.

Este sistema de perfusión se encuentra acoplado a un sistema de registro que permite la monitorización de la actividad cardíaca durante el experimento gracias a dos transductores de presión (Cibertec, S.A., Madrid, España) que se acoplan uno de ellos a la cánula a la que se fija la aorta para registrar el flujo coronario y otro al balón de látex inserto en el ventrículo izquierdo para registrar la función contráctil y dilatadora de este. Ambos transductores se acoplan a un sistema de registro PowerLab 8/35 (PanLab S.A., Barcelona, España) formado por una unidad de amplificación y filtrado de señal conectada a un ordenador que permite el registro de los diferentes parámetros de actividad cardíaca.

En esta Tesis Doctoral, se evaluaron los siguientes parámetros de funcionalidad cardíaca basal:

- **Presión de perfusión de las Coronarias (PPC):** En un flujo de perfusión constante, permite valorar de manera directa el diámetro de los vasos coronarios.
- **Presión Desarrollada por el Ventrículo Izquierdo (PDVI):** Un parámetro indicador de la contractilidad miocárdica. Se calcula como la diferencia entre la presión sistólica y diastólica ventricular.
- **Presión diastólica final (PDF):** Es el valor mínimo de presión ejercida por el ventrículo izquierdo en la diástole.

Una vez perfundidos y estabilizados, los corazones estuvieron un periodo de 20 minutos a un flujo constante de 20 mL/min para su estabilización. Tras dicho periodo, se midieron los valores indicados anteriormente.

### 3.4.3. Índice de masas

Una vez finalizada la valoración de la funcionalidad cardiaca. Se procedió a pesar el corazón con el fin de determinar el **Índice Masa Cardíaco** (IMc) (Ecuación 8), y el **Índice de Masa del Ventrículo Izquierdo** (IMVI) (Ecuación 9)

Para determinar estos índices, se limpió el corazón de tejido adiposo y conectivo que pudiera estar adherido al mismo. Posteriormente, se pesó el corazón. A continuación se cortaron las aurículas y se eliminó la pared del ventrículo derecho, dejando aislado el ventrículo izquierdo (que incluye el septo y la pared del ventrículo izquierdo), que también fue pesado, obteniéndose así el peso del ventrículo izquierdo (Bregagnol et al., 2007).

**Ecuación 8: Fórmula utilizada para determinar el IMc**

$$\text{IMc} = \frac{\text{peso corazón (mg)}}{\text{peso corporal (g)}}$$

**Ecuación 9: Fórmula utilizada para determinar el IMVI**

$$\text{IMVI} = \frac{\text{peso ventrículo izquierdo (mg)}}{\text{peso corporal (g)}}$$

## 3.5. **Determinación de la función vascular en territorio de conductancia. Preparación de aorta aislada de rata**

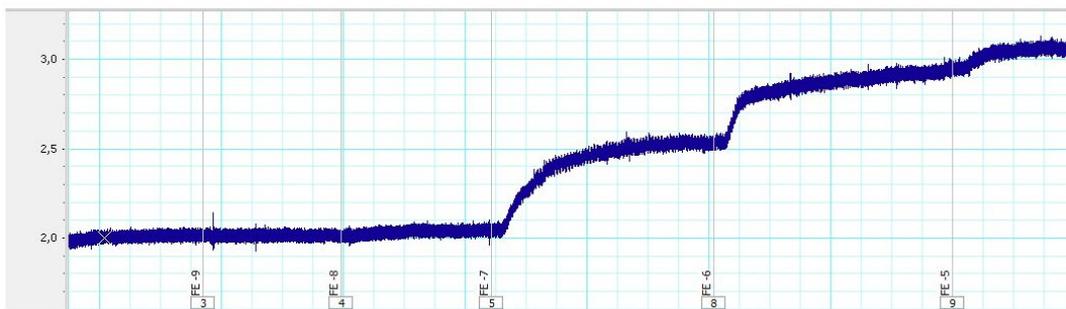
Tras el sacrificio de los animales, la porción torácica de la aorta se extrajo e introdujo en un vaso de precipitados con Solución de Krebs-Henseleit (SKH) fría, donde se eliminaron los restos de sangre del interior del vaso.

A continuación, la aorta se fijó en una placa Petri que contenía SKH fría, se limpió de tejido conectivo y adiposo perivascular y se cortó en anillos de 3-4 mm de longitud, con cuidado de no dañar las estructuras del tejido. De cada aorta, se obtienen 4-8 anillos, y se realiza una sola curva concentración-respuesta en cada anillo.

La preparación se montó en un equipo de baño de órganos. Para ello se introdujeron dos ganchos de acero inoxidable en el interior de la luz del anillo y se introdujo la preparación en el interior de una copa de cristal, que contenía 5 mL de SKH a 37°C y estaba burbujeada con gas carbógeno (95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>), procediendo a fijarla mediante la colocación de los ganchos en sus respectivos soportes. El gancho inferior está fijo y el gancho superior se conectó a un transductor isométrico (Cibertec S.A, Madrid, España) que registró los cambios en el tono vascular de la preparación. Para el registro de dichos cambios se utilizó el equipo informático Powerlab/8e, conectado a un ordenador con el programa Chart 8.1.

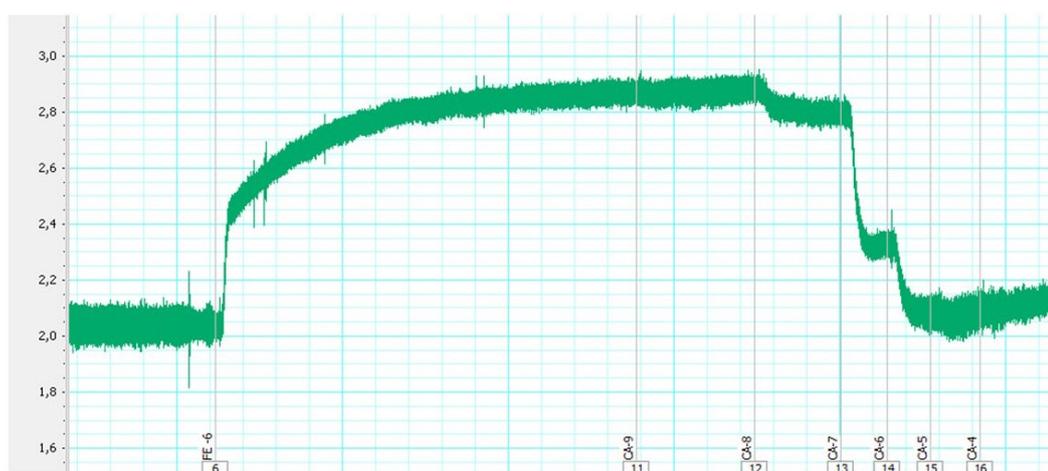
Una vez montados, los anillos se sometieron a una tensión de 2 g seguido de un periodo de estabilización de 60 minutos. Durante este periodo se realizaron lavados de la preparación cada 10 minutos, en caso de ser necesario se reajusto la tensión a 2 g (Herradón et al., 2017, 2021). El experimento comenzó al finalizar el periodo de estabilización.

La función contráctil del vaso se evaluó mediante curvas acumulativas concentración-respuesta al agonista de receptores  $\alpha$ -1, Fenilefrina (Fe) ( $10^{-9}$  M –  $10^{-5}$  M) (Ilustración 9). Para evaluar la funcionalidad endotelial de la preparación se añadió al baño de órganos el agonista muscarínico  $M_2$ , Carbacol (Ca), a la concentración de  $10^{-5}$  M. Se consideraron arterias intactas aquellas que presentaron una relajación igual o superior al 70% tras la administración de Ca, descartándose aquellos que presentaron relajaciones menores al 70% tras la administración de Ca.



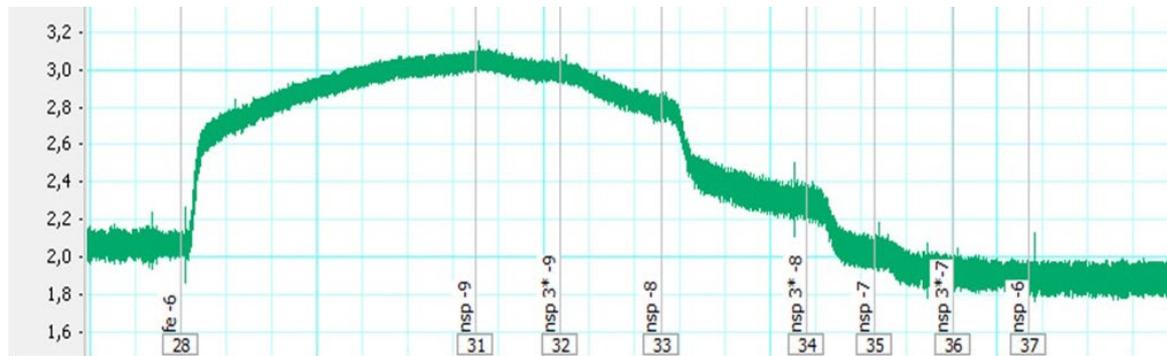
**Ilustración 9: Registro representativo de una curva concentración-respuesta de Fenilefrina (Fe) en aorta aislada de rata. Las concentraciones se refieren a Molar (M).**

Para evaluar la función vasodilatadora dependiente del endotelio se realizó una precontracción submaximal de la preparación con Fe ( $10^{-6}$  M) y una vez estable el tono vascular se llevaron a cabo curvas acumulativas concentración-respuesta con Ca ( $10^{-9}$  M -  $10^{-4}$  M) (Ilustración 10). Para considerar la arteria válida para el desarrollo del experimento, la contracción submaximal de Fe debía ser igual o superior a 0.6 g.



**Ilustración 10: Registro representativo de una curva concentración-respuesta de Carbacol (Ca) tras una pre-contracción con Fenilefrina (Fe) en aorta aislada de rata. Las concentraciones se refieren a Molar (M).**

Para evaluar la función vasodilatadora no dependiente de endotelio se realizó una precontracción submaximal de la preparación con Fe ( $10^{-6}$  M) y una vez estable el tono vascular se llevaron a cabo curvas acumulativas concentración-respuesta ( $10^{-9}$  M -  $10^{-6}$  M) (Ilustración 11) con Nitroprusiato Sódico (NPS), un donador del mediador endógeno vasodilatador Óxido Nítrico, siguiendo el mismo criterio de una contracción de Fe, comentado en el párrafo anterior.



**Ilustración 11: Registro representativo de una curva concentración-respuesta de Nitroprusiato sódico (NSP) tras una pre-contracción con Fenilefrina (Fe) en aorta aislada de rata. Las concentraciones se refieren a Molar (M).**

Las contracciones ocasionadas por Fe en la preparación de aorta aislada se expresaron en gramos. Las respuestas obtenidas para Ca y NSP se expresaron como el tanto por ciento de relajación del tono inducido por Fe, considerando la altura de la contracción con Fe como el 100%.

### **3.6. Determinación de la función vascular en territorio de resistencia. Preparación de lecho mesentérico aislado y perfundido. Preparación de arteria mesentérica aislada**

En los dos modelos experimentales llevados a cabo en esta Tesis Doctoral, se evaluó la reactividad vascular en las arterias del lecho mesentérico.

En el modelo experimental de Cisplatino se llevó a cabo la valoración de la reactividad vascular del lecho mesentérico aislado y perfundido.

En el modelo experimental de SM por dieta, la valoración se llevó a cabo en arterial mesentéricas aisladas mediante la técnica del miógrafo de alambres.

Esta diferencia en los métodos utilizados para la evaluación de la reactividad vascular a nivel de los vasos de resistencia se debe a que, durante el desarrollo de los experimentos, se produjo el fallo del miógrafo de alambres y se tuvo que utilizar la técnica del lecho mesentérico aislado y perfundido.

### **3.6.1. Preparación de lecho mesentérico aislado y perfundido**

Tras la obtención de las preparaciones de corazón y aorta, se extrajo el lecho mesentérico. Para ello, se llevó a cabo una incisión en la zona abdominal, se desplazó el paquete intestinal hacia el lateral, accediendo a la arteria mesentérica superior. A continuación, se canula dicha arteria realizando una incisión en la unión con la porción abdominal de la aorta. Posteriormente, se introdujo una cánula de polietileno, que se sujetó a la arteria mesentérica superior utilizando con hilo atado con un doble nudo. Durante la obtención de la preparación el lecho fue perfundido usando una bomba peristáltica (Gilson Inc, Estados Unidos), con SKH que contenía Heparina sódica (40 UI/mL), para evitar la coagulación sanguínea. Esta SKH también estaba a temperatura constante (37°C), para lo que se utilizó un termorregulador (RTM-1, Cibertec S.A, Madrid, España), y oxigenada con gas carbógeno.

Una vez canulada la arteria mesentérica superior, se diseccionó el lecho mesentérico separándolo del intestino. Iniciando el procedimiento por el ciego y continuando a través del borde del intestino, hasta separar completamente el lecho mesentérico. Por último, se seccionó la arteria mesentérica superior de la arteria aorta, separando así completamente el lecho.

Seguidamente la cánula introducida en el lecho mesentérico se conectó a un transductor de presión, que registró los cambios de presión de perfusión en la preparación. Este transductor estaba unido a un sistema de adquisición de señales analógicas Sistema PowerLab 8/35 (PanLab S.A, Barcelona, España) (Paquete informático LabChart 8.1).

Inmediatamente después, el lecho mesentérico se perfundió de manera constante con SKH burbujeada con gas carbógeno y a la temperatura de 37°C, con un flujo de 2 mL/min. Una vez montado el lecho mesentérico, la preparación se sometió a un periodo de estabilización de 30 minutos y se inició el experimento (Herradón et al., 2017, 2021).

Para evaluar la función contráctil del vaso se llevó a cabo una curva concentración respuesta a Fe, 10-80 nmol, (Ilustración 12 A). Posteriormente, se llevó a cabo un periodo de lavado del lecho mesentérico, perfundiendo SKH a través de este durante un periodo de 15 minutos.

A continuación, se procedió a evaluar la función vasodilatadora dependiente de endotelio. Para ello, a la SKH que se perfundía en el lecho se le añadió Fe a la concentración de  $10^{-5}$  M, una vez que se alcanzó una respuesta estable en los valores de 60-100 mmHg, se realizó una curva acumulativa concentración-respuesta con el agonista muscarínico Ca,  $10^{-12}$  mol –  $10^{-6}$  mol. (Ilustración 12 B).

Una vez finalizado dicho experimento, se continuó perfundiendo SKH con Fe a la concentración de  $10^{-5}$  M. Una vez que se recuperó la contracción submaximal, se procedió a valorar la función vasodilatadora no dependiente de endotelio, para ello se llevó a cabo una curva concentración-respuesta con NPS,  $10^{-11}$  mol –  $10^{-6}$  mol. (Ilustración 12 C).

Todos los fármacos se administraron en bolos con una jeringuilla Hamilton, a un volumen máximo de 50 µL. Las respuestas vasoconstrictoras obtenidas para Fe se

expresaron en mmHg. Las respuestas obtenidas para Ca y NSP se expresaron como el tanto por ciento de relajación del tono inducido por Fe, considerando la altura de la contracción con Fe como el 100% en ambos experimentos.



Ilustración 12 Registro representativo de los experimentos llevados a cabo en el lecho mesentérico aislado y perfundido de rata: A) Curva concentración-respuesta de Fenilefrina (Fe); B) Curva concentración-respuesta a de Carbacol (Ca) tras una precontracción con Fenilefrina (Fe); C) Curva concentración-respuesta de Nitroprusiato sódico (NSP) tras una precontracción con Fenilefrina

### 3.6.2. Preparación de arteria mesentérica aislada

Para estudiar la reactividad vascular se utilizó el método descrito por (Mulvany & Halpern, 1977). Para ello, segmentos de aproximadamente 2 mm de longitud de arterias mesentéricas de resistencia se transfirieron a un baño de órganos de un miógrafo dual isométrico, Multy Myograph System – 620M (Danish Myo Technology, Dinamarca), en el cual se introdujeron dos alambres de acero de 40  $\mu\text{m}$  de diámetro por la luz de la arteria. Después de un periodo de estabilización de 30 minutos en SKH oxigenada con gas carbónico a 37°C y pH de 7,4, los segmentos se estiraron gradualmente hasta conseguir su tensión óptima en función de su diámetro. Para ello, se determinó la relación entre la circunferencia interna y la tensión de la pared de los segmentos, y se fijó su circunferencia interna,  $L_0$ , equivalente al 90% de la que tendrían los vasos si estuvieran expuestos a una tensión pasiva equivalente a la producida por una presión transmural de 100 mmHg. Una vez acabado el proceso de normalización, los segmentos arteriales se lavaron con SKH y se equilibraron durante 30 minutos. A continuación, se comprobó la contractilidad de los segmentos por exposición de estos a una solución de alta concentración de potasio ( $\text{K}^+$ -SKH 120 mM, idéntica a la SKH, salvo que se sustituyó el NaCl por KCl en una base equimolar).

Tras un periodo de equilibrio, se contrajeron los segmentos arteriales con Fenilefrina, hasta una contracción de aproximadamente el 50% de la contracción inducida por  $\text{K}^+$ -SKH; y se realizó una curva concentración-respuesta con concentraciones creciente de ACh (1 nM-10  $\mu\text{M}$ ). Después del lavado con SKH y un periodo de estabilización de 30 min, se realizó una curva concentración-respuesta con concentraciones crecientes de Fe (1 nM-10  $\mu\text{M}$ ). Por último, se realizó una curva concentración-respuesta al donante de Óxido Nítrico, NONOato de dietilamina (DEA-NO, 1 nM-10  $\mu\text{M}$ ) en arterias precontraídas con Fe.

Las respuestas vasoconstrictoras se expresaron como el porcentaje del tono generado por la  $\text{K}^+$ -SKH para cada segmento, considerando la altura de la contracción como el 100%. Las respuestas obtenidas para ACh y DEA-NO se expresaron como el

tanto por ciento de relajación del tono inducido por Fe, considerando la altura de la contracción como el 100%.

### **3.7. Determinación de la expresión de proteínas en los tejidos cardiaco, vascular y renal en los modelos experimentales desarrollados y sus tratamientos**

Al finalizar el periodo experimental en los dos modelos animales llevados a cabo en esta Tesis Doctoral y en los correspondientes grupos de tratamiento con el antagonista TLR4-PA1 se desarrollaron ensayos para determinar la expresión de proteínas mediante la técnica de Western-Blot.

Para analizar si el TLR4, MyD88 y NLRP3 estaban implicados en el desarrollo de las alteraciones cardiovasculares, en los modelos experimentales de tratamiento con Cisplatino y SM por dieta, se cuantificaron los niveles de expresión de estas proteínas en corazón, vasos y riñón en los animales de los diferentes grupos al finalizar el periodo experimental.

Para la obtención de los extractos proteicos, muestras de ventrículo izquierdo y riñón, fueron homogeneizadas utilizando el equipo TissueLysser II (Qiagen, Alemania) y en las condiciones indicadas en la Tabla 3.

**Tabla 3: Condiciones de homogeneización utilizadas en la homogeneización de los tejidos cardiaco y renal**

<b>Tejido</b>	<b>Condiciones</b>	<b>Frecuencia (Hz)</b>	<b>Nº Ciclos</b>	<b>Duración ciclo (seg)</b>
<b>Ventrículo izquierdo</b>		30	1	180
<b>Riñón</b>		30	1	180

En la aorta, para aumentar el rendimiento de la extracción proteica, se procedió a seguir otro protocolo. La sección de la aorta se introdujo en un mortero de porcelana, y se congeló utilizando nitrógeno líquido. Una vez congelada, se procedía a su desintegración mediante el uso del mortero.

Para la extracción de las proteínas de los tejidos de estudio se utilizó un tampón frío de lisis RIPA que contenía (1 mM EGTA, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM NaP<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 10 mM NaF) y un coctel inhibidor de proteasas. A continuación, los homogeneizados fueron centrifugados durante 20 min a 10000 rpm y a 4°C, se recogió el sobrenadante y posteriormente guardaron a -80°C hasta su uso (Herradón et al., 2017, 2021).

La cuantificación de la proteína se realizó utilizando el método de Bradford (BioRad, España, Cat#5000205). Seguidamente, en función de la cantidad de proteína que se deseaba cargar, se calculó el volumen de muestra necesario y se mezcló con una solución de tampón de carga o tampón de LaemmLi 4x y β-mercaptoetanol (BioRad,

España). La mezcla se incubó a 95°C durante 1 minuto para desnaturalizar las proteínas.

Posteriormente, las muestras fueron incorporadas (cargadas) a los geles de poliacrilamida y sometidas a la electroforesis SDS-PAGE utilizando un tampón de electroforesis 10X Tris/Glycine/SDS Buffer (Bio-Rad, España) diluido al 10% con agua Mili-Q. Las condiciones de electroforesis fueron de 40 minutos a un voltaje constante de 200 V.

Las proteínas separadas en el gel fueron transferidas a una membrana de PVDF (Trans-Blot Turbo™ Mini 0.2µm PVDF Transfer Pack, BioRad, España, Cat#1704156) mediante el equipo Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (BioRad, España). Una vez transferidas las proteínas, los sitios de unión no específicos se bloquearon con leche en polvo no grasa al 3% (BioRad, España, Cat#1706404) en una solución salina tamponada con Tris y Tween 20 (TTBS) durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. En la arteria mesentérica, se utilizó suero albumina bovina (Merck KGaA, Alemania) al 5% para bloquear la membrana. A continuación, las membranas se incubaron con anticuerpos mono o policlonales para TLR4 (Novus Biologicals, Cat#76B357.1), MyD88 (abcam, Cat#ab2064) y NLRP3 (abcam, Cat#263899) durante toda la noche a 4°C en agitación continua. Al día siguiente, las membranas se lavaron con TTBS y se incubaron con un anticuerpo IgG de cabra anti-raton (Thermo Fisher Scientific, Cat#31430) o anti-conejo (Thermo Fisher Scientific, Cat#31460), en función del anticuerpo primario utilizado.

Los inmunocomplejos se detectaron en un sistema de imágenes ChemiDoc™ (BioRad, España). Las señales del inmunocomplejo se cuantificaron con el software ImageLab versión 6.0 (Bio Rad). La misma membrana se utilizó para determinar la expresión de GAPDH como control de carga, utilizando anticuerpos monoclonales de ratón (Abcam, Cat#ab8245). En el caso de las arterias de resistencia se utilizó Tubulina como control de carga, utilizando anticuerpos monoclonales de ratón (Merck KGaA, Alemania, T5168).

En la Tabla 4 se muestran las condiciones utilizadas para la evaluación proteica de TLR4, MyD88 y NLRP3 en los tejidos evaluados en esta Tesis Doctoral.

**Tabla 4: Resumen de anticuerpos y condiciones utilizados en los análisis de Western-Blot**

Tejido	Anticuerpo	Dilución anticuerpo 1°	Dilución anticuerpo 2°
Ventrículo izquierdo	TLR4	1:500	1:10000
	MyD88	1:500	1:5000
	NLRP3	1:750	1:5000
Aorta	TLR4	1:5000	1:20000
	MyD88	1:1000	1:10000
	NLRP3	1:1000	1:5000
Riñón	TLR4	1:1000	1:10000
	MyD88	1:500	1:10000
	NLRP3	1:1000	1:10000
Mesentérica	TLR4	1:5000	1:4000
	MyD88	1:1000	1:2000
	NLRP3	1:1000	1:4000

Los datos de expresión proteica se expresaron como la relación entre las señales en el inmunocomplejo correspondiente a la proteína estudiada y la GAPDH. Para comparar los resultados de la expresión proteica, se asignó un valor de 100 a las muestras de los grupos usados como control.

### **3.8. Inmunohistoquímica en arteria mesentérica**

En arteria mesentérica, al finalizar el periodo experimental en el modelo de Cisplatino y en los correspondientes grupos de tratamiento (TLR4-PA1) se valoró la expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3 mediante la técnica de inmunohistoquímica.

Tras la extracción de la arteria mesentérica, las muestras fueron fijadas, a temperatura ambiente, en una solución de formaldehído en una concentración al 10% vol/vol, durante un periodo de 72 horas. A continuación, las muestras fueron sometidas a un proceso de deshidratación en una serie de etanol de concentración creciente (70, 80, 96 y 100%), posteriormente se sumergieron en tolueno como intermediario y se incluyeron en parafina, utilizando el procesador de inclusión Citadel Shandon 2000 (Fisher Scientific Ltd. Leicestershire, Reino Unido).

Después de este proceso, se realizaron cortes de 5 µm utilizando un microtomo tipo Minot (Microm HM360, Marshall Scientific LLC, Hampton, Estados Unidos), posteriormente se llevó a cabo una tinción de los cortes de tejido con Hematoxilina/Eosina, siguiendo el protocolo establecido por (Wittekind, 2003).

Todas las secciones histológicas se estudiaron bajo un microscopio Zeiss Axiophot 3, y fueron fotografiadas con una cámara Axiocam HRc.

Para determinar la expresión de los niveles de expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3, se llevó a cabo el siguiente protocolo en las preparaciones:

- Desparafinar e hidratar las muestras previamente identificadas.
- Desenmascaramiento antigénico, si es necesario.
- Lavado en buffer con detergente.
- Bloqueo de la actividad enzimática de la peroxidasa endógena, tratando los cortes de tejido con 100 µL de una disolución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en metanol durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
- Lavado en buffer con detergente.
- Bloqueo para evitar uniones inespecíficas con albúmina o suero bovino fetal.
- Incubación del anticuerpo primario overnight.
- Lavado con buffer.
- Las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario anticuerpo IgG de cabra anti-raton (Thermo Fisher Scientific, Cat#31430) o anti-conejo (Thermo Fisher Scientific, Cat#31460).
- Lavado con buffer.
- Revelado con diaminobencidina.
- Lavado en buffer.
- Desarrollo de la reacción inmunohistoquímica usando diaminobencidina.
- Lavado en buffer.
- Deshidratar, aclarar y montar.

Todas las secciones histológicas se estudiaron bajo un microscopio Zeiss Axiophot 3, y fueron fotografiadas con una cámara Axiocam HRc.

En todos los casos, se escogió un bloque representativo de parafina para llevar a cabo el análisis estadístico, También, se realizó un control negativo utilizando secciones de tejido en las que se realizó en cada caso la misma técnica, pero con la omisión del paso de incubación con anticuerpo primario.

### **3.9. Fármacos y soluciones utilizados**

En este apartado se detallan los fármacos y soluciones empleadas en el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

### **3.9.1. Fármacos utilizados**

- Dolethal (pentobarbital sódico) (Vetoquinol, Madrid, España).
- Cisplatino, (dicloruro de cis-diaminoplatino (II)) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).
- TLR4-PA1: Sintetizado en el Instituto del Química Médica, del Centro superior de Investigaciones Científicas (IQM-CSIC), y cedido por el Doctor Ernesto Quesada del Sol.
- (Hidroxipropil)metilcelulosa (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).
- Heparina sódica: Heparina sódica 20U.l/mL (Laboratorios farmacéuticos ROVI, S.A. España)
- Carbacol (Carbamato de (2-hidroxietil)trimetilamonio) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).
- Fenilefrina ((R)-(-)-1-(3-hidroxifenil)-2-metilaminoetanol) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).
- Nitroprusiato sódico (Nitroferricianuro(III) de sodio dihidratado) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

### **3.9.2. Disolución de los fármacos. Vehículos utilizados**

Para realizar las soluciones de **Cisplatino 2 mg/Kg y 3 mg/Kg** a administrar, el antitumoral se disolvió en solución salina (NaCl 0.9%) y fue sonificado hasta su completa disolución.

Como vehículo para disolver el antagonista de TLR4, TLR4-PA1, se utilizó **(Hidroxipropil)metilcelulosa**, HPMC, (Romero et al., 2012). Este vehículo se preparó de la siguiente manera:

- Se calentaron 100 mL de agua destilada hasta los 55°C.
- Se añadió HPMC en pequeñas cantidades, para evitar la formación de aglomerados.
- De dejó un periodo de 30 minutos en agitación, con una temperatura superior a los 50°C.
- Una vez que la disolución es traslúcida, se procedió a dejar que la mezcla resultante se enfriase, se tapó y se guardó en nevera a una temperatura de 4°C.
- Una vez que se enfrió, la disolución pasa a ser transparente.
- El vehículo se preparaba cada 7 días.

Para la disolución del **TLR4-PA1 10 mg/Kg** en el vehículo preparado, se siguieron los siguientes pasos:

- Se calentó el vehículo en el baño de ultrasonidos, que había sido configurado a una temperatura de 40°C.
- Se pesó el TLR4-PA1, 10 mg/Kg, en la balanza analítica.
- Se añadió el fármaco, mientras el vehículo estaba en agitación.

- Una vez que se disolvió la mayor parte del fármaco, se procedió a sonicar la disolución, hasta la completa disolución.
- Se prepara la disolución diariamente.

**Carbacol, Fenilefrina y Nitroprusiato sódico** se disolvieron siguiendo los siguientes pasos:

- Se pesó la cantidad del fármaco necesario para hacer una concentración de
- $10^{-2}$ M.
- El fármaco se diluyó en H<sub>2</sub>O destilada mediante agitación, en un frasco topacio.
- Posteriormente se prepararon las diluciones seriadas en tubos erpendorf para llevar a cabo los experimentos.

### 3.9.3. Soluciones nutricias

#### 3.9.3.1. Solución de Krebs-Henseleit

Como solución nutricia para la realización de los experimentos en las dos preparaciones vasculares (aorta y mesentérica) se ha utilizado la solución fisiológica de Krebs-Henseleit (SKH) (López-Miranda et al., 2004). La SKH se preparó diariamente.

En la Tabla 5 se muestra la concentración final de sales y glucosa en la solución de KH utilizada en los experimentos.

**Tabla 5: Concentración de glucosa y de las diferentes sales empleadas en la solución de Krebs-Henseleit**

Sales	Concentración (mM)
<b>NaCl</b>	118
<b>KCl</b>	4,75
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	1,2
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	1,19
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	25
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	2,54
<b>Glucosa</b>	11,0

Todas las sales usadas en la preparación de esta solución nutricia fueron suministradas por Panreac Química (Barcelona, España).

#### 3.9.3.2. Solución de Krebs-Henseleit modificada para corazón

Como solución nutritiva para la realización de los experimentos de evaluación de la funcionalidad cardíaca, se ha utilizado la SKH modificada para corazón (González et al., 2011).

En la Tabla 6 se muestra la concentración final de sales y glucosa en la solución de K-H modificada utilizada en los experimentos de Langendorff.

Tabla 6: Composición de la solución nutritiva de Krebs-Henseleit modificada para corazón

Sales	Concentración (mM)
<b>NaCl</b>	118
<b>KCl</b>	4,7
<b>MgSO4·7H2O</b>	1,2
<b>KH2PO4</b>	1,2
<b>NaHCO3</b>	25
<b>Glucosa</b>	10
<b>CaCl2</b>	2,5
<b>Piruvato</b>	2

El piruvato fue suministrado por Sigma Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). El resto de las sales fueron suministradas por Panreac Química (Barcelona, España).

### 3.9.3.3. Solución de Krebs-Henseleit modificada utilizada en los experimentos de la preparación de arteria mesentérica aislada

Para los experimentos llevados a cabo en arteria mesentérica aislada se utilizó la SKH rica en potasio. Esta solución consiste en sustituir el NaCl por KCl en una base equimolar.

En la **Tabla 7** se muestra la concentración final de sales y glucosa en la solución de K-H modificada utilizada en los experimentos

**Tabla 7: Composición de la solución nutritiva de Krebs-Henseleit rica en potasio.**

<b>Sales</b>	<b>Concentración (mM)</b>
<b>KCl</b>	122,7
<b>MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	1,2
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	1,2
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	25
<b>Glucosa</b>	10
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	2,5
<b>Piruvato</b>	2

#### 3.9.3.4. Soluciones utilizadas para Western-Blot

Las diferentes soluciones utilizadas para la determinación de la expresión de proteínas mediante Western-Blot, se prepararon de la siguiente manera:

- Buffer electroforesis: Se diluyó el tampón Tris-Glicina/SDS comercial (10X) (Biorad, España), en agua bidestilada, en proporción 1:10.
- Buffer TTBS (Tris-Salino/Tween 20): Se diluyó el buffer TBS Tris-Salino comercial 10X (Biorad, España), en agua bidestilada en una proporción 1:10. Además se añadía Tween 20 (Biorad, España) en una proporción de 0,05%.
- Buffer de bloqueo: Se diluyó leche en polvo desnatada (Biorad, España) en un buffer TTBS, a una concentración del 3%.

#### 3.9.4. Unidades de medida y análisis estadístico

Las unidades de medida de cada uno de los parámetros valorados en esta Tesis Doctoral se encuentran resumidas en la Tabla 8.

**Tabla 8: Unidades de medida de los diferentes parámetros evaluados**

Parámetro	Unidades	Parámetro	Unidades
<b>Peso</b>	g	<b>Índice de masas (IMc/IMVI)</b>	mg/g
<b>Ingesta sólida</b>	g/rata/día	<b>Aorta: Contracción</b>	g
<b>Ingesta líquida</b>	mL/rata/día	<b>Aorta: Relajación</b>	%
<b>Longitud hocico-ano</b>	cm	<b>Rama mesentérica: Contracción</b>	%
<b>Perímetro abdominal</b>	cm	<b>Rama mesentérica: Relajación</b>	%
<b>Glucemia</b>	mg/dL	<b>Lecho mesentérico: Contracción</b>	mmHg
<b>Insulina</b>	µg/mL	<b>Lecho mesentérico: Relajación.</b>	mmHg
<b>HOMA-IR</b>		<b>MDA</b>	µM
<b>HOMA-β</b>		<b>Expresión proteica</b>	Unidades Arbitrarias (U.A.)
<b>Lípidos (triglicéridos, Colesterol, HDL)</b>	mg/dL	<b>Citoquinas y quimiocinas</b>	pg/mL
<b>Presión arterial (PAS, PAD, HR)</b>	mmHg		
<b>Fc</b>	Latidos por minuto (l.p.m.)		
<b>PPC</b>	mmHg		
<b>PDVI</b>	mmHg		
<b>PDF</b>	mmHg		

Los valores de los parámetros estudiados en esta Tesis Doctoral se expresan como la media aritmética  $\pm$  error estándar media (E.E.M) de los datos obtenidos de los grupos animales (n).

Para el análisis estadístico, se ha utilizado el software Prims 8.0 (Graphpad Software Inc).

Para la comparación estadística de dos grupos de experimentación, se ha utilizado un análisis estadístico de *t-student* con un test de Welch como *post hoc*.

En las comparaciones estadísticas, de tres o más grupos experimentales, con una sola variable, se ha evaluado con un análisis de varianza (test ANOVA), de una vía con seguido del *post hoc* Tukey.

En las comparaciones estadísticas donde se valoraban dos variables, entre dos o más grupos, la comparación estadística de los parámetros estudiados entre los distintos grupos experimentales se ha evaluado mediante la realización de un análisis

de la varianza (test ANOVA) de una/dos vías seguido del test *post hoc* Sidak cuando se comparaban dos grupos experimentales, y Tukey cuando se comparaban tres o más grupos experimentales.

Se han considerado diferencias estadísticamente significativas valores de  $p < 0,05$ .

# **4. Resultados**

Este apartado detalla los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral. En primer lugar, se expondrá la caracterización de las complicaciones cardiovasculares, así como las modificaciones en la expresión en tejido cardíaco, vascular y renal de los receptores TLR4 y NLRP3 y del señalizador intracelular MyD88 en el modelo de administración crónica de cisplatino (CPT). A continuación, se expondrán los efectos que el antagonista TLR4, TLR4-PA1 tiene sobre los parámetros mencionados en dicho modelo experimental. En segundo lugar, se detallará la caracterización de las alteraciones cardiovasculares en el modelo de SM por dieta, así como las modificaciones en la expresión en tejido cardíaco, vascular y renal de los receptores TLR4 y NLRP3 y del señalizador intracelular MyD88 en dicho modelo. Para terminar, se expondrán los efectos que el antagonista de receptores TLR4, TLR4-PA1 tiene sobre los parámetros mencionados en el modelo experimental de SM por dieta.

## **4.1. Modelo administración crónica de Cisplatino. Desarrollo de complicaciones cardiovasculares**

### 4.1.1. Parámetros generales

#### 4.1.1.1. Evolución del peso corporal de los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg)

En la Figura 1 se presentan los datos de la evolución de peso corporal de los animales tratados durante 5 semanas con Salino, CPT 2 mg/Kg y CPT 3 mg/Kg.

Los animales de los grupos Salino, CPT 2 mg/Kg y CPT 3 mg/Kg mostraron un peso similar al inicio del protocolo experimental (CPT 2 mg/Kg:  $292,80 \pm 3,41$  g (n=10),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $289,00 \pm 6,05$  g (n=10); CPT 3 mg/Kg:  $280,80 \pm 4,00$  g (n=10),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $289,00 \pm 6,05$  g (n=10)).

En los animales del grupo Salino se observó, a lo largo de todo el periodo experimental, un aumento semanal en la ganancia de peso corporal. Sin embargo, los animales del grupo CPT 2 mg /Kg, mantuvieron un peso corporal constante a lo largo de las 5 semanas de tratamiento con el antitumoral, lo que conllevó que al final del periodo experimental el peso de los animales del grupo CPT 2 mg/Kg fuese significativamente menor que el de los animales del grupo Salino (CPT 2 mg/Kg:  $274,80 \pm 12,12$  g (n=10)  $p < 0,0001$  vs. Salino:  $356,40 \pm 5,77$  g (n=10)).

En comparación con el grupo Salino, los animales del grupo CPT 3 mg/Kg mostraron una disminución significativa del peso corporal a partir de la segunda semana de administración del antitumoral. Este peso resultó también significativamente menor que el de los animales control al final del periodo experimental (CPT 3 mg/Kg:  $245,10 \pm 7,30$  g (n=10)  $p < 0,0001$  vs. Salino:  $356,40 \pm 5,77$  g (n=10)).

Además, se observó, que a partir de la semana 4<sup>a</sup> de administración del antitumoral, el peso corporal de los animales del grupo CPT 3 mg/Kg era también significativamente menor que el de los animales del grupo CPT 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg:  $295,70 \pm 7,17$  g (n=10),  $p < 0,001$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $258,40 \pm 7,50$  g (n=10)). Esta diferencia significativa se mantuvo hasta el final del tratamiento con el antitumoral (CPT 2 mg/Kg:  $274,80 \pm 12,12$  g (n=10),  $p < 0,01$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $245,10 \pm 7,30$  g (n=10)).

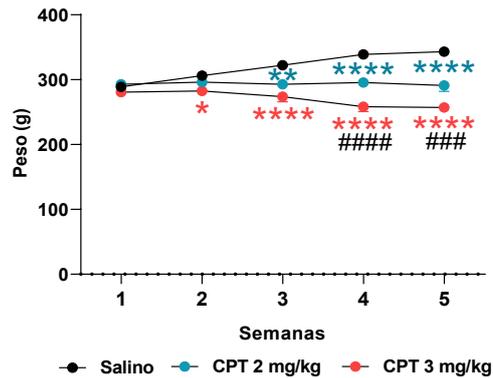


Figura 1: Evolución del peso corporal de los animales tras el tratamiento durante 5 semanas con Salino y Cisplatino (CPT) 2 mg/Kg y CPT 3 mg/Kg. Los datos representan la Media  $\pm$  E.E.M (n= 10). Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de un test *post-hoc* Tukey para el tratamiento estadístico de los datos (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*\*p<0,0001 vs Salino; ### p<0,001 ; #### P<0,0001 vs CPT 2 mg/Kg).

#### 4.1.1.2. Evolución de la ingesta sólida de los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg)

En la Figura 2 se presentan los datos de las ingestas de comida de los animales tratados durante 5 semanas con Salino, CPT 2 mg/Kg y CPT 3 mg/Kg.

Los animales de los grupos Salino, CPT 2 mg/Kg y CPT 3 mg/Kg mostraron una ingesta de comida similar al inicio del protocolo experimental, es decir, antes de la primera administración del antitumoral (CPT 2 mg/Kg: 21,98 $\pm$ 0,95 g/rata/día (n=10), p>0,05 vs. Salino: 19,09 $\pm$ 1,28 g/rata/día (n=10); CPT 3 mg/Kg: 19,29 $\pm$ 2,53 g (n=10), p>0,05 vs. Salino: 19,09 $\pm$ 1,28 g/rata/día (n=10)).

El tratamiento con CPT 2 mg/Kg produjo una disminución de la ingesta de comida desde la primera administración del antitumoral. Esta disminución se mantuvo el resto de las semanas de tratamiento, aunque no fue estadísticamente significativa en ninguna de las semanas analizadas, en comparación con la ingesta sólida resultante en el grupo de animales tratados con Salino (CPT 2 mg/Kg 5 semanas: 16,06 $\pm$ 0,60 g/rata/día (n=10), p>0,05 vs. Salino 5 semanas: 20,50 $\pm$ 1,30 g/rata/día (n=10)).

El tratamiento con CPT 3 mg/Kg también produjo una disminución de la ingesta de comida desde la primera administración del antitumoral. Esta disminución fue progresiva a medida que se administraban las diferentes dosis de antitumoral, resultando estadísticamente significativa al finalizar el periodo experimental en comparación con la ingesta sólida resultante en el grupo de animales tratado con Salino (CPT 3 mg/Kg: 15,08 $\pm$ 2,24 (n=10), p>0,05 vs. Salino: 20,50 $\pm$ 1,30 (n=10) g/rata/día).

Por último, el tratamiento con CPT 3 mg/Kg produjo una disminución de la ingesta mayor, que la observada en el grupo de animales tratados con la otra dosis del antitumoral (CPT 2 mg/Kg: 16,06 $\pm$ 0,60 g/rata/día (n=10), p>0,05 vs. CPT 3 mg/Kg: 15,08 $\pm$ 2,24 g/rata/día (n=10)).

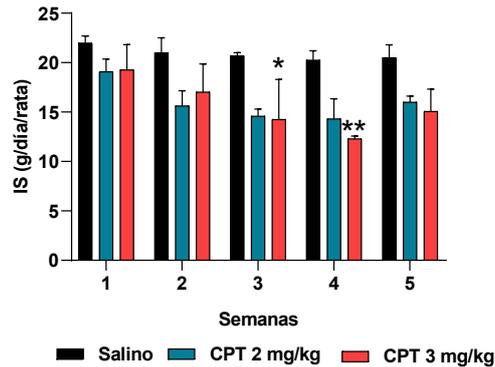


Figura 2: Evolución de la ingesta sólida de los animales tras el tratamiento durante 5 semanas con Salino, Cisplatino (CPT) 2 mg/Kg y CPT 3 mg/Kg. Los datos representan la Media  $\pm$  E.E.M (n=10). Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de un test *post-hoc* Tukey para el tratamiento estadístico de los datos.  $P < 0,05$  vs Salino. IS: Ingesta sólida.

#### 4.1.2. Marcadores plasmáticos

##### 4.1.2.1. Niveles plasmáticos de MDA en los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg)

En la Figura 3 se presentan los niveles de MDA de los animales tratados durante 5 semanas con Salino, CPT 2 mg/Kg y CPT 3 mg/Kg.

El tratamiento con CPT 2 mg/Kg causó un aumento, que no llegó a ser significativo, en los niveles plasmáticos de MDA en relación con los niveles observados en los animales de grupo Salino (CPT 2 mg/Kg:  $0,286 \pm 0,047$  mMol/mL (n=5),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $0,242 \pm 0,023$  mMol/mL (n=4)). Sin embargo, el tratamiento con la dosis de CPT 3 mg/Kg sí ocasionó un aumento significativo en los niveles plasmáticos de MDA con respecto a los animales del grupo Salino (CPT 3 mg/Kg:  $0,559 \pm 0,116$  mMol/mL (n=4),  $p < 0,01$  vs. Salino  $0,242 \pm 0,023$  mMol/mL (n=4)). Este aumento de los niveles plasmáticos de MDA en los animales tratados con CPT 3 mg/Kg fue además significativamente superior al de los animales tratados con CPT 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg:  $0,286 \pm 0,047$  mMol/mL, (n=5),  $p > 0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $0,559 \pm 0,116$  mMol/mL (n=4)).

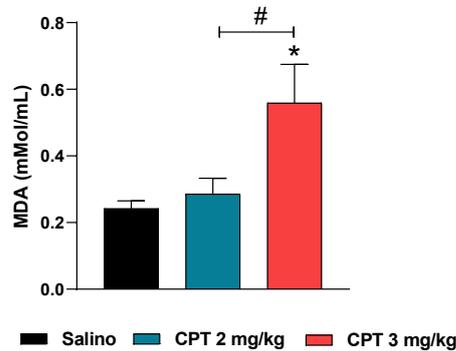


Figura 3: Niveles plasmáticos de Malondialdehído (MDA) en los animales tras el tratamiento durante 5 semanas con Salino, Cisplatino (CPT) 2 mg/Kg y CPT 3 mg/Kg. Los datos representan la Media  $\pm$  E.E.M (n=4). Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Tukey para el tratamiento estadístico de los datos (\*  $p < 0,05$  vs Salino; #  $p < 0,05$  vs CPT 2 mg/Kg).

#### 4.1.2.2. Niveles plasmáticos de Creatinina en los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg)

En la Figura 4 se presentan los niveles de Creatinina de los animales tratados durante 5 semanas con Salino, CPT 2 mg/Kg y CPT 3 mg/Kg.

El tratamiento con CPT 2 mg/Kg causó un aumento en los niveles plasmáticos de Creatinina, que no llegó a ser significativo en comparación con los valores obtenidos en los animales del grupo Salino (CPT 2 mg/Kg:  $0,81 \pm 0,19$  mg/mL (n=6),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $0,25 \pm 0,02$  mg/mL (n=6)). Sin embargo, el tratamiento con CPT 3 mg/Kg sí ocasionó un aumento significativo en los niveles plasmáticos de Creatinina con respecto a los animales del grupo Salino (CPT 3 mg/Kg:  $2,28 \pm 0,53$  mg/mL (n=6),  $p < 0,01$  vs. Salino  $0,25 \pm 0,02$  mg/mL (n=6)).

Este aumento de los niveles plasmáticos de Creatinina en los animales tratados con CPT 3 mg/Kg fue además significativamente superior al de los animales a los que se administró CPT 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg:  $0,81 \pm 0,19$  mg/mL (n=6),  $p > 0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $2,28 \pm 0,53$  mg/mL (n=6)).

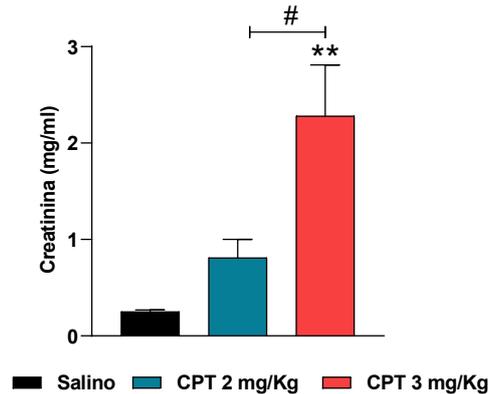


Figura 4: Niveles plasmáticos de Creatinina en los animales tras el tratamiento durante 5 semanas con Salino, Cisplatino (CPT) 2 mg/Kg y CPT 3 mg/Kg. Los datos representan la Media  $\pm$  E.E.M (n=6). Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Tukey para el tratamiento estadístico de los datos (\*\* p<0,01 vs Salino; #p<0,05 vs CPT 2 mg/Kg).

#### 4.1.2.3. Niveles plasmáticos de citoquinas en los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg)

En la Tabla 9 se presentan los niveles de las diferentes citoquinas en los animales tratados durante 5 semanas con Salino, CPT 2 mg/Kg y CPT 3 mg/Kg. No se pudieron obtener datos para las siguientes citoquinas: IL-2, IL-5, IL-17 y VEGF, debido a que sus niveles en las muestras procesadas estaban por debajo del umbral de detección del equipo utilizado.

El tratamiento con CPT 2 mg/Kg no produjo cambios en los niveles plasmáticos de la mayoría de las citoquinas analizadas en comparación con los niveles obtenidos de estos mediadores en los animales tratados con Salino. Únicamente en el caso de la IL-18, el tratamiento con CPT 2 mg/Kg ocasionó un ligero aumento de esta citoquina en comparación con los animales tratados con Salino (CPT 2 mg/Kg:  $584,9 \pm 87,80$  pg/mL, (n=4), P>0,05 vs. Salino:  $298,5 \pm 54,51$  pg/mL (n=4)) (Tabla 9).

El tratamiento crónico con CPT 3 mg/Kg tampoco produjo cambios significativos en los niveles plasmáticos de la mayoría de las citoquinas analizadas. Sin embargo, este tratamiento provocó un aumento significativo de los niveles de IL-18 en comparación con los animales tratados con Salino (CPT 3 mg/Kg:  $5834 \pm 1581$  pg/mL, (n=4), P<0,01 vs. Salino:  $298,5 \pm 54,51$  pg/mL (n=4)) (Tabla 9).

Por último, los niveles plasmáticos de IL-18 en los animales tratados con CPT 3 mg/Kg, también fueron significativamente superiores a los de los animales tratados con CPT 2 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg:  $5834 \pm 1581$  pg/mL, (n=4), P<0,01 vs. CPT 2 mg/Kg:  $584,90 \pm 87,80$  pg/mL, (n=4)).

Analito	Salino (pg/mL)	CPT 2 mg/Kg (pg/mL)	CPT 3 mg/Kg (pg/mL)	p
<b>G-CSF</b>	56,58±4,51	47,94±9,56	51,67±3,96	ns
<b>(GM)-CSF</b>	85,17±8,74	78,72±4,19	90,58±13,25	ns
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	118,9±12,77	87,87±23,55	94,88±7,89	ns
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	28,36±2,77	30,31±8,40	28,50±2,34	ns
<b>IL-2</b>	-	-	-	
<b>IL-5</b>	-	-	-	
<b>IL-6</b>	209,1±38,14	180,8±32,84	189,7±17,55	ns
<b>IL-7</b>	-	-	-	
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	353,5±53,19	299,5±53,77	314,90±41,38	ns
<b>IL-4</b>	89,77±19,93	98,95±23,13	85,73±14,46	ns
<b>IL-7</b>	70,59±9,30	56,19±14,30	62,84±7,42	ns
<b>IL-10</b>	214,2±17,11	234,7±57,21	194,8±34,51	ns
<b>IL-12p70</b>	191,2±54,67	154,7±57,15	147,1±15,49	ns
<b>IL-13</b>	89,65±16,72	61,81±6,55	87,46±15,31	ns
<b>IL-18</b>	<b>298,5±54,51</b>	<b>584,9±87,80</b>	<b>5834±1581<sup>***</sup></b>	<b>&lt;0,01</b>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	153,8±29,94	172,9±40,13	199,4±22,38	ns
<b>MCP-1</b>	22195±2163	27221±4797	25477±1171	ns
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	44,72±1,66	43,33±7,67	50,53±5,82	ns
<b>RANTES</b>	10526±1073	10651±1759	13436±1337	ns
<b>MIP-3<math>\alpha</math></b>	1406±113,1	1414±112,7	1297±16,45	ns
<b>GRO/KC</b>	278,9±41,11	493,8±155,2	336,8±104,8	ns
<b>VEGF</b>	-	-	-	

Tabla 9: Niveles plasmáticos de citoquinas en los animales tras el tratamiento durante 5 semanas con Salino, Cisplatino (CPT) 2 mg/Kg y CPT 3 mg/Kg. Los datos representan la Media  $\pm$  E.E.M (n=4). Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test post-hoc Tukey para el tratamiento estadístico de los datos (ns: No significativo, \*\* p<0,01 vs Salino; ## p<0,01 vs CPT 2 mg/Kg).

#### 4.1.3. Parámetros cardiovasculares

##### 4.1.3.1. Presión arterial y frecuencia cardiaca en los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg)

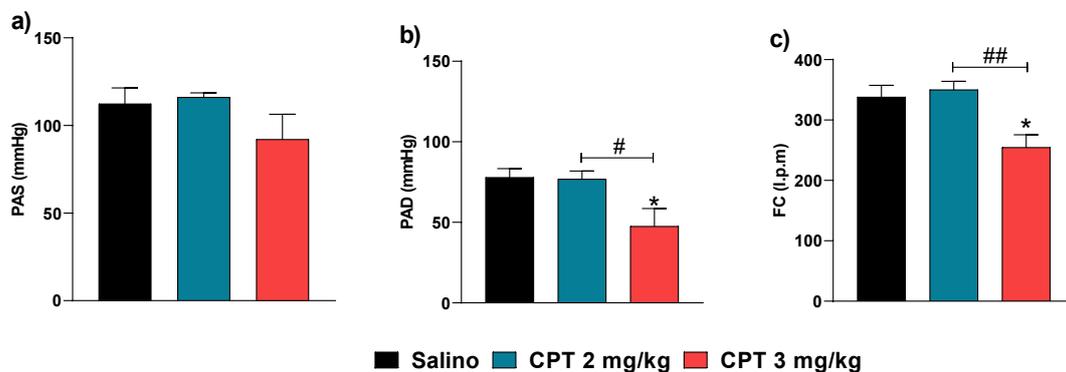
En este apartado se presentan los valores de Presión Arterial Sistólica (PAS) (Figura 5 a), Presión Arterial Diastólica (PAD) (Figura 5 b) y Frecuencia Cardiaca (FC) (Figura 5 c) de los animales tras el tratamiento durante 5 semanas con Salino, CPT 2 mg/Kg y CPT 3 mg/Kg.

En el grupo de animales tratados con CPT 2 mg/Kg, no se observaron cambios en los niveles de PAS, PAD y FC en comparación con los animales tratados con Salino

(PAS: CPT 2 mg/Kg:  $116,09 \pm 2,54$  mm Hg (n=10),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $112,33 \pm 9,05$  mm Hg (n=10); PAD: CPT 2 mg/Kg:  $76,91 \pm 4,99$  mm Hg (n=10),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $77,87 \pm 5,50$  mm Hg (n=10); FC: CPT2 mg/Kg:  $350,11 \pm 14,11$  l.p.m (n=10),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $338,09 \pm 19,40$  l.p.m (n=10)).

En el grupo de animales tratados con CPT 3 mg/Kg, los valores de PAS fueron ligeramente menores que los de los animales tratados con Salino (CPT 3 mg/Kg:  $92,13 \pm 14,25$  mmHg (n=7),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $112,33 \pm 9,05$  mmHg (n=10)). En cambio, en estos animales se observó una disminución estadísticamente significativa en los niveles de PAD en comparación con los obtenidos en los animales tratados con Salino (CPT 3 mg/Kg:  $47,53 \pm 11,08$  mmHg (n=7),  $p < 0,05$  vs. Salino:  $77,87 \pm 5,50$  mmHg (n=10)). Por otra parte, también se observó una disminución significativa en los niveles de FC en el grupo tratado con CPT 3 mg/Kg respecto a los animales tratados con Salino (CPT 3 mg/Kg:  $254,72 \pm 20,82$  l.p.m (n=7),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $338,09 \pm 19,40$  l.p.m (n=10))

Por último, los animales tratados con CPT 3 mg/Kg mostraron valores de PAS y PAD inferiores a los de los animales del grupo CPT 2 mg/Kg, resultando los mismos significativamente diferentes en el caso de la PAD (PAS: CPT 2 mg/Kg:  $116,09 \pm 2,54$  mmHg (n=10),  $p > 0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $92,13 \pm 14,25$  mmHg (n=7); PAD: CPT 2 mg/Kg:  $76,91 \pm 4,99$  mmHg (n=10),  $p < 0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $47,53 \pm 11,08$  mmHg (n=7)). En el caso de la FC, no se observaron diferencias significativas entre los valores de los dos grupos de animales tratados con el antitumoral (CPT 2 mg/Kg:  $350,11 \pm 14,11$  l.p.m (n=10),  $p > 0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $343,42 \pm 21,21$  l.p.m (n=7)).



**Figura 5: (a) Presión Arterial Sistólica (PAS), (b) Presión Arterial Diastólica (PAD) y, (c) Frecuencia Cardíaca (FC) en animales anestesiados tras el tratamiento durante 5 semanas con Salino, Cisplatino (CPT) 2 mg/Kg y CPT 3 mg/Kg. Los datos representan la Media  $\pm$  E.E.M (n=7-10). Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Tukey para el tratamiento estadístico de los datos (\*  $p < 0,05$  vs Salino; #  $< 0,05$  vs CPT 2 mg/Kg). l.p.m: latidos por minuto.**

#### 4.1.3.2. Función cardíaca basal en los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg)

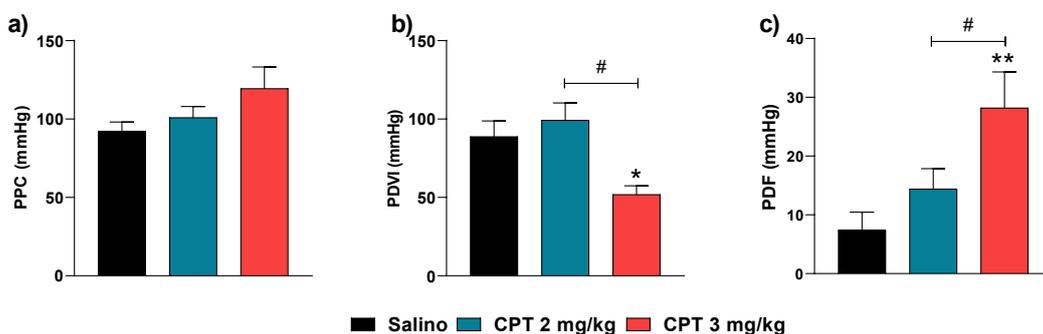
En este apartado se presentan los valores de Presión de Perfusión de las Coronarias (PPC) (Figura 6 a), Presión Desarrollada por el Ventrículo Izquierdo (PDVI) (Figura 6 b) y Presión Diastólica Final (PDF) (Figura 6 c) obtenidos en la preparación de

corazón aislado y perfundido de los animales tras el tratamiento durante 5 semanas con Salino, CPT 2 mg/Kg y CPT 3 mg/Kg.

Los animales tratados con CPT 2 mg/Kg presentaron valores de PPC similares a los obtenidos en los animales tratados con Salino (CPT 2 mg/Kg:  $100,93 \pm 7,03$  mmHg (n=10),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $92,38 \pm 5,77$  mmHg (n=10)). En relación con la PDVI, los animales tratados con CPT 2 mg/Kg también presentaron valores similares a los animales tratados con Salino (CPT 2 mg/Kg:  $99,23 \pm 11,09$  mmHg (n=10),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $88,80 \pm 10,00$  mmHg (n=10)). Sin embargo, en los animales del grupo CPT 2 mg/Kg se observó un ligero aumento en la PDF en relación con la obtenida en los animales del grupo Salino (CPT 2 mg/Kg:  $14,42 \pm 3,44$  mmHg (n=10),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $7,40 \pm 3,10$  mmHg (n=10)).

El tratamiento crónico con CPT 3 mg/Kg produjo un ligero aumento en la PPC de los animales en comparación con la obtenida en los animales tratados con Salino (CPT 3 mg/Kg:  $119,44 \pm 13,82$  mmHg (n=8),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $92,38 \pm 5,77$  mmHg (n=10)). Por otra parte, en los animales tratados con CPT 3 mg/Kg se produjo, en comparación con los animales tratados con Salino, una disminución significativa de la PDVI (CPT 3 mg/Kg:  $51,86 \pm 5,59$  mmHg (n=8),  $p < 0,05$  vs. Salino:  $88,80 \pm 10,00$  mmHg (n=10)), que se acompañó con un aumento significativo en la PDF (CPT 3 mg/Kg:  $32,31 \pm 5,23$  mmHg (n=7),  $p < 0,001$  vs. Salino:  $7,40 \pm 3,10$  mmHg (n=10)).

Por último, al comparar los valores entre los animales tratados con CPT 2 mg/Kg y los animales tratados con CPT 3 mg/Kg, no se observaron diferencias en los valores de la PPC de los animales de ambos grupos (CPT 2 mg/Kg:  $100,93 \pm 7,03$  mmHg (n=10),  $p > 0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $119,44 \pm 13,82$  mmHg (n=8)). Sin embargo, el tratamiento con CPT 3 mg/Kg produjo una disminución significativa en la PDVI de los animales en comparación con la obtenida en los animales tratados con CPT 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg:  $99,23 \pm 11,09$  mmHg (n=10),  $p > 0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $51,86 \pm 5,59$  mmHg (n=8)). Más aún, el tratamiento con CPT 3 mg/Kg produjo un aumento significativo de la PDF de los animales en comparación con la obtenida en los animales tratados con CPT 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg:  $14,42 \pm 3,44$  mmHg (n=10),  $p < 0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $32,31 \pm 5,23$  mmHg (n=7)).



**Figura 6:** (a) Presión de Perfusión de las Coronarias (PPC), (b) Presión Desarrollada por el Ventrículo Izquierdo (PDVI) y, (c) Presión Diastólica Final (PDF) en preparaciones de corazón aislado y perfundido de animales tras el tratamiento durante 5 semanas con Salino, Cisplatino (CPT) 2 mg/Kg y CPT 3 mg/Kg. Los datos representan la Media  $\pm$  E.E.M (n=8-10). Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test post-hoc Tukey para el tratamiento estadístico de los datos (\*  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  vs Salino; # $p < 0,05$  vs CPT 2 mg/Kg).

#### 4.1.3.3. Índices cardiacos en los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg)

En este apartado se presentan el Índice de Masa Cardíaco (IMc) (Figura 7 a) y el Índice de Masa del Ventrículo Izquierdo (IMVI) (Figura 7 b) de los animales tras el tratamiento durante 5 semanas con Salino, CPT 2 mg/Kg y CPT 3 mg/Kg.

El tratamiento con CPT 2 mg/Kg no produjo cambios ni en el IMc, ni en el IMVI de los animales en comparación con el obtenido en los animales tratados con Salino (IMc: CPT 2 mg/Kg:  $2,71 \pm 0,08$  mg/g (n=10),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $2,82 \pm 0,08$  mg/g (n=10); IMVI: CPT 2 mg/Kg:  $1,81 \pm 0,06$  mg/g (n=10),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $1,89 \pm 0,05$  mg/g (n=10)).

Sin embargo, el tratamiento con CPT 3 mg/Kg produjo un aumento significativo tanto del IMc como el IMVI de los animales en comparación con el de los animales tratados con Salino (IMc: CPT 3 mg/Kg:  $3,26 \pm 0,11$  mg/g (n=8),  $p < 0,01$  vs. Salino:  $2,82 \pm 0,08$  mg/g (n=10); IMVI: CPT 3 mg/Kg:  $2,14 \pm 0,05$  mg/g (n=8),  $p < 0,01$  vs. Salino:  $1,89 \pm 0,05$  mg/g (n=10)). Mas aún, los valores de IMc e IMVI de los animales tratados con CPT 3 mg/Kg resultaron significativamente superiores a los obtenidos en los animales tratados con CPT 2 mg/Kg (IMc: CPT 2 mg/Kg:  $2,71 \pm 0,08$  mg/g (n=10),  $p < 0,01$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $3,26 \pm 0,11$  mg/g (n=8); IMVI: CPT 2 mg/Kg:  $1,81 \pm 0,06$  mg/g (n=10),  $p < 0,01$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $2,14 \pm 0,05$  mg/g (n=8)).

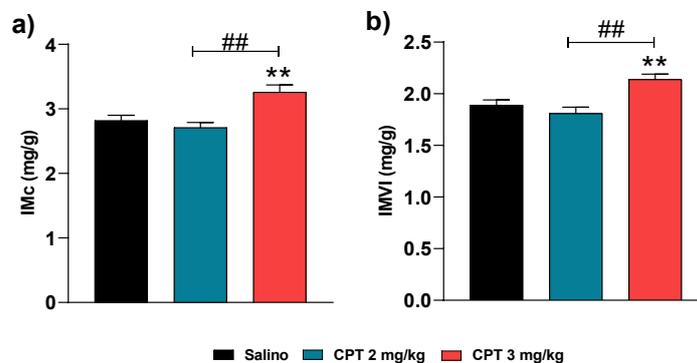


Figura 7: (a) Índice de Masa cardíaco (IMc), (b) Índice de Masa del Ventrículo Izquierdo (IMVI) de animales tras el tratamiento durante 5 semanas con Salino, Cisplatino (CPT) 2 mg/Kg y Cisplatino 3 mg/Kg. Los datos representan la Media  $\pm$  E.E.M (n=8-10). Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Tukey para el tratamiento estadístico de los datos (\*\* $p < 0,01$  vs Salino; ## $p < 0,01$  vs CPT 2 mg/Kg).

#### 4.1.3.4. Reactividad vascular en aorta en los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg)

En este apartado se presentan los resultados de reactividad vascular en la aorta de los animales de los diferentes grupos experimentales. En la Figura 8, se representan: la función contráctil (Figura 8 a), la relajación dependiente de endotelio (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** b), y la relajación no dependiente de endotelio (Figura 8 c), así como el área bajo las correspondientes curvas concentración-respuesta (Figura 8 d, e y f) en las preparaciones obtenidas de los animales tras el tratamiento durante 5 semanas con Salino, CPT 2 mg/Kg y CPT 3 mg/Kg.

El tratamiento con CPT 2 mg/Kg no ocasionó cambios en la función contráctil de la aorta de los animales en comparación con la función obtenida en las preparaciones procedentes de los animales tratados con Salino ( $E_{max}$ : CPT 2 mg/Kg:  $1,08 \pm 0,12$  g (n=10),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $1,16 \pm 0,10$  g (n=10); ABC: CPT 2 mg/Kg:  $2,52 \pm 0,38$  (n=10),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $2,61 \pm 0,30$  (n=10)). Por otra parte, el tratamiento con CPT 2 mg/Kg produjo una disminución significativa de la relajación dependiente de endotelio en la aorta de los animales de este grupo en comparación con la de los animales tratados con Salino ( $E_{max}$ : CPT 2 mg/Kg:  $55,92 \pm 3,26$  % (n=12),  $p < 0,0001$  vs. Salino:  $80,78 \pm 3,56$  % (n=12); ABC: CPT 2 mg/Kg:  $118,10 \pm 13,3$   $p < 0,01$  vs. Salino:  $185,3 \pm 17,5$  (n=12)). Sin embargo, el tratamiento con CPT 2 mg/Kg no afectó la relajación no dependiente de endotelio en las preparaciones de los animales de este grupo en comparación con las respuestas procedentes de animales tratados con Salino ( $E_{max}$ : CPT 2 mg/Kg:  $117,26 \pm 3,07$  % (n=12),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $117,16 \pm 2,87$  % (n=11); ABC: CPT 2 mg/Kg:  $167,10 \pm 8,73$  (n=10),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $184,30 \pm 8,70$  (n=11)).

El tratamiento con CPT 3 mg/Kg ocasionó cambios similares a los obtenidos con el tratamiento de CPT 2 mg/Kg en la contractilidad y relajación dependiente de endotelio en aorta. Así, el tratamiento con CPT 3 mg/Kg tampoco modificó la función contráctil de este vaso en comparación con el tratamiento con Salino ( $E_{max}$ : CPT 3 mg/Kg:  $1,27 \pm 0,11$  g (n=10),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $1,16 \pm 0,10$  g (n=10); ABC: CPT 3 mg/Kg:  $2,81 \pm 0,44$  (n=10)  $p > 0,05$  vs. Salino:  $2,61 \pm 0,30$  (n=10)), y ocasionó una disminución significativa de la relajación dependiente de endotelio ( $E_{max}$ : CPT 3 mg/Kg:  $62,88 \pm 3,93$  % (n=11),  $p < 0,0001$  vs. Salino:  $80,78 \pm 3,56$  % (n=12); ABC: CPT 3 mg/Kg:  $118,10 \pm 13,30$  (n=10)  $p < 0,05$  vs. Salino:  $185,3 \pm 17,5$  (n=12)). Sin embargo, el tratamiento con CPT 3 mg/Kg ocasiona, además, un aumento significativo de la relajación no dependiente de endotelio, produciéndose un desplazamiento de la curva concentración-respuesta a NPS y un incremento en el área bajo la curva correspondiente ( $E_{max}$ : CPT 3 mg/Kg:  $E_{max}: 126,79 \pm 3,99$  % (n=10),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $117,16 \pm 2,87$  % (n=11); ABC: CPT 3 mg/Kg:  $239,90 \pm 13,69$  (n=10)  $p < 0,01$  vs. Salino:  $184,30 \pm 8,66$  (ABC) (n=10)).

Al comparar la reactividad vascular de la aorta en los dos grupos de animales tratados con las dos dosis de antitumoral, no se observaron diferencias ni en la función contráctil de la aorta entre ambos grupos experimentales ( $E_{max}$ : CPT 2 mg/Kg:  $1,08 \pm 0,12$  g (n=10),  $p > 0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $1,27 \pm 0,11$  g (n=10); ABC: CPT 2 mg/Kg:  $2,52 \pm 0,38$  (n=10),  $p > 0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $2,81 \pm 0,44$  (n=10)), ni en la relajación dependiente de endotelio ( $E_{max}$ : CPT 2 mg/Kg:  $55,92 \pm 3,26$  % (n=12),  $p > 0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg:

## **Resultados**

62,88±3,93 % (n=11); ABC: CPT 2 mg/Kg: 118,10±13,3 p<0,05 vs. CPT 3 mg/Kg: 118,10±13,30 (n=10)). Sin embargo, en el grupo de animales tratados con CPT 3 mg/Kg, la relajación no dependiente de endotelio de la aorta fue significativamente mayor que la de las preparaciones obtenidas de los animales tratados con CPT 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg: E<sub>max</sub>:117,26±3,07 % (n=12) p>0,05 vs. CPT 3 mg/Kg: E<sub>max</sub>: 126,79±3,99 % (n=10); ABC: CPT 2 mg/Kg: 167,10±8,73 (n=6) p<0,01 vs. CPT 3 mg/Kg: 239,90±13,69 (n=10)).

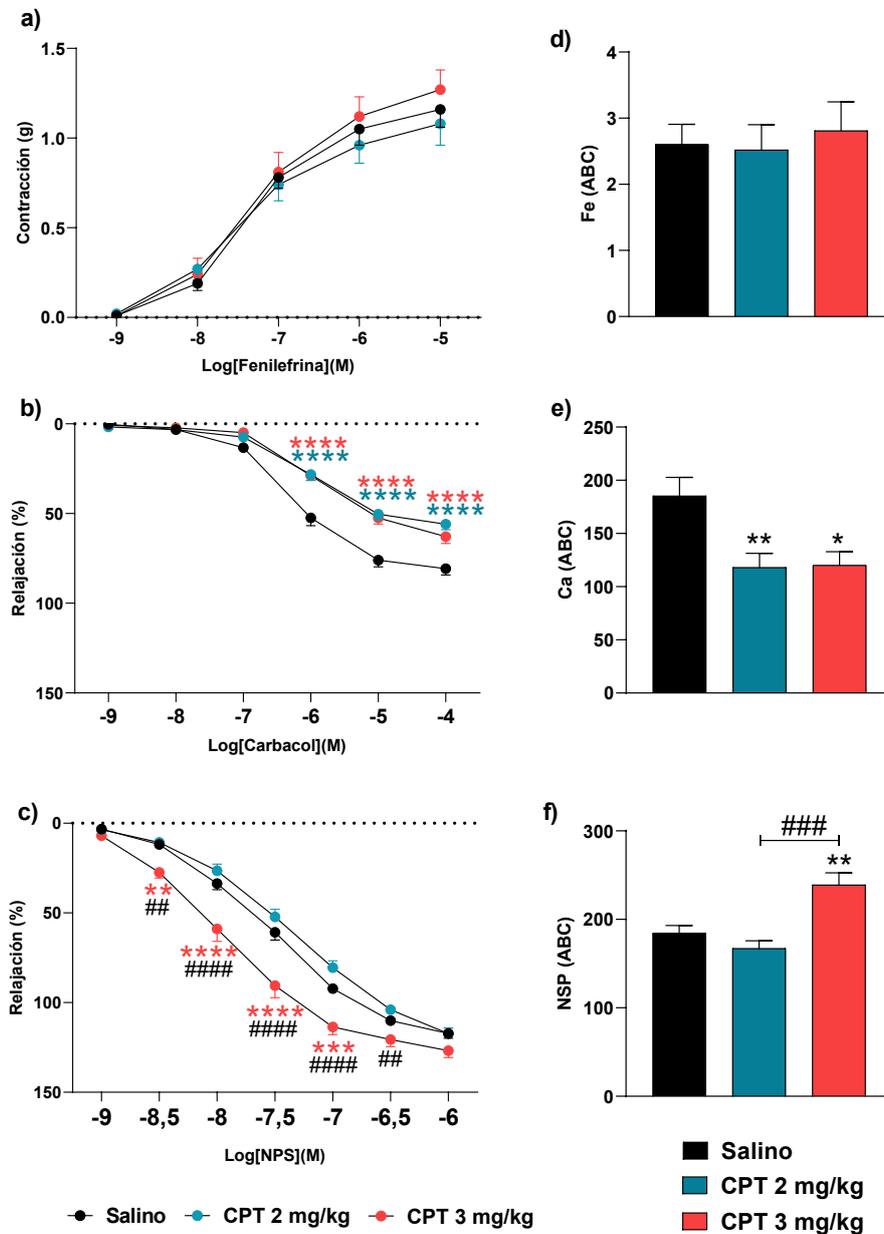


Figura 8: (a) Curva concentración-respuesta a Fe ( $10^{-9}\text{M}$ - $10^{-5}\text{M}$ ), (b) Curva concentración-respuesta a Ca ( $10^{-9}\text{M}$ - $10^{-4}\text{M}$ ), (c) Curva concentración-respuesta de NPS ( $10^{-9}\text{M}$ - $10^{-6}\text{M}$ ), (d) Área bajo la curva de la curva concentración-respuesta a Fe, (e) Área bajo la curva de la curva concentración-respuesta a Ca, (f) Área bajo la curva de la curva concentración-respuesta a NPS, en anillos aislados de aorta de rata procedentes de animales tras el tratamiento durante 5 semanas con Salino, Cisplatino (CPT) 2 mg/Kg y CPT 3 mg/Kg. Los datos representan la Media  $\pm$  E.E.M (n=10). Para el tratamiento estadístico de las curvas concentración-respuesta se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de un test *post-hoc* Tukey. Para el tratamiento estadístico de los datos del área bajo la curva se utilizó un análisis *t-student* con corrección de Welch. (\*\*  $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ ; \*\*\*\* $p<0,0001$  vs Salino; ##  $p<0,01$ ; ####  $p<0,0001$  vs CPT 2 mg/Kg). Fe: Fenilefrina; Ca: Carbacol; NPS: Nitroprusiato sódico; ABC: Área bajo la curva.

#### 4.1.3.5. Reactividad vascular en lecho mesentérico en los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg)

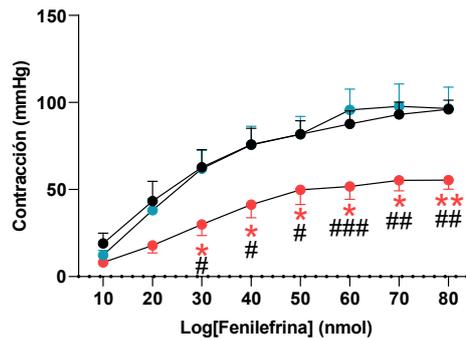
En este apartado se presentan los resultados de reactividad vascular en el lecho mesentérico de los animales de los diferentes grupos experimentales. En la Figura 9, se representan: la función contráctil (Figura 9 a), la relajación dependiente de endotelio (Figura 9 b), y la relajación no dependiente de endotelio (Figura 9 c), así como el área bajo las correspondientes curvas concentración-respuesta (Figura 9 d, e y f) en las preparaciones obtenidas de los animales tras el tratamiento durante 5 semanas con Salino, CPT 2 mg/Kg y CPT 3 mg/Kg.

La función contráctil del lecho mesentérico no se modificó tras el tratamiento con CPT 2 mg/Kg, en comparación, con las preparaciones procedentes de los animales tratados con Salino ( $E_{max}$ : CPT 2 mg/Kg:  $96,54 \pm 12,23$  mmHg ( $n=10$ ),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $96,12 \pm 5,15$  mmHg ( $n=8$ ); ABC: CPT 2 mg/Kg:  $505,30 \pm 67,61$  ( $n=10$ ),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $502,00 \pm 45,55$  ( $n=8$ )). El tratamiento con CPT 2 mg/Kg tampoco modificó la relajación dependiente de endotelio ( $E_{max}$ : CPT 2 mg/Kg:  $72,69 \pm 3,61$  % ( $n=10$ ),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $70,15 \pm 4,46$  % ( $n=11$ ); ABC: CPT 2 mg/Kg:  $150,60 \pm 16,24$  ( $n=10$ ),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $150,38 \pm 25,31$  ( $n=11$ )); ni la relajación no dependiente de endotelio, aunque si produjo un leve aumento del área bajo la curva correspondiente a NPS en comparación con las preparaciones procedentes de animales tratados con Salino ( $E_{max}$ : CPT 2 mg/Kg:  $91,84 \pm 1,18$  % ( $n=9$ ),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $83,47 \pm 3,02$  % ( $n=6$ ); ABC: CPT 2 mg/Kg:  $287,90 \pm 13,35$  ( $n=9$ ),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $233,32 \pm 17,02$  ( $n=6$ )).

El tratamiento con CPT 3 mg/Kg ocasionó una disminución significativa de la contractilidad del lecho mesentérico en comparación con las preparaciones procedentes de los animales tratados con Salino (CPT 3 mg/Kg:  $55,38 \pm 5,23$  mmHg ( $n=10$ ),  $p < 0,001$  vs. Salino:  $96,12 \pm 5,15$  mmHg ( $n=8$ ); ABC: CPT 3 mg/Kg:  $277,84 \pm 38,24$  ( $n=10$ ),  $p < 0,05$  vs. Salino:  $502,02 \pm 45,56$  ( $n=8$ )). Sin embargo, el tratamiento con CPT 3 mg/Kg no modificó ni la relajación dependiente de endotelio (CPT 3 mg/Kg:  $80,49 \pm 2,48$  % ( $n=9$ ),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $83,47 \pm 3,02$  % ( $n=10$ )), ni la relajación independiente del endotelio ( $E_{max}$ : CPT 3 mg/Kg:  $97,30 \pm 1,66$  % ( $n=6$ ),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $83,47 \pm 3,02$  % ( $n=6$ ), aunque en ambos casos se observó un ligero aumento en las áreas bajo la curva correspondientes en comparación con las preparaciones procedentes de los animales tratados con Salino (ABC: Ca: CPT 3 mg/Kg:  $97,30 \pm 1,66$  % ( $n=6$ ),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $83,47 \pm 3,02$  % ( $n=6$ ); ABC: NPS: CPT 3 mg/Kg:  $276,88 \pm 27,59$  ( $n=6$ ),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $233,32 \pm 17,02$  ( $n=6$ )).

Al comparar la reactividad vascular del lecho mesentérico en los dos grupos de animales tratados con las dos dosis de antitumoral, se observó que en las preparaciones de animales tratados con CPT 3 mg/Kg, tanto la función contráctil como el área bajo la curva eran significativamente inferiores que las de las preparaciones procedentes de los animales tratados con CPT 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg:  $96,54 \pm 12,23$  mmHg ( $n=10$ ),  $p < 0,001$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $55,38 \pm 5,23$  mmHg ( $n=10$ ); ABC: CPT 2 mg/Kg:  $505,30 \pm 67,61$  ( $n=10$ ),  $p < 0,001$  vs. Salino:  $502,02 \pm 45,56$  ( $n=8$ )). Sin embargo, no se observaron diferencias en

la relajación dependiente de endotelio (CPT 2 mg/Kg:  $72,69 \pm 3,61$  % (n=10),  $p > 0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $80,49 \pm 2,48$  % (n=9); ABC: CPT 2 mg/Kg  $150,60 \pm 16,24$  (n=10),  $p > 0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $188,31 \pm 25,77$  (n=9)), ni tampoco en la relajación no dependiente de endotelio (CPT 2 mg/Kg:  $91,84 \pm 1,18$  % (n=9),  $p > 0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $97,30 \pm 1,66$  % (n=6); ABC: CPT 2 mg/Kg:  $287,90 \pm 13,35$  (n=9),  $p > 0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $276,88 \pm 27,59$  (n=6)).



**Figura 9:** (a) Curva concentración-respuesta a Fe (10-80 nmol), (b) Curva concentración-respuesta a Ca (0,5-50.000 nmol), (c) Curva concentración-respuesta de NPS (0,1-1000 nmol), (d) Área bajo la curva de la curva concentración-respuesta a Fe, (e) Área bajo la curva de la curva concentración-respuesta a Ca, (f) Área bajo la curva de la curva concentración-respuesta a NPS, en el lecho mesentérico perfundido procedente de animales tras el tratamiento durante 5 semanas con Salino, Cisplatino (CPT) 2 mg/Kg y CPT 3 mg/Kg. Los datos están representados como Media  $\pm$  E.E.M (n=6-10). Para el tratamiento estadístico de las curvas concentración-respuesta se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de un test *post-hoc* Tukey. Para el tratamiento estadístico de los datos del área bajo la curva se utilizó un análisis *t-student* con corrección de Welch (\*  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  vs salino; # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$ ; ### $p < 0,001$  vs CPT 2 mg/Kg). Fe: Fenilefrina; Ca: Carbacol; NPS: Nitroprusiato sódico: ABC: Área bajo la curva.

#### 4.1.4. Expresión proteica

##### 4.1.4.1. Expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3 en el ventrículo izquierdo de los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg)

En este apartado se presentan los resultados de la expresión proteica en el tejido cardiaco de los animales de los diferentes grupos experimentales. En la Figura 10, se representan: expresión proteica de TLR4 (Figura 10 a), expresión proteica de MyD88 (Figura 10 b), y la expresión proteica de NLRP3 (Figura 10 c), en el tejido cardiaco obtenido de los animales tras el tratamiento durante 5 semanas con Salino, CPT 2 mg/Kg y CPT 3 mg/Kg.

El tratamiento con CPT 2 mg/Kg no modificó la expresión proteica de TLR4, ni MyD88, en el ventrículo izquierdo de los animales en comparación con dicha expresión

en el tejido procedente de animales tratados con Salino (TLR4: CPT 2 mg/Kg:  $106,86 \pm 6,66$  U.A (n=6),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $100,00 \pm 5,66$  U.A (n=6); MyD88: CPT 2 mg/Kg:  $97,99 \pm 5,58$  U.A (n=5)  $p > 0,05$  vs. Salino:  $100,00 \pm 2,19$  U.A (n=4)). Sin embargo, el tratamiento con CPT 2 mg/Kg produjo un aumento, aunque no significativo, de la expresión de NLRP3 en el ventrículo izquierdo, en comparación con su expresión en dicho tejido en el grupo de animales tratados con Salino (CPT 2 mg/Kg:  $234,98 \pm 25,53$  U.A (n=6),  $P > 0,05$  vs. Salino:  $100,12 \pm 8,80$  U.A (n=6)).

El tratamiento con CPT 3 mg/Kg no modificó tampoco la expresión del TLR4 ni de MyD88 en el ventrículo izquierdo de los animales en comparación con su expresión en el tejido procedente de animales tratados con Salino (TLR4: CPT 3 mg/Kg:  $100,41 \pm 5,53$  U.A (n=6),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $100,00 \pm 5,66$  U.A (n=6); MyD88: CPT 3 mg/Kg:  $101,99 \pm 7,91$  U.A (n=6)  $p > 0,05$  vs. Salino:  $100,00 \pm 2,19$  U.A (n=4)). Sin embargo, el tratamiento con CPT 3 mg/Kg sí produjo un aumento significativo de la expresión de NLRP3 en el ventrículo izquierdo de los animales, en comparación con su expresión en dicho tejido en animales tratados con Salino (CPT 3 mg/Kg:  $565,68 \pm 154,63$  U.A (n=5),  $P < 0,01$  vs. Salino:  $100,12 \pm 8,80$  U.A (n=6)).

Por último, no se observaron diferencias en la expresión de TLR4 y MyD88 entre los animales tratados con las dos dosis del antitumoral (TLR4: CPT 2 mg/Kg:  $106,86 \pm 6,66$  U.A (n=6),  $p > 0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $100,41 \pm 5,53$  U.A (n=6); MyD88: CPT 2 mg/Kg:  $97,99 \pm 5,58$  U.A (n=5)  $p > 0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $101,99 \pm 7,91$  U.A (n=6)). No obstante, la administración de CPT 3 mg/Kg, produjo un aumento significativo en la expresión de NLRP3 a nivel cardiaco en comparación con la observada en el grupo de animales tratados con CPT 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg:  $234,98 \pm 25,53$  U.A (n=6),  $P > 0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $565,68 \pm 154,63$  U.A (n=5)).

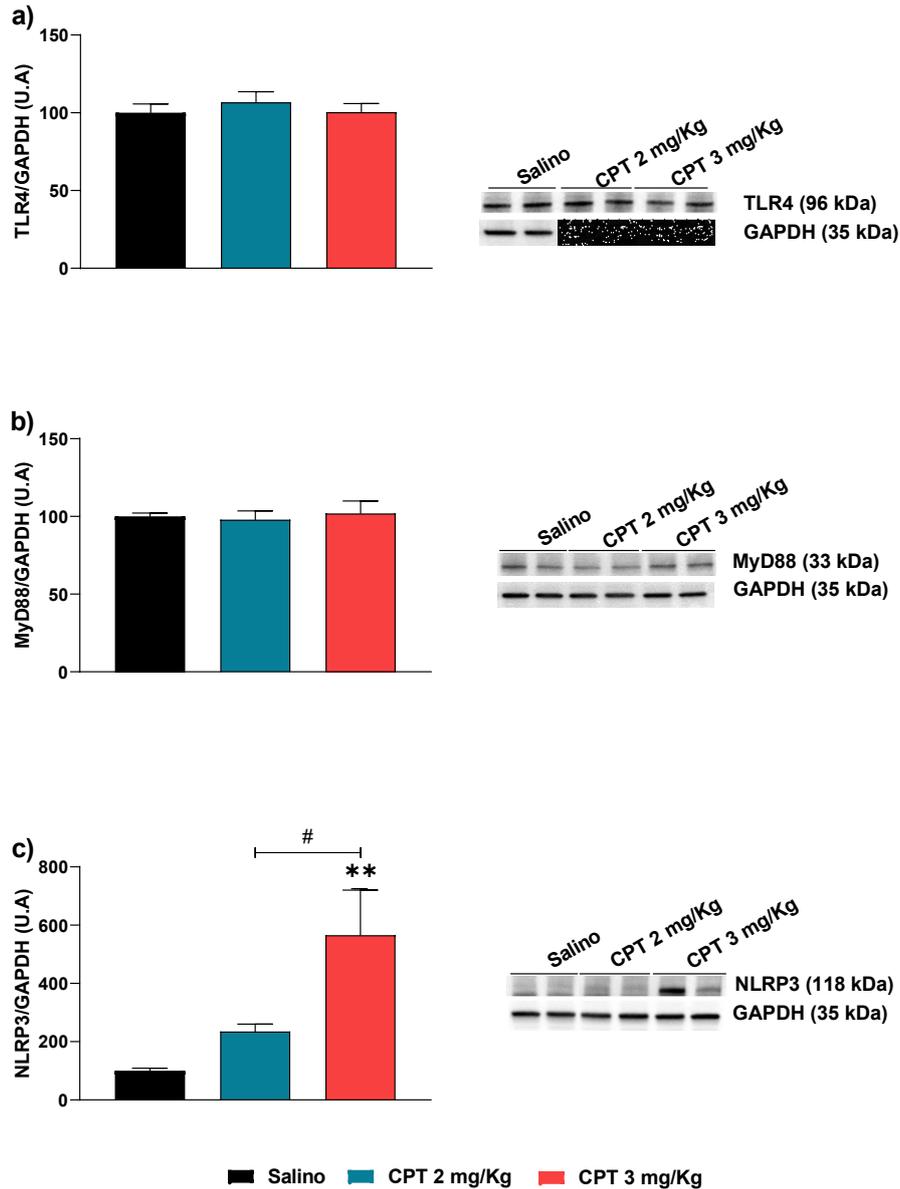


Figura 10: (a) Expresión proteica de TLR4, (b) Expresión proteica de MyD88 y (c) Expresión proteica de NLRP3 en el ventrículo izquierdo procedente de animales tras el tratamiento durante 5 semanas con Salino, Cisplatino (CPT) 2 mg/Kg y CPT 3 mg/Kg. Los datos están representados como Media  $\pm$  E.E.M (n=4-6). Se llevo a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Tukey para el tratamiento estadístico de los datos (\*\*  $p < 0,01$  vs. Salino; #  $p < 0,05$  vs CPT 2 mg/Kg). U.A: Unidades Arbitrarias.

#### 4.1.4.2. Expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3 en la aorta de los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg)

En este apartado se presentan los resultados de la expresión proteica en el tejido de aorta de los animales de los diferentes grupos experimentales. En la Figura 11, se representan: expresión proteica de TLR4 (Figura 11 a), expresión proteica de MyD88 (Figura 11 b), y expresión proteica de NLRP3 (Figura 11 c), obtenida de los animales tras el tratamiento durante 5 semanas con Salino, CPT 2 mg/Kg y CPT 3 mg/Kg.

El tratamiento con CPT 2 mg/Kg no modificó la expresión proteica de TLR4, ni MyD88, en la aorta de los animales en comparación con la expresión de estas proteínas en las preparaciones obtenidas del grupo de animales tratados con Salino (TLR4: CPT 2 mg/Kg:  $97,64 \pm 8,32$  U.A (n=6),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $100,00 \pm 3,50$  U.A (n=6); MyD88: CPT 2 mg/Kg:  $97,99 \pm 5,58$  U.A (n=5),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $100,00 \pm 2,19$  U.A (n=4)). Sin embargo, el tratamiento con CPT 2 mg/Kg produjo una disminución significativa de la expresión de NLRP3 en la aorta de los animales, en comparación con su expresión en este tejido en el grupo de animales tratado con Salino (CPT 2 mg/Kg:  $75,08 \pm 6,90$  U.A (n=6),  $P < 0,05$  vs. Salino:  $100,00 \pm 8,19$  U.A (n=7)).

El tratamiento con CPT 3 mg/Kg tampoco modificó la expresión proteica de TLR4 y MyD88 en la aorta de los animales en comparación con la expresión de estas proteínas en las preparaciones obtenidas del grupo de animales tratado con Salino (TLR4: CPT 3 mg/Kg:  $97,36 \pm 9,88$  U.A (n=5),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $100,00 \pm 3,50$  U.A (n=6); MyD88: CPT 3 mg/Kg:  $101,99 \pm 7,91$  U.A (n=6),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $100,00 \pm 2,19$  U.A (n=4)). Sin embargo, de nuevo, el tratamiento con CPT 3 mg/Kg produjo una disminución significativa de la expresión de NLRP3 en la aorta de los animales en comparación con la expresión de esta proteína en las preparaciones procedentes de animales tratados con Salino (CPT 3 mg/Kg:  $58,64 \pm 3,83$  U.A (n=6),  $P < 0,01$  vs. Salino:  $100,00 \pm 8,19$  U.A (n=7)).

Por último, no se observaron diferencias en la expresión proteica del TLR4 y el MyD88, entre los animales tratados con las dos dosis de cisplatino (TLR4: CPT 2 mg/Kg:  $97,64 \pm 8,32$  U.A (n=6),  $p > 0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $97,36 \pm 9,88$  U.A (n=5); MyD88: CPT 2 mg/Kg:  $97,99 \pm 5,58$  U.A (n=5),  $p > 0,05$  vs CPT 3 mg/Kg: CPT 3 mg/Kg:  $101,99 \pm 7,91$  U.A (n=6)). La expresión proteica de NLRP3 fue menor en la aorta de los animales tratados con CPT 3 mg/Kg que en la de los animales tratados con CPT 2 mg/Kg, sin embargo, no se observaron tampoco diferencias significativas entre estos valores (CPT 2 mg/Kg:  $75,08 \pm 6,90$  U.A (n=6),  $P > 0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $58,64 \pm 3,83$  U.A (n=6)).

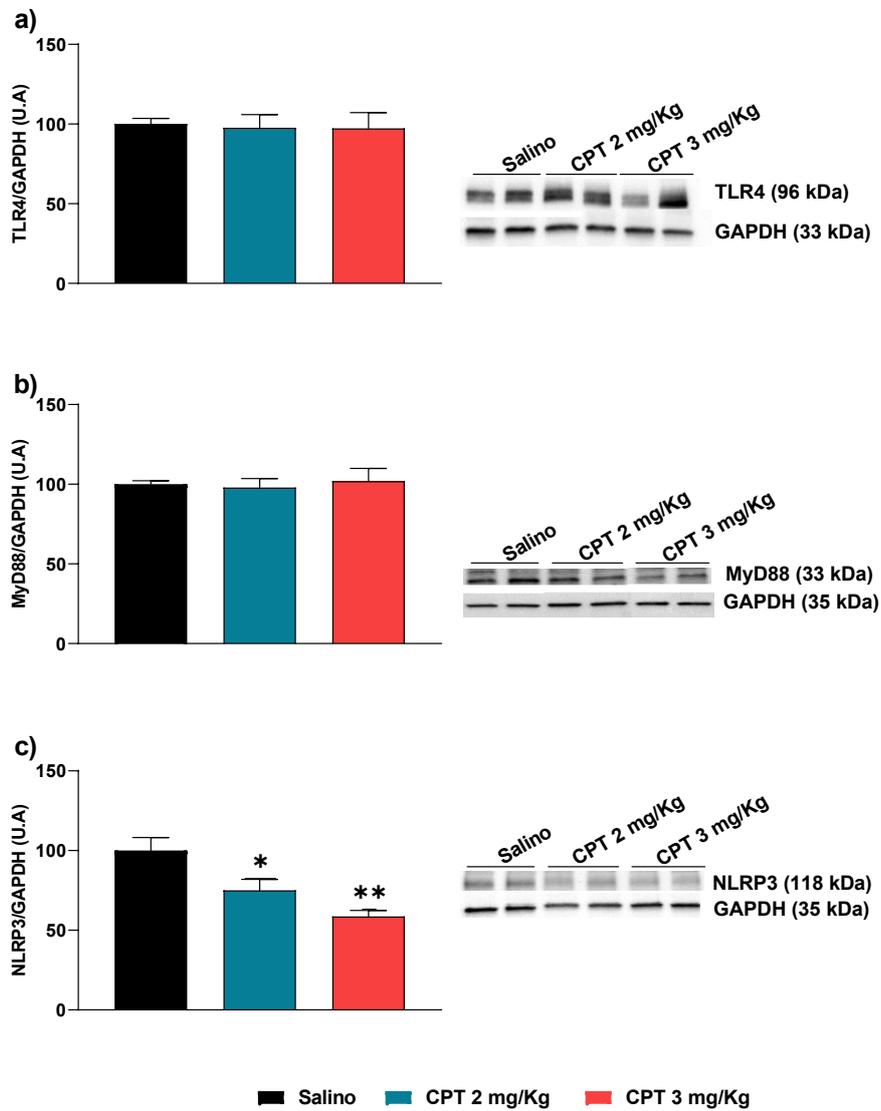


Figura 11: (a) Expresión proteica de TLR4, (b) Expresión proteica de MyD88 y (c) Expresión proteica de NLRP3, en la aorta procedente de animales tras el tratamiento durante 5 semanas con Salino, Cisplatino (CPT) 2 mg/Kg y CPT 3 mg/Kg. Los datos están representados como Media  $\pm$  E.E.M (n=5-6). Se llevo a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Tukey para el tratamiento estadístico de los datos (\*\*p<0,01 vs. salino). U.A: Unidades Arbitrarias.

#### 4.1.4.3. Expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3 en el tejido renal de los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg)

En este apartado se presentan los resultados de la expresión proteica en el tejido renal de los animales de los diferentes grupos experimentales. En la Figura 12, se representan: expresión proteica de TLR4 (Figura 12 a), la expresión proteica de MyD88 (Figura 12 b), y expresión proteica de NLRP3 (Figura 12 c), obtenida de los animales tras el tratamiento durante 5 semanas con Salino, CPT 2 mg/Kg y CPT 3 mg/Kg.

El tratamiento con CPT 2 mg/Kg produjo un aumento, no significativo, de la expresión de TLR4 en el tejido renal de los animales en comparación con su expresión en las muestras de tejido obtenidas en el grupo de animales tratado con Salino (CPT 2 mg/Kg:  $173,77 \pm 18,18$  U.A (n=6),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $100,00 \pm 2,06$  U.A (n=6)). Sin embargo, el tratamiento con CPT 2 mg/Kg aumentó significativamente la expresión de MyD88 en el tejido renal de los animales en comparación con su expresión en las muestras de tejido obtenidas del grupo de animales tratado con Salino (CPT 2 mg/Kg:  $232,03 \pm 36,62$  U.A (n=5),  $p < 0,05$  vs. Salino:  $100,00 \pm 1,40$  U.A (n=6)). Además, la expresión de NLRP3 aumentó también de manera significativa en el tejido renal de animales tratados con CPT 2 mg/Kg en comparación con la expresión de esta proteína en el tejido obtenido de animales tratados con Salino (CPT 2 mg/Kg:  $864,40 \pm 167,53$  U.A (n=6),  $p < 0,01$  vs. Salino:  $100,02 \pm 4,53$  U.A (n=6)).

El tratamiento con CPT 3 mg/Kg aumentó de manera significativa la expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3 en el tejido renal de los animales en comparación con su expresión en las muestras de tejido obtenidas del grupo de animales tratados con Salino (TLR4: CPT 3 mg/Kg:  $379,74 \pm 64,82$  U.A (n=5),  $p < 0,001$  vs. Salino:  $100,00 \pm 2,06$  U.A (n=6); MyD88: CPT 3 mg/Kg:  $342,72 \pm 35,63$  U.A (n=5),  $p < 0,0001$  vs. Salino:  $100,00 \pm 1,40$  U.A (n=6); NLRP3: CPT 3 mg/Kg:  $1664,93 \pm 142,77$  U.A (n=6),  $p < 0,01$  vs. Salino:  $100,02 \pm 4,53$  U.A (n=6)).

Por último, la expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3 a nivel renal en el grupo de animales tratado con CPT 3 mg/Kg fue superior a la expresión de estas proteínas en el tejido procedente de los animales tratados con CPT 2 mg/Kg, resultando dicho aumento estadísticamente significativo en el caso de la expresión de TLR4 y NLRP3 (TLR4: CPT 2 mg/Kg:  $173,77 \pm 18,18$  U.A (n=6),  $p < 0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $379,74 \pm 64,82$  U.A (n=5); MyD88: CPT 2 mg/Kg:  $232,03 \pm 36,62$  U.A (n=5),  $p > 0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $342,72 \pm 35,63$  U.A (n=5); NLRP3: CPT 2 mg/Kg:  $864,40 \pm 167,53$  U.A (n=6),  $p < 0,01$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $1664,93 \pm 142,77$  U.A (n=6)).

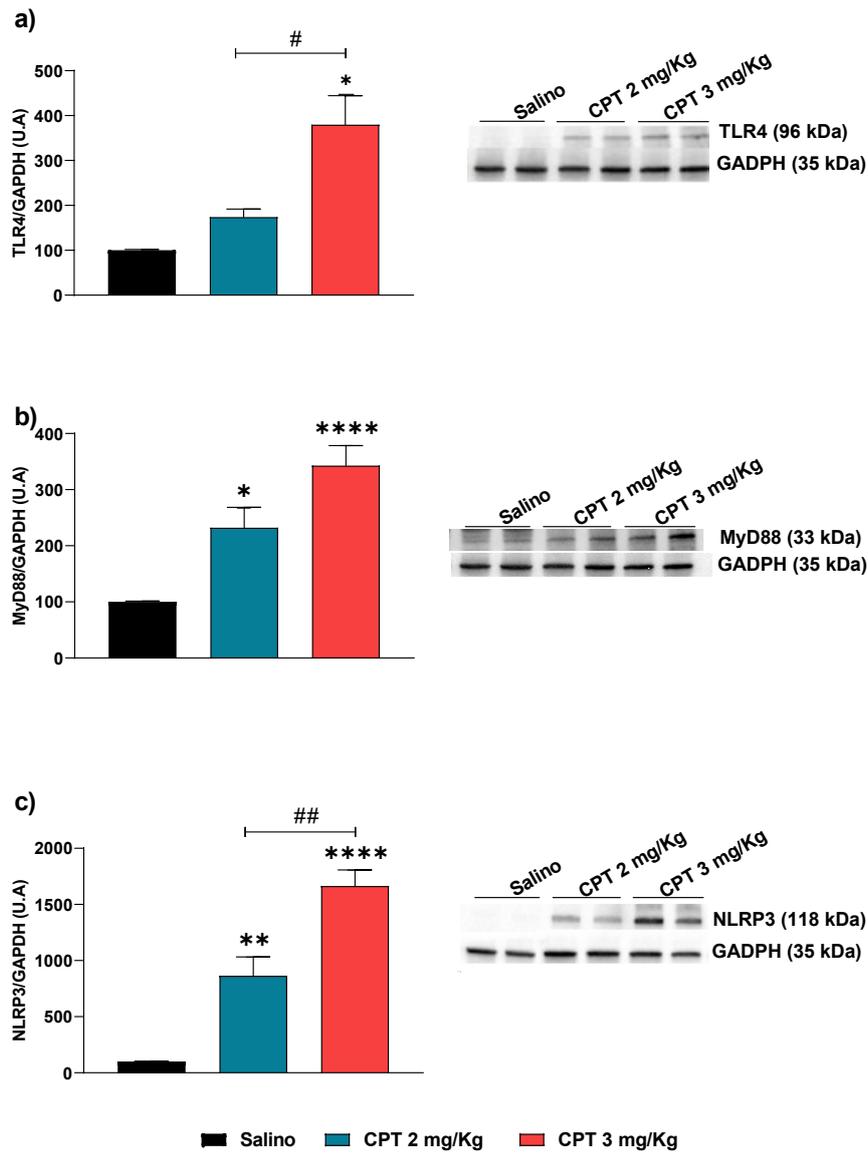


Figura 12: (a) Expresión proteica de TLR4, (b) Expresión proteica de MyD88 y (c) Expresión proteica de NLRP3, en el tejido renal procedente de animales tras el tratamiento durante 5 semanas con Salino, Cisplatino (CPT) 2 mg/Kg y CPT 3 mg/Kg. Los datos están representados como Media  $\pm$  E.E.M (n=5-6). Se llevo a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Tukey para el tratamiento estadístico de los datos (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001 vs. salino; ## p<0,01 vs. CPT 2 mg/Kg). U.A: Unidades Arbitrarias.

**4.1.4.4. Expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3 en la arteria mesentérica de los animales tratados durante 5 semanas con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg)**

En la Figura 13 se muestran los resultados de la evaluación de la expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3 en la capa endotelial, capa muscular lisa, y adventicia de la arteria mesentérica obtenida de los animales tras el tratamiento con Salino, CPT 2 mg/Kg y CPT 3 mg/Kg.

En el endotelio y la capa muscular media, el tratamiento con las dos dosis de cisplatino (CPT 2 mg/Kg y CPT 3 mg/Kg) produjo un aumento de la expresión de TLR4 y MyD88, que fue mayor a la dosis más alta administrada. Sin embargo, la expresión de NLRP3 no se modificó en la capa endotelial, ni en la capa muscular media en comparación con la expresión correspondiente en el grupo de animales tratados con Salino.

En la capa adventicia, el tratamiento con Cisplatino 2 mg/Kg y 3 mg/Kg no ocasionó cambios en la expresión TLR4, MyD88, ni NLRP3.

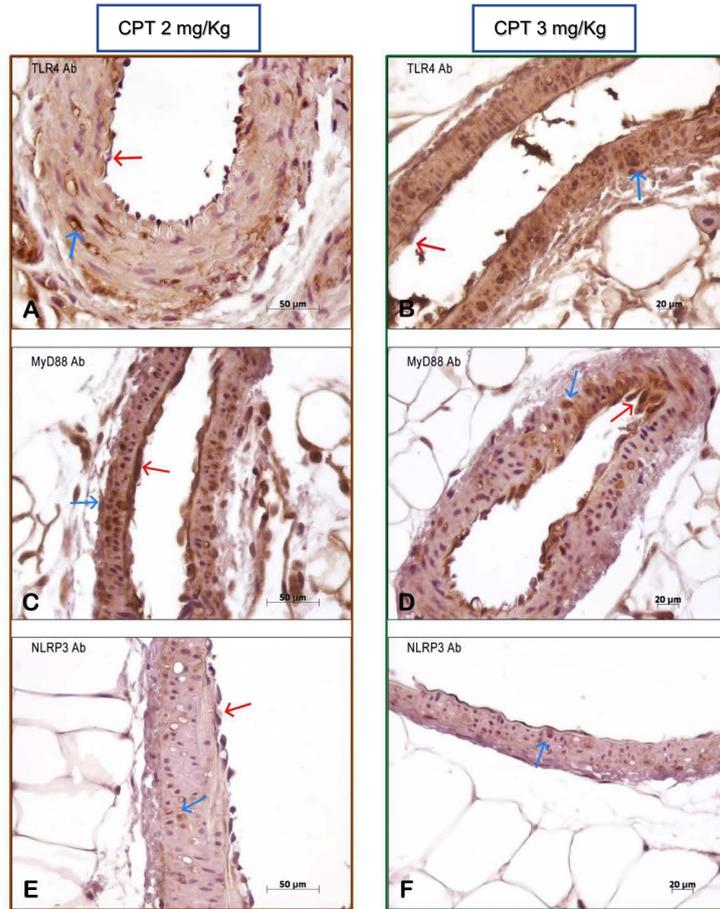


Figura 13: Imágenes representativas de la inmunohistoquímica (40x) en las ramas de la arteria mesentérica, después de la administración de ciclos de cisplatino. (A) Expresión de TLR4 tras el tratamiento con Cisplatino (CPT 2) mg/Kg; (B) Expresión de TLR4 tras el tratamiento con CPT 3 mg/Kg; (C) Expresión de MyD88 tras el tratamiento con CPT 2 mg/Kg; (D) Expresión de MyD88 tras el tratamiento con CPT 3 mg/Kg; (E) Expresión de NLRP3 tras el tratamiento con CPT 2 mg/Kg; (F) Expresión de NLRP3 tras el tratamiento con CPT 3 mg/Kg. Las flechas rojas señalan las células endoteliales, y las flechas azules señalan las células musculares lisas.

## **4.2. Efecto de la administración de TLR4-PA1 en el modelo de administración crónica de cisplatino**

Como se especificó en la sección de “Material y Métodos”, apartado 3.1.1.3 de esta Tesis Doctoral, el vehículo para disolver el antagonista de TLR4, TLR4-PA1, fue Hidroxipropil)metilcelulosa, HPMC, (Romero et al., 2012). Antes de iniciar el desarrollo del tratamiento con el TLR4-PA1 se analizó, el efecto de la administración de este vehículo en los parámetros analizados, obteniéndose resultados similares en los grupos CPT 2 mg/Kg + HPMC y CPT 3 mg/Kg + HPMC a los obtenidos en los grupos de CPT 2 mg/Kg y CPT 3 mg/Kg respectivamente (datos no mostrados).

Por ello, y para facilitar la lectura e interpretación de los resultados de esta Tesis Doctoral, el grupo vehículo no se muestra en la exposición de los resultados dentro de este apartado, realizándose las comparaciones directamente con el grupo tratado con el antitumoral a la dosis correspondiente.

### 4.2.1. Parámetros generales

#### 4.2.1.1. Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, en la ganancia de peso de los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg)

En la Figura 14, se presentan los resultados del efecto de la administración de TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, en la ganancia de peso de los animales tratados durante 5 semanas con CPT 2 mg/Kg (Figura 14 a) y CPT 3 mg/Kg (Figura 14 b). En ambas figuras, se muestra como referencia la ganancia de peso de los animales tratados con Salino, es decir, no tratados con el antitumoral.

Los animales del grupo experimental al que se le administró TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, durante las últimas dos semanas del tratamiento con CPT 2 mg/Kg, presentaron un peso similar al grupo de animales tratados con CPT 2 mg/Kg que no recibió tratamiento con TLR4-PA1 (CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1: 301,75±4,63 g (n=8),  $p>0,05$  vs. CPT 2 mg/Kg: 274,80±12,12 g (n=10)). Más aun, los animales a los que se les administró el antagonista TLR4 experimentaron una pérdida de peso corporal similar a la observada en el grupo de animales tratados con CPT 2 mg/Kg que no recibió dicho tratamiento (CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1: -4,00±2,22 g (n=10),  $p>0,05$  vs. CPT 2 mg/Kg: -1,80±4,20 g (n=10)).

De la misma manera, los animales del grupo experimental al que se le administró TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, durante las últimas dos semanas del tratamiento con CPT 3 mg/Kg, presentaron un peso similar al grupo de animales tratados con CPT 3 mg/Kg que no recibió tratamiento con TLR4-PA1 (CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1: 262,00±5,34 g (n=8),  $p>0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg: 245,10±75,28 g (n=10)). Más aún los animales a los que se les administró el antagonista TLR4 experimentaron una pérdida

de peso corporal similar a la observada en el grupo de animales tratados con CPT 3 mg/Kg que no recibió dicho tratamiento (CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1:  $-20,29 \pm 3,44$  g (n=7),  $p > 0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg;  $-18,89 \pm 3,43$  g (n=9)). Así, el tratamiento con TLR4-PA1 no fue capaz de modificar la pérdida de la ganancia de peso en animales tratados durante 5 semanas con CPT a la dos dosis evaluadas, 2 mg/Kg y 3 mg/Kg en relación con los animales no tratados con el antitumoral (CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1:  $-4,00 \pm 2,22$  g (n=10),  $p < 0,001$ ; CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1:  $-20,29 \pm 3,44$  g (n=7),  $p < 0,0001$  vs. Salino;  $21,10 \pm 5,61$  g (n=10)).

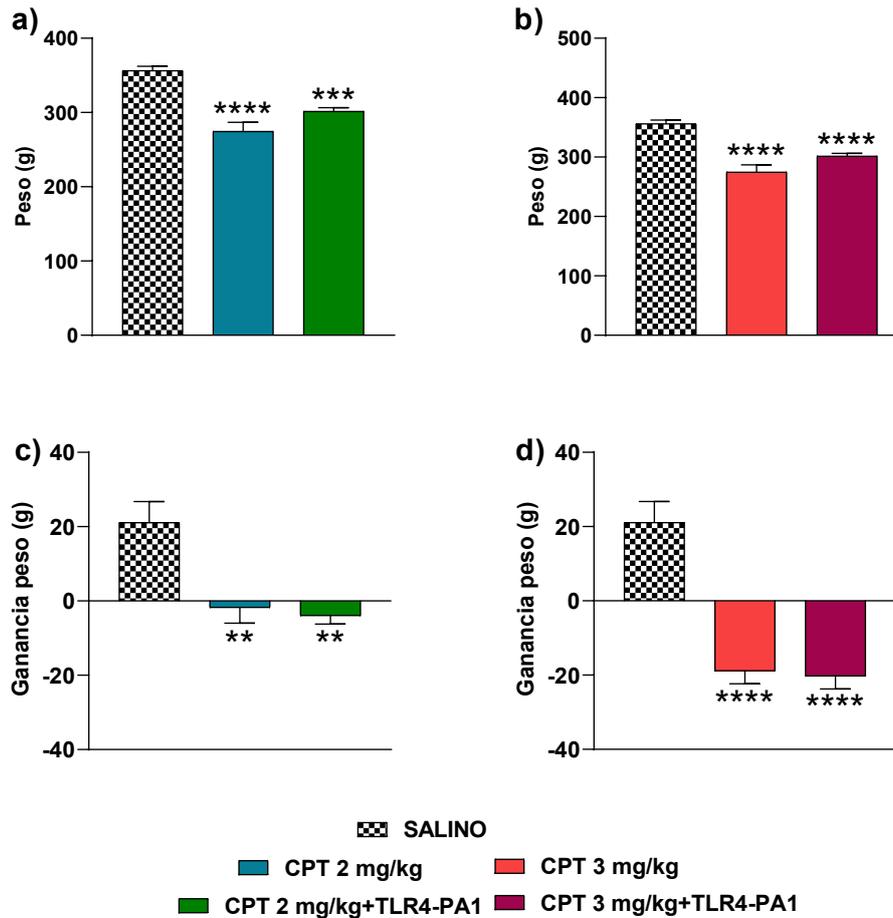


Figura 14: Ganancia de peso de los animales (a) tratados durante 5 semanas con Cisplatino (CPT) 2 mg/Kg o con CPT 2 mg/Kg y que recibieron las últimas 2 semanas un tratamiento diario de TLR4-PA1, dosis 10 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1); (b) tratados durante 5 semanas con CPT 3 mg/Kg o con CPT 3 mg/Kg y que recibieron las últimas 2 semanas un tratamiento diario de TLR4-PA1, dosis 10mg/Kg (CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1). El grupo Salino está representado como referencia. Los datos están representados como Media  $\pm$  E.E.M (n=7-10). Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Tukey para llevar a cabo el tratamiento estadístico de los datos. (\*\* p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001 vs. Salino).

#### 4.2.1.2. Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, en la ingesta sólida de los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg)

En la Figura 15 se presentan los resultados del efecto de la administración de TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, en las ingestas de comida de los animales tratados durante 5 semanas con CPT 2 mg/Kg (Figura 15 a) y CPT 3 mg/Kg (Figura 15 b). En ambas figuras, se muestra como referencia la ingesta sólida de los animales tratados con Salino, es decir, no tratados con el antitumoral.

Los animales del grupo experimental al que se le administró TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, durante las últimas dos semanas del tratamiento con CPT 2 mg/Kg, mostraron una ingesta sólida similar a la de los animales del grupo tratado con CPT 2 mg/Kg que no recibió tratamiento con TLR4-PA1 (CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1:  $13,01 \pm 1,75$  g/rata/día (n=10),  $p > 0,05$  vs. CPT 2 mg/Kg:  $14,33 \pm 2,02$  g/rata/día (n=10)). En los animales tratados con TLR4-PA1 a la dosis de 10 mg/Kg, durante las últimas dos semanas del tratamiento con CPT 3 mg/Kg, también se observó una ingesta sólida similar a la de los animales del grupo tratado con CPT 3 mg/Kg que no recibió tratamiento con TLR4-PA1 (CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1:  $10,86 \pm 1,06$  g/rata/día (n=8),  $p > 0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $12,31 \pm 0,27$  g/rata/día (n=10)). Así, el tratamiento con TLR4-PA1 no fue capaz de modificar la disminución en la ingesta sólida observada en animales tratados durante 5 semanas con cisplatino a la dos dosis evaluadas, 2 mg/Kg y 3 mg/Kg en relación con los animales no tratados con el antitumoral (CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1:  $13,01 \pm 1,75$  g/rata/día (n=10),  $p < 0,05$ ; CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1:  $10,86 \pm 1,06$  g/rata/día (n=8),  $p < 0,001$  vs. Salino;  $21,14 \pm 10,40$  g/rata/día (n=10)).

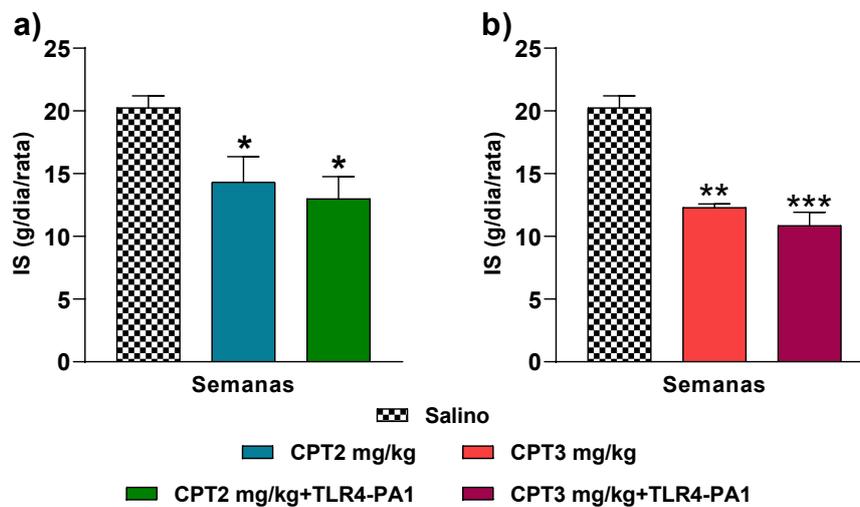


Figura 15: Ingesta Sólida de los animales (a) tratados durante 5 semanas con Cisplatino (CPT) 2 mg/Kg o con CPT 2 mg/Kg y que recibieron las últimas 2 semanas un tratamiento diario de TLR4-PA1, dosis 10 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1); (b) tratados durante 5 semanas con CPT 3 mg/Kg o con CPT 3 mg/Kg y que recibieron las últimas 2 semanas un tratamiento diario de TLR4-PA1, dosis 10mg/Kg (CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1). El grupo Salino está representado como referencia. Los datos están representados como Media  $\pm$  E.E.M (n=8-10). Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Tukey para llevar a cabo el tratamiento estadístico de los datos. (\* $P < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  vs. Salino). IS: Ingesta sólida.

## 4.2.2. Marcadores plasmáticos

### 4.2.2.1. Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, en los niveles plasmáticos de MDA de los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg)

En la Figura 16 se presentan los resultados del efecto de la administración de TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, en los niveles plasmáticos de MDA de los animales tratados durante 5 semanas con CPT 2 mg/Kg (Figura 16 a) y CPT 3 mg/Kg (Figura 16 b). En ambas figuras, se muestran como referencia los niveles plasmáticos de MDA de los animales tratados con Salino, es decir, no tratados con el antitumoral.

Los animales del grupo experimental al que se le administró TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, durante las últimas dos semanas del tratamiento con CPT 2 mg/Kg, mostraron un aumento significativo de los niveles plasmáticos de MDA respecto a los niveles observados en los animales tratados con CPT 2 mg/Kg que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 (CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1:  $0,83 \pm 0,04$  mMol/mL (n=8),  $p < 0,0001$  vs. CPT 2 mg/Kg:  $0,286 \pm 0,0047$  mMol/mL (n=5)). De la misma manera, los

animales tratados con TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, y durante las últimas dos semanas del tratamiento con CPT 3 mg/Kg, experimentaron un aumento significativo en los niveles plasmáticos de MDA en comparación con dichos niveles en los animales tratados con CPT 3 mg/Kg que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 (CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1:  $1,08 \pm 0,07$  mMol/mL (n=8),  $p < 0,001$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $0,60 \pm 0,12$  mMol/mL (n=5)). Mas aún, en comparación con el grupo de animales tratado con Salino, el tratamiento con TLR4-PA1 durante las dos últimas semanas de tratamiento con el antitumoral, aumento significativamente los niveles plasmáticos de MDA tanto en el grupo de animales que se administró CPT 2 mg/Kg como en el que se administró CPT 3 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1:  $0,83 \pm 0,04$  mMol/mL (n=8),  $p < 0,0001$ ; CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1:  $1,08 \pm 0,07$  mMol/mL (n=8),  $p < 0,001$  vs. Salino:  $0,24 \pm 0,02$  mMol/mL (n=4)).

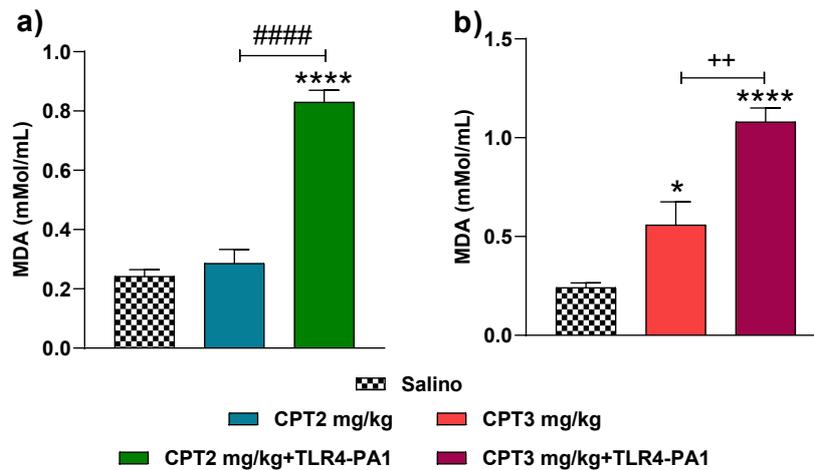


Figura 16: Niveles plasmáticos de Malondialdehído (MDA) de los animales (a) tratados durante 5 semanas con Cisplatino (CPT) 2 mg/Kg o con CPT 2 mg/Kg y que recibieron las últimas 2 semanas un tratamiento diario de TLR4-PA1, dosis 10 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1); (b) tratados durante 5 semanas con CPT 3 mg/Kg o con CPT 3 mg/Kg y que recibieron las últimas 2 semanas un tratamiento diario de TLR4-PA1, dosis 10mg/Kg (CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1). El grupo Salino está representado como referencia. Los datos están representados como Media  $\pm$  E.E.M (n=5-8). Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Tukey para llevar a cabo el tratamiento estadístico de los datos. (#### p<0,0001 vs. CPT 2 mg/Kg; +++ p<0,001 vs. CPT 3 mg/Kg; \*\*\*\* p<0,0001 vs. Salino).

Antes de concluir este subapartado, hay que señalar que por diferentes problemas técnicos no ha sido posible concluir las determinaciones de los niveles plasmáticos de Creatinina y de Citoquinas proinflamatorias en los animales del modelo de administración crónica de CPT, por lo que estos resultados no han podido incluirse en esta Tesis Doctoral.

#### 4.2.3. Parámetros cardiovasculares

##### 4.2.3.1. Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, en los niveles de presión arterial y frecuencia cardiaca de los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg)

En la Figura 17 se presentan los resultados del efecto de la administración de TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, en los niveles de Presión Arterial Sistólica (PAS), Presión Arterial Diastólica (PAD) y Frecuencia Cardiaca (FC) de los animales tratados durante 5 semanas con CPT 2 mg/Kg (Figura 17 a, b y c) y CPT 3 mg/Kg (Figura 17 d, e y f). En ambas figuras, se muestran como referencia los niveles de presión arterial y FC de los animales tratados con Salino, es decir, no tratados con el antitumoral.

Los animales del grupo experimental al que se le administró TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, durante las últimas dos semanas del tratamiento con CPT 2 mg/Kg, mostraron niveles de PAS similares a los que presentaban los animales tratados con

CPT 2 mg/Kg que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 (CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1: 118,61±7,00 mm Hg (n=6),  $p>0,05$  vs. CPT 2 mg/Kg: 116,09±2,54 mm Hg (n=10)). Sin embargo, los animales que habían sido tratados con TLR4-PA1 durante dos semanas, mostraron un aumento significativo en los niveles de PAD, en comparación con los valores de los animales tratados con CPT 2 mg/Kg que no recibieron dicho tratamiento (CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1: 103,55±6,19 mmHg (n=6),  $p<0,05$  vs. CPT 2 mg/Kg: 76,91±4,99 mmHg (n=10)). En el caso de la FC, los animales que habían sido tratados con TLR4-PA1 durante dos semanas presentaron valores ligeramente superiores a los mostrados por los animales tratados con CPT 2 mg/Kg que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 (CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1: 404,42±36,79 l.p.m (n=6),  $p>0,05$  vs. CPT 2 mg/Kg: 350,11±14,11 l.p.m (n=10)). Más aun, hay que señalar, que el tratamiento con TLR4-PA1 durante las dos últimas semanas de CPT 2 mg/Kg ocasionó un aumento significativo de los valores de la PAD y un ligero aumento en la FC en comparación al grupo de animales tratados con Salino (PAD: CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1: 103,55±6,19 mm Hg (n=6),  $p<0,05$  vs. Salino: 77,87±5,50 mmHg (n=10)); FC: CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1: 404,42±36,79 l.p.m (n=6),  $p>0,05$  vs. Salino: 338,09±19,40 l.p.m (n=10)).

Los animales tratados con TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, durante las últimas dos semanas del tratamiento con CPT 3 mg/Kg, mostraron valores similares de PAS a los de los animales tratados con CPT 3 mg/Kg que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 (CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1: 83,82±8,56 mmHg (n=7),  $p>0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg: 92,13±14,25 mmHg (n=7)). Por otra parte, el tratamiento con TLR4-PA1 durante dos semanas en los animales que recibían tratamiento con CPT 3 mg/Kg provocó un ligero aumento en los niveles de PAD, y un ligero descenso en la FC de los animales en comparación con los correspondientes valores en los animales tratados únicamente con CPT 3 mg/Kg (PAD: CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1: 69,52±7,69 mmHg (n=7),  $p>0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg: 47,53±11,08 mmHg (n=7)); FC: CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1: 291,61±20,28 l.p.m (n=7),  $p>0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg: 340,14±24,80 l.p.m (n=6)). Hay que señalar, además, que el tratamiento durante dos semanas con el fármaco TLR4-PA1 fue capaz de revertir la hipotensión y bradicardia observadas en los animales tratados con CPT 3 mg/Kg que no recibieron el tratamiento con dicho fármaco, obteniéndose en los animales tratados valores de PAD y FC similares a los obtenidos en el grupo de animales tratados con Salino (PAD: CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1: 69,52±7,69 mmHg (n=7),  $p>0,05$  vs. Salino: 77,87±5,50 mmHg (n=10); FC: CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1: 291,61±20,28 l.p.m (n=7),  $p>0,05$  Salino: 338,09±19,40 l.p.m (n=10)).

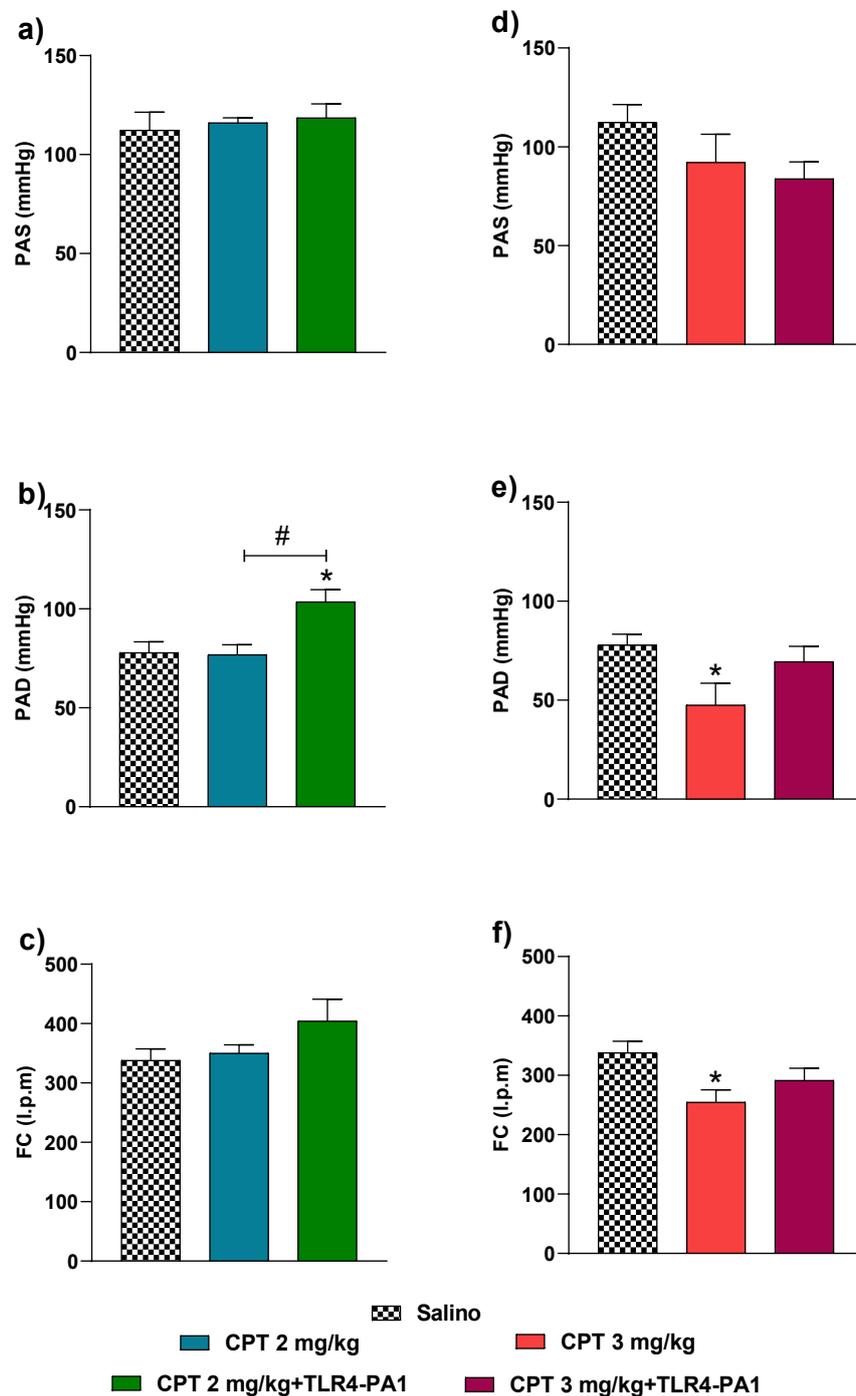


Figura 17: Presión Arterial Sistólica (PAS), Presión Arterial Diastólica (PAD) y Frecuencia Cardíaca (FC) en animales anestesiados (a, b, c) tratados durante 5 semanas con Cisplatino (CPT) 2 mg/Kg o con CPT 2 mg/Kg y que recibieron las últimas 2 semanas un tratamiento diario de TLR4-PA1, dosis 10 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1); (d, e, f) tratados durante 5 semanas con CPT 3 mg/Kg o con CPT 3 mg/Kg y que recibieron las últimas 2 semanas un tratamiento diario de TLR4-PA1, dosis 10 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1). El grupo Salino está representado como referencia. Los datos están representados como Media  $\pm$  E.E.M (n=6-10). Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Tukey para llevar a cabo el tratamiento estadístico de los datos (# p<0,05 vs. CPT 2 mg/Kg; \*p<0,05 vs. Salino). l.p.m: Latidos por minuto.

#### 4.2.3.2. Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, en la funcionalidad cardiaca de los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg)

En la Figura 18 se presentan los resultados del efecto de la administración de TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, en los valores de Presión de Perfusión de las Coronarias (PPC), Presión Desarrollada por el Ventrículo Izquierdo (PDVI) y Presión Diastólica Final (PDF) obtenidos en la preparación de corazón aislado y perfundido de los animales tratados durante 5 semanas con CPT 2 mg/Kg (Figura 18 a, b, c) y CPT 3 mg/Kg (Figura 18 d, e y f). En ambas figuras, se muestran como referencia los niveles de presión arterial y frecuencia cardiaca de los animales tratados con Salino, es decir, no tratados con el antitumoral.

Los animales del grupo experimental al que se le administró TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, durante las últimas dos semanas del tratamiento con CPT 2 mg/Kg, mostraron un aumento significativo de los valores de la PPC en comparación con los de los animales tratados con CPT 2 mg/Kg que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 (CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1:  $124,75 \pm 6,22$  mm Hg (n=8),  $p < 0,05$  vs. CPT 2 mg/Kg:  $100,93 \pm 7,03$  mm Hg (n=10)). Asimismo, la administración de TLR4-PA1 durante 2 semanas en los animales tratados con CPT 2 mg/Kg, aumentó ligeramente los valores de la PDVI respecto a los obtenidos en animales únicamente tratados con CPT 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1:  $107,76 \pm 7,31$  mm Hg (n=8),  $p > 0,05$  vs. CPT 2 mg/Kg:  $99,23 \pm 11,09$  mm Hg (n=10)). No obstante, el tratamiento con TLR4-PA1 durante 2 semanas en el grupo de animales tratado con CPT 2 mg/Kg ocasionó una disminución significativa en la PDF en comparación con dicho parámetro en los animales tratados con CPT 2 mg/Kg que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 (CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1:  $-11,62 \pm 4,83$  (n=7),  $p < 0,0001$  vs CPT 2 mg/Kg:  $14,42 \pm 3,44$  mm Hg (n=10)).

En los animales al que se le administró TLR4-PA1 a la dosis de 10 mg/Kg, durante las últimas dos semanas del tratamiento con CPT 3 mg/Kg, mostraron valores de PPC similares a los de los animales tratados con CPT 3 mg/Kg que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 (CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1:  $134,40 \pm 9,08$  mmHg (n=7),  $p > 0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $119,44 \pm 13,82$  (n=8)). Sin embargo, el tratamiento durante dos semanas con TLR4-PA1, sí modificó significativamente la función ventricular izquierda en los animales tratados con CPT 3 mg/Kg. Así, este tratamiento ocasionó un aumento significativo en los valores de la PDVI, que se acompañó de una disminución significativa de la PDF, en comparación con los correspondientes valores en los animales tratados con CPT 3 mg/Kg que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 (PDVI: CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1:  $182,98 \pm 10,11$  mmHg (n=7),  $p < 0,0001$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $51,86 \pm 5,59$  mmHg (n=8); PDF: CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1:  $3,16 \pm 2,85$  mmHg (n=6),  $p < 0,001$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $32,31 \pm 5,23$  mmHg (n=7)).

Por último, hay que señalar que, aunque el tratamiento con TLR4-PA1 produjo aumento significativo de la PPC, en comparación con los animales tratados con Salino (CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1:  $124,75 \pm 6,22$  mmHg (n=8)  $p < 0,001$ ; CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1:  $134,40 \pm 9,08$  mmHg (n=7),  $p < 0,05$  vs Salino:  $92,38 \pm 5,77$  mmHg (n=10)); fue capaz de revertir las alteraciones observadas en la función ventricular izquierda de los animales tratados con CPT 3 mg/Kg (PDVI: CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1:  $182,98 \pm 10,11$

## **Resultados**

mmHg (n=7),  $p < 0,0001$  vs. Salino:  $88,80 \pm 9,95$  mmHg; PDF:CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1:  $3,16 \pm 2,85$  mmHg (n=6),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $7,40 \pm 3,07$  mmHg (n=10)).

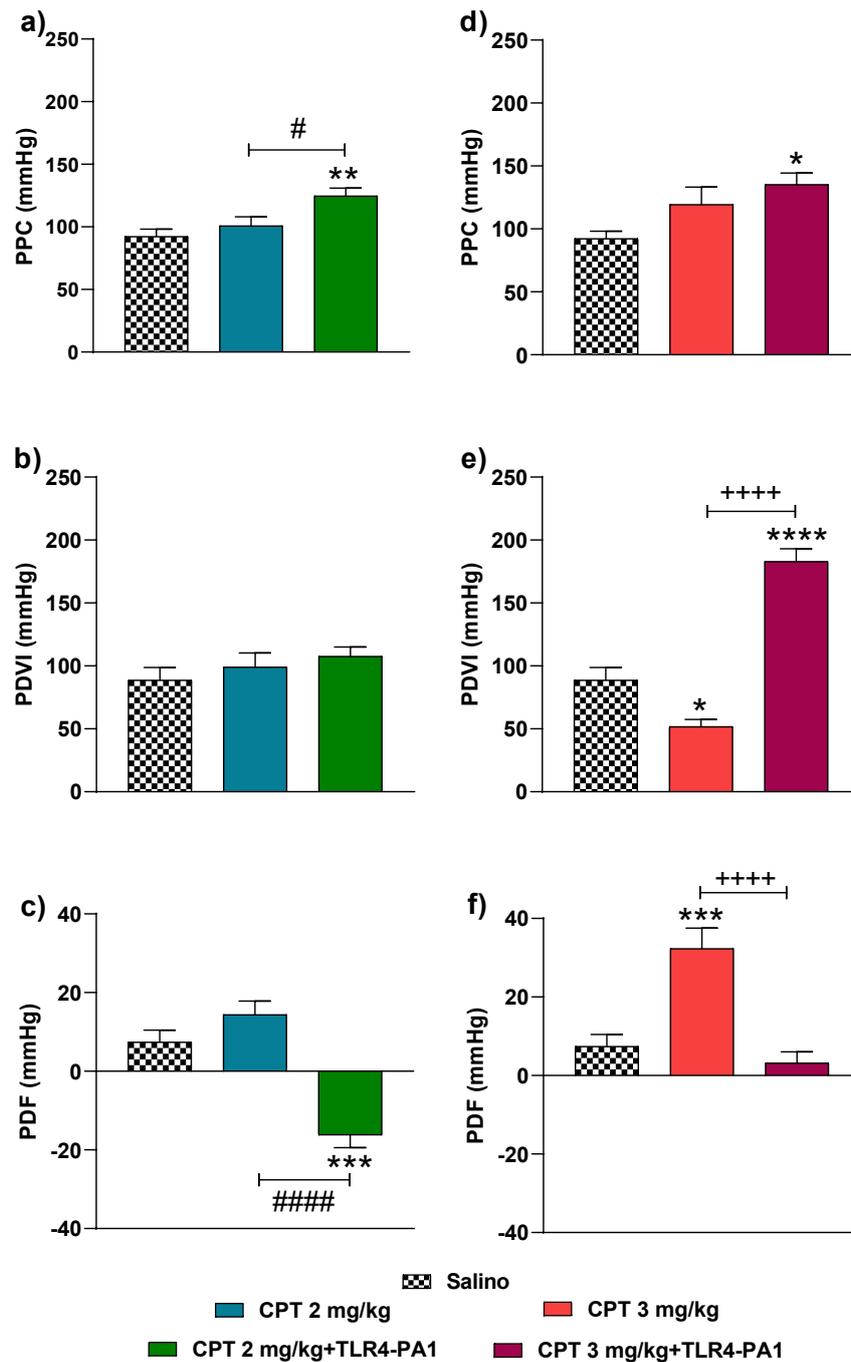


Figura 18: Presión de Perfusión de las Coronarias (PPC), Presión Desarrollada por el Ventriculo Izquierdo (PDVI) y Presión Diastólica Final (PDF) en preparaciones de corazón aislado y perfundido de animales (a, b, c) tratados durante 5 semanas con Cisplatino (CPT) 2 mg/Kg o con CPT 2 mg/Kg y que recibieron las últimas 2 semanas un tratamiento diario de TLR4-PA1, dosis 10 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1); (d, e, f) tratados durante 5 semanas con CPT 3 mg/Kg o con CPT 3 mg/Kg y que recibieron las últimas 2 semanas un tratamiento diario de TLR4-PA1, dosis 10 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1). El grupo Salino está representado como referencia. Los datos están representados como Media  $\pm$  E.E.M (n=6-10). Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Tukey para llevar a cabo el tratamiento estadístico de los datos. (#p<0,05; #####p<0,0001 vs. CPT 2 mg/Kg; +++ p<0,001; +++++p<0,0001 vs CPT 3mg/Kg; \*p<0,05; \*\*p<0,01; p<0,001; p<0,0001 vs. Salino).

#### 4.2.3.3. Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, sobre los índices cardiacos de los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg)

En la Figura 19 se presentan los resultados del efecto de la administración de TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, en los valores de Índice de Masa cardiaco (IMc) y el Índice de Masa del Ventriculo Izquierdo (IMVI) de los animales tratados durante 5 semanas con CPT 2 mg/Kg (Figura 19 a, b) y CPT 3 mg/Kg (Figura 19 c, d). En ambas figuras, se muestran como referencia los valores de IMc y IMVI de los animales tratados con Salino, es decir, no tratados con el antitumoral.

Los animales del grupo experimental al que se le administró TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, durante las últimas dos semanas del tratamiento con CPT 2 mg/Kg mostraron un aumento significativo en el IMc, además de un leve aumento en el IMVI, en comparación con los valores obtenidos en los animales tratados con CPT 2 mg/Kg que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 (IMc: CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1:  $4,13\pm 0,11$  mg/g (n=8),  $p<0,001$  vs. CPT 2 mg/Kg:  $2,71\pm 0,08$  mg/g (n=10); IMVI: CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1:  $2,15\pm 0,31$  mg/g (n=8),  $p>0,05$  vs. CPT 2 mg/Kg:  $1,81\pm 0,06$  mg/g (n=10)).

Por otra parte, los animales del grupo experimental al que se le administró TLR4-PA1, dosis 10 mg/Kg, durante las últimas dos semanas del tratamiento con CPT 3 mg/Kg mostraron también un aumento significativo en el IMc, y en el IMVI, en comparación con los valores en los animales tratados con CPT 3 mg/Kg que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 (IMc: CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1:  $4,20\pm 0,13$  mg/g (n=7),  $p<0,0001$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $3,26\pm 0,11$  mg/g (n=10); IMVI: CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1:  $2,50\pm 0,08$  mg/g (n=7),  $p<0,01$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $2,14\pm 0,05$  mg/g (n=10)).

Hay que destacar que el tratamiento con TLR4-PA1 no mejoro ninguno de los índices cardiacos en los animales tratados con CPT 2 mg/Kg y CPT 3 mg/Kg (IMc: CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1:  $4,13\pm 0,11$  mg/g (n=8),  $p<0,0001$ ; CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1:  $4,20\pm 0,13$  mg/g (n=7),  $p<0,0001$  vs. Salino:  $2,82\pm 0,08$  mg/g (n=10); IMVI: CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1:  $2,15\pm 0,31$  mg/g (n=8),  $p>0,05$ ; CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1:  $2,50\pm 0,08$  mg/g (n=7),  $p<0,0001$  vs. Salino:  $1,89\pm 0,05$  mg/g (n=10)).

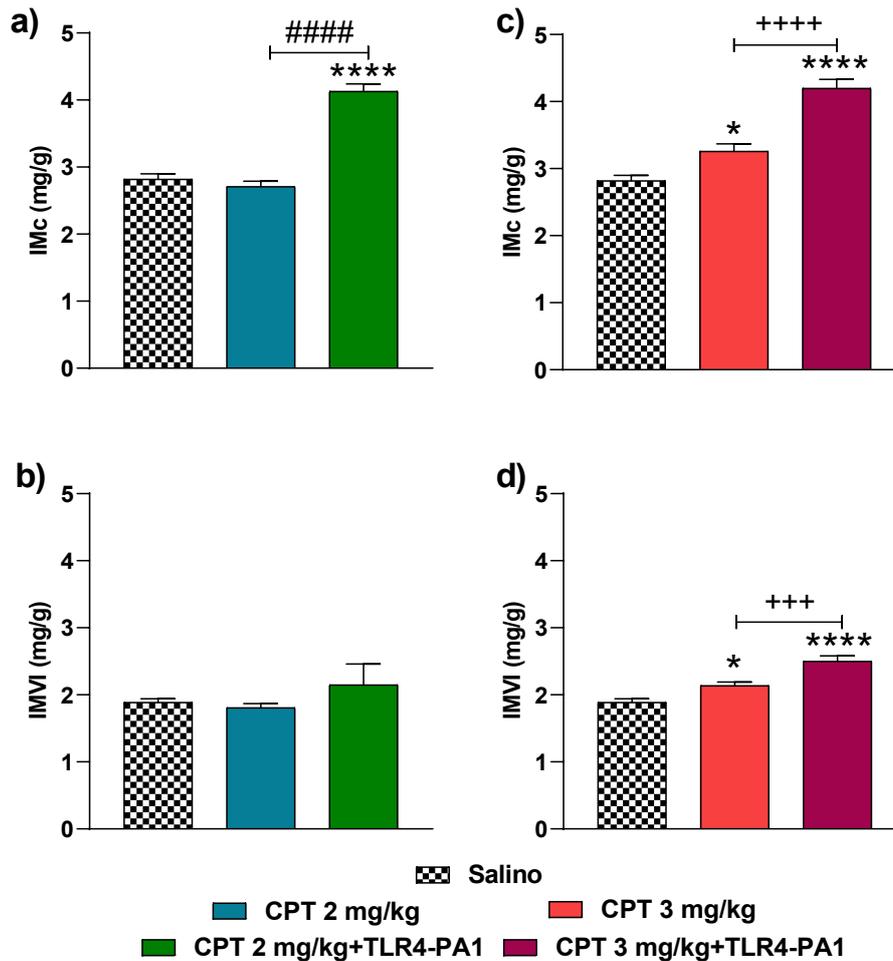


Figura 19: Índice de Masas cardiaco (IMc), Índice de Masas del Ventriculo Izquierdo (IMVI) de animales (a, b) tratados durante 5 semanas con Cisplatino (CPT) 2 mg/Kg o con CPT 2 mg/Kg y que recibieron las últimas 2 semanas un tratamiento diario de TLR4-PA1, dosis 10 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1); (c, d) tratados durante 5 semanas con CPT 3 mg/Kg o con CPT 3 mg/Kg y, que recibieron las últimas 2 semanas un tratamiento diario de TLR4-PA1, dosis 10mg/Kg (CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1). El grupo Salino está representado como referencia. Los datos están representados como Media  $\pm$  E.E.M (n=7-10). Se llevo a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Tukey para llevar a cabo el tratamiento estadístico de los datos (#####p<0,0001 vs. CPT 2 mg/Kg; ++ p<0,01; + p<0,05; \*\*\*\* p<0,0001 vs. Salino).

#### 4.2.3.4. Efecto de la administración de TLR4-PA1 10 mg/Kg sobre la reactividad de la aorta de los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg)

En las Figura 20 y Figura 21; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se presentan los resultados del efecto de la administración de TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, en los valores de reactividad vascular en la aorta de los animales de los diferentes grupos experimentales. En las Figura 20 y Figura 21 se representan: la función contráctil, la relajación dependiente de endotelio, la relajación no dependiente

de endotelio, así como el área bajo las correspondientes curvas concentración-respuesta en las preparaciones obtenidas de los animales tratados durante 5 semanas con CPT 2 mg/Kg (Figura 20; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** a, b, c, d, e, f) y CPT 3 mg/Kg (Figura 21 a, b, c, d, e, f). En las figuras se muestran como referencia los valores correspondientes de los animales tratados con Salino, es decir, no tratados con el antitumoral.

Los animales del grupo experimental al que se le administró TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, durante las últimas dos semanas del tratamiento con CPT 2 mg/Kg, mostraron una disminución significativa de la contractilidad de la aorta en comparación con la obtenida en el grupo de animales tratados con CPT 2 mg/Kg que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 ( $E_{max}$ : CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1:  $0,75 \pm 0,08$  g (n=8),  $p < 0,01$  vs. CPT 2 mg/Kg:  $1,08 \pm 0,12$  g (n=10); ABC: CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1:  $1,49 \pm 0,25$  (n=8),  $p > 0,05$  vs. CPT 2 mg/Kg:  $2,52 \pm 0,38$  g (n=10)). Asimismo, la administración de TLR4-PA1 durante 2 semanas en los animales tratados con CPT 2 mg/Kg, produjo un aumento significativo de la relajación dependiente de endotelio en comparación con la obtenida en el grupo de animales tratados con CPT 2 mg/Kg que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 ( $E_{max}$ : CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1:  $76,72 \pm 5,00$  % (n=9),  $p < 0,05$  vs. CPT 2 mg/Kg:  $55,92 \pm 3,26$  % (n=10); ABC: CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1:  $209,70 \pm 22,54$  (n=9),  $p > 0,05$  vs. CPT 2 mg/Kg:  $118,16 \pm 13,35$  g (n=10)). De manera similar, el tratamiento con TLR4-PA1 en los animales tratados con CPT 2 mg/Kg, produjo un aumento significativo de la relajación no dependiente de endotelio en la aorta de los animales, en comparación con la obtenida en el grupo de animales tratado con CPT 2 mg/Kg que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 ( $E_{max}$ : CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1:  $118,21 \pm 2,93$  % (n=8),  $p > 0,05$  vs. CPT 2 mg/Kg:  $117,26 \pm 3,07$  % (n=10); ABC: CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1:  $208,40 \pm 6,86$  (n=6),  $p < 0,01$  vs. CPT 2 mg/Kg:  $167,10 \pm 8,74$  g (n=10)).

Hay que destacar que el tratamiento con TLR4-PA1 fue capaz de revertir la disfunción endotelial observada en las preparaciones procedentes de animales tratados con CPT 2 mg/Kg y potenciar la vasodilatación no dependiente de endotelio en estos animales, obteniéndose valores similares o incluso superiores a los obtenidos en animales tratados con Salino (Ca:  $E_{max}$ : CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1:  $76,72 \pm 5,00$  % (n=9),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $80,78 \pm 3,56$  % (n=12); ABC: CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1:  $209,70 \pm 22,54$  (n=9),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $185,30 \pm 17,55$  (n=10); NPS:  $E_{max}$ : CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1:  $118,21 \pm 2,93$  % (n=8),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $117,26 \pm 3,07$  % (n=10); ABC: CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1:  $208,40 \pm 6,86$  (n=6),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $184,30 \pm 8,67$  g (n=11)). Sin embargo, el tratamiento con el fármaco antagonista TLR4 produjo una disminución significativa de la función contráctil en las preparaciones procedentes de animales tratados con CPT 2 mg/Kg, resultando valores incluso inferiores a los de los animales tratados con Salino ( $E_{max}$ : CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1:  $0,75 \pm 0,08$  g (n=8),  $p < 0,001$  vs. Salino:  $1,16 \pm 0,10$  g (n=10); ABC: CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1:  $1,49 \pm 0,25$  (n=8),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $2,61 \pm 0,30$  (n=10)).

Resultados similares se obtuvieron en los animales del grupo experimental al que se le administró TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, durante las últimas dos semanas del tratamiento con CPT 3 mg/Kg. Así, en estos animales el tratamiento durante 2 semanas con TLR4-PA1, ocasionó un descenso significativo de la contractilidad de la aorta de los animales en comparación con la de las preparaciones procedentes de los animales tratados con CPT 3 mg/Kg que no recibieron tratamiento

con TLR4-PA1 ( $E_{max}$ : CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1:  $0,94 \pm 0,12$  g (n=7),  $p < 0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $1,27 \pm 0,11$  (n=10); ABC: CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1:  $248,50 \pm 18,43$  (n=8),  $p > 0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $2,81 \pm 0,44$  (n=10)). Asimismo, la administración de TLR4-PA1 también aumento de manera significativa la relajación dependiente de endotelio, en la aorta de los animales en comparación con la obtenida de los animales tratados con CPT 3 mg/Kg que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 ( $E_{max}$ : CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1:  $84,31 \pm 6,14$  % (n=8),  $p < 0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $62,88 \pm 3,93$  (n=11); ABC: CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1:  $248,50 \pm 18,43$  (n=8),  $p < 0,01$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $120,20 \pm 12,69$  (n=11)). Sin embargo, el tratamiento con TLR4-PA1 durante 2 semanas en animales que recibían CPT 3 mg/Kg no afectó la relajación no dependiente de endotelio, en comparación con el grupo de animales tratados con CPT 3 mg/Kg que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 ( $E_{max}$ : CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1:  $121,31 \pm 5,27$  % (n=8),  $p > 0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $126,79 \pm 3,99$  % (n=10); ABC: CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1:  $256,00 \pm 20,38$  (n=7),  $p > 0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $120,20 \pm 12,69$  (n=11)).

De nuevo, el tratamiento con TLR4-PA1 fue capaz de revertir la disfunción endotelial observada en las preparaciones procedentes de animales tratados con CPT 3 mg/Kg y potenciar la vasodilatación no dependiente de endotelio en estos animales, obteniéndose valores superiores a los obtenidos en animales tratados con Salino (Ca:  $E_{max}$ : CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1:  $84,31 \pm 6,14$  % (n=8),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $80,78 \pm 3,56$  % (n=12); ABC: CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1:  $248,50 \pm 18,43$  (n=8),  $p < 0,05$  vs. Salino:  $185,32 \pm 17,65$  (n=10); NPS:  $E_{max}$ : CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1:  $121,31 \pm 5,27$  % (n=7),  $p < 0,05$  vs. Salino:  $117,16 \pm 2,87$  % (n=11); ABC: CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1:  $256,00 \pm 20,38$  (n=6),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $184,30 \pm 8,67$  g (n=11)). De la misma manera, el tratamiento con el fármaco antagonista TLR4 también produjo una disminución significativa de la función contráctil en las preparaciones procedentes de animales tratados CPT 3 mg/Kg, resultando valores incluso inferiores a los de los animales tratados con Salino ( $E_{max}$ : CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1:  $0,94 \pm 0,12$  g (n=7),  $p < 0,05$  vs. Salino:  $1,16 \pm 0,10$  g (n=10); ABC: CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1:  $1,91 \pm 0,33$  (n=8),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $2,61 \pm 0,30$  (n=10)).

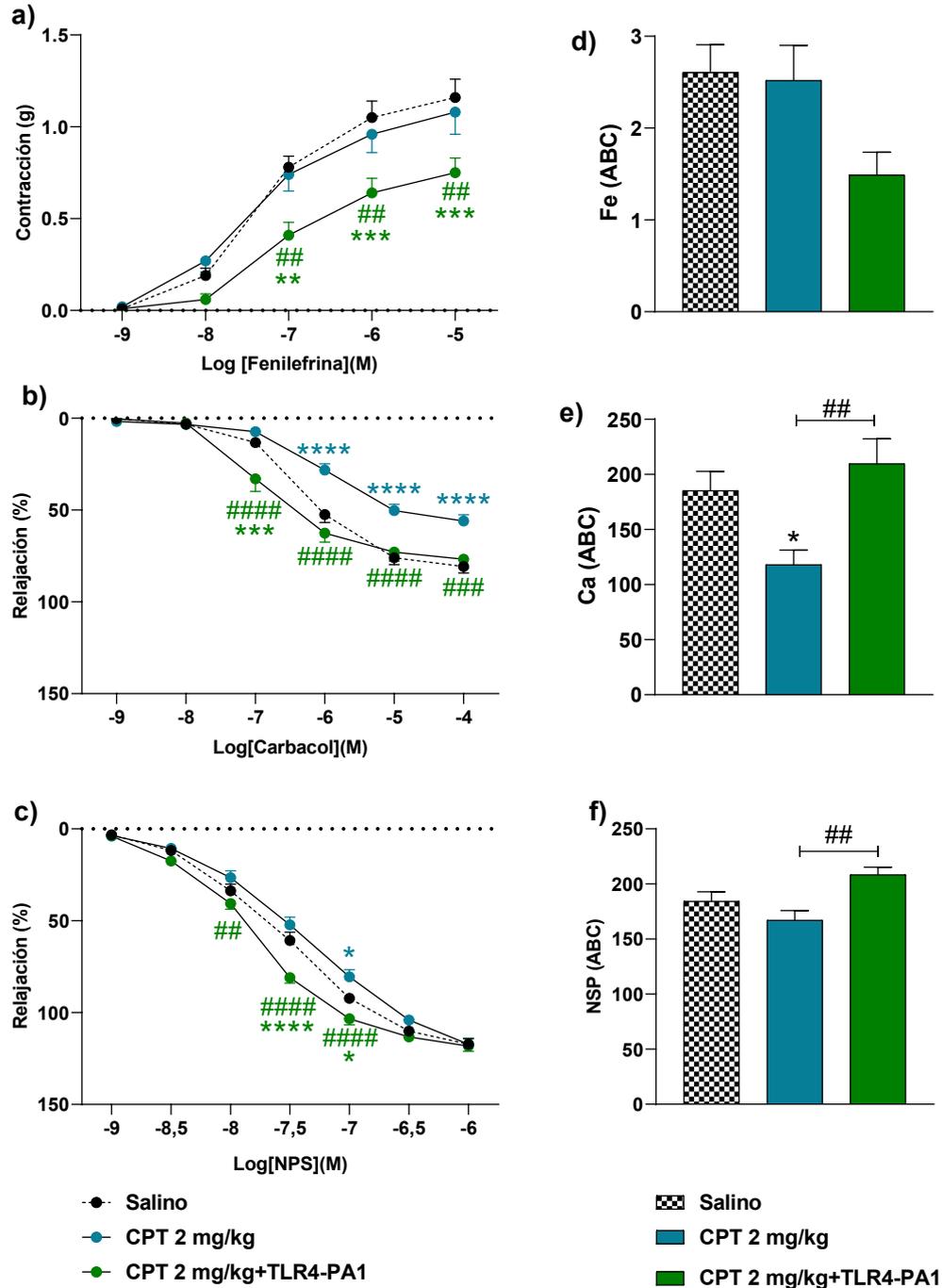


Figura 20: (a) Curva concentración-respuesta a Fe ( $10^{-9}$ M- $10^{-5}$ M), (b) Curva concentración-respuesta a Ca ( $10^{-9}$ M- $10^{-4}$ M), (c) Curva concentración-respuesta de NPS ( $10^{-9}$ M- $10^{-6}$ M), (d) Área bajo la curva de la curva concentración-respuesta a Fe, (e) Área bajo la curva de la curva concentración-respuesta a Ca, (f) Área bajo la curva de la curva concentración-respuesta a NPS, en anillos aislados de aorta de rata procedentes de animales tratados durante 5 semanas con Cisplatino (CPT) 2 mg/Kg o con CPT 2 mg/Kg y que recibieron las últimas 2 semanas un tratamiento diario de TLR4-PA1, dosis 10 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1). El grupo salino está representado como referencia. Los datos están representados como Media  $\pm$  E.E.M (n=6-11). Para el tratamiento estadístico de las curvas concentración-respuesta se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de un test *post-hoc* Tukey. Para el tratamiento estadístico de los datos del área bajo la curva se utilizó un análisis *t-student* con corrección de Welch. (#p<0,05; ## p<0,01; #### p<0,0001 vs. CPT 2 mg/Kg; \*p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001 vs. Salino). Fe: Fenilefrina; Ca: Carbacol; NPS: Nitroprusiato sódico; ABC: Área bajo la curva.

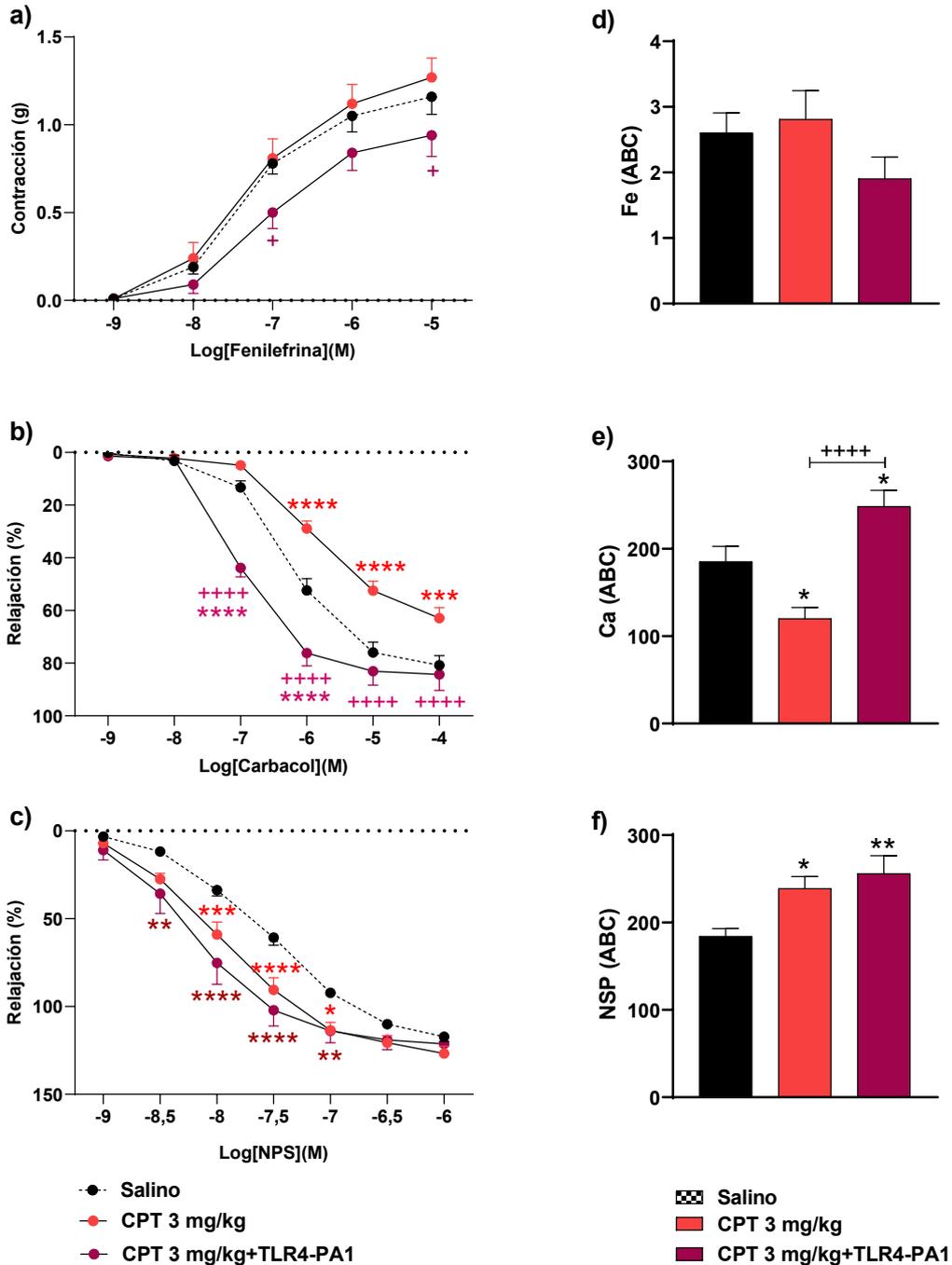


Figura 21: (a) Curva concentración-respuesta a Fe (10<sup>-9</sup>M-10<sup>-5</sup>M), (b) Curva concentración-respuesta a Ca (10<sup>-9</sup>M-10<sup>-4</sup>M), (c) Curva concentración-respuesta de NPS (10<sup>-9</sup>M-10<sup>-6</sup>M), (d) Área bajo la curva de la curva concentración-respuesta a Fe, (e) Área bajo la curva de la curva concentración-respuesta a Ca, (f) Área bajo la curva de la curva concentración-respuesta a NPS, en anillos aislados de aorta de rata procedentes de animales tratados durante 5 semanas con Cisplatino (CPT) 3 mg/Kg o con CPT 3 mg/Kg y que recibieron las últimas 2 semanas un tratamiento diario de TLR4-PA1, dosis 10 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1). El grupo Salino está representado como referencia. Los datos están representados como Media ± E.E.M (n=6-11). Para el tratamiento estadístico de las curvas concentración-respuesta se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de un test *post-hoc* Tukey. Para el tratamiento estadístico de los datos del área bajo la curva se utilizó un análisis *t-student* con corrección de Welch. (+ p<0,05; ++++ p<0,0001 vs. CPT 3 mg/Kg; \*p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001 vs. Salino). Fe: Fenilefrina; Ca: Carbacol; NPS: Nitroprusiato sódico; ABC: Área bajo la curva.

#### 4.2.3.5. Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, sobre la reactividad del lecho mesentérico de los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg)

En las Figura 22 y Figura 23 se presentan los resultados del efecto de la administración de TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, en los valores de reactividad vascular del lecho mesentérico de los animales de los diferentes grupos experimentales. En las Figura 22 y Figura 23 se representan: la función contráctil, la relajación dependiente de endotelio, la relajación no dependiente de endotelio, así como el área bajo las correspondientes curvas concentración-respuesta en las preparaciones obtenidas de los animales tratados durante 5 semanas con CPT 2 mg/Kg (Figura 22 a, b, c, d, e, f) y CPT 3 mg/Kg (Figura 23 a, b, c, d, e, f). En las figuras se muestran como referencia los valores correspondientes de los animales tratados con Salino, es decir, no tratados con el antitumoral.

Los animales del grupo experimental al que se le administró TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, durante las últimas dos semanas del tratamiento con CPT 2 mg/Kg, mostraron una contractilidad del lecho mesentérico ligeramente superior a la obtenida en el grupo de animales tratados con CPT 2 mg/Kg que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 ( $E_{max}$ : CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1: 118,42±9,46 mm Hg (n=8),  $p>0,05$  vs. CPT 2 mg/Kg: 96,54±12,53 mm Hg (n=12); ABC: CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1: 582,00±50,04 (n=8),  $p>0,05$  vs. CPT 2 mg/Kg: 505,34±67,69 (n=12)). Por otra parte, la administración de TLR4-PA1 durante 2 semanas en los animales tratados con CPT 2 mg/Kg, produjo un aumento significativo de la relajación dependiente de endotelio en el lecho mesentérico de los animales, en comparación con la obtenida en el grupo de animales tratados con CPT 2 mg/Kg que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 ( $E_{max}$ : CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1: 81,61±6,14 % (n=7),  $p>0,05$  vs. CPT 2 mg/Kg: 72,69±3,61 % (n=10); ABC: CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1: 254,75±20,59 (n=7),  $p<0,05$  vs. CPT 2 mg/Kg: 150,64±16,03 (n=12)). Asimismo, se observó que el tratamiento con TLR4-PA1 durante 2 semanas en animales que recibían CPT 2 mg/Kg, produjo un aumento significativo de la relajación no dependiente de endotelio en el lecho mesentérico de los animales en comparación con la obtenida en el grupo de animales tratados con CPT 2 mg/Kg que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 ( $E_{max}$ : CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1: 94,93±3,43 % (n=5),  $p>0,05$  vs. CPT 2 mg/Kg: 91,84±1,18 % (n=9); ABC: CPT 2 mg/Kg+ TLR4-PA1: 383,85±25,87 % (n=5),  $p<0,01$  vs. CPT 2 mg/Kg: 287,99±13,35 (n=9)).

Hay que destacar que el tratamiento con TLR4-PA1 fue capaz de potenciar tanto la vasodilatación dependiente como no dependiente de endotelio en las preparaciones procedentes de animales tratados con CPT 2 mg/Kg, obteniéndose incluso valores significativamente superiores a los obtenidos en animales tratados con Salino (Ca:  $E_{max}$ : CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1: 81,61±6,14 % (n=7),  $p>0,05$  vs. Salino: 70,15±4,46 % (n=11); ABC: CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1: 254,75±20,59 (n=7),  $p<0,05$  vs Salino: 150,38±25,31 (n=11); NSP:  $E_{max}$ : CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1: 94,93±3,43 % (n=5),  $p>0,05$  vs. Salino: 83,47±3,02 % (n=6); ABC: CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1: 254,75±20,59 (n=7),  $p<0,01$  vs. Salino: 233,32±17,02 (n=6)), sin ocasionar modificaciones importantes en la función contráctil de esta preparación (Fe:  $E_{max}$ : CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1: 118,42±9,46 mm Hg

(n=8),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $96,12 \pm 5,15$  mmHg (n=8); ABC: CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1:  $582,00 \pm 50,04$  (n=8),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $502,00 \pm 45,55$  (n=8)).

En el caso de los animales tratados con CPT 3 mg/Kg a los que se le administró TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, durante las últimas dos semanas del tratamiento con CPT 3 mg/Kg, se observaron resultados distintos a los mencionados en el párrafo anterior. Así, los animales del grupo experimental al que se le administró TLR4-PA1 durante las últimas dos semanas del tratamiento con CPT 3 mg/Kg mostraron un aumento significativo de la función contráctil del lecho mesentérico, en comparación con las preparaciones procedentes del grupo de animales tratado con CPT 3 mg/Kg que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 ( $E_{max}$ : CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1:  $108,91 \pm 18,49$  mm Hg (n=4),  $p < 0,01$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $55,38 \pm 5,23$  mm Hg (n=10); ABC: CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1:  $543,90 \pm 78,29$  (n=4),  $p > 0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $277,80 \pm 38,22$  (n=10)). Por otra parte, la administración de TLR4-PA1 durante 2 semanas en los animales tratados con CPT 3mg/Kg, ocasionó un ligero aumento en la relajación dependiente de endotelio, pero no modificó la relajación no dependiente de endotelio en el lecho mesentérico de los animales, en comparación con las correspondientes relajaciones en las preparaciones del grupo de animales tratado con CPT 3 mg/Kg que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 (Ca:  $E_{max}$ : CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1:  $84,50 \pm 5,29$  % (n=4),  $p > 0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg  $80,94 \pm 2,48$  % (n=9); ABC: CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1:  $259,40 \pm 27,06$  (n=4),  $p > 0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg  $188,30 \pm 25,71$  (n=9)), NPS:  $E_{max}$ : CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1:  $81,64 \pm 4,34$  % (n=4),  $p > 0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $97,30 \pm 1,66$  % (n=6); ABC: CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1:  $234,60 \pm 19,02$  (n=4),  $p > 0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg  $276,80 \pm 27,45$  (n=6)).

Por último, el tratamiento con TLR4-PA1 fue capaz de revertir la disminución de la contractilidad observada en el lecho mesentérico procedente de los animales tratados con CPT 3 mg/Kg, obteniéndose valores similares a los del grupo de animales tratados con Salino ( $E_{max}$ : CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1:  $108,91 \pm 18,49$  mmHg (n=4),  $p < 0,05$  vs. Salino:  $96,12 \pm 5,15$  mmHg (n=8); ABC: CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1:  $543,90 \pm 78,29$  (n=4),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $502,00 \pm 45,55$  (n=8)). Más aun, el aumento de la relajación dependiente de endotelio en el lecho mesentérico procedente de los animales tratados con TLR4-PA1, también fue superior a la de las preparaciones procedentes de animales tratados con Salino ( $E_{max}$ : CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1:  $84,50 \pm 5,29$  % (n=4),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $70,15 \pm 4,46$  % (n=11); ABC: CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1:  $259,40 \pm 27,06$  (n=4),  $p > 0,05$  vs. Salino:  $150,38 \pm 25,31$  (n=11)).

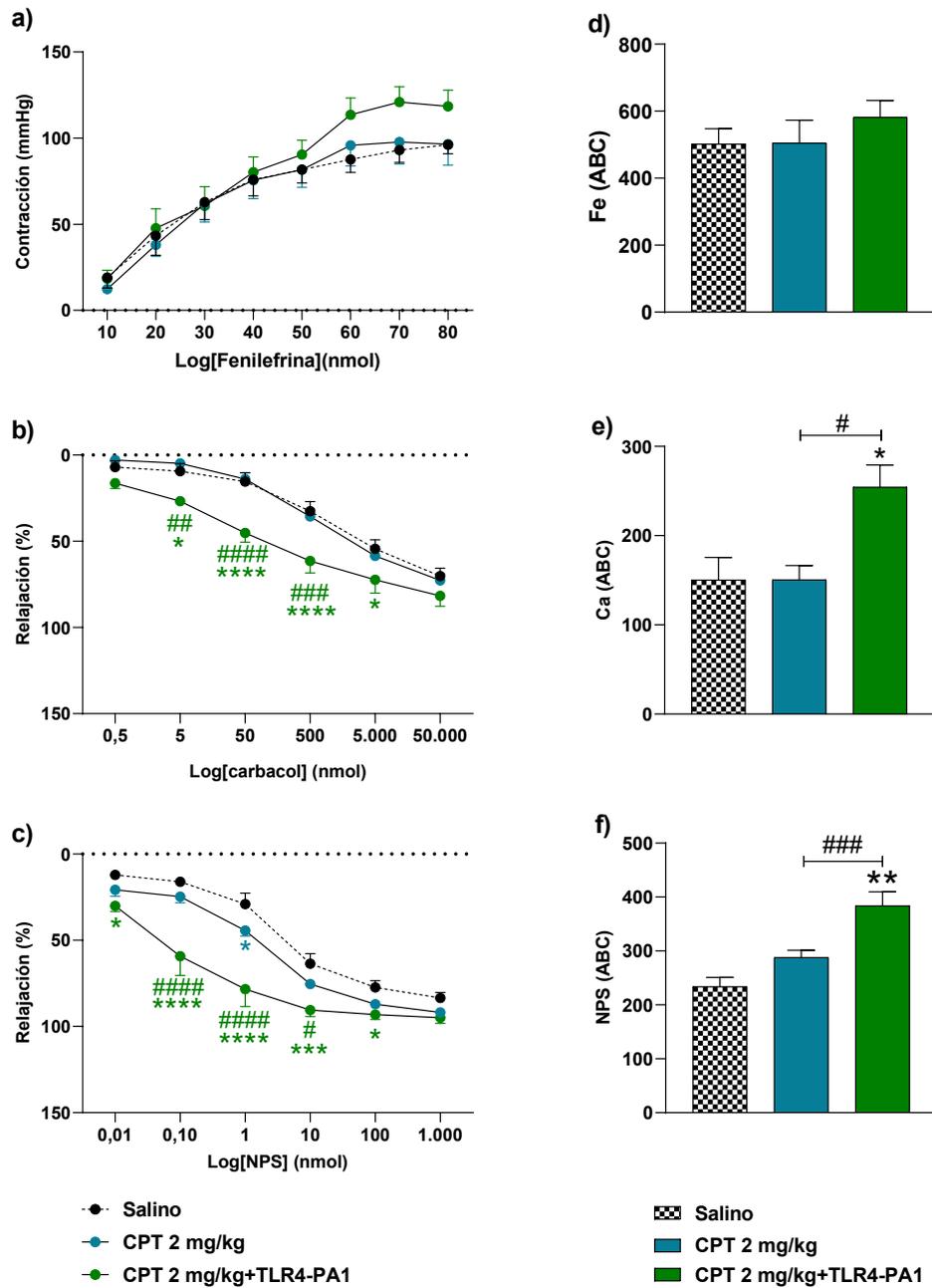


Figura 22: (a) Curva concentración-respuesta a Fe (10-80 nmol), (b) Curva concentración-respuesta a Ca (0,5-50.000 nmol), y (c) Curva concentración-respuesta de NPS (0,1-1000 nmol), (d) Área bajo la curva de la curva concentración-respuesta a Fe, (e) Área bajo la curva de la curva concentración-respuesta a Ca, (f) Área bajo la curva de la curva concentración-respuesta a NPS, en el lecho mesentérico perfundido de animales tratados durante 5 semanas con Cisplatino (CPT) 2 mg/Kg o con CPT 2 mg/Kg y que recibieron las últimas 2 semanas un tratamiento diario de TLR4-PA1, dosis 10 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1). El grupo Salino está representado como referencia. Los datos están representados como Media  $\pm$  E.E.M (n=5-12). Para el tratamiento estadístico de las curvas concentración-respuesta se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de un test *post-hoc* Tukey. Para el tratamiento estadístico de los datos del área bajo la curva se utilizó un análisis *t-student* con corrección de Welch. (#  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,001$ ; ####  $p < 0,0001$  vs. CPT 2 mg/Kg; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs. Salino). Fe: Fenilefrina; Ca: Carbacol; NPS: Nitroprusiato sódico; ABC: Área bajo la curva.

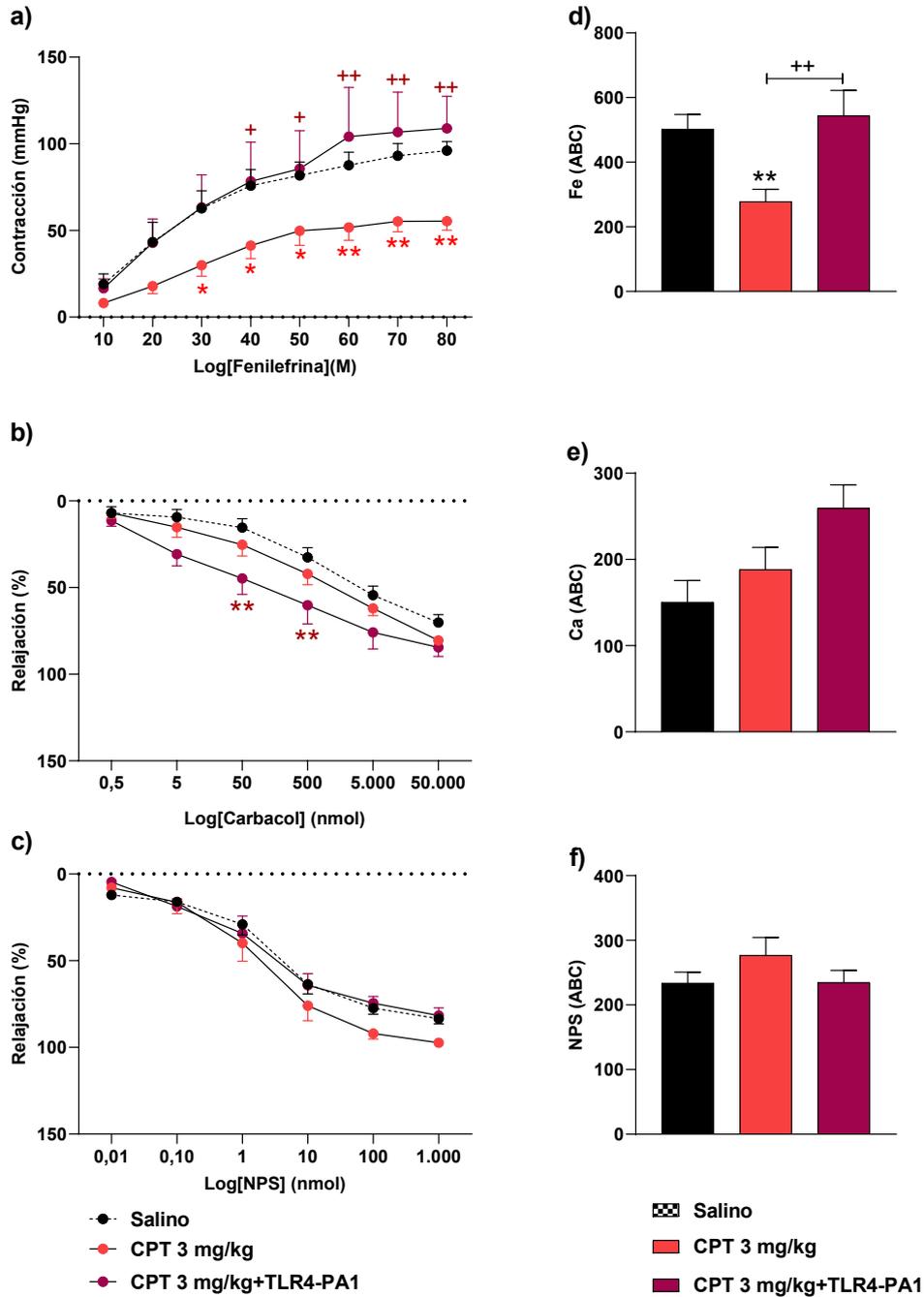


Figura 23: (a) Curva concentración-respuesta a Fe (10-80 nmol), (b) Curva concentración-respuesta a Ca (0,5-50.000 nmol), y (c) Curva concentración-respuesta de NPS (0,1-1000 nmol), (d) Área bajo la curva de la curva concentración-respuesta a Fe, (e) Área bajo la curva de la curva concentración-respuesta a Ca, (f) Área bajo la curva de la curva concentración-respuesta a NPS, en el lecho mesentérico perfundido de animales tratados durante 5 semanas con Cisplatino (CPT) 3 mg/Kg o tratados durante 5 semanas con CPT 3 mg/Kg y que recibieron las últimas 2 semanas un tratamiento diario de TLR4-PA1, dosis 10 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1). El grupo Salino está representado como referencia. Los datos están representados como Media  $\pm$  E.E.M (n=4-10 Para el tratamiento estadístico de las curvas concentración-respuesta se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de un test *post-hoc* Tukey. Para el tratamiento estadístico de los datos del área bajo la curva se utilizó un análisis *t-student* con corrección de Welch. (+ p<0,05; ++ p<0,01 vs. CPT 3 mg/Kg; \* p<0,05; \*\* p<0,01 vs. Salino). Fe: Fenilefrina; Ca: Carbacol; NPS: Nitroprusiato sódico; ABC: Área bajo la curva.

#### 4.2.4. Expresión proteica

##### 4.2.4.1. Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, sobre la expresión proteica en el ventrículo izquierdo de los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg)

En las Figura 24 y Figura 25 se presentan los resultados del efecto de la administración de TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, en la expresión proteica de TLR4, MyD88 y NLRP3 en el ventrículo izquierdo de los animales de los diferentes grupos experimentales. En las Figura 24 y Figura 25 se representan: expresión proteica de TLR4, expresión proteica de MyD88 y expresión proteica de NLRP3 obtenidas de los animales tratados durante 5 semanas con CPT 2 mg/Kg (Figura 24 a, b, c) y CPT 3 mg/Kg (Figura 25 a, b, c). En las figuras se muestran como referencia los valores correspondientes de los animales tratados con Salino, es decir, no tratados con el antitumoral.

En el ventrículo izquierdo procedente de los animales a los que se le administró TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, durante las dos últimas semanas de tratamiento con CPT 2 mg/Kg, no se modificó la expresión de MyD88 ni NLRP3, en comparación con la expresión de estas proteínas en las preparaciones procedentes del grupo de animales tratados con CPT 2 mg/Kg que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 (MyD88: CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1: 121,11±8,64 U.A (n=6),  $p>0,05$  CPT 2 mg/Kg: 119,35±10,39 U.A (n=6); NLRP3: CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1: 124,74±26,62 U.A (n=4),  $p>0,05$  CPT 2 mg/Kg: 116,18±11,24 U.A (n=5)). Sin embargo, la administración de TLR4-PA1 durante las dos últimas semanas de tratamiento con CPT 2 mg/Kg, aumento de manera significativa la expresión de TLR4 en el tejido cardiaco en comparación con dicha expresión en el tejido procedente de animales tratados con CPT 2 mg/Kg que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 (CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1: 145,64±16,57 U.A (n=5),  $p<0,05$  vs. CPT 2 mg/Kg: 93,26±5,27 U.A (n=5)). Más aún, el aumento de la expresión de TLR4 en el ventrículo izquierdo de los animales tras el tratamiento durante dos semanas con el fármaco TLR4-PA1 durante las dos últimas semanas de tratamiento con CPT 2 mg/Kg, también fue significativamente superior a la expresión de este receptor en las muestras procedentes de los animales del grupo Salino (CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1: 145,64±16,57 U.A (n=5),  $p<0,01$  vs. Salino: 100,00±0,98 U.A (n=5)).

En el caso de los animales tratados con CPT 3 mg/Kg a los que se le administró TLR4-PA1 durante las últimas dos semanas, se observaron resultados distintos a los mencionados en el párrafo anterior. Así, en el ventrículo izquierdo procedente los animales del grupo experimental al que se le administró TLR4-PA1 durante las últimas dos semanas del tratamiento con CPT 3 mg/Kg, no se observó una modificación de la expresión del receptor TLR4, en comparación con la del grupo de animales tratados con CPT 3 mg/Kg que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 (CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1: 113,19±10,98 U.A (n=6),  $p>0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg: 111,35±14,56 U.A (n=5)). Sin embargo, la expresión de MyD88 fue superior en el grupo experimental al que se le administró TLR4-PA1 durante las últimas dos semanas del tratamiento con CPT 3 mg/Kg en relación con los animales que no recibieron el tratamiento con el fármaco anti TLR4 (CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1: 164,52±13,37 U.A (n=6),  $p>0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg:

134,68±6,76 U.A (n=4)). Además, la administración de TLR4-PA1 durante las últimas dos semanas del tratamiento con CPT 3 mg/Kg, redujo la expresión de NLRP3 en comparación con la del grupo de animales tratados con CPT 3 mg/Kg que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 (CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1: 140,62±21,58 U.A (n=5),  $p>0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg: 176,06±18,66 U.A (n=5)). Los datos mencionados muestran que el tratamiento durante dos semanas con el fármaco TLR4-PA1 fue capaz de disminuir ligeramente el aumento en la expresión de NLRP3 en el ventrículo izquierdo causada por la administración crónica de CPT 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1: 140,62±21,58 U.A (n=5),  $p>0,05$  vs. Salino: 100,00±2,28 U.A (n=6)). Finalmente, hay que señalar que el aumento en la expresión de MyD88 en tejido cardíaco observado tras el tratamiento durante dos semanas con el fármaco TLR4-PA1 fue también significativamente mayor que el obtenido en las muestras procedentes de los animales tratados con Salino (CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1: 164,52±13,37 U.A (n=6),  $p<0.001$  vs. Salino: 100,00±0,98 U.A (n=6)).

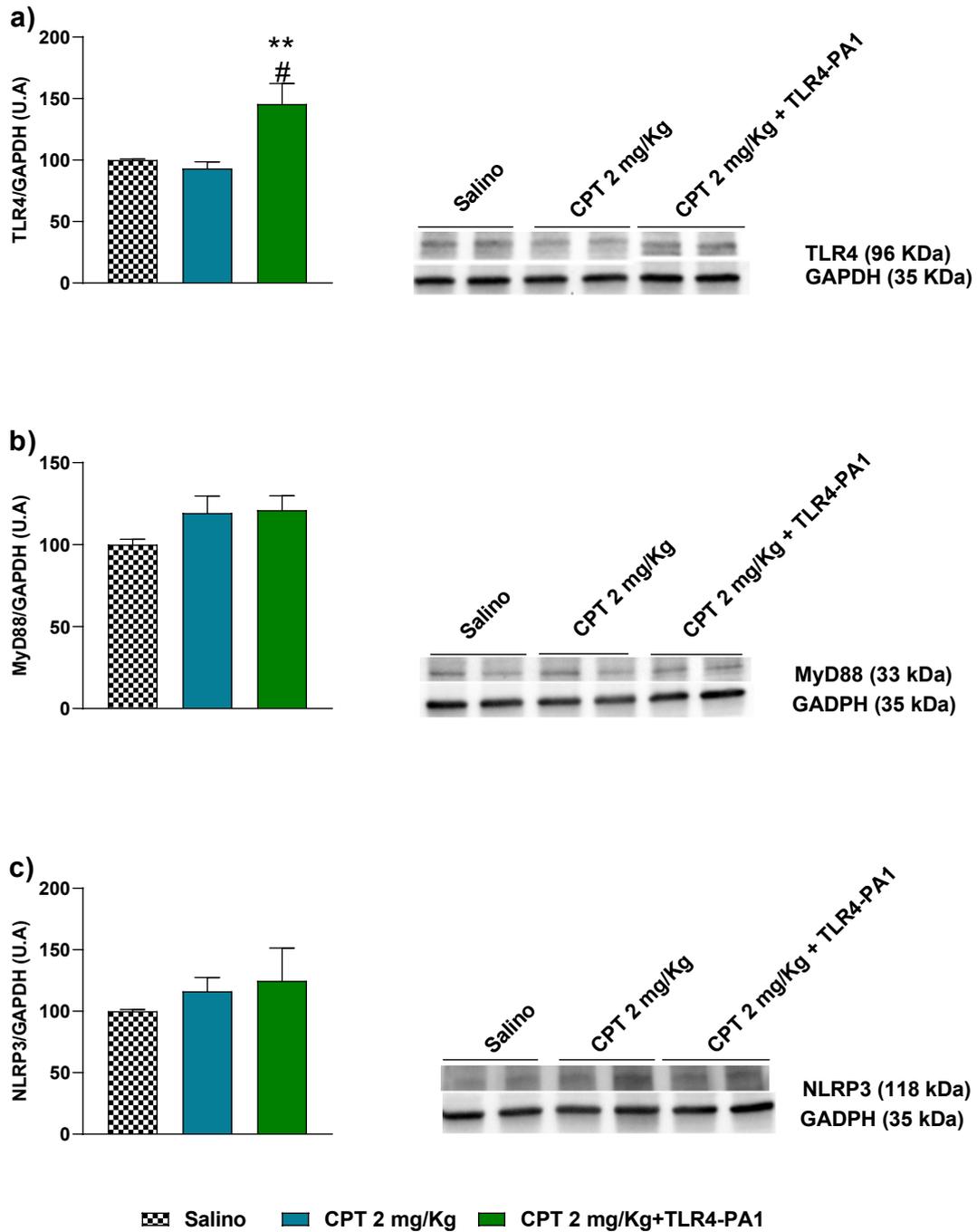


Figura 24: (a) Expresión proteica de TLR4, (b) Expresión proteica de MyD88, (c) Expresión proteica de NLRP3 en el ventrículo izquierdo procedente de animales tratados durante 5 semanas con Cisplatino (CPT) 2 mg/Kg o con CPT 2 mg/Kg y que recibieron las últimas 2 semanas un tratamiento diario de TLR4-PA1, dosis 10 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1). Los datos están representados como Media  $\pm$  E.E.M (n=4-6). Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Tukey para llevar a cabo el análisis estadístico (#  $p < 0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg; \*\*  $p < 0,01$  vs Salino). U.A: Unidades Arbitrarias.

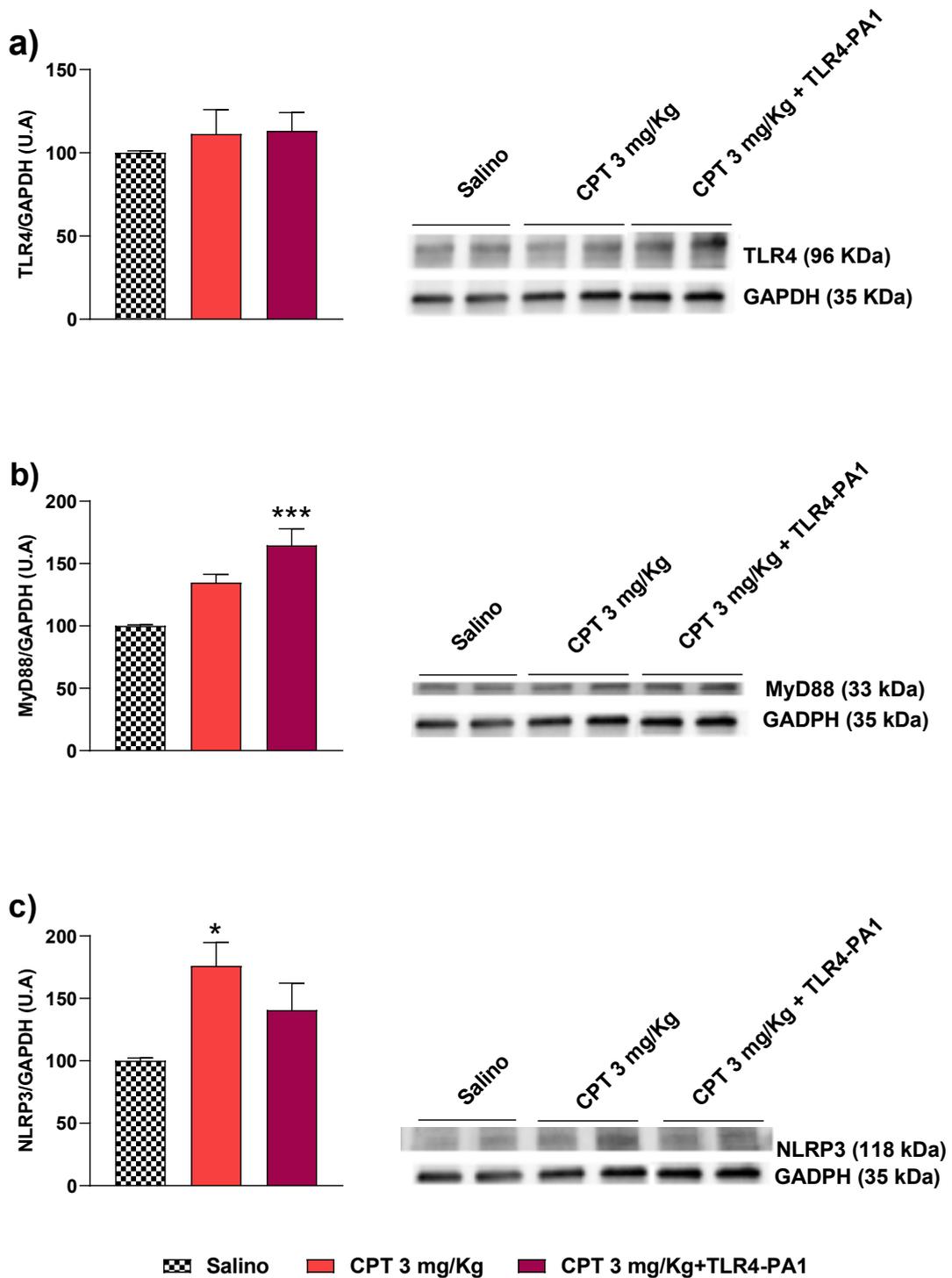


Figura 25 (a) Expresión proteica de TLR4, (b) Expresión proteica de MyD88, (c) Expresión proteica de NLRP3 en el ventrículo izquierdo procedente de animales tratados durante 5 semanas con Cisplatino (CPT) 3 mg/Kg o con CPT 3 mg/Kg y que recibieron las últimas 2 semanas un tratamiento diario de TLR4-PA1, dosis 10 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1). Los datos están representados como Media  $\pm$  E.E.M (n=4-6). Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Tukey para llevar a cabo el análisis estadístico (\* p<0,05; \*\*\* p<0,001 vs Salino).

#### 4.2.4.2. Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, sobre la expresión proteica en la aorta de los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg)

En las Figura 26 y Figura 27 se presentan los resultados del efecto de la administración de TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, en la expresión proteica de TLR4, MyD88 y NLRP3 en la aorta de los animales de los diferentes grupos experimentales. En las Figura 26 y Figura 27 se representan: expresión proteica de TLR4, expresión proteica de MyD88 y expresión proteica de NLRP3 obtenidas de los animales tratados durante 5 semanas con CPT 2 mg/Kg (Figura 26 a, b, c) y CPT 3 mg/Kg (Figura 27 a, b, c). En las figuras se muestran como referencia los valores correspondientes de los animales tratados con Salino, es decir, no tratados con el antitumoral.

En la aorta procedente de los animales a los que se le administró TLR4-PA1 durante las dos últimas semanas de tratamiento con CPT 2 mg/Kg, se observó un leve aumento de la expresión de TLR4 en la aorta de los animales comparación con la expresión obtenida en las muestras de tejido procedentes de animales tratados con CPT 2 mg/Kg que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 (CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1: 111,31±15,83 U.A (n=5),  $p>0,05$  vs. CPT 2 mg/Kg: 93,52±16,74 U.A (n=5)). Sin embargo, la administración de TLR4-PA1 durante las dos últimas semanas de tratamiento con CPT 2 mg/Kg, provocó un ligero descenso de la expresión de MyD88 en este tejido, en comparación a la expresión de esta proteína en la aorta obtenida de los animales tratados con CPT 2 mg/Kg que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 (CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1: 104,64±8,49 U.A (n=5),  $p>0,05$  vs. CPT 2 mg/Kg: 132,61±17,13 U.A (n=6)). Por último, la expresión de NLRP3 en la aorta no se modificó en el grupo de animales a los que se administró TLR4-PA1 durante las dos últimas semanas de tratamiento con CPT 2 mg/Kg, en comparación a dicha expresión en el tejido procedente de los animales tratados con CPT 2 mg/Kg que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 (CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1: 44,87±12,35 U.A (n=4),  $p>0,05$  vs. CPT 2 mg/Kg: 44,12±11,72 U.A (n=4)).

Resultados similares se obtuvieron en la expresión proteica de TLR4 y NLRP3, en la aorta de los animales del grupo experimental al que se le administró TLR4-PA1 durante las últimas dos semanas del tratamiento con CPT 3 mg/Kg. Así, el tratamiento con TLR4-PA1 durante las dos últimas semanas de tratamiento CPT 3 mg/Kg, ocasionó un aumento de la expresión de TLR4 en la aorta, que no resulto significativa, en comparación con dicha expresión en el tejido procedente de los animales tratados con CPT 3 mg/Kg que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 (CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1: 138,93±7,47 U.A (n=4),  $p>0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg: 104,11±14,12 U.A (n=6)). De la misma manera, la expresión de NLRP3 en la aorta de los animales tratados con TLR4-PA1 no se modificó respecto a la expresión obtenida en este mismo tejido en los animales tratados con CPT 3 mg/Kg que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 (CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1: 64,78±13,28 U.A (n=4),  $p>0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg: 56,17±20,28 U.A (n=5)). Sin embargo, al contrario que en los animales tratados con una dosis más baja de cisplatino, la administración de TLR4-PA1 durante las dos últimas semanas del tratamiento con CPT 3 mg/Kg, no modificó la expresión de MyD88 en la aorta de los animales en comparación a su expresión en las muestras de animales tratados con CPT

## **Resultados**

3 mg/Kg que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 (CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1:  $61,19 \pm 5,53$  U.A (n=5),  $p > 0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $55,82 \pm 6,55$  U.A (n=4)).

Los datos mencionados anteriormente, muestran que el tratamiento con TLR4-PA1 durante las últimas dos semanas de tratamiento con CPT 2 mg/Kg y CPT 3 mg/Kg, no corrige las alteraciones observadas en la expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3 en la aorta de los animales tratados únicamente con el antitumoral.

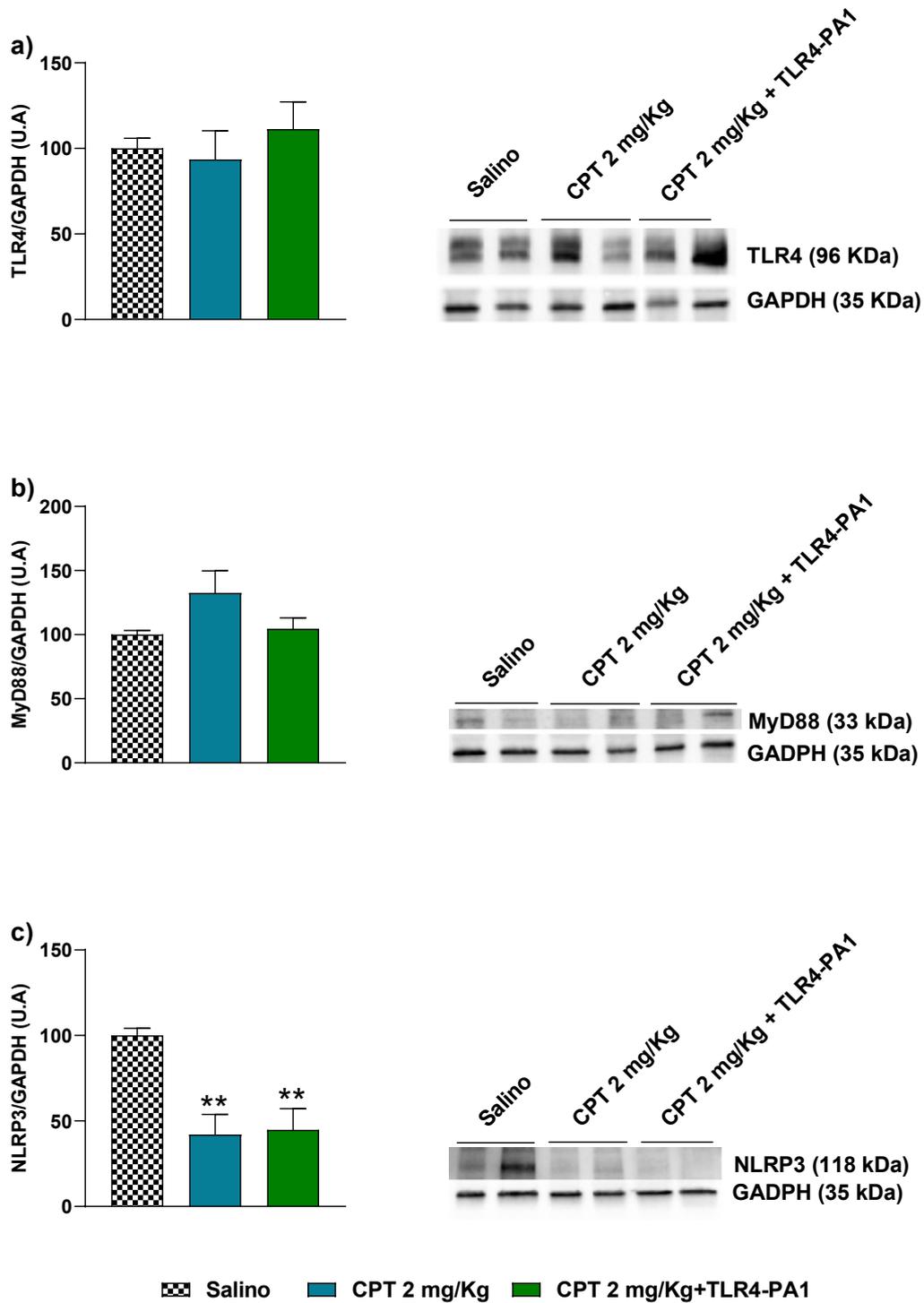


Figura 26: (a) Expresión proteica de TLR4, (b) Expresión proteica de MyD88, (c) Expresión proteica de NLRP3 en la aorta procedente de animales tratados durante 5 semanas con Cisplatino (CPT) 2 mg/Kg o con CPT 2 mg/Kg y que recibieron las últimas 2 semanas un tratamiento diario de TLR4-PA1, dosis 10 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1). Los datos están representados como Media  $\pm$  E.E.M (n=4-6). Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Tukey para llevar a cabo el análisis estadístico (\*\* p<0,01 vs Salino).

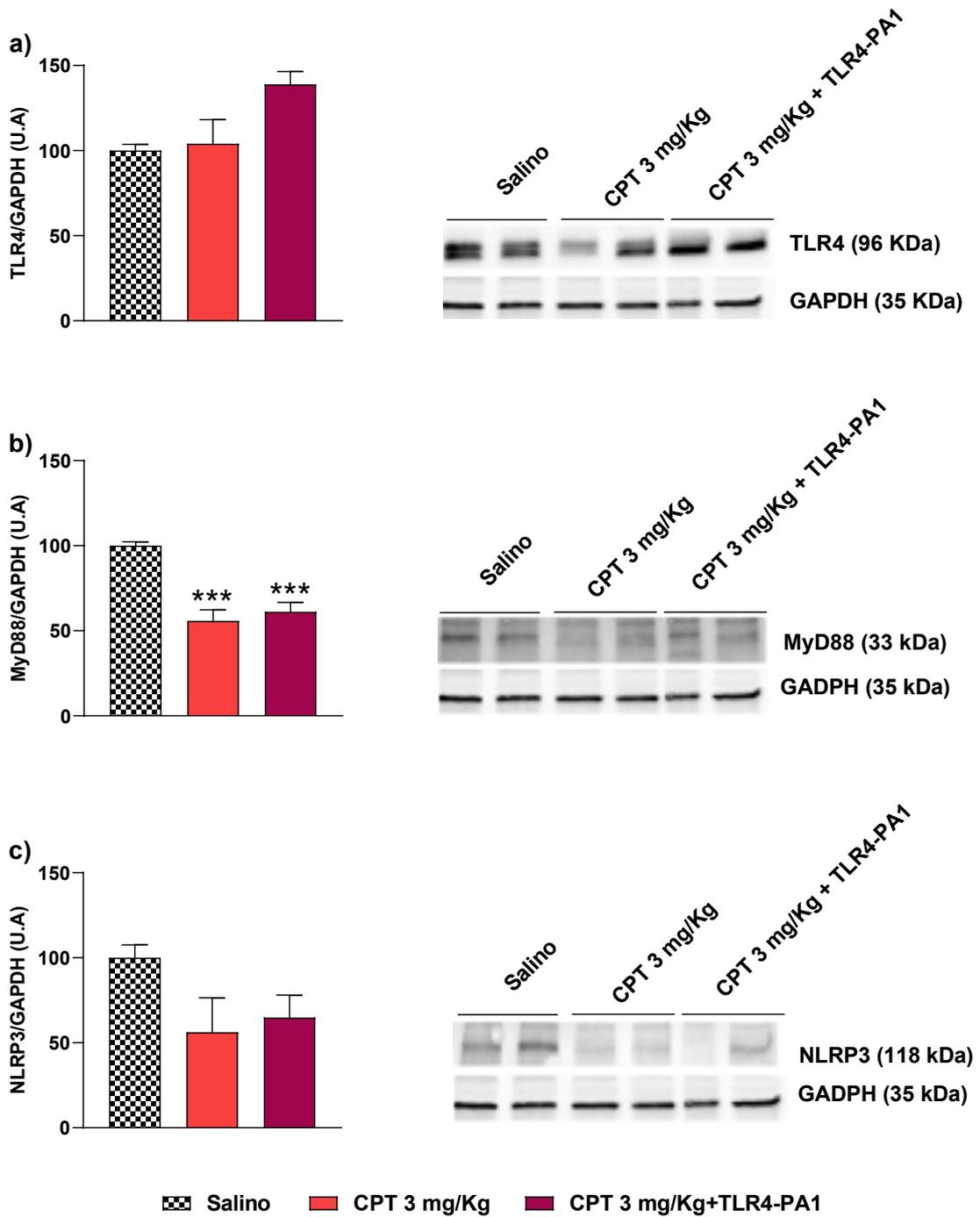


Figura 27: (a) Expresión proteica de TLR4, (b) Expresión proteica de MyD88, (c) Expresión proteica de NLRP3 en la aorta procedente de animales tratados durante 5 semanas con Cisplatino (CPT) 3 mg/Kg o con CPT 3 mg/Kg y que recibieron las últimas 2 semanas un tratamiento diario de TLR4-PA1, dosis 10 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1). Los datos están representados como Media ± E.E.M (n=4-6). Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Tukey para llevar a cabo el análisis estadístico. (\*\*\*)  $p < 0,001$  vs. Salino).

#### 4.2.4.3. Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, sobre la expresión proteica en el tejido renal de los animales tratados con cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2mg/Kg) y cisplatino 3 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg)

En las Figura 28 y Figura 29 se presentan los resultados del efecto de la administración de TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, en la expresión proteica de TLR4, MyD88 y NLRP3 en el tejido renal de los animales de los diferentes grupos experimentales. En las Figura 28 y Figura 29 se representan: expresión proteica de TLR4, expresión proteica de MyD88 y expresión proteica de NLRP3 obtenidas de los animales tratados durante 5 semanas con CPT 2 mg/Kg (Figura 28 a, b, c) y CPT 3 mg/Kg (Figura 29 a, b, c). En las figuras se muestran como referencia los valores correspondientes de los animales tratados con Salino, es decir, no tratados con el antitumoral.

En el tejido renal procedente de animales a los que se le administró TLR4-PA1 durante las dos últimas semanas de tratamiento con CPT 2 mg/Kg, no se observaron cambios en la expresión de TLR4, en comparación con dicha expresión en muestras de animales tratados con CPT 2 mg/Kg que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 (CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1:  $246,50 \pm 94,96$  U.A (n=4),  $p > 0,05$  vs. CPT 2 mg/Kg:  $223,71 \pm 8,31$  U.A (n=4)). Sin embargo, el tratamiento con TLR4-PA1 durante las dos últimas semanas que se administró CPT 2 mg/Kg, produjo un aumento de la expresión de MyD88 en el riñón, que no llegó a ser significativo, en comparación con la expresión de esta proteína en muestras del grupo de animales tratados con CPT 2 mg/Kg que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 (CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1:  $353,70 \pm 92,17$  U.A (n=5),  $p > 0,05$  vs. CPT 2 mg/Kg:  $193,45 \pm 26,39$  U.A (n=6)). Por el contrario, la expresión de NLRP3 a nivel renal experimentó un ligero descenso en el grupo de animales a los que se les trató con TLR4-PA1 durante las dos últimas semanas de administración de CPT 2 mg/Kg en relación a la expresión obtenida en muestras de animales que no habían recibido dicho tratamiento (CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1:  $404,25 \pm 66,70$  U.A (n=4),  $p > 0,05$  vs. CPT 2 mg/Kg:  $482,87 \pm 135,69$  U.A (n=5)).

En el caso de los animales tratados con CPT 3 mg/Kg a los que se le administró TLR4-PA1 durante las últimas dos semanas, se observaron resultados distintos a los mencionados en el párrafo anterior. Así, en el tejido renal procedente de los animales del grupo experimental al que se le administró TLR4-PA1 durante las últimas dos semanas del tratamiento con CPT 3 mg/Kg, se observó una disminución de la expresión de TLR4 y NLRP3, en comparación con la observada en muestras de este tejido procedentes de animales tratados con CPT 3 mg/Kg que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 (TLR4: CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1:  $507,66 \pm 8,36$  U.A (n=5),  $p > 0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $762,71 \pm 114,59$  U.A (n=6); NLRP3: CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1:  $665,22 \pm 127,05$  U.A (n=6),  $p > 0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg:  $962,55 \pm 82,10$  U.A (n=4)). Sin embargo, la administración TLR4-PA1 durante las últimas dos semanas del tratamiento con CPT 3 mg/Kg, produjo un aumento significativo de la expresión de MyD88 en el riñón, en comparación con la expresión obtenida en muestras de este tejido obtenidas de los animales tratados con CPT 3 mg/Kg que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 (CPT

3 mg/Kg+TLR4-PA1: 1011,19±58,93 U.A (n=6),  $p<0,05$  vs. CPT 3 mg/Kg: 740,35±29,81 U.A (n=4)).

Así, el tratamiento durante dos semanas con el fármaco TLR4-PA1 redujo ligeramente la expresión de TLR4 y NLRP3 en los animales tratados con CPT a las dosis evaluadas (TLR4: CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1: 246,50±94,96 U.A (n=4),  $p>0,05$ ; CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1: 507,66±8,36 U.A (n=5)  $p<0,01$  vs Salino: 100,00±1,18 (n=5); NLRP3: CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1: 404,25±66,70 U.A (n=4)  $p>0,05$ ; CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1: 665,22±127,05 U.A (n=6),  $p>0,05$  vs. Salino: 100,00±2,43 U.A (n=6)). Los datos mencionados anteriormente, muestran que el tratamiento con TLR4-PA1 únicamente corrige de manera parcial las alteraciones observadas en la expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3 en tejido renal de los animales tratados con CPT, produciendo una ligera disminución de la expresión de TLR4 y NLRP3 en los animales que recibían el tratamiento con la dosis más alta de antitumoral, CPT 3 mg/Kg.

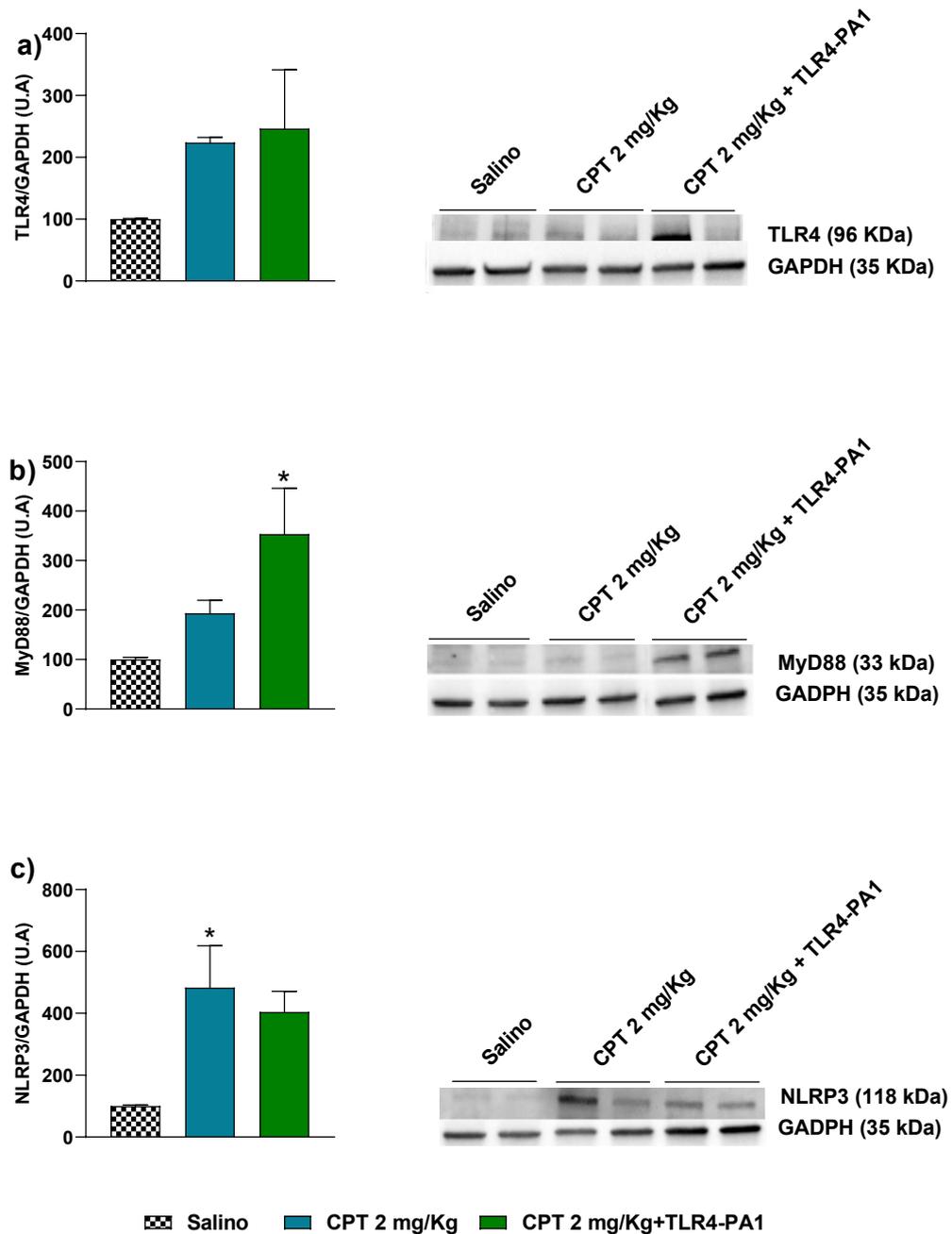


Figura 28: (a) Expresión proteica de TLR4, (b) Expresión proteica de MyD88, (c) Expresión proteica de NLRP3 en el tejido renal procedente de animales tratados durante 5 semanas con Cisplatino (CPT) 2 mg/Kg o con CPT 2 mg/Kg y que recibieron las últimas 2 semanas un tratamiento diario de TLR4-PA1, dosis 10 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg+TLR4-PA1). Los datos están representados como Media  $\pm$  E.E.M (n=4-6). Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Tukey para llevar a cabo el análisis estadístico (\*  $p < 0,05$  vs Salino).

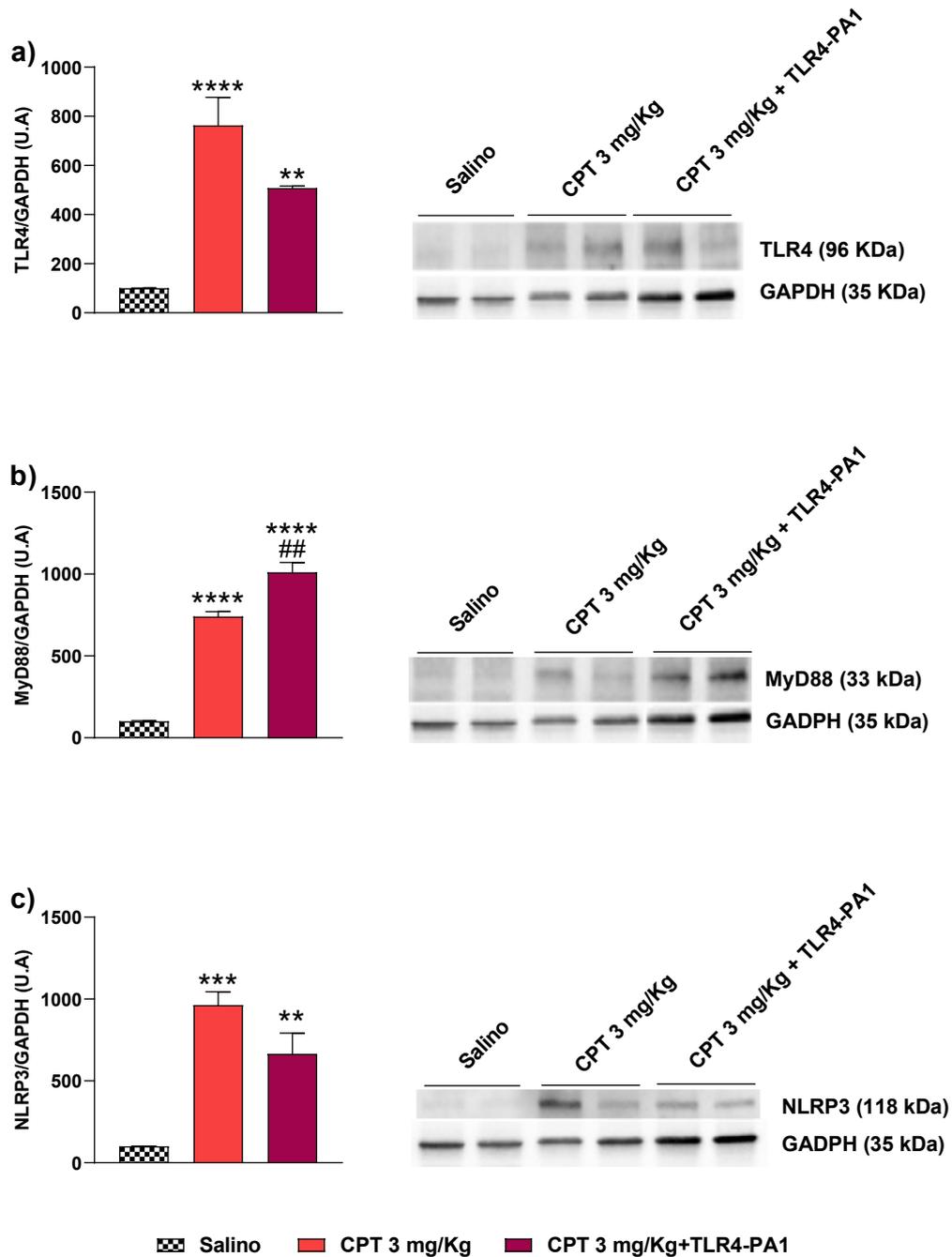


Figura 29: (a) Expresión proteica de TLR4, (b) Expresión proteica de MyD88, (c) Expresión proteica de NLRP3 en el tejido renal procedente de animales tratados durante 5 semanas con Cisplatino (CPT) 3 mg/Kg o con CPT 3 mg/Kg y que recibieron las últimas 2 semanas un tratamiento diario de TLR4-PA1, dosis 10 mg/Kg (CPT 3 mg/Kg+TLR4-PA1). Los datos están representados como Media  $\pm$  E.E.M (n=4-6). Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Tukey para llevar a cabo el análisis estadístico. (## p<0,01 vs CPT 3 mg/Kg, \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001 vs. Salino).

Antes de concluir este subapartado, hay que señalar que por diferentes problemas técnicos no ha sido posible concluir la determinación en la expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3 en arteria mesentérica de los animales del modelo de administración crónica de CPT, por lo que estos resultados no han podido incluirse en esta Tesis Doctoral.

### 4.3. Modelo de Síndrome Metabólico por dieta. Complicaciones cardiovasculares

#### 4.3.1. Parámetros generales

##### 4.3.1.1. Evolución del peso corporal y de la ganancia de peso de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta

En este apartado se presentan: la evolución del peso corporal (Figura 30 a) y de la ganancia de peso de los animales (Figura 30 b) obtenida tras alimentar a los animales durante 20 semanas, con una dieta estándar normocalórica (Control) o una dieta hipercalórica e hipergrasa (SM).

Tras 20 semanas de periodo experimental, los animales del grupo SM tuvieron un peso y ganancia de peso significativamente superior a la observada en los animales del grupo Control (Peso al final del periodo experimental: SM:  $590,80 \pm 22,91$  g (n=10),  $p < 0,01$  vs. Control:  $505,80 \pm 18,35$  g (n=10); Ganancia peso al final del periodo experimental: SM:  $80,12 \pm 7,36$  % (n=10),  $p < 0,01$  vs. Control:  $56,16 \pm 6,14$  % (n=10)).

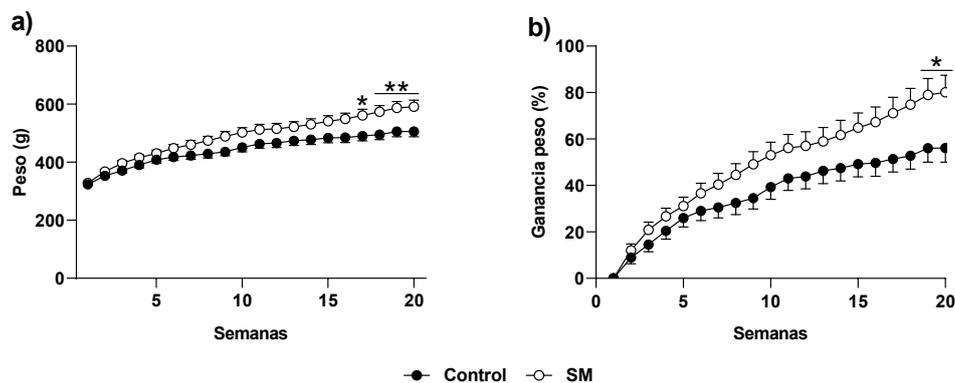


Figura 30: (a) Evolución del peso corporal y (b) Porcentaje de ganancia de peso corporal, en animales con Síndrome Metabólico por dieta (SM) y en animales a los que se les alimentó con una dieta estándar (Control). Los datos representan la Media  $\pm$  E.E.M (n=10). Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de un test *post-hoc* Sidak para el tratamiento estadístico de los datos (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  vs. Control).

#### **4.3.1.2. Evolución de la Ingesta Sólida, Ingesta Líquida e Ingesta Calórica de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta**

En este apartado se presentan: la Ingesta Sólida (IS) (Figura 31 a), Ingesta Líquida (IL) (Figura 31 b) e Ingesta Calórica (IC) (Figura 31 c) obtenidas tras alimentar a los animales durante 20 semanas, con una dieta estándar normocalórica (Control) o una dieta hipercalórica e hipergrasa (SM).

Tras 20 semanas de periodo experimental, los animales con SM por dieta mantuvieron una ingesta de comida significativamente inferior a la de los animales del grupo Control (IS al final del periodo experimental: SM:  $14,70 \pm 0,40$  gr/rata/día (n=10),  $p < 0,0001$  vs. Control:  $25,93 \pm 0,77$  gr/rata/día (n=10)). Sin embargo, en los con SM, se produjo un aumento significativo de la ingesta líquida, en comparación con la ingesta correspondiente en los animales del grupo Control (IL al final del periodo experimental: SM:  $54,33 \pm 2,33$  mL/rata/día (n=10),  $p < 0,0001$  vs. Control:  $31,00 \pm 0,43$  mL/rata/día (n=10)). Más aún, la ingesta calórica de los animales con SM fue significativamente mayor a la de los animales del grupo Control durante todas las semanas de alimentación hipercalórica a hipergrasa (IC: al final del periodo experimental: SM:  $121,49 \pm 5,43$  Kcal/rata/día (n=10),  $p < 0,0001$  vs. Control:  $86,51 \pm 2,56$  Kcal/rata/día (n=10)).

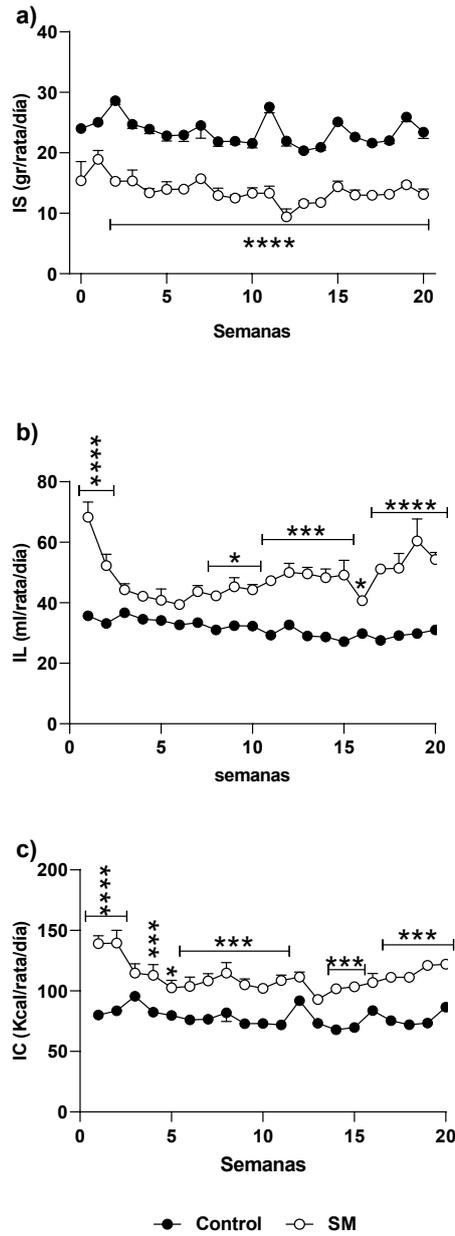


Figura 31: (a) Evolución de la Ingesta Sólida (IS), (b) Ingesta Líquida (IL) e (c) Ingesta calórica (IC) en animales con Síndrome Metabólico por dieta (SM) y en animales a los que se les alimentó con una dieta estándar (Control). Los datos representan la Media  $\pm$  E.E.M (n=10). Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de un test *post-hoc* Sidak para el tratamiento estadístico de los datos (\*p<0,05; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001 vs. Control).

#### 4.3.1.3. Índice de Masa Corporal y Perímetro Abdominal de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta

En la Figura 32 se representan: el Índice de Masa Corporal (IMC) (Figura 32 a) y el Perímetro Abdominal (Figura 32 b) obtenidos tras alimentar a los animales durante 20 semanas, con una dieta estándar normocalórica (Control) o una dieta hipercalórica e hipergrasa (SM).

La ingesta de una dieta hipercalórica e hipergrasa durante 20 semanas produjo un incremento significativo tanto del IMC y como del Perímetro abdominal en los animales, en comparación con dichos parámetros en animales del grupo Control (IMC: SM:  $0,81 \pm 0,02$  g/cm<sup>2</sup> (n=10),  $p < 0,01$  vs. Control:  $0,71 \pm 0,02$  g/cm<sup>2</sup> (n=9); Perímetro Abdominal:  $24,04 \pm 0,52$  cm (n=10),  $p < 0,01$  vs. Control:  $21,43 \pm 0,46$  cm (n=10)).

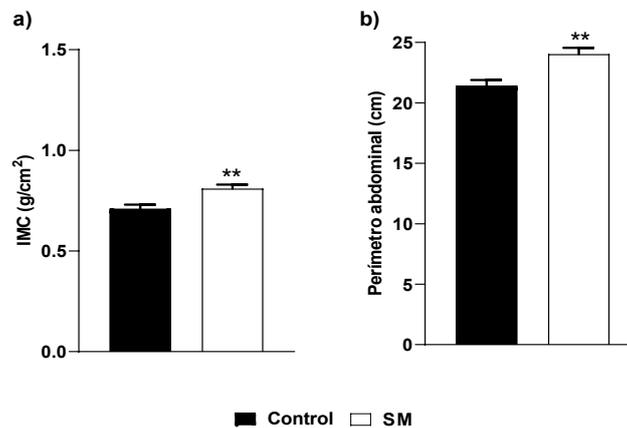


Figura 32: (a) Índice de Masa Corporal (IMC) y (b) Perímetro Abdominal en animales con Síndrome Metabólico por dieta (SM) y en animales a los que se les alimentó con una dieta estándar (Control). Los datos representan la Media  $\pm$  E.E.M (n=9). Se utilizó un análisis *t-student* con corrección de Welch para el tratamiento estadístico de los datos (\*\* $p < 0,001$  vs. Control).

### 4.3.2. Marcadores plasmáticos

Los niveles plasmáticos de glucosa, triglicéridos, colesterol total y lipoproteínas se midieron a lo largo del desarrollo del modelo experimental de SM por dieta con el fin de realizar un seguimiento del desarrollo del mismo y como Control interno de reproducibilidad del modelo en el laboratorio (datos no mostrados). En esta sección de resultados se presentan únicamente los datos obtenidos en los marcadores plasmáticos al final de periodo experimental.

#### 4.3.2.1. Biomarcadores del metabolismo de la glucosa de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta

En este apartado se presentan: los niveles plasmáticos de glucosa (Figura 33 a), niveles plasmáticos de insulina (Figura 33 b), índice HOMA-IR (Figura 33 c) e índice HOMA- $\beta$  (Figura 33 d) obtenidos tras alimentar a los animales durante 20 semanas, con una dieta estándar normocalórica (Control) o una dieta hipercalórica e hipergrasa (SM).

Tras un periodo experimental de 20 semanas de alimentación con una dieta hipercalórica e hipergrasa, los animales con SM presentaron un aumento significativo de los niveles plasmáticos de glucosa e insulina en comparación con los obtenidos en animales del grupo Control (Glucosa: SM:  $195,75 \pm 15,76$  mg/dL (n=10),  $p < 0,01$  vs. Control:  $121,78 \pm 5,08$  mg/dL (n=10); Insulina: SM:  $8,39 \pm 1,23$   $\mu$ g/mL (n=8),  $p < 0,05$  vs. Control:  $5,31 \pm 0,50$   $\mu$ g/mL (n=10)).

Por otra parte, en el grupo de animales con SM, el índice HOMA-IR fue ligeramente superior al obtenido en los animales del grupo Control (SM:  $63,33 \pm 14,29$  (n=8),  $p > 0,05$  vs. Control:  $47,22 \pm 3,58$  (n=6)). En cambio, en el grupo de animales con SM se observó una disminución significativa en el índice HOMA- $\beta$  en comparación al obtenido en los animales del grupo Control (SM:  $333,90 \pm 38,95$  (n=8),  $p < 0,05$  vs. Control:  $628,15 \pm 93,24$  (n=6)).

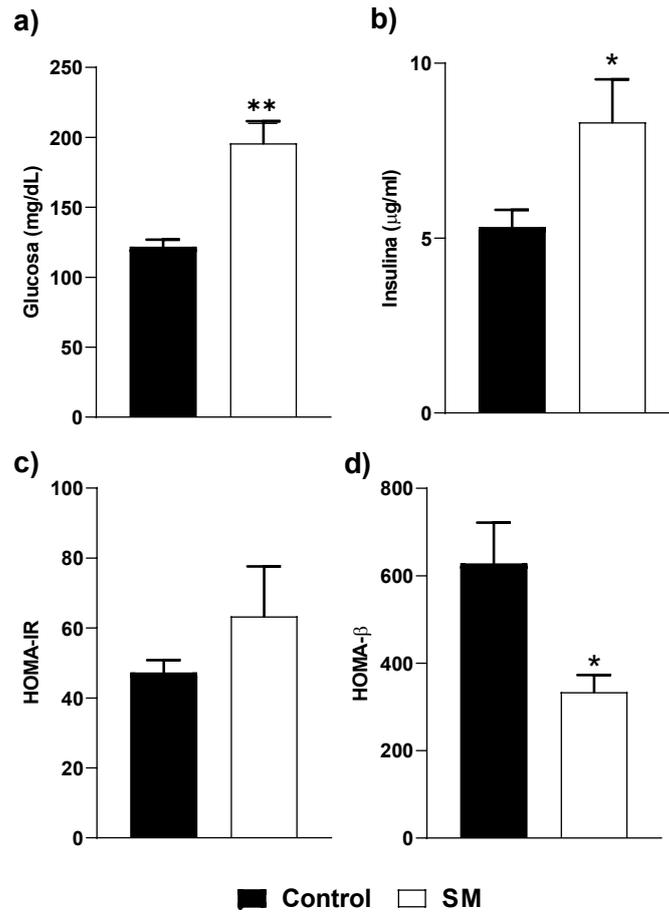


Figura 33: (a) Niveles plasmáticos de glucosa, (b) Niveles plasmáticos de insulina, (c) Índice HOMA-IR e, (d) Índice HOMA-β en animales con Síndrome Metabólico por dieta (SM) y en animales a los que se les alimentó con una dieta estándar (Control). Los datos representan la Media  $\pm$  E.E.M (n=7). Se utilizó un análisis *t-student* con corrección de Welch para el tratamiento estadístico de los datos (\* $p < 0,05$  vs. Control).

#### 4.3.2.2. Biomarcadores del metabolismo lipídico de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta

En este apartado se presentan los niveles plasmáticos de: Triglicéridos (Figura 34 a), Colesterol (Figura 34 b), HDL (Figura 34 c) y LDL (Figura 34 d) obtenidos tras alimentar a los animales durante 20 semanas, con una dieta estándar normocalórica (Control) o una dieta hipercalórica e hipergrasa (SM).

Tras un periodo experimental de 20 semanas de alimentación con una dieta hipercalórica e hipergrasa, los niveles plasmáticos de triglicéridos, colesterol, HDL y LDL de los animales con SM aumentaron de forma significativa en comparación con los niveles obtenidos en los animales del grupo Control (Triglicéridos: SM:  $289,25 \pm 15,60$  mg/dL (n=8),  $p < 0,05$  vs. Control:  $215,44 \pm 19,89$  mg/dL (n=9); Colesterol: SM:  $80,00 \pm 3,42$  mg/dL (n=8),  $p < 0,0001$  vs. Control:  $52,38 \pm 1,45$  mg/dL (n=8); HDL: SM:  $36,25 \pm 2,78$  mg/dL (n=8),  $p < 0,05$  vs. Control:  $26,67 \pm 1,12$  mg/dL (n=6); LDL: SM:  $148,51 \pm 9,35$  mg/dL (n=8),  $p < 0,05$  vs. Control:  $102,75 \pm 13,66$  mg/dL (n=6)).

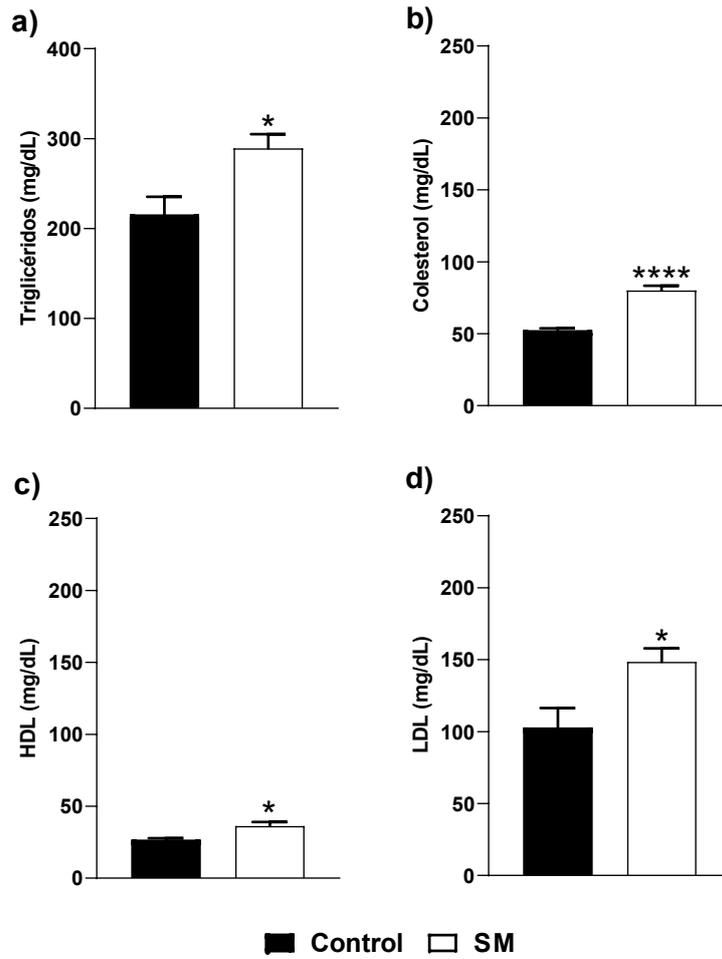
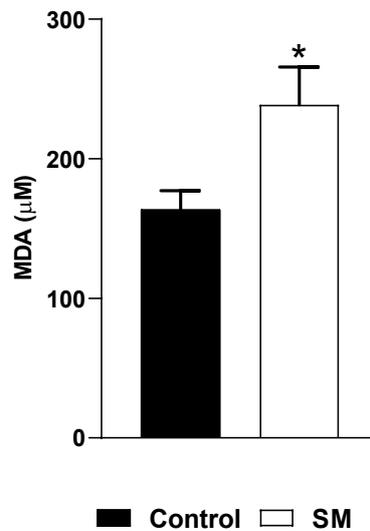


Figura 34: (a) Niveles plasmáticos de Triglicéridos, (b) Niveles plasmáticos de Colesterol, (c) Niveles plasmáticos de HDL y, (d) Niveles plasmáticos de LDL en animales con Síndrome Metabólico por dieta (SM) y en animales a los que se les alimentó con una dieta estándar (Control). Los datos representan la Media  $\pm$  E.E.M (n=8). Se utilizó un análisis *t-student* con corrección de Welch para el tratamiento estadístico de los datos (\*p<0,05; \*\*p<0,01 vs. Control).

#### 4.3.2.3. Niveles plasmáticos de MDA de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta

En la Figura 35 se representan los niveles plasmáticos de MDA obtenidos tras alimentar a los animales durante 20 semanas, con una dieta estándar normocalórica (Control) o una dieta hipercalórica e hipergrasa (SM).

Los animales con SM presentaron un aumento significativo de los niveles plasmáticos de MDA en comparación con los animales del grupo Control (SM:  $232,68 \pm 27,03 \mu\text{M}$  (n=6),  $p < 0,05$  vs. Control:  $163,53 \pm 13,68 \mu\text{M}$  (n=5)).



**Figura 35: Niveles plasmáticos de MDA en animales con Síndrome Metabólico por dieta (SM), y en animales a los que se les alimentó con una dieta estándar (Control). Los datos representan la Media  $\pm$  E.E.M (n= 6). Se utilizó un análisis *t-student* con corrección de Welch para el tratamiento estadístico de los datos (\* $p < 0,05$  vs. Control).**

#### 4.3.2.4. Niveles plasmáticos de Creatinina de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta

En la Figura 36 se representan los niveles plasmáticos de Creatinina obtenidos tras alimentar a los animales durante 20 semanas, con una dieta estándar normocalórica (Control) o una dieta hipercalórica e hipergrasa (SM).

Tras un periodo experimental de 20 semanas, en los animales alimentados con una dieta hipercalórica e hipergrasa, se produjo un aumento significativo de los niveles plasmáticos de Creatinina, en comparación con los obtenidos en los animales del grupo Control (SM:  $0,40 \pm 0,01$  mg/mL (n=8),  $p < 0,01$  vs. Control:  $0,30 \pm 0,02$  mg/mL (n=6)).

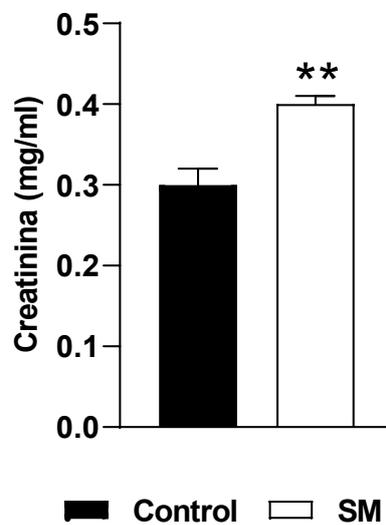


Figura 36: Niveles plasmáticos de Creatinina en animales con Síndrome Metabólico por dieta (SM), y en animales a los que se les alimentó con una dieta estándar (Control). Los datos representan la Media  $\pm$  E.E.M (n=6). Se utilizó un análisis *t-student* con corrección de Welch para el tratamiento estadístico de los datos (\*\* $p < 0,01$ ; vs. Control).

#### 4.3.2.5. Niveles plasmáticos de citoquinas de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta

Los niveles de las diferentes citoquinas se determinaron al finalizar el periodo de 20 semanas de alimentación, con una dieta estándar normocalórica (Control) o una dieta hipercalórica e hipergrasa (SM). No se pudieron obtener datos para las citoquinas IL-5 y VEGF debido a que sus niveles en las muestras procesadas estaban por debajo del umbral de detección del equipo utilizado.

Tras un periodo experimental de 20 semanas alimentando a los animales con una dieta hipercalórica e hipergrasa, se produjo un aumento en la mayoría de los niveles plasmáticos de las citoquinas analizadas. Sin embargo, este aumento únicamente resultó significativo en el caso de las citoquinas IL-12p70, IL-18, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (Tabla 10) (IL-12p70: SM:  $225,51 \pm 14,08$  pg/mL (n=5),  $p < 0,01$  vs. Control:  $110,51 \pm 21,86$  pg/mL (n=7); IL-18: SM:  $6993 \pm 1625$  pg/mL (n=7),  $p < 0,05$  vs. Control:  $1659 \pm 486$  pg/mL (n=6); IFN- $\gamma$ : SM:  $227,28 \pm 5,10$  pg/mL (n=5),  $p < 0,001$  vs. Control:  $130,13 \pm 16,25$  pg/mL (n=7); TNF- $\alpha$ : SM:  $369,84 \pm 25,23$  pg/mL (n=6),  $p < 0,05$  vs. Control:  $272,47 \pm 20,52$  pg/mL (n=7)).

Analito	Control (pg/mL)	SM (pg/mL)	p
<b>G-CSF</b>	54,39±9,29	61,65±6,73	p>0,05
<b>(GM)-CSF</b>	127,54±33,53	202,87±21,05	p>0,05
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	101,06±8,09	104,23±6,93	p>0,05
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	37,95±6,08	41,04±6,02	p>0,05
<b>IL-2</b>	940,99±121,60	973,14±111,27	p>0,05
<b>IL-4</b>	62,83±6,35	65,95±7,08	p>0,05
<b>IL-5</b>	-	-	p>0,05
<b>IL-6</b>	163,61±25,31	195,26±24,46	p>0,05
<b>IL-7</b>	68,36±13,58	76,43±12,15	p>0,05
<b>IL-10</b>	153,60±22,49	145,89±18,09	p>0,05
<b>IL-12p70</b>	<b>143,31±37,87</b>	<b>225,51±14,08**</b>	<b>p&lt;0,01</b>
<b>IL-13</b>	110,71±14,43	127,14±14,14	p>0,05
<b>IL-17</b>	39,47±7,49	31,81±4,39	p>0,05
<b>IL-18</b>	<b>1659,39±486,98</b>	<b>6993,06±1625,03*</b>	<b>p&lt;0,05</b>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>150,43±24,70</b>	<b>191,15±23,68***</b>	<b>p&lt;0,001</b>
<b>MCP-1</b>	24541,96±3356,53	26793,09±3718,71	p>0,05
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	54,06±7,51	49,64±3,11	p>0,05
<b>MIP-3<math>\alpha</math></b>	1201,87±40,33	1208,22±20,13	p>0,05
<b>RANTES</b>	291,20±25,82	351,11±28,38	p>0,05
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>291,20±25,82</b>	<b>369,84±25,23*</b>	<b>p&lt;0,05</b>
<b>VEGF</b>	-	-	p>0,05

Tabla 10: Niveles plasmáticos de citoquinas en animales con Síndrome Metabólico por dieta (SM) y en animales a los que se les alimentó con una dieta estándar (Control). Los datos representan la Media  $\pm$  E.E.M (n=5). Se utilizó un análisis t-student con corrección de Welch para el tratamiento estadístico de los datos (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 vs. Control).

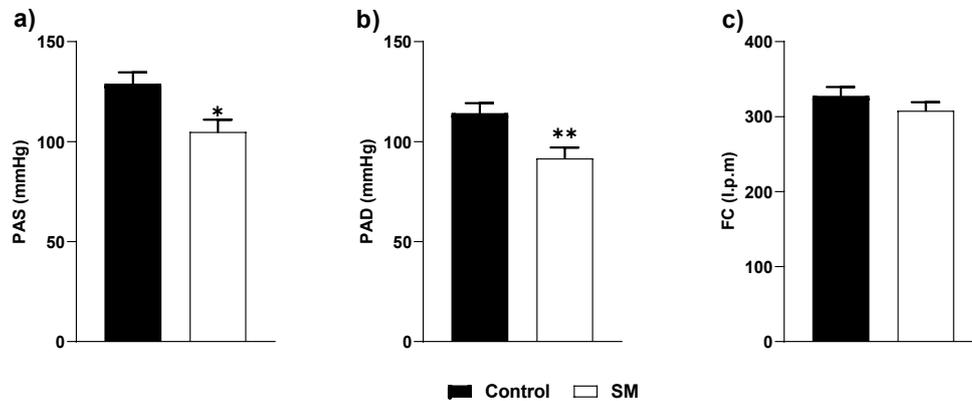
### 4.3.3. Parámetros cardiovasculares

#### 4.3.3.1. Presión arterial y frecuencia cardiaca de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta

En este apartado se presentan los valores de Presión Arterial Sistólica (PAS) (Figura 37 a), Presión Arterial Diastólica (PAD) (Figura 37 b) y Frecuencia Cardiaca (FC) (Figura 37 c) tras alimentar a los animales durante 20 semanas con una dieta estándar normocalórica (Control) o, una dieta hipercalórica e hipergrasa (SM).

Los animales con SM mostraron unos valores de PAS y PAD significativamente inferiores a los obtenidos en los animales del grupo Control (PAS: SM: 104,83±6,19 mmHg (n=9), p<0,05 vs. Control: 128,95±5,74 mmHg (n=9); PAD: SM: 91,59±5,50 mmHg (n=9), p<0,01 vs. Control: 114,13±5,14 mm Hg (n=9)).

Sin embargo, los animales con SM no mostraron ningún cambio en la FC en comparación con los valores obtenidos en los animales del grupo Control (SM:  $307,90 \pm 11,36$  l.p.m (n=9),  $p > 0,05$  vs. Control:  $327,58 \pm 11,94$  l.p.m (n=9)).



**Figura 37:** (a) Presión Arterial Sistólica (PAS), (b) Presión Arterial Diastólica (PAD) Y, (C) Frecuencia cardiaca (FC) en animales anestesiados con Síndrome Metabólico por dieta (SM) y en animales anestesiados a los que se les alimentó con una dieta estándar (Control). Los datos representan la Media  $\pm$  E.E.M (n= 10). Se utilizó un análisis *t-student* con corrección de Welch para el tratamiento estadístico de los datos (\*\* $p < 0,01$ ; vs. Control). l.p.m: Latidos por minuto.

#### 4.3.3.2. Función cardiaca basal de los animales con Síndrome Metabólico por dieta

En este apartado se presentan los valores de Presión de Perfusión de las Coronarias (PPC) (Figura 38 a), Presión Desarrollada por el Ventrículo Izquierdo (PDVI) (Figura 38 b) y Presión Diastólica Final (PDF) (Figura 38 c) en la preparación de corazón aislado y perfundido tras alimentar a los animales durante 20 semanas, con una dieta estándar normocalórica (Control) o una dieta hipercalórica e hipergrasa (SM).

En los animales con SM no se produjeron cambios en los valores de la PPC, la PDVI y la PDF en comparación con los valores obtenidos en los animales del grupo Control (PPC: SM:  $89,10 \pm 7,83$  mmHg (n=9),  $p > 0,05$  vs. Control:  $88,740 \pm 6,91$  mmHg (n=9); PDVI: SM:  $89,35 \pm 2,96$  mmHg (n=9),  $p > 0,05$  vs. Control:  $87,77 \pm 6,79$  mmHg (n=9); PDF:  $11,04 \pm 1,31$  mmHg (n=9),  $p > 0,05$  vs. Control:  $9,11 \pm 3,55$  mmHg (n=9)).

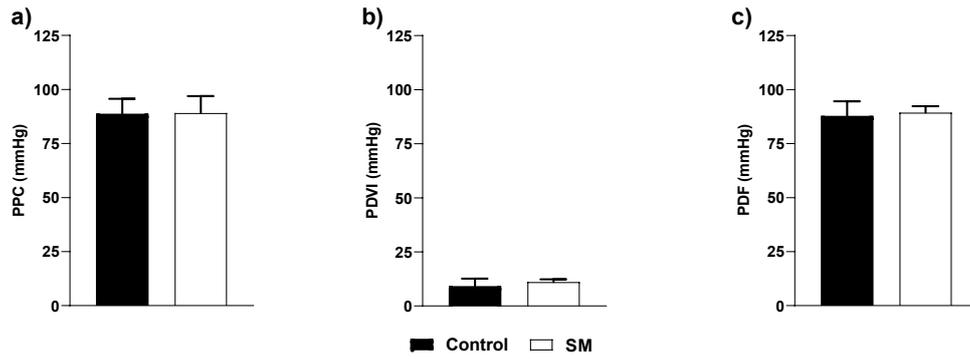


Figura 38: (a) Presión de Perfusión de las Coronarias (PPC), (b) Presión Desarrollada por el Ventrículo Izquierdo (PDVI) y (c) Presión Diastólica Final (PDF) en preparaciones de corazón aislado y perfundido de animales con Síndrome Metabólico por dieta (SM) y en animales a los que se les alimentó con una dieta estándar (Control). Los datos representan la Media  $\pm$  E.E.M (n= 10). Se utilizó un análisis *t-student* con corrección de Welch para el tratamiento estadístico de los datos. No se observaron cambios significativos.

#### 4.3.3.3. Índices cardíacos de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta

En este apartado se presentan el Índice de Masa Cardíaco (IMc) (Figura 39 a) y el Índice de Masa del Ventrículo Izquierdo (IMVI) (Figura 39 b) de los animales de los grupos Control y SM tras alimentar a los animales durante 20 semanas con una dieta estándar normocalórica (Control) o, una dieta hipercalórica e hipergrasa (SM).

En los animales con SM se produjo una disminución en los valores de IMc e IMVI en comparación con los valores obtenidos en los animales del grupo Control (IMc: SM:  $2,59 \pm 0,07$  mg/g (n=8),  $p < 0,05$  vs. Control:  $2,94 \pm 0,13$  mg/g (n=9); IMVI: SM:  $1,64 \pm 0,06$  mg/g (n=7),  $p > 0,05$  vs. Control:  $1,90 \pm 0,11$  mg/g (n=8)). Esta disminución únicamente resultó significativa en el caso del IMc.

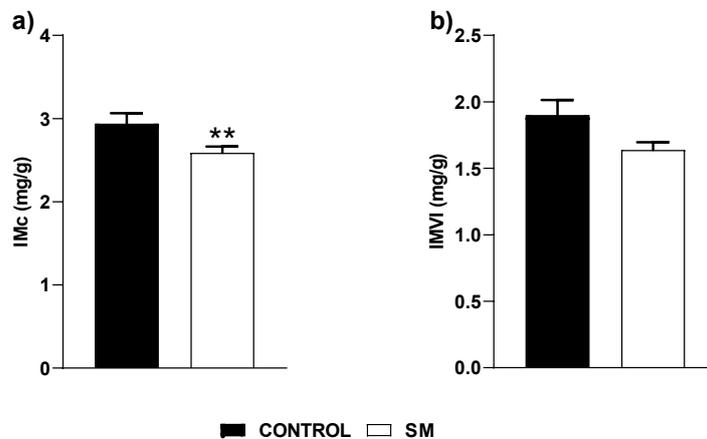


Figura 39: (a) Índice de Masa cardíaco (IMc), (b) Índice de Masa del Ventrículo Izquierdo (IMVI) de animales con Síndrome Metabólico por dieta (SM) y en animales a los que se les alimentó con una dieta estándar (Control). Los datos representan la Media  $\pm$  E.E.M (n=9). Se utilizó un análisis *t-student* con corrección de Welch para el tratamiento estadístico de los datos (\*\* $p < 0,01$  vs. Control).

#### 4.3.3.4. Evaluación de la reactividad vascular de la aorta de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta

En este apartado se presentan los resultados de reactividad vascular en la aorta de los animales de los diferentes grupos experimentales. En la Figura 40, se representan: la función contráctil (Figura 40 a), la relajación dependiente de endotelio (Figura 40 b), y la relajación no dependiente de endotelio (Figura 40 c), así como el área bajo las correspondientes curvas concentración-respuesta (Figura 40 d, e y f) en las preparaciones obtenidas tras alimentar a los animales durante 20 semanas, con una dieta estándar normocalórica (Control) o una dieta hipercalórica e hipergrasa (SM).

En los animales con SM se produjo una disminución, que no llegó a ser estadísticamente significativa, en la función contráctil de la aorta de los animales en comparación con la función obtenida en las preparaciones procedentes de los animales del grupo Control ( $E_{\max}$ : SM:  $1,01 \pm 0,09$  g (n=10),  $p > 0,05$  vs. Control:  $1,21 \pm 0,11$  g (n=9); ABC: SM:  $2,02 \pm 0,31$  (n=10),  $p > 0,05$  vs. Control:  $2,54 \pm 0,38$  mg/g (n=9)). Por otra parte, en la aorta de los animales con SM no se modificó la relajación dependiente de endotelio, ni la relajación no dependiente de endotelio, en comparación con las respuestas obtenidas en las preparaciones procedentes de los animales del grupo Control (Carbacol:  $E_{\max}$ : SM:  $92,70 \pm 4,73$  % (n=11),  $p > 0,05$  vs. Control:  $96,68 \pm 3,30$  % (n=9); ABC: SM:  $252,12 \pm 26,61$  (n=11),  $p > 0,05$  vs. Control:  $230,20 \pm 15,39$  (n=9); NSP:  $E_{\max}$ : SM:  $118,71 \pm 3,00$  % (n=8),  $p > 0,05$  vs. Control:  $122,61 \pm 6,94$  % (n=9); ABC: SM:  $461,55 \pm 27,87$  (n=9),  $p > 0,05$  vs. Control:  $412,15 \pm 29,07$  (n=9)).

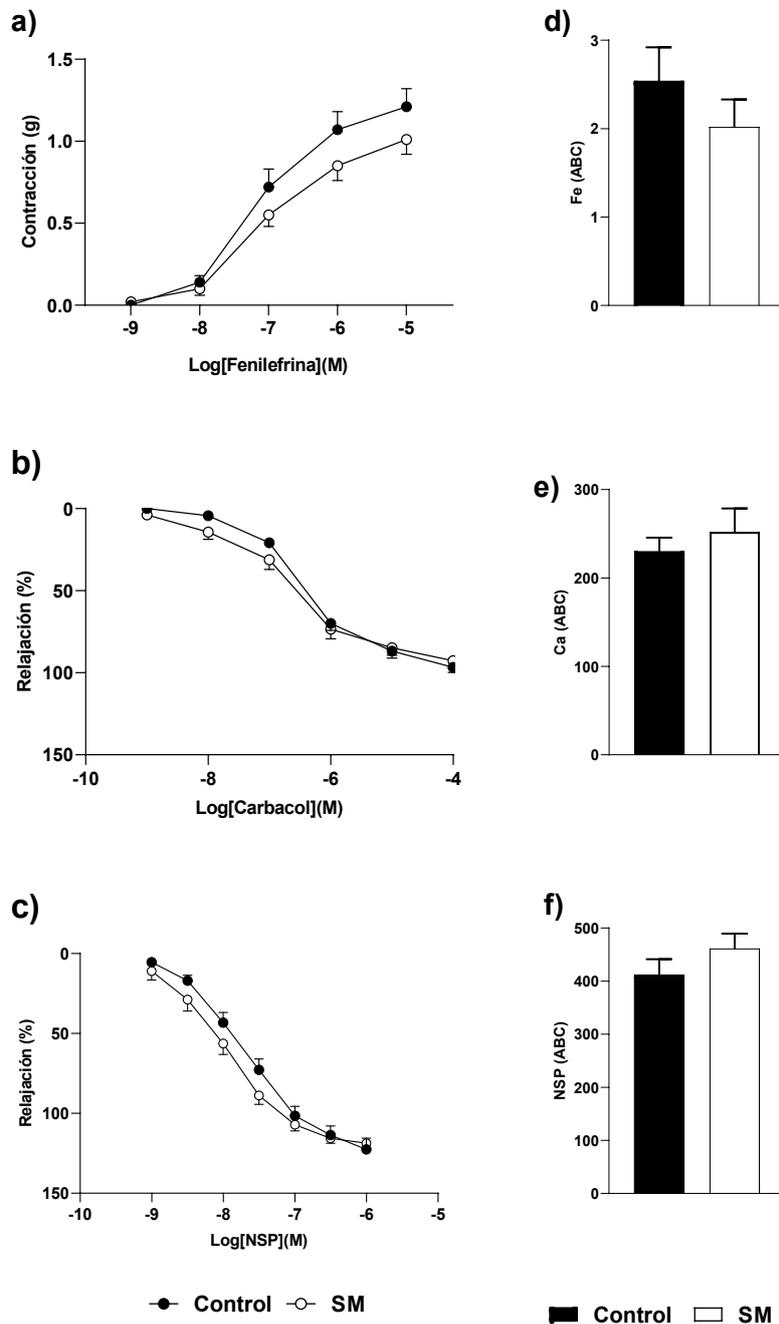


Figura 40: (a) Curva concentración-respuesta a Fe ( $10^{-9}\text{M}$ - $10^{-5}\text{M}$ ), (b) Curva concentración-respuesta a Ca ( $10^{-9}\text{M}$ - $10^{-4}\text{M}$ ), (c) Curva concentración-respuesta de NPS ( $10^{-9}\text{M}$ - $10^{-6}\text{M}$ ), (d) Área bajo la curva de la curva concentración-respuesta a Fe, (e) Área bajo la curva de la curva concentración-respuesta a Ca, (f) Área bajo la curva de la curva concentración-respuesta a NPS, en anillos aislados de aorta de animales con Síndrome Metabólico por dieta (SM) y en animales a los que se les alimentó con una dieta estándar (Control). Los datos representan la Media  $\pm$  E.E.M (n=8). Para el tratamiento estadístico de los datos de las curvas concentración-respuesta se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de un test *post-hoc* Sidak. Para el tratamiento estadístico de los datos del área bajo la curva se utilizó un análisis *t-student* con corrección de Welch. No se observaron diferencias significativas. Fe: Fenilefrina; Ca: Carbacol; NPS: Nitroprusiato sódico; ABC: Área bajo la curva

#### **4.3.3.5. Evaluación de la reactividad vascular de la arteria de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta**

En este apartado se presentan los resultados de reactividad vascular en la arteria mesentérica de los animales de los diferentes grupos experimentales. En la Figura 41, se representan: la función contráctil (Figura 41 a), la relajación dependiente de endotelio (Figura 41 b), y la relajación no dependiente de endotelio (Figura 41 c), así como el área bajo las correspondientes curvas concentración-respuesta (Figura 41 d, e y f) en las preparaciones obtenidas tras alimentar a los animales durante 20 semanas, con una dieta estándar normocalórica (Control) o una dieta hipercalórica e hipergrasa (SM).

En los animales con SM no se observaron cambios en la función contráctil de la arteria mesentérica, en comparación con la de los animales del grupo Control ( $E_{max}$ : SM:  $144,62 \pm 2,85$  % ( $n=6$ ),  $p > 0,05$  vs. Control:  $137,86 \pm 5,73$  % ( $n=6$ ); ABC: SM:  $738,40 \pm 19,66$  ( $n=6$ ),  $p > 0,05$  vs Control:  $659,70 \pm 37,33$  ( $n=6$ )). Por otra parte, en la arteria mesentérica de los animales con SM, la respuesta de las preparaciones en la evaluación de la relajación dependiente de endotelio fue inferior, observándose además un desplazamiento en la curva concentración-respuesta a Acetilcolina que resultó en una disminución significativa del área bajo la curva en comparación con las preparaciones del grupo Control ( $E_{max}$ : SM:  $86,57 \pm 3,96$  % ( $n=6$ ),  $p > 0,05$  vs. Control:  $92,39 \pm 3,26$  % ( $n=6$ ); ABC: SM:  $401,00 \pm 57,44$  ( $n=6$ ),  $p < 0,05$  vs. Control:  $550,10 \pm 25,29$  ( $n=6$ )). La relajación no dependiente de endotelio no se modificó en las preparaciones de arteria mesentérica procedentes de animales con SM en comparación con las respuestas obtenidas en las preparaciones procedentes de los animales del grupo Control ( $E_{max}$ : SM:  $98,65 \pm 0,94$  % ( $n=6$ ),  $p < 0,05$  vs. Control:  $98,43 \pm 1,36$  % ( $n=6$ ); ABC: SM:  $348,30 \pm 18,07$  ( $n=6$ ),  $p > 0,05$  vs. Control:  $387,30 \pm 24,25$  ( $n=6$ )).

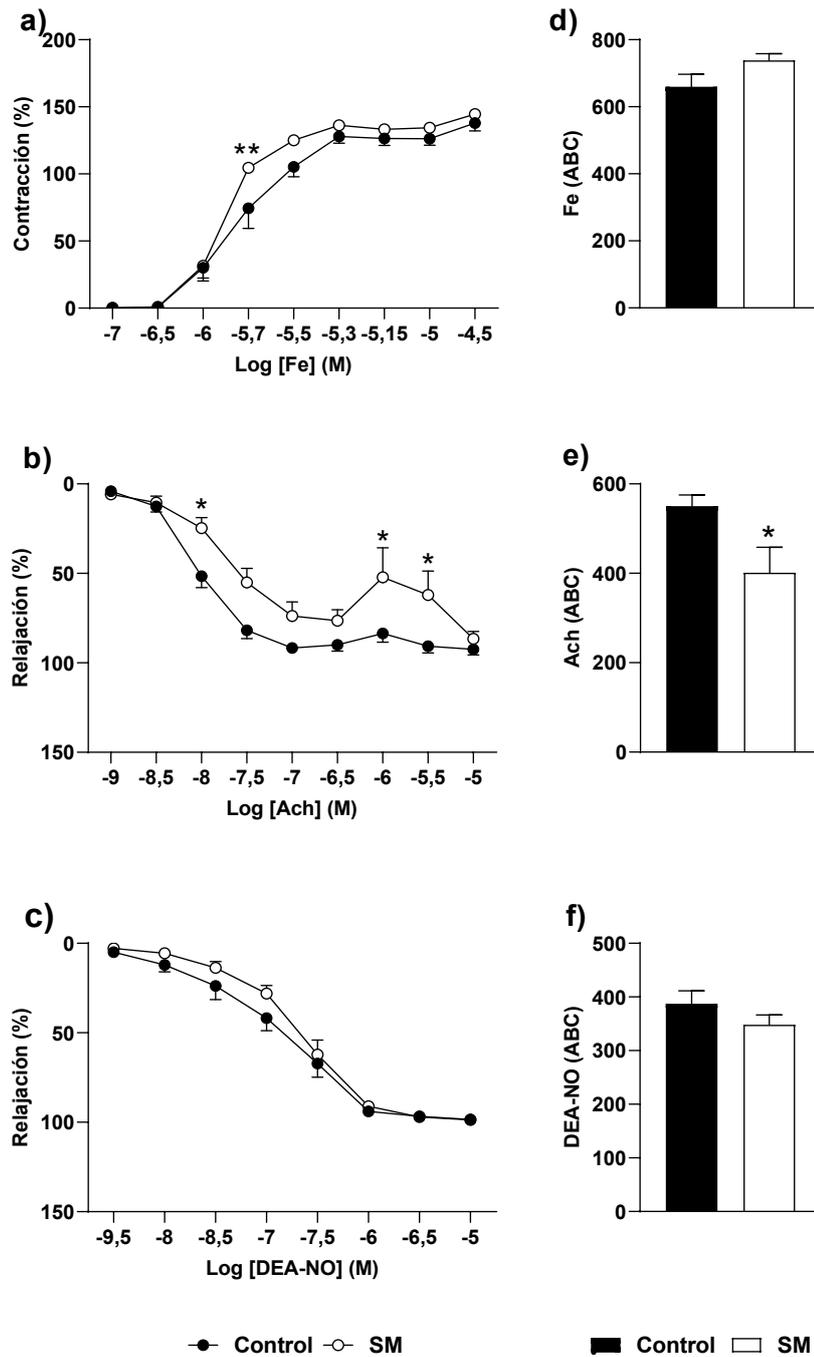


Figura 41: (a) Curva concentración-respuesta a Fe ( $10^{-7}$ M- $10^{-4.5}$ M), (b) Curva concentración-respuesta a ACh ( $10^{-9}$ M- $10^{-5}$ M), (c) Curva concentración-respuesta de DEA-NO ( $10^{-9.5}$ M- $10^{-5}$ M), (d) Área bajo la curva de la curva concentración-respuesta a Fe, (e) Área bajo la curva de la curva concentración respuesta a ACh, (f) Área bajo la curva de la curva concentración respuesta a DEA-NO, en anillos aislados de arteria mesentérica de animales con Síndrome Metabólico por dieta (SM) y en animales a los que se les alimentó con una dieta estándar (Control). Los datos representan la Media  $\pm$  E.E.M (n=6). Para el tratamiento estadístico de los datos de las curvas concentración-respuesta se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de un test *post-hoc* Sidak. Para el tratamiento estadístico de los datos del área bajo la curva se utilizó un análisis *t-student* con corrección de Welch (\*p<0,05; \*\*p<0,01 vs. Control). Fe: Fenilefrina; ACh: Acetilcolina; DEA-NO: NONOato de dietilamina; ABC: Área bajo la curva.

#### 4.3.4. Expresión proteica

##### 4.3.4.1. Expresión del TLR4, MyD88 y NLRP3 en el ventrículo izquierdo de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta

En este apartado se presentan: la expresión proteica de TLR4 (Figura 42 a), la expresión proteica de MyD88 (Figura 42 b) y la expresión proteica de NLRP3 (Figura 42 c) en el tejido cardiaco obtenido de los animales de los grupos Control y tras alimentar a los animales durante 20 semanas, con una dieta estándar normocalórica (Control) o una dieta hipercalórica e hipergrasa (SM).

En los animales con SM no se modificó la expresión de TLR4, MyD88, ni NLRP3 en el tejido cardiaco en comparación con dicha expresión en el tejido obtenido de los animales del grupo Control (TLR4: SM:  $108,55 \pm 13,10$  U.A. (n=5),  $p > 0,05$  vs. Control:  $100,00 \pm 9,54$  U.A. (n=5); MyD88: SM:  $93,43 \pm 4,84$  U.A. (n=6),  $p > 0,05$  vs. Control:  $100,00 \pm 2,02$  U.A. (n=7); NLRP3: SM:  $97,26 \pm 13,68$  U.A. (n=6),  $p > 0,05$  vs. Control:  $100,00 \pm 7,78$  U.A. (n=6)).

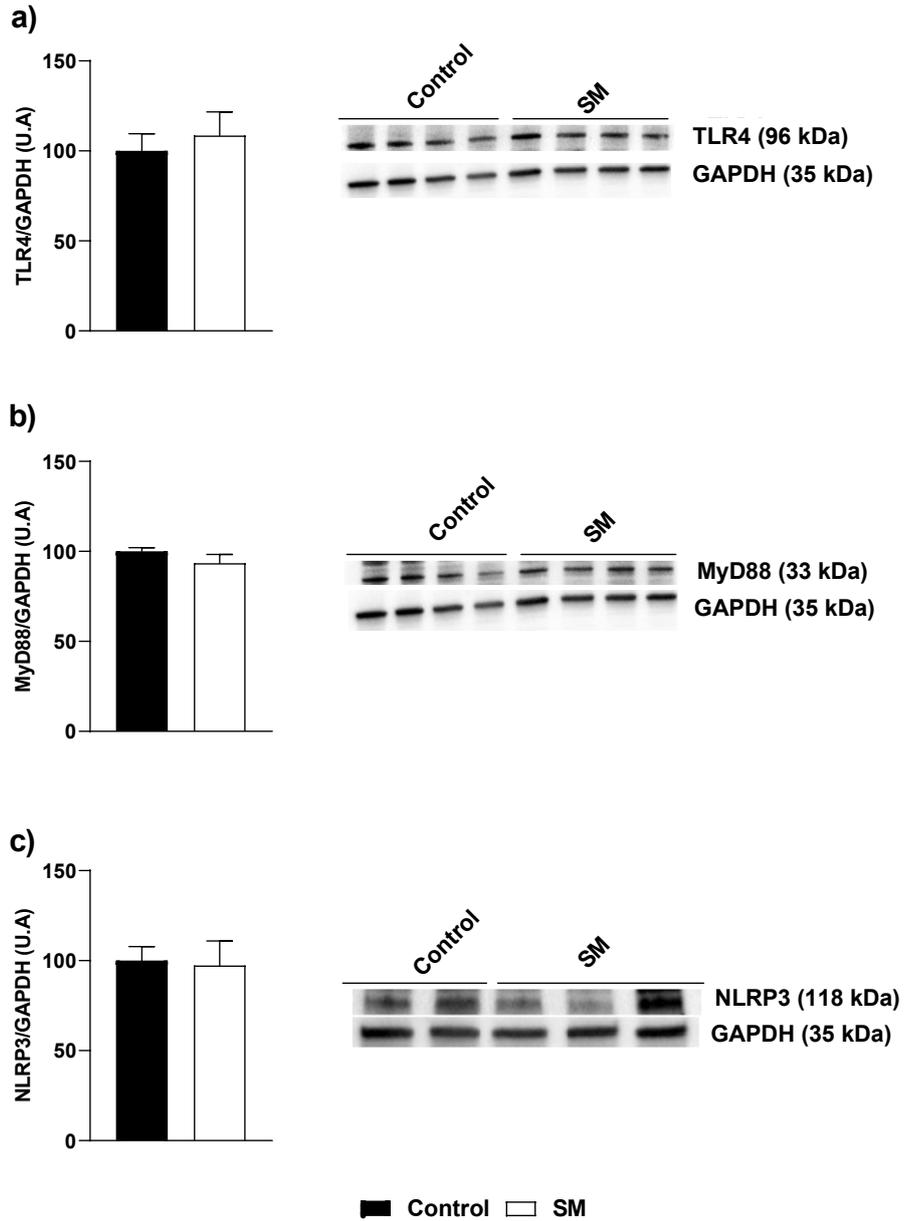


Figura 42: (a) Expresión proteica de TLR4, (b) Expresión proteica de MyD88 y (c) Expresión proteica de NLRP3 en el ventrículo izquierdo de animales con Síndrome Metabólico por dieta (SM) y en animales a los que se les alimentó con una dieta estándar (Control). Los datos representan la Media  $\pm$  E.E.M (n= 5). Se utilizó un análisis *t-student* con corrección de Welch para el tratamiento estadístico de los datos. No se observaron diferencias significativas. U.A: Unidades Arbitrarias.

#### **4.3.4.2. Expresión del TLR4, MyD88 y NLRP3 en la aorta de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta**

En este apartado se presentan: la expresión proteica de TLR4 (Figura 43 a), la expresión proteica de MyD88 (Figura 43 b) y la expresión proteica de NLRP3 (Figura 43 c) en el tejido de aorta obtenido de los animales de los grupos Control y SM tras alimentar a los animales durante 20 semanas, con una dieta estándar normocalórica (Control) o una dieta hipercalórica e hipergrasa (SM).

En animales con SM se produjo una disminución significativa de la expresión de TLR4 en la aorta en comparación con la expresión de dicha proteína en preparaciones procedentes del grupo de animales Control (SM:  $60,40 \pm 7,10$  U.A. (n=6),  $p < 0,01$  vs. Control:  $100,00 \pm 2,55$  U.A. (n=6)).

Sin embargo, el desarrollo de SM produjo un aumento significativo de la expresión de MyD88 y NLRP3 en la aorta de los animales en comparación con la expresión de dichas proteínas en este tejido procedente de animales del grupo Control (MyD88: SM:  $184,95 \pm 31,53$  U.A. (n=6),  $p < 0,05$  vs. Control:  $100,00 \pm 4,90$  U.A. (n=6); NLRP3: SM:  $175,71 \pm 27,91$  U.A. (n=6),  $p < 0,05$  vs. Control:  $100,00 \pm 9,82$  U.A. (n=5)).

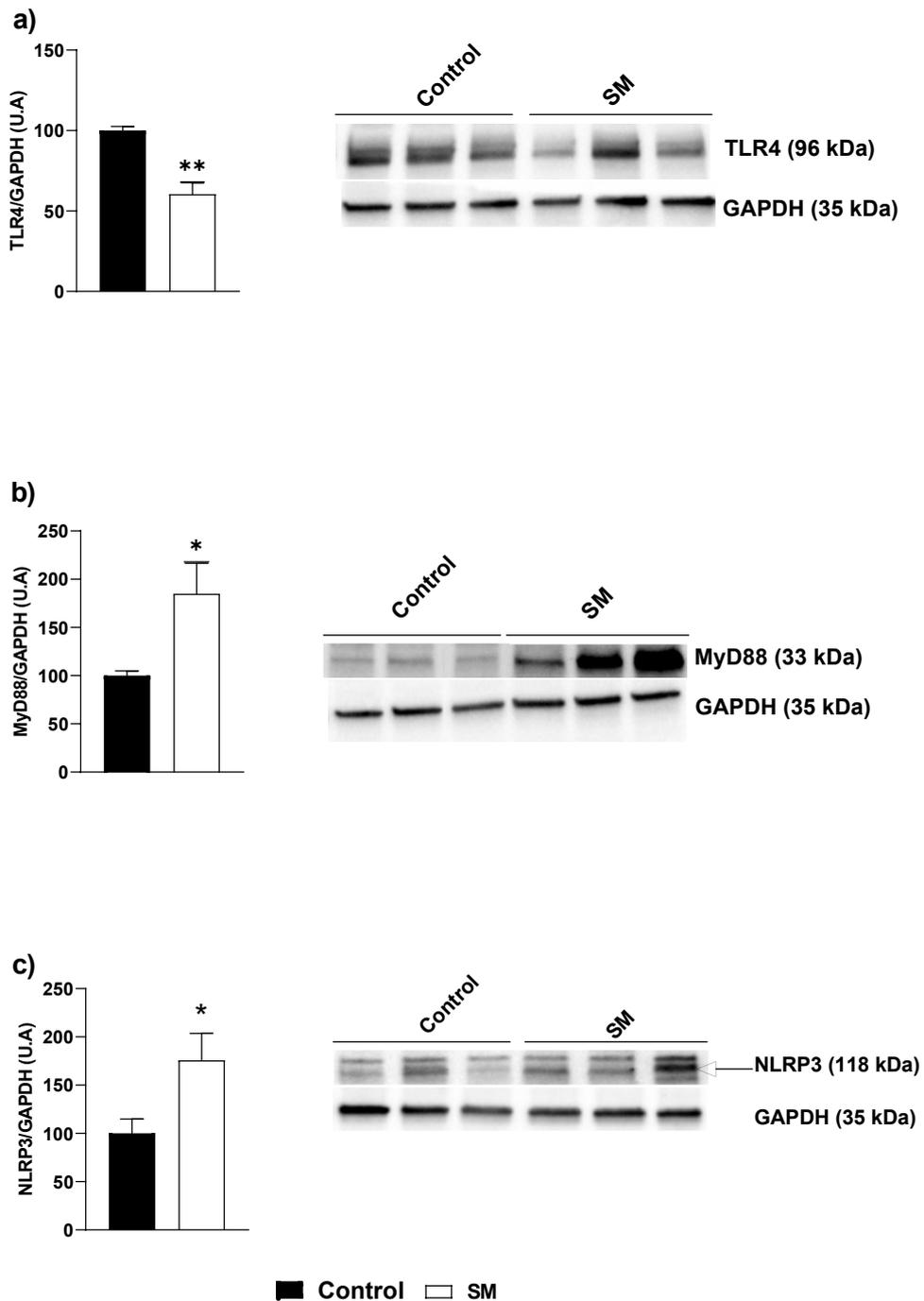


Figura 43: (a) Expresión proteica de TLR4, (b) Expresión proteica de MyD88 y (c) Expresión proteica de NLRP3 en la aorta de con Síndrome Metabólico por dieta (SM) y en animales a los que se les alimentó con una dieta estándar (Control). Los datos representan la Media  $\pm$  E.E.M (n= 5). Se utilizó un análisis *t-student* con corrección de Welch para el tratamiento estadístico de los datos (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  vs. Control). U.A: Unidades Arbitrarias

#### **4.3.4.3. Expresión del TLR4, MyD88 Y NLRP3 en la arteria mesentérica de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta**

En este apartado se presentan: la expresión proteica de TLR4 (Figura 44 a), expresión proteica de MyD88 (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** b), y expresión proteica de NLRP3 (Figura 44 c), en la arteria mesentérica obtenida tras alimentar a los animales durante 20 semanas, con una dieta estándar normocalórica (Control) o una dieta hipercalórica e hipergrasa (SM).

En los animales con SM se produjo una disminución, no significativa, de la expresión proteica de TLR4 y MyD88 en la arteria mesentérica en comparación con dicha expresión en las muestras de tejido procedente de animales del grupo Control (TLR4: SM:  $65,77 \pm 16,55$  U.A. (n=6),  $p > 0,05$  vs. Control:  $100,00 \pm 32,78$  U.A. (n=6); MyD88: SM:  $84,53 \pm 5,03$  U.A. (n=6),  $p > 0,05$  vs. Control:  $100,00 \pm 19,95$  U.A. (n=6)). No se observaron cambios en la expresión de NLRP3 en la arteria mesentérica de animales con SM, en comparación con la expresión de esta proteína en dicho tejido en animales del grupo Control (SM:  $99,76 \pm 8,27$  U.A. (n=6),  $p > 0,05$  vs. Control:  $100,00 \pm 4,62$  U.A. (n=6)).

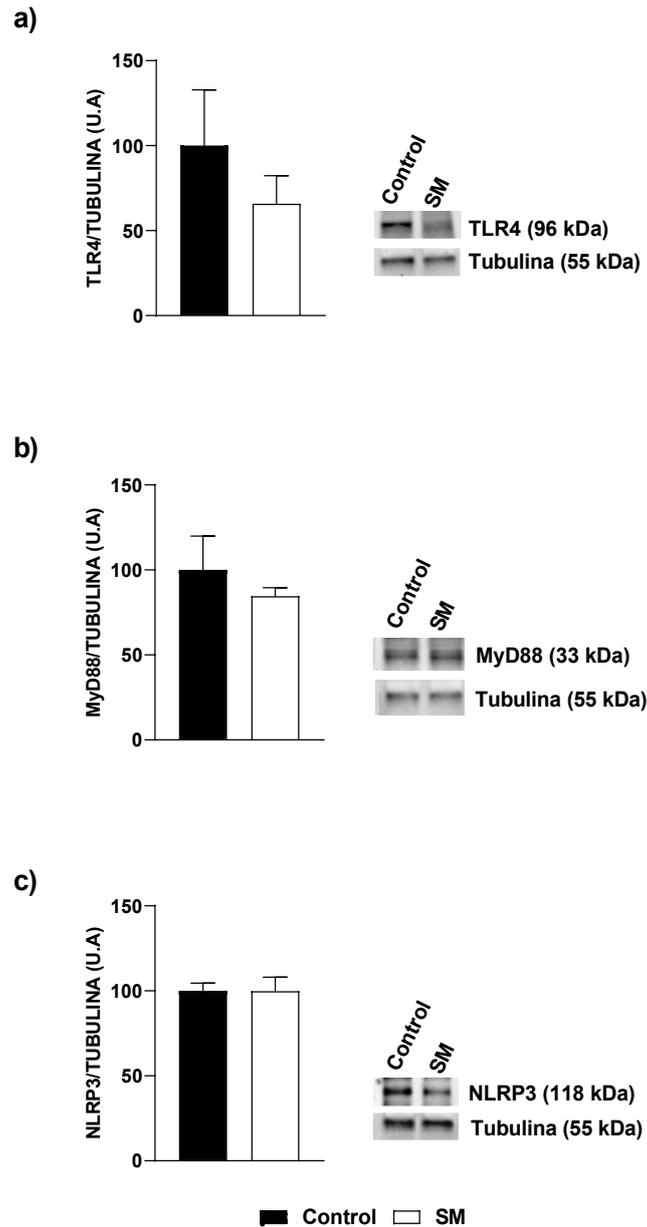


Figura 44: (a) Expresión proteica de TLR4, (b) Expresión proteica de MyD88 y (c) Expresión proteica de NLRP3 en la arteria mesentérica de animales con Síndrome Metabólico por dieta (SM) y en animales a los que se les alimentó con una dieta estándar (Control). Los datos representan la Media  $\pm$  E.E.M (n=6). Se utilizó un análisis *t-student* con corrección de Welch para el tratamiento estadístico de los datos. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  vs. Control). U.A: Unidades Arbitrarias

#### **4.3.4.4. Expresión del TLR4, MyD88 y NLRP3 en el tejido renal de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta**

En este apartado se presentan: la expresión proteica de TLR4 (Figura 45 a), expresión proteica de MyD88 (Figura 45 b) y expresión proteica de NLRP3 (Figura 45 c), en el tejido renal obtenido tras alimentar a los animales durante 20 semanas, con una dieta estándar normocalórica (Control) o una dieta hipercalórica e hipergrasa (SM).

En animales con SM no se modificó la expresión de TLR4, ni de NLRP3 en los riñones en comparación con la expresión de esta proteína en el tejido renal procedente de animales del grupo Control (TLR4: SM:  $107,56 \pm 8,31$  U.A. (n=4),  $p > 0,05$  vs. Control:  $100,00 \pm 6,49$  U.A. (n=4); NLRP3: SM:  $117,01 \pm 4,56$  U.A. (n=4),  $p > 0,05$  vs. Control:  $100,00 \pm 7,31$  U.A. (n=5)).

Sin embargo, en el tejido renal de los animales con SM se produjo un aumento significativo en la expresión de MyD88 en comparación con la expresión de esta proteína en este tejido procedente de animales del grupo Control (SM:  $167,83 \pm 25,82$  U.A. (n=6),  $p < 0,05$  vs. Control:  $100,00 \pm 10,85$  U.A. (n=5)).

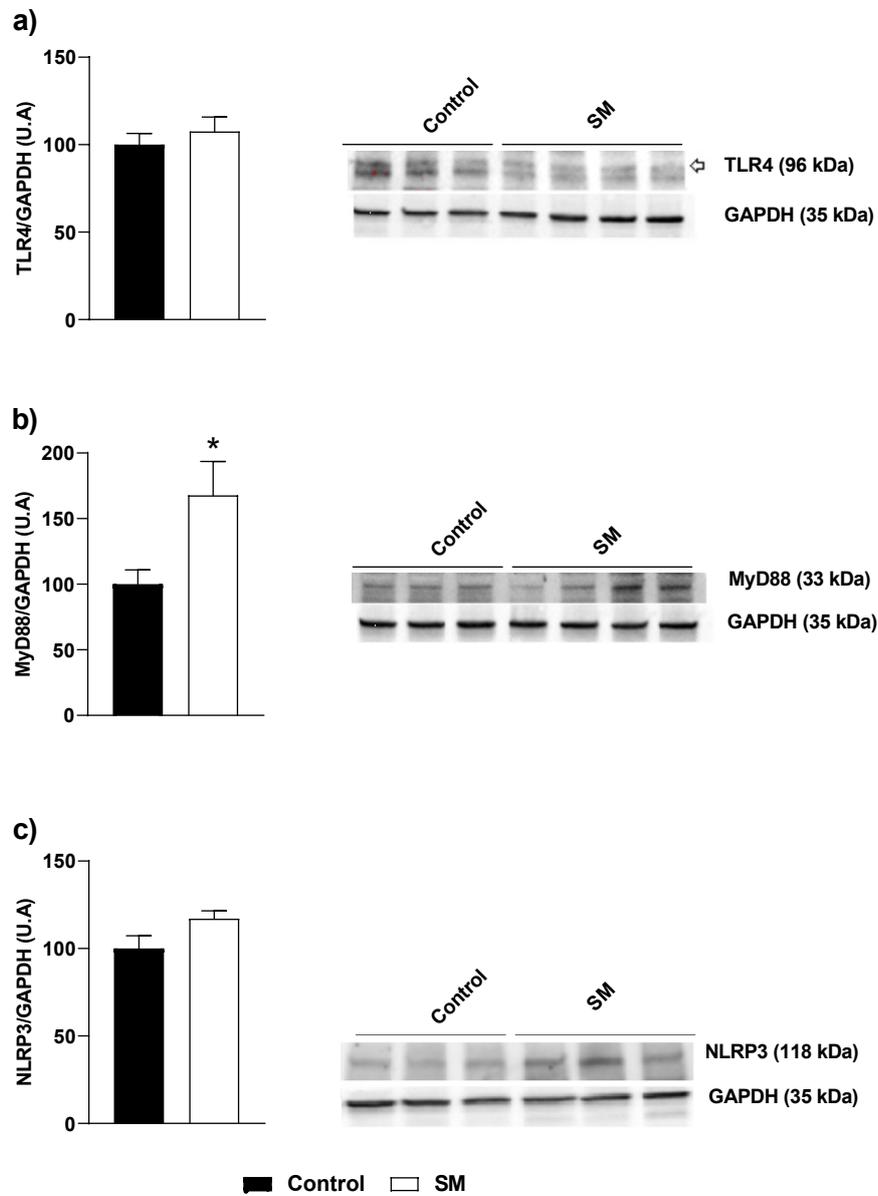


Figura 45: (a) Expresión proteica de TLR4, (b) Expresión proteica de MyD88 y (c) Expresión proteica de NLRP3 en el tejido renal de animales a los que se les indujo Síndrome Metabólico por dieta (SM), y en animales a los que se les alimentó con una dieta estándar (Control). Los datos representan la Media  $\pm$  E.E.M (n=5). Se utilizó un análisis *t-student* con corrección de Welch para el tratamiento estadístico de los datos. (\* $p < 0,05$  vs. Control). U.A: Unidades Arbitrarias.

#### **4.4. Efecto de la administración de TLR4-PA1 en el modelo de Síndrome Metabólico por dieta**

Como se mencionó previamente en la sección de “Material y Métodos” de esta Tesis Doctoral, apartado 3.1.2.3, el vehículo para disolver el antagonista de TLR4, TLR4-PA1, fue HPMC. De la misma manera, antes de iniciar el desarrollo del tratamiento con el TLR4-PA1 se analizó, el efecto de la administración de este vehículo en los parámetros analizados en este modelo experimental, obteniéndose resultados similares en los grupos “SM+ HPMC” y “SM” (datos no mostrados).

Por ello, y para facilitar la lectura e interpretación de los resultados de esta Tesis Doctoral y homogeneizar la presentación de los resultados en ambos modelos experimentales, el grupo vehículo no se muestra en la exposición de los resultados dentro de este apartado, realizándose las comparaciones directamente con el grupo SM.

##### **4.4.1. Parámetros generales**

##### **4.4.1.1. Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, en el peso corporal y la ganancia de peso de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta**

En la Figura 46, se presentan los resultados del efecto de la administración de TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, en el peso corporal (Figura 46 a) y en la ganancia de peso (Figura 46 b) de los animales en el modelo de SM por dieta. En dicha figura se muestran como referencia los parámetros correspondientes de los animales del grupo Control, es decir, animales alimentados durante 20 semanas con dieta normocalórica y normograsa.

Los animales del grupo experimental al que se le administró TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, durante las últimas dos semanas de alimentación con dieta hipercalórica e hipergrasa presentaron un peso ligeramente inferior, aunque no estadísticamente significativo, al de los animales con SM que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 (SM+TLR4-PA1: 531,00±33,17 g (n=8)  $p>0,05$  vs. SM: 590,80±22,91 g (n=10)). Este menor peso corporal se acompañó de una menor ganancia de peso de los animales tras las dos semanas que duró el tratamiento con TLR4-PA1 (SM+TLR4-PA1: -2,70±7,70 % (n=10)  $p>0,05$  vs. SM: 5,28±5,68 % (n=10)). Hay que destacar que, aunque la disminución en el peso corporal de los animales tratados con TLR4-PA1 no resultó estadísticamente significativa, sí permitió alcanzar valores de peso corporal similares a los del grupo Control (SM+TLR4-PA1: 531,00±33,17 g (n=8)  $p>0,05$  vs. Control: 505,80±18,35 g (n=10)).

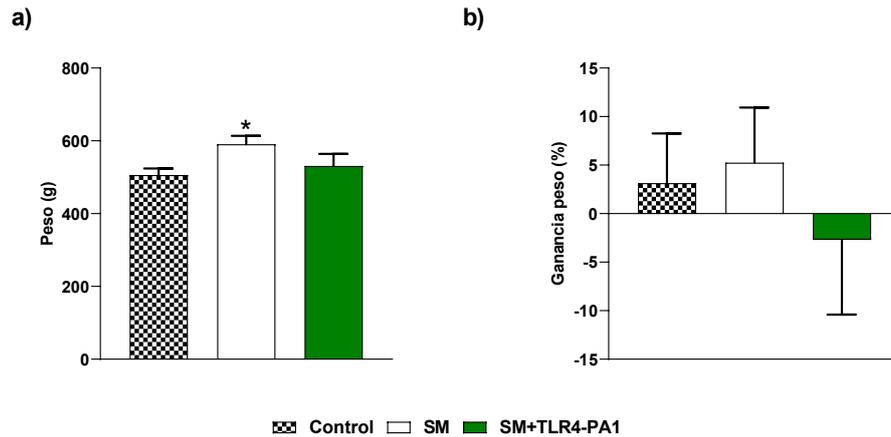


Figura 46: (a) Peso corporal y (b) Ganancia de peso de los animales alimentados durante 20 semanas con dieta hipercalórica e hipergrasa (SM) o que recibieron las últimas 2 semanas de dicho tratamiento dietético un tratamiento diario de TLR4-PA1, dosis 10 mg/Kg (SM +TLR4-PA1). El grupo Control corresponde a animales que habían sido alimentados durante 20 semanas con dieta normocalórica y normograsa y está representado como referencia. Los datos están representados como Media  $\pm$  E.E.M (n=8-10). Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Tukey para llevar a cabo el tratamiento estadístico de los datos. ( $p < 0,05$  vs. Control).

#### 4.4.1.2. Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, en el comportamiento alimentario e ingesta calórica de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta

En la Figura 47 se presentan los resultados del efecto de la administración de TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, en la Ingesta Sólida (IS) (Figura 47 a), Ingesta Líquida (IL) (Figura 47 b) e Ingesta Calórica (IC) (Figura 47 c) de los animales en el modelo de SM por dieta. En dicha figura se muestran como referencia los parámetros correspondientes de los animales del grupo Control, es decir, animales alimentados durante 20 semanas con dieta normocalórica y normograsa.

Los animales del grupo experimental al que se le administró TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, durante las últimas dos semanas de alimentación con dieta hipercalórica e hipergrasa presentaron valores de IS e IC significativamente inferiores, a las correspondientes ingestas de los animales con SM que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 (IS: SM+TLR4-PA1:  $8,31 \pm 1,84$  g/rata/día (n=8)  $p < 0,001$  vs. SM:  $14,70 \pm 0,40$  g/rata/día (n=10); IC: SM+TLR4-PA1:  $123,75 \pm 2,53$  Kcal/rata/día (n=10)  $p < 0,001$  vs. SM:  $121,49 \pm 5,43$  Kcal/rata/día (n=10)). Además, el tratamiento con TLR4-PA1 también produjo una ligera disminución en la IL en los animales en comparación con los animales alimentados con dieta hipercalórica e hipergrasa que no recibieron dicho tratamiento (SM+TLR4-PA1:  $45,18 \pm 8,93$  mL/rata /día (n=10)  $p > 0,05$  vs. SM:  $54,33 \pm 2,33$  mL/rata/día (n=10)). Por tanto, el tratamiento durante dos semanas con el fármaco antagonista TLR4 fue capaz de provocar cambios en el comportamiento alimentario de los animales que permitió corregir la alta ingesta calórica observada en los animales con SM, obteniéndose en los animales tratados con el fármaco TLR4-PA1 valores de IC similares a los presentados en los animales del grupo Control (IC:

SM+TLR4-PA1: 123,75±2,53 Kcal/día (n=10) p<0.05 vs. Control: 74,39±1,19 Kcal/día (n=10)).

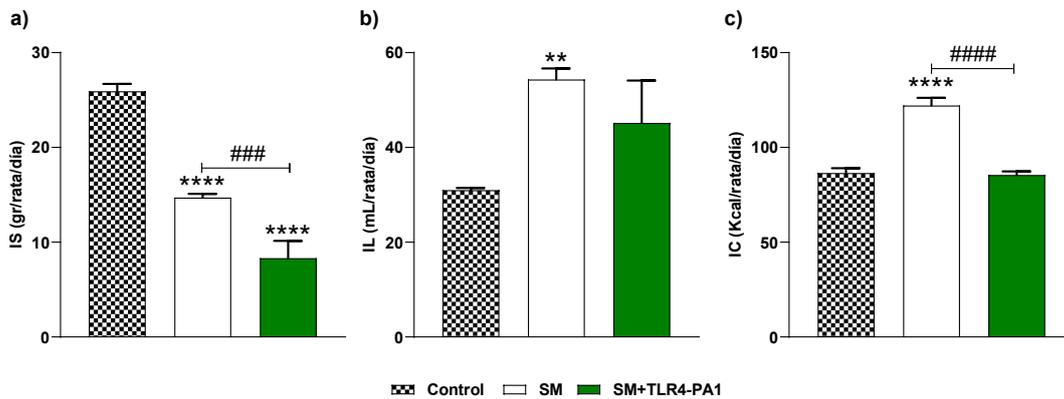


Figura 47: (a) Ingesta sólida (IS), (b) Ingesta líquida (IL) y (c) Ingesta calórica (IC) de los animales alimentados durante 20 semanas con dieta hipercalórica e hipergrasa (SM) o que recibieron las últimas 2 semanas de dicho tratamiento dietético un tratamiento diario de TLR4-PA1, dosis 10 mg/Kg (SM +TLR4-PA1). El grupo Control corresponde a animales que habían sido alimentados durante 20 semanas con dieta normocalórica y normograsa y está representado como referencia. Los datos están representados como Media ± E.E.M (n=8-10). Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Tukey para llevar a cabo el tratamiento estadístico de los datos. (### p<0,001; #### p<0,0001 vs. SM; p<0,05; \*\*\*\* p<0,0001 vs. Control). IS: Ingesta sólida; IL: Ingesta líquida; IC: Ingesta calórica

#### 4.4.1.3. Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, en los parámetros antropométricos de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta

En la Figura 48 se presentan los resultados del efecto de la administración de TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, en el Índice de Masa Corporal (IMC) (Figura 48 a) y el Perímetro abdominal (Figura 48 b) de los animales en el modelo de SM por dieta. En dicha figura se muestran como referencia los parámetros correspondientes de los animales del grupo Control, es decir, animales alimentados durante 20 semanas con dieta normocalórica y normograsa.

Los animales del grupo experimental al que se le administró TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, durante las últimas dos semanas de alimentación con dieta hipercalórica e hipergrasa, mostraron un IMC y un Perímetro Abdominal inferiores a los correspondientes parámetros de los animales con SM que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 (IMC: SM+TLR4-PA1: 0,77±0,03 g/cm<sup>2</sup> (n=8) p>0,05 vs. SM: 0,81±0,02 g/cm<sup>2</sup> (n=9); Perímetro abdominal: SM+TLR4-PA1: 22,29±0,65 cm (n=8) p>0,05 vs. SM: 24,04±0,52 cm (n=9)). Hay que señalar que aunque la disminución en estos parámetros antropométricos no resultó estadísticamente significativa, fue suficiente para corregir dichas medidas, obteniéndose en los animales tratados con el fármaco TLR4-PA1 valores de IMC y Perímetro Abdominal similares a los presentados en los animales del grupo Control (IMC: SM+TLR4-PA1: 0,77±0,03 g/cm<sup>2</sup> (n=8) p>0,05 vs. Control: 0,71±0,02 g/cm<sup>2</sup> (n=9); Perímetro abdominal: SM+TLR4-PA1: 22,13±0,45 cm (n=8) p>0,05 vs. Control: 21,43±0,46 cm (n=9)).

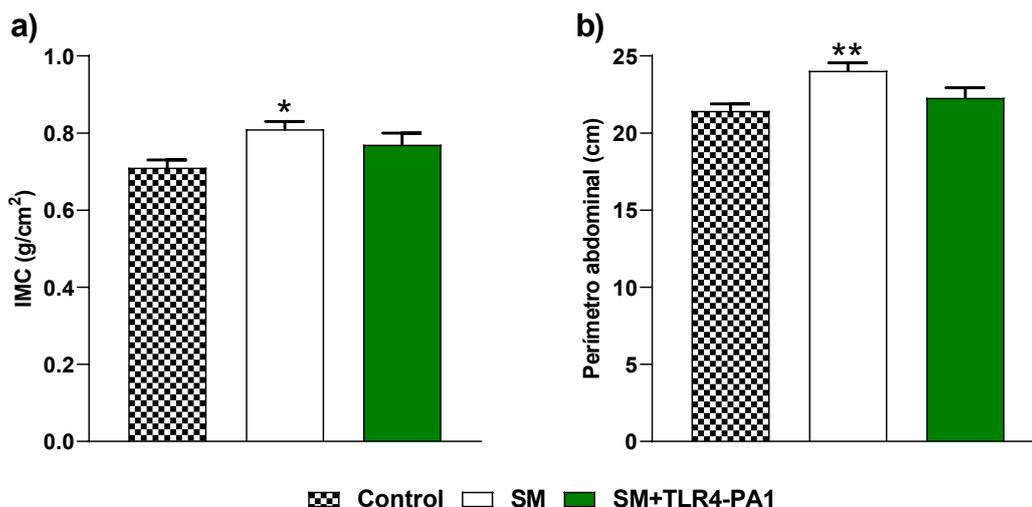


Figura 48: (a) Índice de masa corporal (IMC) y (b) Perímetro abdominal de los animales alimentados durante 20 semanas con dieta hipercalórica e hipergrasa (SM) o que recibieron las últimas 2 semanas de dicho tratamiento dietético un tratamiento diario de TLR4-PA1, dosis 10 mg/Kg (SM +TLR4-PA1). El grupo Control corresponde a animales que habían sido alimentados durante 20 semanas con dieta normocalórica y normograsa y está representado como referencia. Los datos están representados como Media  $\pm$  E.E.M (n=8-9). Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Tukey para llevar a cabo el tratamiento estadístico de los datos. (\* p<0,05; \*\* p < 0,01 vs. Control).

#### 4.4.2. Marcadores plasmáticos

##### 4.4.2.1. Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, en los niveles plasmáticos de biomarcadores del metabolismo de la glucosa de los animales con síndrome Metabólico (SM) por dieta

En la Figura 49 se presentan los resultados del efecto de la administración de TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, en los niveles plasmáticos de Glucosa (Figura 49 a), Insulina (Figura 49 b) y en los Índices HOMA-IR (Figura 49 c) y HOMA- $\beta$  (Figura 49 d) de los animales en el modelo de SM por dieta. En dicha figura se muestran como referencia los parámetros correspondientes de los animales del grupo Control, es decir, animales alimentados durante 20 semanas con dieta normocalórica y normograsa.

Los animales del grupo experimental al que se le administró TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, durante las últimas dos semanas de alimentación con dieta hipercalórica e hipergrasa presentaron unos niveles plasmáticos de Glucosa significativamente inferiores a los niveles de los animales con SM que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 (SM+TLR4-PA1: 155,50 $\pm$ 8,51 mg/dL (n=8) p<0,05 vs. SM: 195,75 $\pm$ 15,16 mg/dL (n=10)). Por otra parte, el tratamiento con el fármaco anti TLR4, no modificó ni los niveles de Insulina, ni el índice HOMA-IR (Insulina: SM+TLR4-PA1: 7,48 $\pm$ 1,54  $\mu$ g/mL (n=7) p>0,05 vs. SM: 4,91 $\pm$ 0,75  $\mu$ g/mL (n=8); HOMA-IR: SM+TLR4-PA1: 72,64 $\pm$ 15,28 (n=8) p>0,05 vs. SM: 63,33 $\pm$ 14,29 (n=9)). Por el contrario, el índice

HOMA- $\beta$  resultó significativamente superior en los animales con SM que habían recibido el tratamiento con TLR4-PA1 en comparación con los animales que no lo habían recibido (HOMA- $\beta$ : SM+TLR4-PA1: 758,60 $\pm$ 15,28 (n=8) p<0.001 vs. SM: 333,90 $\pm$ 38,98 (n=8)). Así, los datos anteriores muestran que el tratamiento durante dos semanas con el fármaco antagonista TLR4 fue capaz de corregir parcialmente las alteraciones en el metabolismo glucídico observadas en los animales con SM en relación con los animales del grupo Control (Glucosa: SM+TLR4-PA1: 155,50 $\pm$ 8,51 mg/dL (n=8) p>0,05 vs. Control: 121,78 $\pm$ 5,08 mg/dL (n=9); Insulina: SM+TLR4-PA1: 7,48 $\pm$ 1,54  $\mu$ g/mL(n=7) p>0,05 vs. Control: 5,31 $\pm$ 0,50  $\mu$ g/ (n=6); HOMA-IR: SM+TLR4-PA1: 72,64 $\pm$ 15,28 (n=8) p>0,05 vs. Control: 47,22 $\pm$ 3,58 (n=6); HOMA- $\beta$ : SM+TLR4-PA1: 758,60 $\pm$ 15,28 (n=8) p>0,05 vs. Control: 628,15 $\pm$ 93,24 (n=6)).

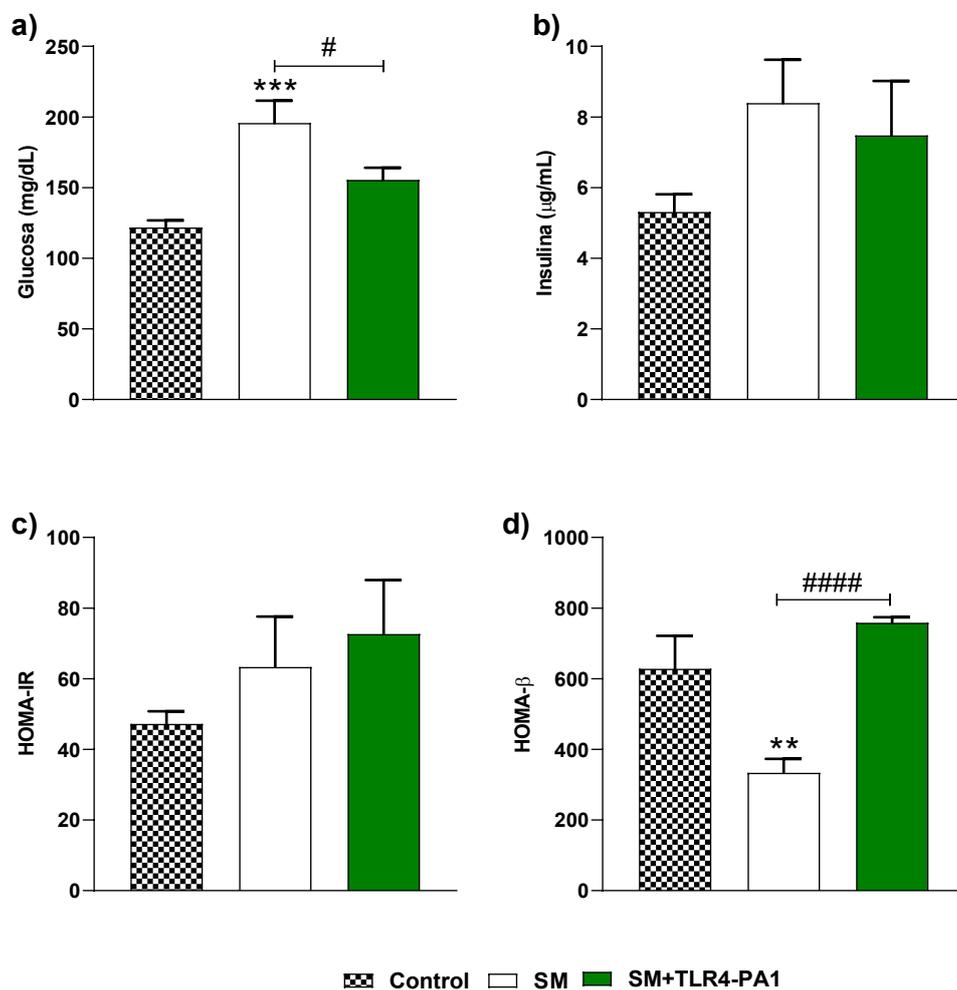


Figura 49: (a) Niveles plasmáticos de Glucosa, (b) Niveles plasmáticos de Insulina, (c) Índice HOMA-IR y (d) Índice HOMA-b de los animales alimentados durante 20 semanas con dieta hipercalórica e hipergrasa (SM) o que recibieron las últimas 2 semanas de dicho tratamiento dietético un tratamiento diario de TLR4-PA1, dosis 10 mg/Kg (SM +TLR4-PA1). El grupo Control corresponde a animales que habían sido alimentados durante 20 semanas con dieta normocalórica y normograsa y está representado como referencia. Los datos están representados como Media  $\pm$  E.E.M (n=7-8). Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Tukey para llevar a cabo el tratamiento estadístico de los datos. (# p<0,05; ##### p<0,0001 vs. SM; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001 vs. Control).

#### 4.4.2.2. Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, en los niveles plasmáticos de biomarcadores del metabolismo lipídico de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta

En la Figura 50 se presentan los resultados del efecto de la administración de TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, en los niveles plasmáticos de Triglicéridos (Figura 50 a), Colesterol (Figura 50 b), HDL (Figura 50 c) y LDL (Figura 50 d) de los animales en el modelo de SM por dieta. En dicha figura se muestran como referencia los parámetros correspondientes de los animales del grupo Control, es decir, animales alimentados durante 20 semanas con dieta normocalórica y normograsa.

Los animales del grupo experimental al que se le administró TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, durante las últimas dos semanas de alimentación con dieta hipercalórica e hipergrasa presentaron unos niveles plasmáticos de Triglicéridos, Colesterol y LDL significativamente inferiores a los correspondientes valores de los animales con SM que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 (Triglicéridos: SM+TLR4-PA1:  $153,50 \pm 16,20$  mg/dL (n=8)  $p < 0,001$  vs. SM:  $289,25 \pm 15,60$  mg/dL (n=9); Colesterol: SM+TLR4-PA1:  $65,13 \pm 3,82$  mg/dL (n=8)  $p < 0,05$  vs. SM:  $80,00 \pm 3,42$  mg/dL (n=8); LDL: SM+TLR4-PA1:  $65,82 \pm 9,26$  mg/dL (n=7)  $p < 0,0001$  vs. SM:  $148,51 \pm 3,35$  mg/dL (n=8)). Por otra parte, los niveles plasmáticos de HDL en los animales alimentados con dieta hipercalórica e hipergrasa, que habían recibido un tratamiento durante las dos últimas semanas con TLR4-PA1 fueron similares a los de los animales con SM que no habían recibido el tratamiento con el fármaco anti TLR4 (HDL: SM+TLR4-PA1:  $34,88 \pm 2,93$  mg/dL (n=8)  $p > 0,05$  vs. SM:  $36,35 \pm 2,78$  mg/dL (n=9)). Por tanto, el tratamiento durante dos semanas con el fármaco antagonista TLR4 fue capaz de corregir las alteraciones en el perfil lipídico observadas en los animales con SM, obteniéndose en los animales tratados con el fármaco TLR4-PA1 valores similares a los presentados en los animales del grupo Control (Triglicéridos: SM+TLR4-PA1:  $153,50 \pm 16,20$  mg/dL (n=8)  $p > 0,05$  vs. Control:  $215,44 \pm 19,89$  mg/dL (n=9); Colesterol: SM+TLR4-PA:  $65,13 \pm 3,82$  mg/dL (n=8)  $p > 0,05$  vs. Control:  $52,38 \pm 1,45$  mg/dL (n=8); HDL: SM+TLR4-PA1:  $34,88 \pm 2,93$  mg/dL (n=8)  $p > 0,05$  vs. Control:  $26,67 \pm 1,12$  mg/dL (n=6); LDL: SM+TLR4-PA1:  $65,82 \pm 6,29$  mg/dL (n=7)  $p > 0,05$  vs. Control:  $102,75 \pm 13,66$  mg/dL (n=8)).

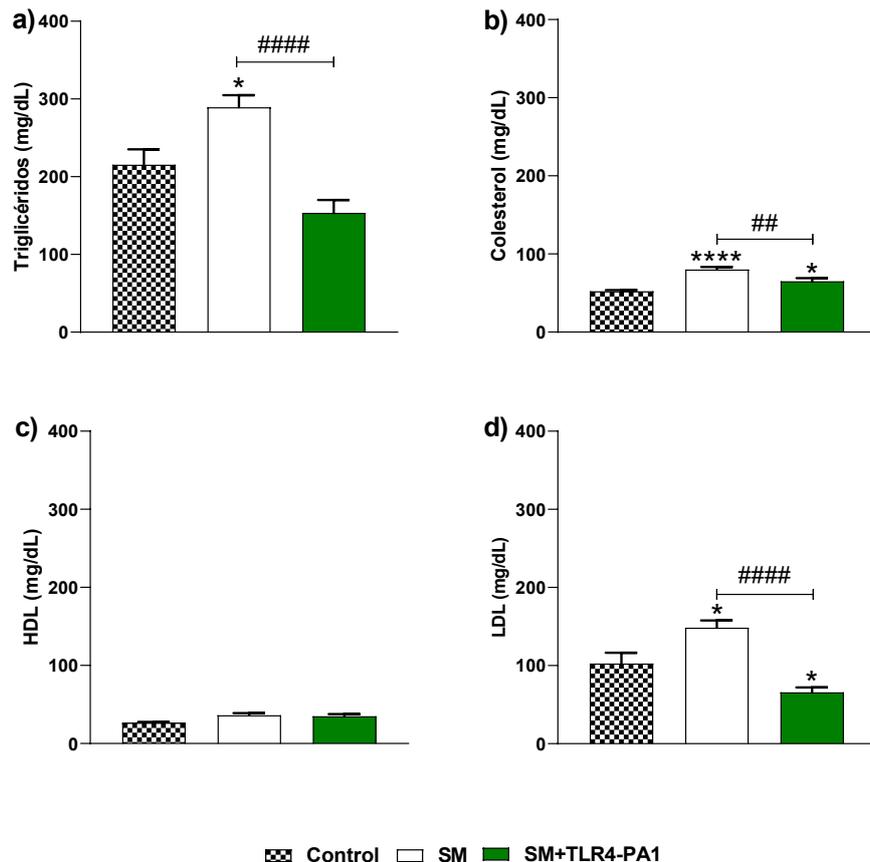


Figura 50: (a) Niveles plasmáticos de Triglicéridos, (b) Niveles plasmáticos de Colesterol, (c) Niveles plasmáticos de HDL y (d) Niveles plasmáticos de LDL de los animales alimentados durante 20 semanas con dieta hipercalórica e hipergrasa (SM) o que recibieron las últimas 2 semanas de dicho tratamiento dietético un tratamiento diario de TLR4-PA1, dosis 10 mg/Kg (SM +TLR4-PA1). El grupo Control corresponde a animales que habían sido alimentados durante 20 semanas con dieta normocalórica y normograsa y está representado como referencia. Los datos están representados como Media  $\pm$  E.E.M (n=6-9). Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Tukey para llevar a cabo el tratamiento estadístico de los datos. (## p<0,01: #### p<0,0001 vs. SM; \* p<0,05; \*\*\*\*p<0,0001 vs. Control).

#### 4.4.2.3. Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg en los niveles plasmáticos de Malondialdehído (MDA) de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta

En la Figura 51 se presentan los resultados del efecto de la administración de TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, en los niveles plasmáticos de MDA de los animales en el modelo de SM por dieta. En dicha figura se muestran como referencia los parámetros correspondientes de los animales del grupo Control, es decir, animales alimentados durante 20 semanas con dieta normocalórica y normograsa.

Los animales del grupo experimental al que se le administró TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, durante las últimas dos semanas de alimentación con dieta hipercalórica e hipergrasa presentaron unos niveles plasmáticos de MDA inferiores a los

correspondientes valores de los animales con SM que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 (MDA: SM+TLR4-PA1:  $176,99 \pm 11,13 \mu\text{M}$  (n=6)  $p > 0,05$  vs. SM:  $232,68 \pm 27,03 \mu\text{M}$  (n=5)). Sin embargo, aunque esta disminución no llegó a ser estadísticamente significativa, hay que señalar que fue suficiente para revertir el aumento en los niveles de MDA, obteniéndose en los animales con SM tratados con el fármaco TLR4-PA1 valores de dicho parámetro similares a los presentados en los animales del grupo Control (MDA: SM+TLR4-PA1:  $176,99 \pm 11,13 \mu\text{M}$  (n=6)  $p > 0,05$  vs. Control:  $163,53 \pm 13,60 \mu\text{M}$  (n=5)).

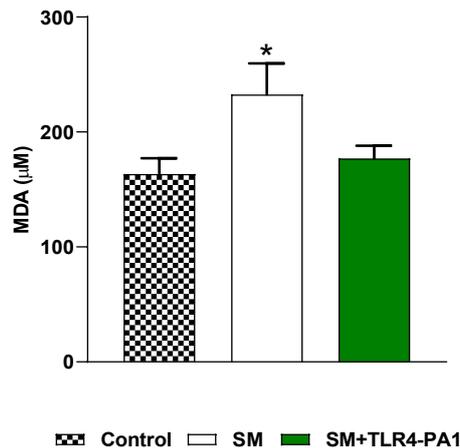


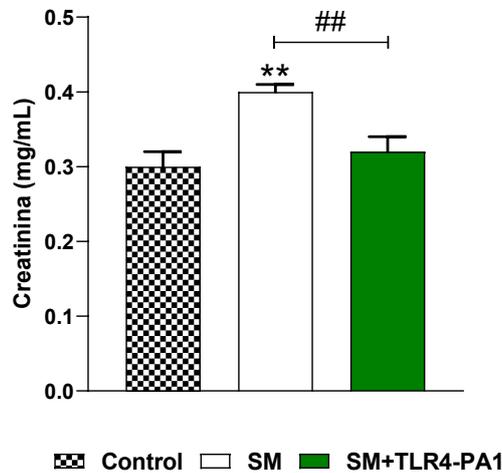
Figura 51: Niveles plasmáticos de Malondialdehído (MDA) de los de los animales alimentados durante 20 semanas con dieta hipercalórica e hipergrasa (SM) o que recibieron las últimas 2 semanas de dicho tratamiento dietético un tratamiento diario de TLR4-PA1, dosis 10 mg/Kg (SM +TLR4-PA1). El grupo Control corresponde a animales que habían sido alimentados durante 20 semanas con dieta normocalórica y normograsa y está representado como referencia. Los datos están representados como Media ± E.E.M (n=5-6). Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Tukey para llevar a cabo el tratamiento estadístico de los datos. ( $p < 0,05$  vs. Control).

#### 4.4.2.4. Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg en los niveles plasmáticos de Creatinina de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta

En la Figura 52 se presentan los resultados del efecto de la administración de TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, en los niveles plasmáticos de creatinina de los animales en el modelo de SM por dieta. En dicha figura se muestran como referencia los parámetros correspondientes de los animales del grupo Control, es decir, animales alimentados durante 20 semanas con dieta normocalórica y normograsa.

Los animales del grupo experimental al que se le administró TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, durante las últimas dos semanas de alimentación con dieta hipercalórica e hipergrasa presentaron unos niveles plasmáticos de Creatinina significativamente inferiores a los correspondientes valores de los animales con SM que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 (Creatinina: SM+TLR4-PA1:  $0,33 \pm 0,02 \text{ mg/mL}$  (n=6)  $p < 0,01$  vs. SM:  $0,40 \pm 0,01 \text{ mg/mL}$  (n=8)). Hay que señalar, además, que esta

disminución ha sido capaz de revertir el aumento en los niveles de creatinina, obteniéndose en los animales con SM tratados con el fármaco TLR4-PA1 valores de dicho parámetro similares a los presentados en los animales del grupo Control (Creatinina: SM+TLR4-PA1:  $0,32 \pm 0,02$  mg/mL (n=6)  $p > 0,05$  vs. Control:  $0,30 \pm 0,02$  mg/mL (n=6)).



**Figura 52:** Niveles plasmáticos de Creatinina de los animales alimentados durante 20 semanas con dieta hipercalórica e hipergrasa (SM) o que recibieron las últimas 2 semanas de dicho tratamiento dietético un tratamiento diario de TLR4-PA1, dosis 10 mg/Kg (SM +TLR4-PA1). El grupo Control corresponde a animales que habían sido alimentados durante 20 semanas con dieta normocalórica y normograsa y está representado como referencia. Los datos están representados como Media  $\pm$  E.E.M (n=6-8). Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Tukey para llevar a cabo el tratamiento estadístico de los datos. (##  $p < 0,01$  vs. SM; \*\*  $p < 0,01$  vs. Control).

Antes de concluir este subapartado, hay que señalar que por diferentes problemas técnicos no ha sido posible concluir las determinaciones de los niveles plasmáticos de Citoquinas proinflamatorias en los animales del modelo de SM por dieta, por lo que estos resultados no han podido incluirse en esta Tesis Doctoral.

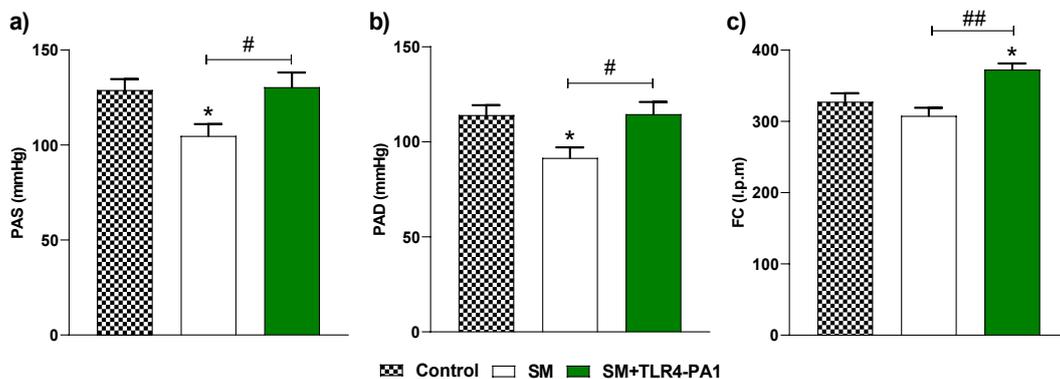
#### 4.4.3. Parámetros cardiovasculares

##### 4.4.3.1. Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, en los niveles de presión arterial y frecuencia cardiaca de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta

En la Figura 53 se presentan los resultados del efecto de la administración de TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, en los niveles de Presión Arterial Sistólica (PAS) (Figura 53 a), Presión Arterial Diastólica (PAD) (Figura 53 b) y Frecuencia Cardiaca (FC) (Figura 53 c) de los animales en el modelo de SM por dieta. En dicha figura se muestran como referencia los parámetros correspondientes de los animales del grupo Control, es

decir, animales alimentados durante 20 semanas con dieta normocalórica y normograsa.

Los animales del grupo experimental al que se le administró TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, durante las últimas dos semanas de alimentación con dieta hipercalórica e hipergrasa presentaron unos niveles de PAS, PAD y FC significativamente superiores, a los correspondientes valores de los animales con SM que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 (PAS: SM+TLR4-PA1: 130,52±7,66 mmHg (n=8) p<0,05 vs. SM: 104,83±6,19 mmHg (n=9); PAD: SM+TLR4-PA1: 114,66±6,38 mmHg (n=8) p<0,05 vs. SM: 91,59±5,50 mmHg (n=9); FC: SM+TLR4-PA1: 372,69±8,68 l.p.m. (n=8) p<0,01 vs. SM: 307,90±11,36 l.p.m. (n=90)). Así, los datos mencionados anteriormente muestran que el tratamiento durante dos semanas con el fármaco TLR4-PA1 fue capaz de revertir la hipotensión observada en animales con SM, obteniéndose en los animales tratados valores de PAS y PAD similares a los presentados en los animales del grupo Control (PAS: SM+TLR4-PA1: 130,52±7,66 mmHg (n=8) p>0,05 vs. Control: 128,95±5,74 mmHg (n=9); PAD: SM+TLR4-PA1: 114,66±6,38 mmHg (n=8) p>0,05 vs. Control: 114,13±5,14 mmHg (n=10)).



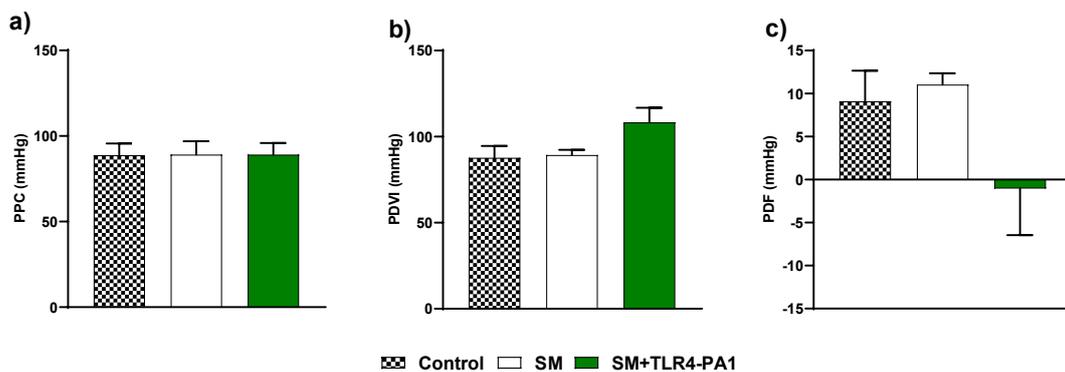
**Figura 53:** (a) Presión Arterial Sistólica (PAS), (b) Presión Arterial Diastólica (PAD) y (c) Frecuencia Cardíaca (FC) en animales anestesiados alimentados durante 20 semanas con dieta hipercalórica e hipergrasa (SM) o que recibieron las últimas 2 semanas de dicho tratamiento dietético un tratamiento diario de TLR4-PA1, dosis 10 mg/Kg (SM +TLR4-PA1). El grupo Control corresponde a animales que habían sido alimentados durante 20 semanas con dieta normocalórica y normograsa y está representado como referencia. Los datos están representados como Media ± E.E.M (n=8-10). Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Tukey para llevar a cabo el tratamiento estadístico de los datos (# p<0,05; ## p<0,01 vs. SM; \* p<0,05 vs. Control). l.p.m: Latidos por minuto.

#### 4.4.3.2. Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, en la funcionalidad cardíaca de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta

En la Figura 54 se presentan los resultados del efecto de la administración de TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, en los valores de Presión de Perfusión de las Coronarias (PPC) (Figura 54 a), Presión Desarrollada por el Ventrículo Izquierdo (PDVI) (Figura 54 b) y Presión Diastólica Final (Figura 54PDF) (2c) obtenidos en la preparación

de corazón aislado y perfundido de los animales en el modelo de SM por dieta. En dicha figura se muestran como referencia los parámetros correspondientes de los animales del grupo Control, es decir, animales alimentados durante 20 semanas con dieta normocalórica y normograsa.

Los animales del grupo experimental al que se le administró TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, durante las últimas dos semanas de alimentación con dieta hipercalórica e hipergrasa presentaron unos niveles de PPC similares a los correspondientes valores de los animales con SM que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 (PPC: SM+TLR4-PA1:  $89,11 \pm 6,78$  mmHg (n=10)  $p > 0,05$  vs. SM:  $89,10 \pm 7,83$  mmHg (n=9)). En el caso función ventricular izquierda, los animales con SM que habían recibido un tratamiento durante las dos últimas semanas de alimentación con TLR4-PA1 mostraron valores ligeramente superiores en la PDVI y ligeramente inferiores en la PDF a los de los animales con SM que no habían recibido el tratamiento con el fármaco antagonista TLR4 (PDVI: SM+TLR4-PA1:  $108,32 \pm 8,42$  mmHg (n=8)  $p > 0,05$  vs. SM:  $89,35 \pm 2,96$  mmHg (n=9); PDF: SM+TLR4-PA1:  $-1,05 \pm 5,41$  mmHg (n=8)  $p > 0,05$  vs. SM:  $11,04 \pm 1,31$  mmHg (n=10)). Así, el tratamiento durante 2 semanas con el fármaco antagonista TLR4 no afectó a la función cardíaca de los animales con SM.



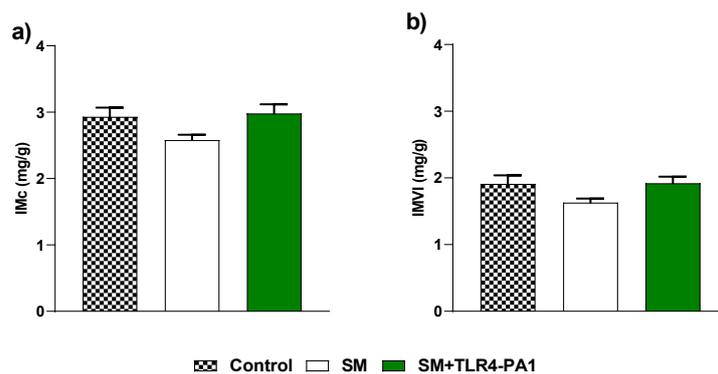
**Figura 54:** (a) Presión de Perfusión de las Coronarias (PPC), (b) Presión Desarrollada por el Ventrículo Izquierdo (PDVI) y (c) Presión Diastólica Final (PDF) en preparaciones de corazón aislado y perfundido de animales alimentados durante 20 semanas con dieta hipercalórica e hipergrasa (SM) o que recibieron las últimas 2 semanas de dicho tratamiento dietético un tratamiento diario de TLR4-PA1, dosis 10 mg/Kg (SM +TLR4-PA1). El grupo Control corresponde a animales que habían sido alimentados durante 20 semanas con dieta normocalórica y normograsa y está representado como referencia. Los datos están representados como Media  $\pm$  E.E.M (n=8-10). Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Tukey para llevar a cabo el tratamiento estadístico de los datos. No se observaron diferencias significativas.

#### 4.4.3.3. Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, sobre los índices cardíacos de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta

En la Figura 55 se presentan los resultados del efecto de la administración de TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, en los valores de Índice de Masa cardíaco (IMc) (Figura 55 a) y el Índice de Masa del Ventrículo Izquierdo (IMVI) (Figura 55 b) de los animales en el modelo de SM por dieta. En dicha figura se muestran como referencia

los parámetros correspondientes de los animales del grupo Control, es decir, animales alimentados durante 20 semanas con dieta normocalórica y normograsa.

Los animales del grupo experimental al que se le administró TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, durante las últimas dos semanas de alimentación con dieta hipercalórica e hipergrasa mostraron valores de IMc y de IMVI similares a los correspondientes índices obtenidos en los animales con SM que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 (IMc: SM+TLR4-PA1:  $2,98 \pm 0,14$  mg/g (n=8)  $p > 0,05$  vs. SM:  $2,58 \pm 0,08$  mg/g (n=8); IMVI: SM+TLR4-PA1:  $1,92 \pm 0,10$  mg/g (n=8)  $p > 0,05$  vs. SM:  $1,63 \pm 0,06$  mg/g (n=8)). Estos valores fueron también similares a los de los animales del grupo Control (IMc: SM+TLR4-PA1:  $2,98 \pm 0,14$  mg/g (n=8)  $p < 0,05$  vs. Control:  $2,93 \pm 0,14$  mg/g (n=9)).



**Figura 55:** (a) Índice de Masa cardiaco (IMc), y (b) Índice de Masa del Ventrículo Izquierdo (IMVI) de animales alimentados durante 20 semanas con dieta hipercalórica e hipergrasa (SM) o que recibieron las últimas 2 semanas de dicho tratamiento dietético un tratamiento diario de TLR4-PA1, dosis 10 mg/Kg (SM +TLR4-PA1). El grupo Control corresponde a animales que habían sido alimentados durante 20 semanas con dieta normocalórica y normograsa y está representado como referencia. Los datos están representados como Media  $\pm$  E.E.M (n=8-9). Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Tukey para llevar a cabo el tratamiento estadístico de los datos. No se observaron diferencias significativas.

#### 4.4.3.4. Efecto de la administración de TLR4-PA1 10 mg/Kg sobre la reactividad de la aorta de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta

En la Figura 56 se presentan los resultados del efecto de la administración de TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, en los valores de reactividad vascular en la aorta de los animales de los diferentes grupos experimentales. En la Figura 56 se representan: la función contráctil, la relajación dependiente de endotelio, la relajación no dependiente de endotelio (Figura 56 a, b, c), así como el área bajo las correspondientes curvas concentración-respuesta (Figura 56 d, b, c) en la aorta de los animales en el modelo de SM por dieta. En dicha figura se muestran como referencia los parámetros correspondientes de los animales del grupo Control, es decir, animales alimentados durante 20 semanas con dieta normocalórica y normograsa.

Los animales del grupo experimental al que se le administró TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, durante las últimas dos semanas de alimentación con dieta hipercalórica e hipergrasa, mostraron valores similares tanto en la función contráctil

como dilatadora de la aorta en comparación con los valores obtenidos en las preparaciones procedentes de los animales con SM que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1. Así, las curvas concentración-respuesta y las ABC correspondientes resultaron similares en ambos grupos experimentales tanto para Fe ( $E_{max}$ : SM+TLR4-PA1:  $0,98 \pm 0,04$  g (n=8)  $p > 0,05$  vs. SM:  $1,01 \pm 0,09$  g (n=10); ABC: SM+TLR4-PA1:  $2,03 \pm 0,14$  (n=9)  $p > 0,05$  vs. SM:  $2,02 \pm 0,31$  (n=10)), como para Ca ( $E_{max}$ : SM+TLR4-PA1:  $104,60 \pm 5,28\%$  (n=10)  $p > 0,05$  vs. SM:  $92,70 \pm 4,73\%$  (n=11); ABC: SM+TLR4-PA1:  $245,46 \pm 245,81\%$  (n=10)  $p > 0,05$  vs. SM:  $252,12 \pm 26,61\%$  (n=11)) y NPS ( $E_{max}$ : SM+TLR4-PA1:  $116,65 \pm 5,05\%$  (n=9)  $p > 0,05$  vs. SM:  $118,71 \pm 3,00\%$  (n=8); ABC: SM+TLR4-PA1:  $437,52 \pm 32,12\%$  (n=9)  $p > 0,05$  vs. SM:  $461,55 \pm 27,87\%$  (n=9)). Por tanto, el tratamiento durante 2 semanas con el fármaco antagonista TLR4 no afectó a la reactividad vascular de la aorta de los animales con SM.

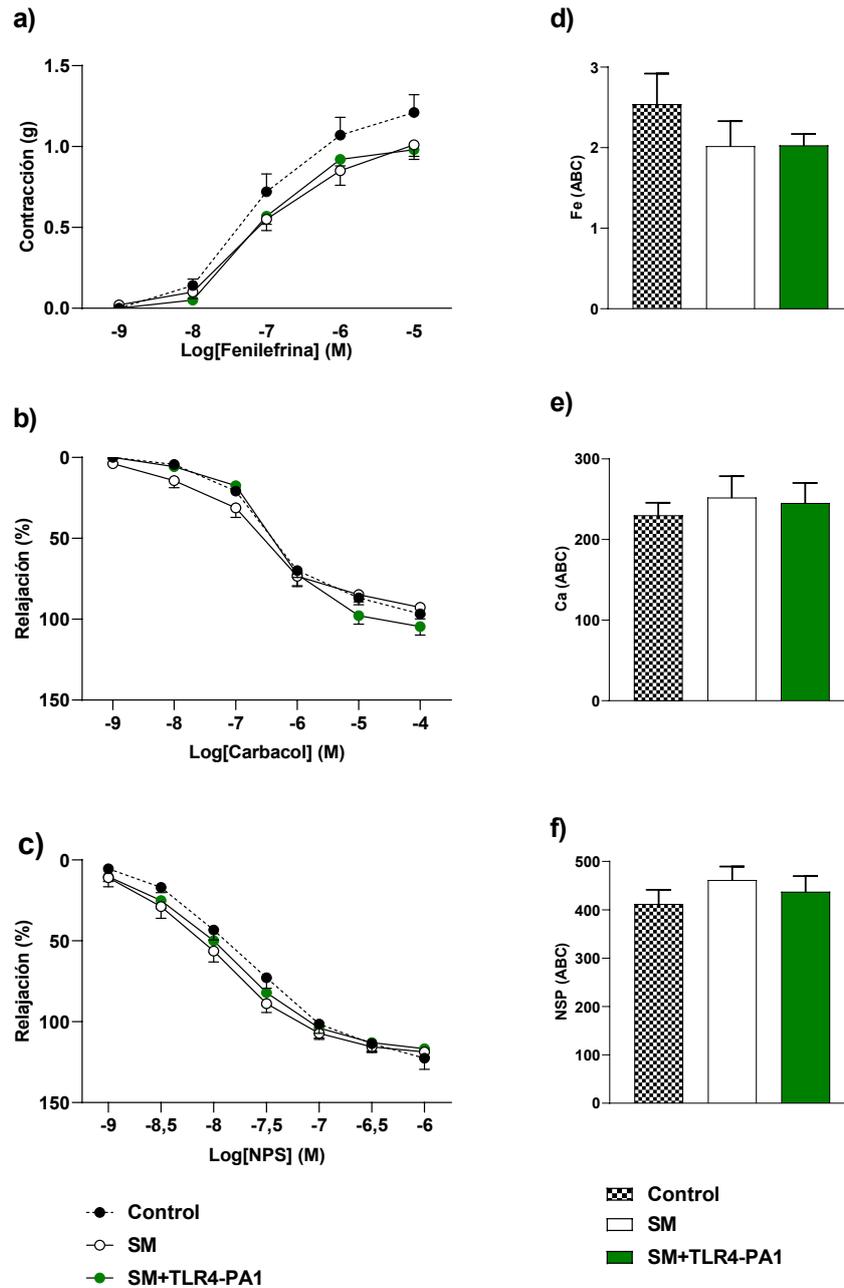
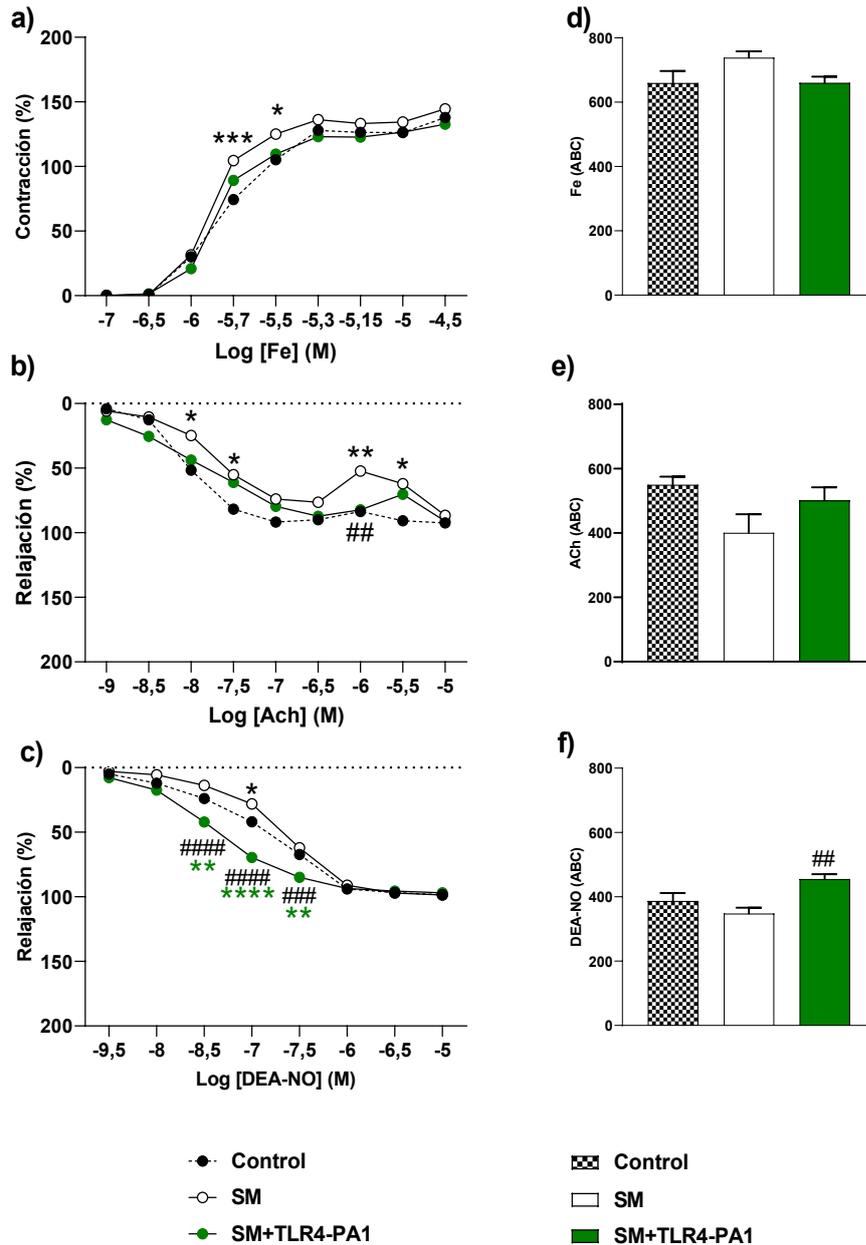


Figura 56: (a) Curva concentración-respuesta a Fe ( $10^{-9}M-10^{-5}M$ ), (b) Curva concentración-respuesta a Ca ( $10^{-9}M-10^{-4}M$ ), (c) Curva concentración-respuesta de NPS ( $10^{-9}M-10^{-6}M$ ), (d) Área bajo la curva de la curva concentración-respuesta a Fe, (e) Área bajo la curva de la curva concentración-respuesta a Ca, (f) Área bajo la curva de la curva concentración-respuesta a NPS, en anillos aislados de aorta de rata procedentes de animales alimentados durante 20 semanas con dieta hipercalórica e hipergrasa (SM) o que recibieron las últimas 2 semanas de dicho tratamiento dietético un tratamiento diario de TLR4-PA1, dosis 10 mg/Kg (SM +TLR4-PA1). El grupo Control corresponde a animales que habían sido alimentados durante 20 semanas con dieta normocalórica y normograsa y está representado como referencia. Los datos están representados como Media  $\pm$  E.E.M (n=9-11). Para el tratamiento estadístico de las curvas concentración-respuesta se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de un test *post-hoc* Tukey. Para el tratamiento estadístico de los datos del área bajo la curva se utilizó un análisis *t-student* con corrección de Welch.No se observaron diferencias significativas. Fe: Fenilefrina; Ca: Carbacol; NPS: Nitroprusiato sódico; ABC: Área bajo la curva.

#### 4.4.3.5. Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, sobre la reactividad de la arteria mesentérica de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta

En la Figura 57 se presentan los resultados del efecto de la administración de TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, en los valores de reactividad vascular de la arteria mesentérica de los diferentes grupos experimentales. En la Figura 57 se representan: la función contráctil, la relajación dependiente de endotelio, la relajación no dependiente de endotelio (Figura 57 a, b, c), así como el área bajo las correspondientes curvas concentración-respuesta (Figura 57 d, e, f) en las preparaciones obtenidas de los animales en el modelo de SM por dieta. En dicha figura se muestran como referencia los parámetros correspondientes de los animales del grupo Control, es decir, animales alimentados durante 20 semanas con dieta normocalórica y normograsa.

Los animales del grupo experimental al que se le administró TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, durante las últimas dos semanas de alimentación con dieta hipercalórica e hipergrasa, mostraron una contractilidad de la arteria mesentérica similar a la obtenida en los animales con SM que no recibieron tratamiento con TLR4-PA1 ( $E_{max}$ : SM+TLR4-PA1:  $132,81 \pm 3,66$  % (n=6)  $p > 0,05$  vs. SM:  $144,62 \pm 2,85$  % (n=6); ABC: SM+TLR4-PA1:  $660,20 \pm 19,27$  (n=6)  $p > 0,05$  vs. SM:  $738,40 \pm 19,66$ % (n=6)). De la misma manera, la administración de TLR4-PA1 durante 2 semanas en los animales alimentados con dieta hipercalórica e hipergrasa no modificó la relajación dependiente de endotelio de la arteria mesentérica de los animales en comparación con la obtenida en los animales con SM que no habían recibido tratamiento con TLR4-PA1 ( $E_{max}$ : SM+TLR4-PA1:  $91,16 \pm 2,36$ % (n=6)  $p > 0,05$  vs. SM:  $86,57 \pm 3,96$ % (n=6); ABC: SM+TLR4-PA1:  $501,30 \pm 40,80$ % (n=10)  $p > 0,05$  vs. SM:  $401,00 \pm 57,44$  % (n=6)). Sin embargo, la administración de TLR4-PA1 ocasionó un aumento significativo en la capacidad vasodilatadora no dependiente de endotelio en la arteria mesentérica en relación con los valores obtenidos en los animales con SM que no recibieron tratamiento con el fármaco anti TLR4 ( $E_{max}$ : SM+TLR4-PA1:  $96,91 \pm 0,41$ % (n=6)  $p > 0,05$  vs. SM:  $98,65 \pm 0,94$ % (n=6); ABC: SM+TLR4-PA1:  $455,50 \pm 15,02$ % (n=6)  $p < 0,01$  vs. SM:  $348,30 \pm 18,05$  % (n=6)). Más aún, este aumento en la capacidad vasodilatadora no dependiente de endotelio en la arteria mesentérica causada por el tratamiento con TLR4-PA1 fue incluso ligeramente mayor que este mismo parámetro en las preparaciones procedentes de animales Control ( $E_{max}$ : SM+TLR4-PA1:  $96,91 \pm 0,41$ % (n=6)  $p > 0,05$  vs. Control:  $98,43 \pm 1,36$ % (n=6); ABC: SM+TLR4-PA1:  $455,50 \pm 15,02$ % (n=6)  $p > 0,05$  vs. Control:  $387,30 \pm 24,25$  % (n=10)).



#### 4.4.4. Expresión proteica

##### 4.4.4.1. Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, sobre la expresión del TLR4, MyD88 y NLRP3 en el ventrículo izquierdo de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta

En la Figura 58 se presentan los resultados del efecto de la administración de TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, en la expresión proteica de TLR4, MyD88 y NLRP3 en el ventrículo izquierdo de los animales de los diferentes grupos experimentales. En la Figura 58 se representan: expresión proteica de TLR4, expresión proteica de MyD88 y expresión proteica de NLRP3 (Figura 58 a, b, c) obtenidas en el ventrículo izquierdo de los animales en el modelo de SM por dieta. En dicha figura se muestran como referencia los parámetros correspondientes de los animales del grupo Control, es decir, animales alimentados durante 20 semanas con dieta normocalórica y normograsa.

En el ventrículo izquierdo procedente de los animales del grupo experimental al que se le administró TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, durante las últimas dos semanas de alimentación con dieta hipercalórica e hipergrasa, no se observaron cambios en la expresión de TLR4 y MyD88, en comparación con dicha expresión en este tejido en los animales con SM que no recibieron dicho tratamiento (TLR4: SM+TLR4-PA1:  $110,17 \pm 8,63$  U.A (n=4)  $p > 0,05$  vs. SM:  $108,10 \pm 6,33$  U.A (n=5); MyD88:  $101,15 \pm 1,92$  U.A (n=5)  $p > 0,05$  vs. SM:  $92,84 \pm 8,72$  U.A (n=5)). Sin embargo, tras la administración de TLR4-PA1, la expresión de NLRP3 en el tejido cardiaco de los animales disminuyó ligeramente en relación con dicha expresión en los animales con SM que no habían sido tratados con dicho fármaco (SM+TLR4-PA1:  $102,50 \pm 9,35$  U.A (n=6)  $p > 0,05$  vs. SM:  $120,67 \pm 16,30$  U.A (n=6)). Hay que señalar que, aunque esta disminución en la expresión de NLRP3 a nivel cardiaco tras el tratamiento con TLR4-PA1 no resultó significativa, fue suficiente para corregir el aumento de la expresión de NLRP3 observada en animales con SM, obteniéndose en los animales tratados con el fármaco TLR4-PA1 valores de dicha expresión similares a los presentados en los animales del grupo Control alimentados con dieta hipercalórica e hipergrasa (SM+TLR4-PA1:  $102,50 \pm 9,35$  U.A (n=6)  $p > 0,05$  vs. Control:  $100,00 \pm 8,96$  U.A (n=6)).

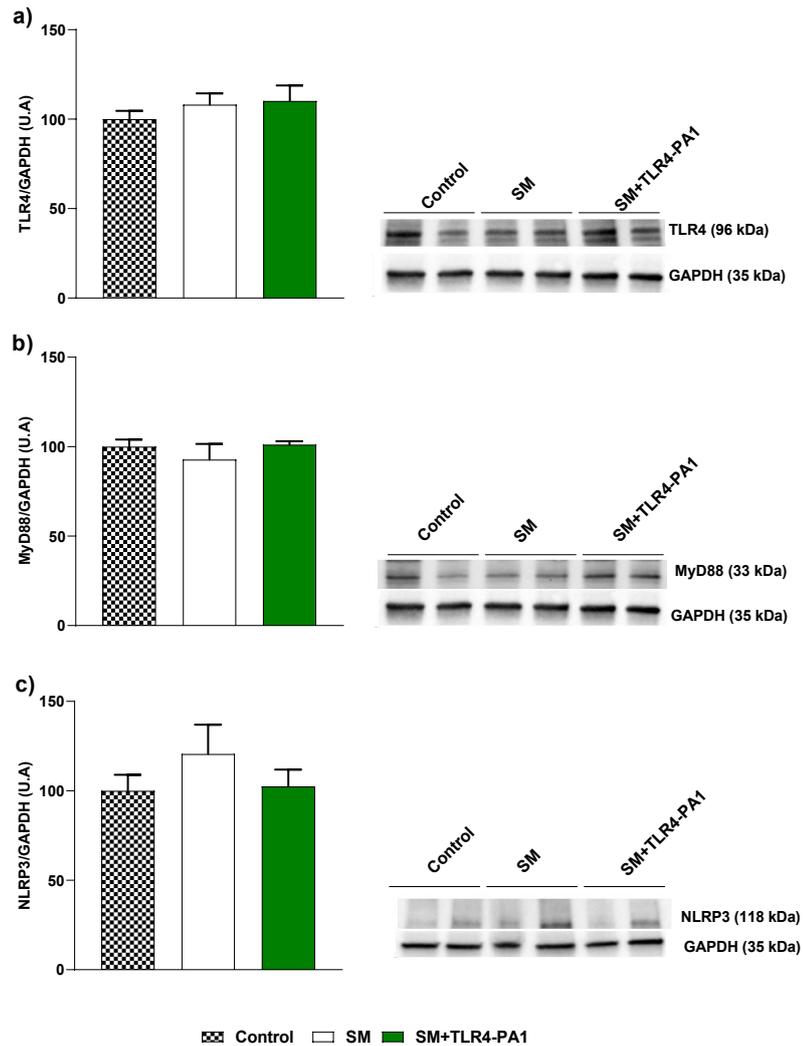


Figura 58: (a) Expresión proteica de TLR4, (b) Expresión proteica de MyD88, (c) Expresión proteica de NLRP3 en el ventrículo izquierdo procedente de animales alimentados durante 20 semanas con dieta hipercalórica e hipergrasa (SM) o que recibieron las últimas 2 semanas de dicho tratamiento dietético, un tratamiento diario de TLR4-PA1, dosis 10 mg/Kg (SM + TLR4-PA1). El grupo Control corresponde a animales que habían sido alimentados durante 20 semanas con dieta normocalórica y normograsa y está representado como referencia. Los datos están representados como Media  $\pm$  E.E.M (n=4-6). Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Tukey para llevar a cabo el tratamiento estadístico de los datos. (\*  $p < 0,05$  vs. Salino). U.A: Unidades arbitrarias.

#### 4.4.4.2. Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, sobre la expresión del TLR4, MyD88 y NLRP3 en la aorta de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta

En la Figura 59 se presentan los resultados del efecto de la administración de TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, en la expresión proteica de TLR4, MyD88 y NLRP3 en la aorta de los animales de los diferentes grupos experimentales. En la Figura 2 se representan: expresión proteica de TLR4, expresión proteica de MyD88 y expresión proteica de NLRP3 (Figura 59 a, b, c) obtenidas en la aorta de los animales en el modelo de SM por dieta. En dicha figura se muestran como referencia los parámetros correspondientes de los animales del grupo Control, es decir, animales alimentados durante 20 semanas con dieta normocalórica y normograsa.

En la aorta procedente de los animales del grupo experimental al que se le administró TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, durante las últimas dos semanas de alimentación con dieta hipercalórica e hipergrasa, se observó un leve aumento de la expresión de TLR4 en relación a la expresión de esta proteína en la aorta procedente de animales con SM que no recibieron dicho tratamiento (SM+TLR4-PA1:  $73,38 \pm 9,41$  U.A (n=4)  $p > 0,05$  vs. SM:  $65,67 \pm 10,32$  U.A (n=5)). En cambio, la administración de TLR4-PA1 produjo una clara disminución en la expresión de MyD88 y un ligero descenso en la de NLRP3 en la aorta de los animales, en comparación con las correspondientes expresiones de estas proteínas en los tejidos procedentes de los animales con SM que no habían recibido dicho tratamiento (MyD88: SM+TLR4-PA1:  $51,89 \pm 17,71$  U.A (n=4)  $p > 0,05$  vs. SM:  $278,37 \pm 109,12$  (n=4); NLRP3: SM+TLR4-PA1:  $145,07 \pm 19,54$   $p > 0,05$  U.A (n=5) vs. SM:  $167,84 \pm 38,31$  (n=4)). Hay que destacar, que la administración de TLR4-PA1 fue capaz de corregir parcialmente los cambios en la expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3 observados en animales con SM, obteniéndose en los animales tratados con el fármaco TLR4-PA1 valores de expresión de estas proteínas similares a los presentados en los animales del grupo Control (TLR4: SM+TLR4-PA1:  $73,38 \pm 9,41$  U.A (n=4)  $p > 0,05$  vs. Control:  $100,00 \pm 2,06$  U.A (n=6); MyD88: SM+TLR4-PA1:  $51,89 \pm 17,71$  U.A (n=4)  $p > 0,05$  vs. Control:  $100,00 \pm 10,83$  (n=5); NLRP3: SM+TLR4-PA1:  $73,38 \pm 9,41$  U.A (n=4)  $p > 0,05$  vs. Control:  $100,00 \pm 10,96$  U.A (n=6)).

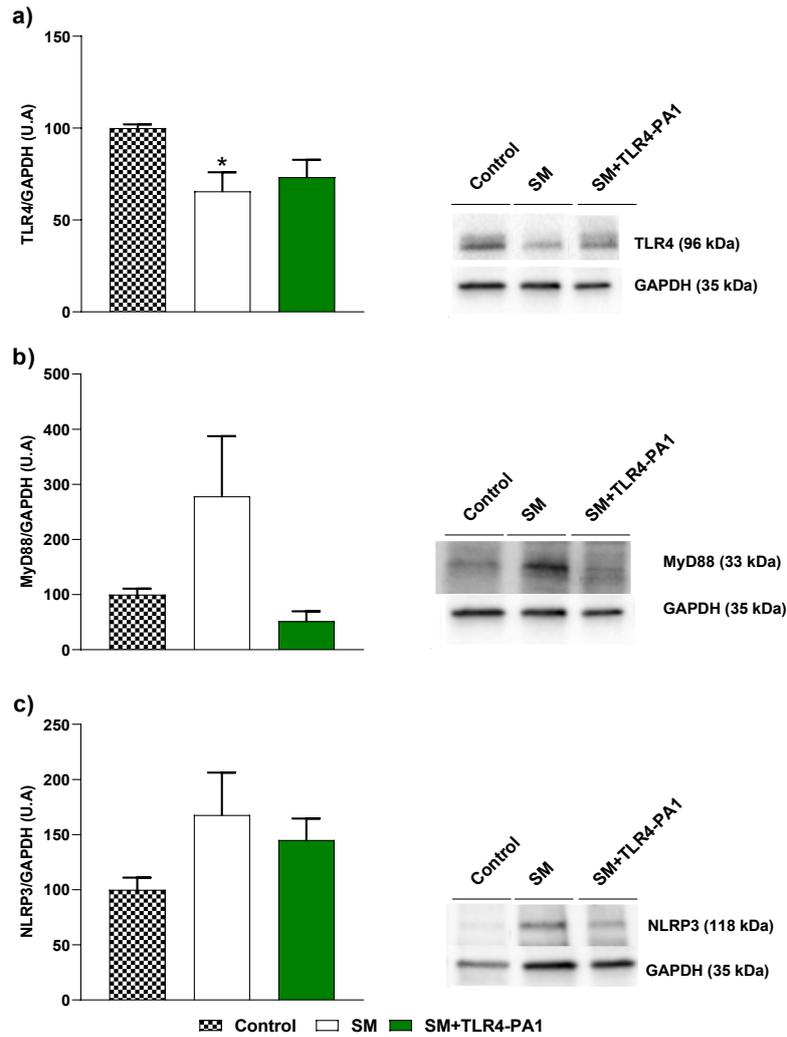


Figura 59: a) Expresión proteica de TLR4, (b) Expresión proteica de MyD88, (c) Expresión proteica de NLRP3 en la aorta procedente de animales alimentados durante 20 semanas con dieta hipercalórica e hipergrasa (SM) o que recibieron las últimas 2 semanas de dicho tratamiento dietético, un tratamiento diario de TLR4-PA1, dosis 10 mg/Kg (SM + TLR4-PA1). El grupo Control corresponde a animales que habían sido alimentados durante 20 semanas con dieta normocalórica y normograsa y está representado como referencia. Los datos están representados como Media  $\pm$  E.E.M (n=4-6). Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Tukey para llevar a cabo el tratamiento estadístico de los datos. (\*  $p < 0,05$  vs. Salino). U.A: Unidades arbitrarias.

#### 4.4.4.3. Efecto de la administración de TLR4-PA1, 10 mg/Kg, sobre la expresión del TLR4, MyD88 y NLRP3 en el tejido renal de los animales con Síndrome Metabólico (SM) por dieta

En la Figura 60 se presentan los resultados del efecto de la administración de TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, en la expresión proteica de TLR4, MyD88 y NLRP3 en el tejido renal de los animales de los diferentes grupos experimentales. En la Figura 2 se representan: expresión proteica de TLR4, expresión proteica de MyD88 y expresión proteica de NLRP3 (Figura 60 a, b, c) obtenidas en el riñón de los animales en el modelo de SM por dieta. En dicha figura se muestran como referencia los parámetros correspondientes de los animales del grupo Control, es decir, animales alimentados durante 20 semanas con dieta normocalórica y normograsa.

En el tejido renal procedente de los animales del grupo experimental al que se administró TLR4-PA1, a la dosis de 10 mg/Kg, durante las últimas dos semanas de alimentación con dieta hipercalórica e hipergrasa, no se observaron cambios en la expresión de TLR4 en comparación con la expresión de dicha proteína en el tejido renal procedente de animales con SM que no recibieron dicho tratamiento (SM+TLR4-PA1:  $85,97 \pm 11,21$  U.A (n=5)  $p > 0,05$  vs. SM:  $96,48 \pm 22,39$  U.A (n=6)). Sin embargo, la administración de TLR4-PA1 produjo un aumento de la expresión de MyD88 y NLRP3 que fue significativamente superior a la expresión de estas mismas proteínas en el tejido renal de los animales con SM que no recibieron dicho tratamiento (MyD88; SM+TLR4-PA1:  $473,01 \pm 69,49$  U.A (n=6)  $p < 0,05$  vs. SM:  $223,66 \pm 31,14$  U.A (n=5); NLRP3: SM+TLR4-PA1:  $245,68 \pm 26,35$  U.A (n=6)  $p < 0,01$  vs SM:  $113,13 \pm 9,54$  (n=5). Más aún, este aumento en la expresión de MyD88 y NLRP3 a nivel renal causada por el tratamiento con TLR4-PA1 fue incluso significativamente mayor que estos mismos parámetros en las preparaciones procedentes de animales Control (MyD88:  $473,01 \pm 69,49$  U.A (n=6)  $p < 0,001$  vs. Control:  $100,00 \pm 2,42$  U.A. (n=4); NLRP3: SM+TLR4-PA1:  $245,68 \pm 26,35$  U.A (n=6)  $p < 0,001$  vs. Control:  $100,00 \pm 1,89$  U.A. (n=5)).

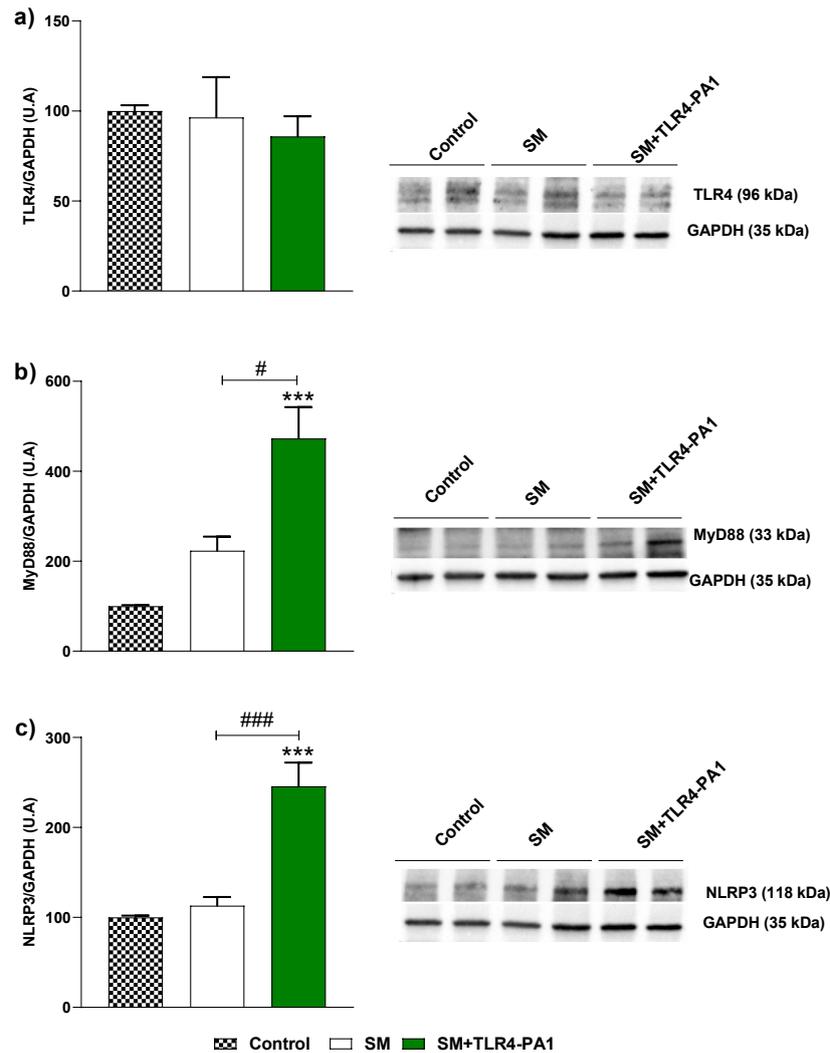


Figura 60: a) Expresión proteica de TLR4, (b) Expresión proteica de MyD88, (c) Expresión proteica de NLRP3 en tejido renal procedente de animales alimentados durante 20 semanas con dieta hipercalórica e hipergrasa (SM) o que recibieron las últimas 2 semanas de dicho tratamiento dietético, un tratamiento diario de TLR4-PA1, dosis 10 mg/Kg (SM + TLR4-PA1). El grupo Control corresponde a animales que habían sido alimentados durante 20 semanas con dieta normocalórica y normograsa y está representado como referencia. Los datos están representados como Media  $\pm$  E.E.M (n=4-6). Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post-hoc* Tukey para llevar a cabo el tratamiento estadístico de los datos. (\*  $p < 0,05$  vs. Salino). U.A: Unidades arbitrarias.

Antes de concluir este subapartado, hay que señalar que por diferentes problemas técnicos no ha sido posible concluir la determinación en la expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3 en arteria mesentérica de los animales del modelo de SM por dieta, por lo que estos resultados no han podido incluirse en esta Tesis Doctoral

# **5. Discusión**

En esta Tesis Doctoral, se han estudiado las alteraciones cardiovasculares producidas en dos modelos experimentales: modelo de administración crónica de cisplatino y modelo de SM por dieta, analizando si en dichas alteraciones estaban implicados cambios en la expresión de proteínas del eje TLR4/MyD88/NLRP3. Además, se evaluó el bloqueo de la vía del receptor TLR4, con el antagonista TLR4-PA1, era capaz de mejorar las alteraciones cardiovasculares en dichos modelos.

Los resultados obtenidos en el modelo de administración crónica de cisplatino demuestran que el tratamiento con este antitumoral ocasiona alteraciones cardiovasculares, dosis-dependientes, que afectan de manera diferente a los distintos territorios cardiovasculares. La toxicidad vascular y renal se inicia a dosis más bajas que las alteraciones cardíacas o sistémicas, y afecta en mayor medida a los vasos de conductancia que a los de resistencia. Cuando el antitumoral se administra a dosis elevadas, la toxicidad vascular se agrava, se produce una disfunción ventricular izquierda y se ocasionan cambios en la presión arterial. Por otra parte, el tratamiento crónico con este antitumoral provoca una situación de estrés oxidativo generalizado, así como un aumento en los niveles plasmáticos de algunas citoquinas proinflamatorias compatible con un estado de inflamación de bajo grado. Por último, los resultados obtenidos señalan que el tratamiento crónico con cisplatino provoca cambios en la expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3 a nivel cardiovascular y renal. El eje TLR4/MyD88/NLRP3 parece jugar un papel más importante en el desarrollo de la toxicidad renal que, en la toxicidad cardiovascular, siendo la expresión de NLRP3 la más afectada en todos los tejidos analizados. Estos cambios se correlacionan con las alteraciones funcionales cardiovasculares y renales desencadenadas por el tratamiento crónico con cisplatino. El tratamiento con el antagonista de receptores TLR4, TLR4-PA1, mejora las alteraciones cardiovasculares provocadas por el tratamiento con cisplatino, no modificando el estado generalizado de estrés oxidativo. La modificación en la expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3 no parece estar relacionada con su efecto vascular, pero la disminución en la expresión de NLRP3 a nivel cardíaco y la de TLR4 y NLRP3 a nivel renal si podrían relacionarse con la mejora en la función de estos tejidos.

En el modelo de SM por dieta, los animales han desarrollado los principales factores que caracterizan esta patología metabólica: obesidad central, dislipemias y alteraciones en el metabolismo de la glucosa. Sin embargo, los animales con SM por dieta no han desarrollado hipertensión, sino todo lo contrario, una hipotensión que podría ser debida a la neuropatía autonómica cardiovascular que se desarrolla en las etapas iniciales de esta patología. Además, los resultados de este modelo experimental indican también que las alteraciones a nivel vascular son previas a las alteraciones cardíacas, siendo los vasos de resistencia los que se afectan en primer lugar, desarrollando una disfunción endotelial. El daño renal en este modelo también se desarrolla desde etapas tempranas y antes que las alteraciones cardiovasculares sean generalizadas. Por otra parte, este modelo también ha reproducido el estado de estrés oxidativo generalizado en los animales, así como un aumento en los niveles plasmáticos de citoquinas proinflamatorias compatible con un estado de inflamación de bajo grado. Por último, los resultados obtenidos señalan que en las etapas iniciales de daño cardiovascular y renal en el modelo de SM por dieta no hay grandes alteraciones en la expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3, siendo los vasos de conductancia los primeros tejidos en los que se aprecian estas modificaciones. El tratamiento con el antagonista de receptores TLR4, TLR4-PA1, es capaz de mejorar las alteraciones metabólicas, cardiovasculares y renales provocadas por el SM inducido por dieta, disminuyendo también el estado generalizado de estrés oxidativo en los animales. Este antagonista, no parece tener

efectos importantes sobre la expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3 en el tejido cardiovascular, pero sí ocasiona cambios en la expresión de MyD88 y NLRP3 a nivel renal que requieren un estudio más profundo para identificar su implicación en las complicaciones renales en este modelo experimental.

## **5.1. Alteraciones cardiovasculares inducidas por la administración crónica de Cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y CPT 3 (mg/Kg). Implicación del eje TLR4/MyD88/NLRP3.**

El cisplatino es un potente agente quimioterapéutico con una gran eficacia clínica en tumores de pulmón, ovario, pecho, cerebral, sarcomas, cánceres de tejido blando, hueso, músculos, y tejidos sanguíneos (Dasari & Bernard Tchounwou, 2014). Sin embargo, su actividad antitumoral se ha asociado con diferentes efectos adversos de mayor o menor gravedad como la nefrotoxicidad, cardiotoxicidad, hepatotoxicidad, toxicidad gastrointestinal, mielo supresión, ototoxicidad y neurotoxicidad (Rosic et al., 2018).

Los datos clínicos muestran que algunos supervivientes de cáncer tratados con Cisplatino tienen un riesgo alto de sufrir enfermedades cardiovasculares (Abramavicius et al., 2017; Centola et al., 2016; Herrmann, 2020; Ishioka et al., 2008; Karabay et al., 2014; Madeddu et al., 2016; Vaughn et al., 2008), siendo la toxicidad cardiovascular inducida por Cisplatino una preocupación cada vez mayor. Además, se sabe que la nefrotoxicidad es el principal efecto secundario de la administración de Cisplatino, apareciendo en porcentajes que oscilan entre el 20% y el 35% en los pacientes tratados y conduce a la muerte por fallo renal agudo (Pierson-Marchandise et al., 2017). Además, algunos estudios han demostrado que la toxicidad renal y cardiovascular ocasionada por el tratamiento con Cisplatino comparten mecanismos celulares y moleculares (Dugbartey et al., 2016; Varga et al., 2015), con lo que podrían influirse mutuamente en su desarrollo.

Aunque existen algunos datos experimentales que analizan la toxicidad renal y/o cardiovascular del Cisplatino tras administraciones agudas (Chowdhury et al., 2016; Holditch et al., 2019; Ozkok & Edelstein, 2014; Stojic et al., 2018), no hay estudios en animales que evalúen específicamente esta toxicidad tras su tratamiento crónico, principalmente en ciclos (forma habitual de administración en la terapia clínica) y que estudien los mecanismos implicados en estas alteraciones. El modelo experimental utilizado en esta Tesis Doctoral imita los ciclos de tratamiento quimioterápico, describiendo alteraciones cardíacas y vasculares con esta pauta de administración. Otros autores ya han demostrado que este mismo modelo experimental es válido para analizar las alteraciones en el comportamiento alimentario, actividad locomotora espontánea, neuropatía periférica sensorial y alteraciones gastrointestinales causadas por el tratamiento crónico con Cisplatino (López-Tofiño et al., 2021; Paniagua et al., 2019; Vera et al., 2006b). De hecho, en el modelo experimental desarrollado en esta Tesis Doctoral se ha analizado como control interno del mismo, el peso y el comportamiento alimentario de los animales. Así, ganancia de peso de los animales tratados con Cisplatino 2 mg/Kg y Cisplatino 3 mg/Kg durante 5 semanas fue de 0,56% y -8,47% respectivamente, resultando en valores similares a los descritos por otros autores (P. Cabezos et al., 2010). Más aún, la anorexia desarrollada en estos animales, medida como disminución en la ingesta sólida, fue de alrededor de 13 g/día por animal al finalizar los tratamientos con el antitumoral y también resultó similar a la descrita por dichos autores. La disminución de peso corporal y de ingesta sólida observadas en los animales del modelo de Cisplatino podrían ser consecuencia del retraso en el

vaciamiento gástrico y la existencia de náusea que ocasiona este antitumoral y que ya ha sido demostrada (P. Cabezos et al., 2010; P. A. Cabezos et al., 2008; Paniagua et al., 2019; Vera et al., 2011).

Estudios recientes han puesto de manifiesto la relación entre el estrés oxidativo, la inflamación estéril y las alteraciones cardiovasculares ocasionadas por la administración de antitumorales (Rosic et al., 2015, 2018). De hecho, la administración de Cisplatino aumenta los niveles plasmáticos de radicales libres, agotando rápidamente los sistemas antioxidantes del organismo y ocasionando daños en componentes celulares, como las proteínas, ADN y los compuestos lipídicos presentes en la membrana celular, entre otros. Este último daño ocasiona peroxidación lipídica. El Malondialdehído (MDA) es un compuesto generado tras la peroxidación de los lípidos que componen las membranas celulares, siendo, por ello, un compuesto reconocido para la evaluación del estrés oxidativo (Lykkesfeldt, 2007). Asimismo, se ha observado que hay una relación directa entre el aumento de especies reactivas de oxígeno producido por la administración de Cisplatino, y el aumento de citoquinas proinflamatorias (Chowdhury et al., 2016). Este estado inflamatorio puede estar implicado en los efectos adversos de los antitumorales (El-Awady et al., 2011), y en particular del Cisplatino (Dugbartey et al., 2016; Perše & Večerić-Haler, 2018).

En esta Tesis doctoral se han analizado los niveles plasmáticos de MDA y citoquinas proinflamatorias tras el tratamiento crónico con ciclos de Cisplatino.

Los resultados muestran un aumento significativo y dosis-dependiente de los niveles plasmáticos de MDA de los animales tras el tratamiento con el antitumoral lo que indica un estado de estrés oxidativo generalizado y que está de acuerdo con lo descrito también por otros autores (El-Hawwary & Omar, 2019; Kursunluoglu et al., 2018; Rosic et al., 2018; Stojic et al., 2018). Además, está demostrado que el Cisplatino ocasiona disfunción mitocondrial por acumulación de especies reactivas de oxígeno y por daño del ADN mitocondrial en tejido renal (Miller et al., 2010).

En esta Tesis Doctoral se han analizado los niveles plasmáticos de 23 citoquinas proinflamatorias. Los resultados obtenidos no muestran patrones claros de alteración en estos mediadores proinflamatorios tras el tratamiento con Cisplatino. Así, no se observó el aumento esperable en los niveles plasmáticos de las citoquinas proinflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  o IL-6 después del tratamiento con Cisplatino independientemente de la dosis utilizada. De hecho, estos resultados no concuerdan con los obtenidos en otros estudios que sí describen un aumento de estas citoquinas a nivel renal y cardíaco después de la administración de Cisplatino (Akhter et al., 2022; Aladaileh et al., 2021; Deng et al., 2020; Wei et al., 2022). Esta diferencia se puede deber a que la inflamación causada por la administración de Cisplatino se inicie a nivel tisular antes que se traslade a nivel sistémico. Por otra parte, también es posible que en nuestro modelo experimental la fase aguda de la inflamación, que implica una mayor participación de estas citoquinas ya haya finalizado, mientras que el desarrollo de la inflamación crónica está en proceso, por lo que los niveles de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  o IL-6 no son ya tan elevados (Thomas & Grisanti, 2020). Este último aspecto mencionado concordaría con la tendencia al aumento en los niveles plasmáticos de MCP-1 y RANTES observados en estos animales. Por otra parte, hay que destacar que, al analizar los niveles de estas citoquinas, sí se observó un aumento significativo y dosis-dependiente de los niveles plasmáticos de IL-18 tras el tratamiento crónico con Cisplatino. Este aumento, ha sido también descrito por otros

autores, que han propuesto a la IL-18 como un mediador crítico en el daño cardíaco y renal agudo ocasionado por Cisplatino en modelos animales (Jing et al., 2019; H. Meng et al., 2017; Nozaki et al., 2012; J. Shen et al., 2020; J. Xu et al., 2021), e incluso en pacientes (Zubowska et al., 2013). De acuerdo con lo mencionado anteriormente, en esta Tesis Doctoral se demuestra que el tratamiento con ciclos de Cisplatino provoca una inflamación sistémica de bajo grado, con un aumento de la IL-18 en el plasma sanguíneo, pudiendo sugerirse que esta citoquina es un marcador temprano de inflamación sistémica tras el tratamiento con Cisplatino.

Como se ha mencionado a lo largo de esta Tesis Doctoral, uno de sus objetivos era la identificación de las posibles alteraciones cardiovasculares tras un tratamiento crónico en ciclos con Cisplatino. Los resultados obtenidos muestran que, a la dosis más alta del fármaco antitumoral utilizada, 3 mg/Kg, se produce una disminución significativa de la PAD y una clara bradicardia. La PAS no se modificó tras ninguna de las dosis de antitumoral evaluadas, y la FC no se alteró a la dosis de 2 mg/Kg de Cisplatino. Se sabe que el tratamiento crónico con Cisplatino a dosis similares (1-3 mg/Kg) a las evaluadas en esta Tesis Doctoral causa neuropatía sensorial periférica y neuropatía autonómica entérica (Vera et al., 2011, 2013). Nuestros resultados muestran que el tratamiento crónico con Cisplatino también podría provocar una neuropatía autonómica cardiovascular que justificaría la disminución de la PAD y bradicardia, señalando que esta neuropatía autonómica cardiovascular se produce a dosis más altas que las neuropatías sensoriales o entéricas que se han mostrado a dosis de tratamiento de Cisplatino de 1 y 2 mg/Kg (Vera et al., 2011, 2013). Diferentes autores describen que el Cisplatino induce también bradicardia severa en humanos (Bin Naeem et al., 2021; Kounis et al., 2016; Kucharz et al., 2016; Schlumbrecht & Hehr, 2015), y otros autores describen, tras una única inyección de Cisplatino (7 mg/Kg) en ratas, alteraciones cardíacas que incluyen una disminución de la presión arterial así como una disminución de la FC, debido a la cardiotoxicidad que el Cisplatino produce en el nodo sinoauricular, lo que conduce a bradicardia (El-Sawalhi & Ahmed, 2014). En relación a la no existencia de cambios en los niveles de PAS, nuestros resultados son similares a los descritos por otros autores con una pauta de administración ligeramente superior a la establecida en esta Tesis Doctoral, 2 mg/Kg semanales durante 10 semanas (Abdelkader et al., 2017).

En los pacientes oncológicos tratados con quimioterapia, la morbimortalidad cardíaca es mayor que en la población general, sobre todo y de forma preocupante en los pacientes menores de 45 años (van den Belt-Dusebout et al., 2006). La toxicidad cardíaca más evaluada es la producida por las antraciclinas (Berdichevski et al., 2010; Shaker & Sourour, 2010; Soga et al., 2006). Sin embargo, esta cardiotoxicidad no es exclusiva de este grupo de fármacos antineoplásicos, sino que puede ocurrir con otros grupos de agentes antitumorales, incluido el Cisplatino (Finsterer & Ohnsorge, 2013; Madeddu et al., 2016; Pai & Nahata, 2000). Se sabe que el tratamiento con una dosis única de Cisplatino causa disfunción ventricular izquierda y depresión de la contractilidad de los cardiomiocitos en rata, debido a alteraciones en la función mitocondrial, el aumento de estrés oxidativo y de la apoptosis (El-Sawalhi & Ahmed, 2014; H. Ma et al., 2010). Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral confirman que el tratamiento crónico con ciclos de Cisplatino produce una disminución significativa de la contractilidad cardíaca, asociada a una disminución de la función dilatadora del ventrículo izquierdo. Otros autores, utilizando dosis similares o incluso inferiores, en pauta de administración aguda o crónica de Cisplatino, obtuvieron resultados similares

de función cardiaca a los obtenidos en esta Tesis doctoral (Ciftci et al., 2011; Coskun et al., 2014; El-Awady et al., 2011; El-Sawalhi & Ahmed, 2014; Hussein, 2012; H. Ma et al., 2010), describiendo además que este antitumoral produce una disminución de flujo coronario, un aumento de presión sistólica ventricular izquierda y de la contractilidad ventricular izquierda (Rosic et al., 2016) y apoptosis de los cardiomiocitos (Xing et al., 2022). Por otra parte, al analizar los índices de masa del corazón y ventrículo izquierdo de los animales tras los tratamientos con Cisplatino, únicamente se observó un aumento de ambos índices tras el tratamiento con la dosis más alta del antitumoral, 3 mg/Kg. El aumento significativo en el IMc y el IMVI tras el tratamiento con 3 mg/kg de Cisplatino estaría en consonancia con la disfunción ventricular izquierda observada en estos animales, y se correlacionaría con la existencia de una hipertrofia ventricular izquierda (Topal et al., 2018). Más aún, este daño cardiaco también podría estar relacionado con las alteraciones estructurales a nivel del tejido cardiaco que produce la administración crónica de Cisplatino 2 y 3 mg/Kg. Otros autores también han descrito la citotoxicidad de la administración aguda (10 mg/kg) o crónica (4 mg/kg una vez a la semana durante 4 semanas) de Cisplatino que produjo alteraciones estructurales en el tejido cardíaco en las que se observó una desorganización en la estructura del miocardio y fibrosis (Y. Jiang et al., 2014; Saleh et al., 2015).

En cuanto a la funcionalidad de los vasos sanguíneos, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral mostraron que el tratamiento crónico con Cisplatino no ocasiona cambios en la función contráctil en aorta, pero provoca una clara disfunción endotelial en esta arteria. Resultados de otros autores, han descrito, en ratas, que el Cisplatino (200  $\mu$ M) disminuye la función contráctil en la aorta torácica y que este efecto es causado por un daño severo del antitumoral en las paredes de los vasos sanguíneos (Y. Jiang et al., 2014; Soultati et al., 2012). Nuestros resultados no concuerdan con los descritos por estos autores, pero es posible que las concentraciones plasmáticas de Cisplatino alcanzadas en nuestro modelo experimental no fueran tan elevadas y no lleguemos a ver este efecto citotóxico. En relación con la disfunción endotelial observada en la aorta, es importante señalar que la magnitud de esta disfunción endotelial no depende de la dosis, ya que las dosis de 2 y 3 mg/Kg del antitumoral indujeron una disminución similar de la función endotelial. En pacientes oncológicos tratados con Cisplatino, se ha descrito la presencia de disfunción endotelial en grandes arterias a partir de las 24 horas de la administración del antitumoral (Cameron et al., 2020), manteniéndose dicha disfunción mientras dura el tratamiento con Cisplatino (Cameron et al., 2016; Pretnar-Oblak et al., 2007; Serrano-Castro et al., 2000). Por otra parte, hay que mencionar que la vasodilatación independiente del endotelio aumentó tras la dosis máxima de Cisplatino analizada, 3 mg/Kg. Es posible que este aumento se produzca como mecanismo compensador a la disfunción endotelial causa por el antitumoral o que el estrés oxidativo y el estado proinflamatorio que se ha observado con la dosis máxima de Cisplatino sea el responsable. En esta Tesis Doctoral no se han analizado los niveles de iNOS u otras moléculas cuyo aumento de expresión pudieran corroborar este hecho (Cameron et al., 2020; Soultati et al., 2012).

El territorio vascular de resistencia se vio afectado de forma diferente al de la aorta por el tratamiento crónico con Cisplatino. Así, en el lecho vascular mesentérico, el tratamiento con Cisplatino causó una reducción significativa de la función contráctil, pero no provocó ninguna modificación de la función vasodilatadora a ninguna de las dos dosis evaluadas. Respecto a la hiporreactividad contráctil en el lecho mesentérico podría ser

compatible con la existencia de una neuropatía autonómica a este nivel. De hecho, Authier y colaboradores señalaron que las velocidades de conducción nerviosa periférica estaban disminuidas en las ratas tratadas con Cisplatino 3 mg/Kg (Authier et al., 2003). Además, en pacientes tratados con Cisplatino se produjo una disminución similar de la velocidad de conducción nerviosa tras dosis acumulativas de 200-400 mg/m<sup>2</sup> (Boogerd et al., 1990). Es posible que las dosis acumuladas en nuestro modelo experimental (10-15 mg) no sean lo suficientemente elevadas como para producir esta respuesta alfa-vasoconstrictora alterada en los grandes vasos, mientras que los territorios de resistencia pueden ser más sensibles a su toxicidad neuronal. En la literatura no hay datos experimentales sobre la toxicidad del Cisplatino en los vasos de resistencia, con los que podamos comparar el resultado obtenido en esta Tesis Doctoral. Son necesarias, por tanto, más investigaciones para establecer completamente las diferencias encontradas entre los territorios vasculares de resistencia y los de conductancia tras los tratamientos con Cisplatino. Respecto a la ausencia de cambios en la función vasodilatadora de los vasos de resistencia tras el tratamiento con el antitumoral, podría justificarse por el hecho de que es posible que la disfunción endotelial vascular en los vasos grandes se produzca antes de la neuropatía autonómica vascular en los tratamientos con Cisplatino. Además, el endotelio de los grandes vasos puede ser más sensible al estrés oxidativo y el estado inflamatorio generalizado observado tras el tratamiento crónico con Cisplatino, y, por tanto, la disfunción puede producirse incluso a dosis bajas y antes que en el territorio de resistencia. Este patrón de acontecimientos no es sorprendente. De hecho, otros autores han demostrado en otras neuropatías periféricas autonómicas, como la neuropatía diabética, que la alteración de la relajación vascular mediada por acetilcolina se produce antes de alteraciones en el flujo sanguíneo nervioso y antes que los déficits de conducción (Oltman et al., 2005).

Como se ha comentado anteriormente, la nefrotoxicidad es uno de los efectos adversos más frecuentes en la terapia con Cisplatino. Además, la toxicidad renal y cardiovascular causada por este antitumoral pueden compartir mecanismos. También es sabido que la función renal es fundamental para el mantenimiento de la función cardiovascular. Por eso en esta Tesis Doctoral, también se ha analizado la posible alteración renal tras el tratamiento crónico con Cisplatino. Los resultados obtenidos, como era previsible, muestran que el tratamiento con Cisplatino aumenta de manera dosis dependiente los niveles plasmáticos de creatinina, indicando daño renal. Además, datos previos en nuestro laboratorio también han mostrado la aparición de una hipertrofia renal tras los tratamientos crónicos de Cisplatino (Gonzalez et al., 2023, aceptado y en prensa). Estos resultados concuerdan con los descritos por otros autores tanto tras dosis únicas (Aljuhani et al., 2020; Barakat et al., 2020; Deng et al., 2020; Y. Guo et al., 2018; Khedr et al., 2022; H. Liang et al., 2017; Wei et al., 2022), como ciclos (Al Za'abi et al., 2021) de tratamientos de Cisplatino.

Como ya se ha indicado, en esta Tesis Doctoral, se planteó también como objetivo conocer si alteraciones en el eje TLR4/MyD88/NLRP3 estaban implicadas en las complicaciones cardiovasculares desarrolladas en un modelo de administración crónica de Cisplatino. Para ello, se analizaron, como primera aproximación, los niveles en la expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3 en los tejidos, cardíaco, vascular y renal tras el tratamiento con el antitumoral.

Se ha descrito que la activación del receptor TLR4 puede originar una reacción inflamatoria en cualquier tipo de célula, jugando un papel central en el desarrollo del daño cardiovascular y renal (Jha et al., 2021; Vaez et al., 2023; Vallés et al., 2023). En esta Tesis doctoral, el tratamiento con Cisplatino no aumentó la expresión de este receptor en el tejido cardíaco ni en la aorta. Sin embargo, su expresión si aumento aumentó en la arteria mesentérica y el riñón. Más aún, en el tejido renal, la administración crónica de Cisplatino indujo un aumento dosis-dependiente de la expresión de TLR4 y de MyD88. Estos datos sugieren, el daño en el tejido renal y la hiporreactividad vascular en mesentérica observadas tras el tratamiento con Cisplatino, podría estar relacionado con la inflamación a este nivel causada por la activación de la vía del TLR4. Sin embargo, esta vía no parece estar mediando el daño endotelial en otros vasos de mayor calibre como la aorta. Estos resultados están en consonancia con los descritos por otros autores en modelos de nefropatía aguda inducida por Cisplatino (Deng et al., 2020; Y. Guo et al., 2018; Vasaikar et al., 2018), siendo en esta Tesis Doctoral, la primera vez que se describe la implicación de la ruta TLR4/MyD88 en la toxicidad renal inducida por Cisplatino tras una administración crónica. Asimismo, no hay ningún estudio que haya analizado el papel de la vía TLR4/MyD88 en el daño vascular causado por la administración crónica de Cisplatino, siendo este trabajo también el primer estudio que describe esta ruta como posible responsable en la toxicidad vascular en territorios de resistencia. Se sabe también que el receptor TLR4 está asociado con la neurotoxicidad inducida por la quimioterapia tanto en humanos como en modelos animales (Oo et al., 2022), y se ha implicado la activación de este receptor en el desarrollo de neuropatía autonómica entérica (L. Ye et al., 2020). Es posible que este aumento de expresión de TLR4 a nivel mesentérico esté relacionado con la neuropatía autonómica que mencionamos podría justificar los resultados de función observados a este nivel tras el tratamiento con Cisplatino.

La activación del NLRP3 no relacionada con un proceso infeccioso, ha sido involucrada en múltiples enfermedades que tienen un componente inflamatorio asociado, incluyendo las patologías cardiovasculares y el daño renal (Esser et al., 2015; Pinar et al., 2020a; Zhong et al., 2018). Estudios recientes han demostrado que un aumento de la expresión de NLRP3 está implicado en el daño renal después de tratamientos agudos y crónicos con Cisplatino (Akhter et al., 2013; R. Gao et al., 2019; S. Jiang et al., 2021; L. Li et al., 2019; Q. Zhang et al., 2022). Los datos obtenidos en esta Tesis Doctoral están en línea con los descritos por otros autores en el tejido renal, mostrando también que el aumento en la expresión de NLRP3 a nivel renal es dosis-dependiente. En relación con la expresión de NLRP3 a nivel del tejido cardíaco y vascular, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral indican que después del tratamiento crónico con Cisplatino, hay un aumento de la expresión de NLRP3 a nivel cardíaco. Resultados similares ha sido descritos por otros autores en ratones tras el tratamiento dosis de 6 mg/Kg de Cisplatino (dosis acumulativa 18mg) (J. Xu et al., 2021). Asimismo, esta Tesis Doctoral es también la primera en demostrar que el aumento de la expresión de NLRP3 a nivel cardíaco es dosis-dependiente. Estas modificaciones observadas en la expresión de NLRP3 en tejido cardíaco correlacionan con las alteraciones funcionales cardíacas observadas y con el aumento significativo los niveles plasmáticos de IL-18 en los animales tras el tratamiento con el antitumoral. De hecho, hay estudios experimentales con este y otros antitumorales que han establecido esta correlación (Cheng et al., 2022; S. Hu et al., 2023; Yiyang Wang et al., 2023; J. Xu et

al., 2021). Nuestros resultados corroborarían este mecanismo. Por otra parte, a nivel vascular, nuestros resultados describen una disminución de la expresión de NLRP3 que fue significativa a la dosis más alta de Cisplatino administrada, 3 mg/kg en aorta, mientras que en tejido mesentérico no se encontraron cambios en la expresión de NLRP3 tras el tratamiento con Cisplatino. No se han encontrado datos en la literatura que permitan comparar los resultados obtenidos a nivel vascular en esta Tesis Doctoral con otros estudios, pero estos datos parecen no estar de acuerdo con los descritos en otras situaciones de disfunción endotelial, donde a nivel vascular se observa un aumento en la expresión de NLRP3 (Y. Liang et al., 2019; Takahashi, 2022; Yin et al., 2017), ni se correlacionarían con el incremento de IL-18 en los animales de nuestro modelo experimental. Así, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral parecen indicar que el daño vascular causado por la administración crónica de Cisplatino no está mediado por la vía NLRP3, pero más estudios serían necesario para confirmar este aspecto.

Por último, es conocido que una de las primeras etapas que promueve el cebado y la activación del NLRP3 a nivel celular es la activación de TLR4 (Boza et al., 2016; Pinar et al., 2020b; Takahashi, 2022). Los resultados de esta Tesis Doctoral coinciden parcialmente con esta premisa, dado que solo se ha demostrado la activación del eje TLR4/MyD88/NLRP3 en el tejido renal. En el tejido cardiaco y vascular no hay un aumento de la expresión de TLR4 /MyD88 paralela con cambios en la expresión de NLRP3 en los tejidos. Es importante señalar que esto es posible, dado que la activación del inflamasoma y sus componentes se puede producir a través de múltiples mecanismos y vías de señalización y estos mecanismos pueden ser diferentes en distintos tejidos (Pinar et al., 2020a).

## **5.2. Efecto de la administración de TLR4-PA1 en las alteraciones cardiovasculares inducidas por la administración crónica de Cisplatino 2 mg/Kg (CPT 2 mg/Kg) y CPT 3 (mg/Kg).**

La respuesta inflamatoria causada por el receptor TLR4 a través de la cadena de señalización MyD88 se ha asociado con la aparición y desarrollo de muchas enfermedades en las que la inflamación tiene un papel central (Di et al., 2016; Dugbartey et al., 2016; Vázquez-Carballo et al., 2021; Yu Wang et al., 2016a; Yu & Feng, 2018b). Por ello, en los últimos años se están realizando múltiples esfuerzos para desarrollar antagonistas de los receptores, TLR, y concretamente de los receptores TLR4 y sus cadenas de señalización (S. Sharma et al., 2016b). Sin embargo, solo unos pocos de estos antagonistas están disponibles para su posible uso en clínica, ya que la mayoría de los antagonistas o inhibidores no se han evaluado en estudios clínicos o bien no han pasado esta evaluación (W. Gao et al., 2017b; Miguel M Garcia et al., 2020). Por ello, es de interés continuar con la búsqueda de posibles fármacos que modulen esta diana farmacología y constituyan la base para el desarrollo de nuevos tratamientos prometedores, reduciendo la polifarmacia y repercutiendo probablemente en el uso de medicamentos en numerosas patologías.

En esta Tesis Doctoral, se ha analizado el efecto del antagonista de receptores TLR4, TLR4-PA1, sobre las alteraciones cardiovasculares observadas en el modelo de administración crónica de Cisplatino. Además, dado que, en este modelo experimental, también se habían observado otras alteraciones en parámetros generales como el peso, ingesta y estrés oxidativo, igualmente se ha analizado su efecto sobre ellas. Por último, se ha estudiado también si este tratamiento con el antagonista TLR4-PA1 era capaz de modificar la expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3 en tejidos cardiovasculares y renal ocasionada por el antitumoral.

Algunos antagonistas del receptor TLR4 han sido ya ensayados como posibles herramientas farmacológicas en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares en modelos de infarto cerebral, hipertensión, disfunción ventricular neonatal o aterosclerosis (Haj-Mirzaian et al., 2021; R. Hernanz et al., 2015; Mian et al., 2019; N. Wang et al., 2023). Sin embargo, no hay estudios, hasta el momento, que usen esta estrategia farmacológica, ni concretamente el antagonista TLR4-PA1, para corregir las alteraciones en el sistema cardiovascular ocasionadas por antitumorales. Así, esta Tesis Doctoral es el primer estudio que analiza esta posibilidad. Por ello, a lo largo de todo este apartado de “Discusión”, se compararán los resultados obtenidos con estudios en los que se han analizado los mismos parámetros, aunque no sean sobre tratamientos con antitumorales.

Como ya se comentó en la sección de “Introducción” de esta Tesis Doctoral, para la inhibición de receptores TLR4 se ha utilizado el agente denominado TLR4-PA1, perteneciente al grupo de antagonistas miméticos del Lípido A. El compuesto TLR4-A1 ya ha sido probado con anterioridad en modelos animales donde la pauta de administración empleada en esta Tesis Doctoral ha sido eficaz en reducir diversos signos nociceptivos (Ferreira-Gomes et al., 2021; M M Garcia et al., 2017).

El tratamiento con el antagonista TLR4-PA1 no modificó la ganancia de peso de los animales tras la administración crónica de Cisplatino a ninguna de las dos dosis evaluadas, 2 mg/Kg y 3 mg/Kg. Es más, este antagonista tampoco fue capaz de revertir la disminución que en la ingesta sólida de los animales producía este antitumoral. Por tanto, podemos afirmar que el bloqueo del receptor TLR4 no resultó útil para revertir ni la pérdida de peso, ni la anorexia que ocasiona el tratamiento con Cisplatino a la dos dosis ensayadas. Estos resultados no concuerdan con los obtenidos por otros autores, en los que el antagonista TLR4, TAK-242, es capaz de revertir la pérdida de peso en un modelo de asma por administración de LPS (Arora et al., 2023). Es posible que los mecanismos por los que se produce la pérdida de peso y la anorexia no sean los mismos en ambos modelos y esto pueda justificar la diferencia. De hecho, como se ha comentado anteriormente las alteraciones en el comportamiento alimentario ocasionadas por Cisplatino se deben a cambios en la motilidad gastrointestinal (P. Cabezos et al., 2010; P. A. Cabezos et al., 2008), mientras que la pérdida de peso ocasionada en el modelo de asma mencionado se podría deber más a una causa infecciosa e inflamatoria que cursa sobre todo con deshidratación (Breuille et al., 1999). Aunque no existen muchos estudios en los que se analice el papel de los antagonistas TLR4 en la motilidad gastrointestinal, si se sabe por estudios en ratones *Knock-out* para el receptor TLR4 que la ausencia de dicho receptor empeora la motilidad gastrointestinal y sus respuestas a los diferentes neurotransmisores excitadores de la misma (Caputi et al., 2017). Por eso, sería lógico pensar que el bloqueo de estos receptores con el antagonista TLR4-PA1 no solo no mejoraría la motilidad, sino que la agravaría, por lo que no es capaz de corregir las alteraciones observadas. Mas estudios serían necesarios para confirmar este hecho.

En los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, el tratamiento con TLR4-PA1 durante dos semanas produjo un aumento significativo de los niveles plasmáticos de MDA en los animales a las dos dosis de Cisplatino evaluadas, siendo este aumento mayor incluso que el causado por el propio antitumoral. Por tanto, el bloqueo del receptor TLR4 empeora la situación de estrés oxidativo existente de los animales tratados con Cisplatino. Estos datos resultaron inesperados, ya que los estudios que existen en la literatura en modelos de animales de inflamación, muestran que el tratamiento con antagonistas de TLR4 provoca una disminución de los niveles de MDA a nivel tisular, e incluso que esta disminución es dosis-dependiente (Arora et al., 2023; H. Wang et al., 2021; N.-C. Wu & Wang, 2020; Zaniani et al., 2022; Z.-M. Zhang et al., 2019). Esta diferencia en los resultados podría deberse, bien al modelo utilizado, bien a la interacción entre el Cisplatino y el antagonista. No hemos encontrado estudios que analicen estos aspectos, siendo por tanto necesarios más estudios para poder confirmar que el tratamiento con TLR4-PA1 empeora el estado oxidativo tras tratamiento con antitumorales, concretamente Cisplatino. Por otra parte, también se ha descrito que la administración de antagonistas del receptor TLR4 es capaz de disminuir los niveles de citoquinas proinflamatorias en líneas celulares de cardiomiocitos y en modelos de isquemia-reperfusión cardiaca (Paz-García et al., 2023). Mas aún, estudios llevados a cabo en líneas celulares tumorales tratadas con paclitaxel, demuestran que el aumento de citoquinas proinflamatorias causadas por este antitumoral se puede revertir con el antagonista TLR4, TAK-242 (Kashani et al., 2019). Otro estudio también ha observado que, el bloqueo del receptor TLR4 también reduce los niveles de citoquinas proinflamatorias en células de la raíz dorsal de la médula de pacientes tratados con

antitumorales (Yan Li et al., 2021). Hay que señalar que, en esta Tesis Doctoral, no se han podido evaluar los cambios que el tratamiento con el antagonista TLR4-PA1 podría ocasionar en los niveles plasmáticos de diferentes citoquinas tras la administración de Cisplatino. Este hecho, nos impide confirmar si el aumento del estrés oxidativo debido al bloqueo del TLR4-PA1 también produce un aumento paralelo de citoquinas proinflamatorias. En cualquier caso, es posible que haya un efecto antiinflamatorio y esto no repercuta en los niveles de especies reactivas de oxígeno, ya que estas pueden ser producidos por diferentes mecanismos como la disfunción mitocondrial, aumento de ácidos grasos, aumento de la actividad de NOX, alteraciones en la actividad antioxidante del organismo (Akhigbe & Ajayi, 2021).

Como se ha comentado al inicio de este apartado, uno de los objetivos planteados en esta Tesis Doctoral era evaluar el efecto que el antagonista TLR4, TLR4-PA1, tenía sobre las alteraciones cardiovasculares observadas en el modelo de administración crónica de Cisplatino. Para ello, se han evaluado tantos parámetros generales de presión arterial y frecuencia cardíaca como parámetros más específicos como la función cardíaca basal y la reactividad vascular en vasos de conductancia y resistencia tras el tratamiento con este antagonista en los animales tratados a su vez con el antitumoral.

El tratamiento con el antagonista de receptores TLR4, TLR4-PA1, ocasionó un aumento en los niveles de PAD y FC de los animales tratados con Cisplatino 3 mg/Kg, por lo que corrigió la hipotensión y bradicardia observadas, no ocasionando ningún cambio en la PAS. Es más, este aumento en la PAD y FC causado por el antagonista TLR4 también se observó en los animales tratados con Cisplatino 2 mg/Kg que no habían tenido alteraciones en sus niveles de presión arterial y frecuencia cardíaca tras el tratamiento con el antitumoral. Esto pone de manifiesto que el fármaco TLR4-PA1 podría tener un efecto doble, por un lado, sería capaz de corregir la neuropatía autonómica cardiovascular y con ello la caída en los niveles de presión arterial y FC que provoca el tratamiento con dosis altas de Cisplatino, y por otro, podría tener un efecto directo sobre el sistema cardiovascular modificando su tono. Sobre la primera premisa, hay estudios que han demostrado que los antagonistas TLR4 son capaces de corregir la neuropatía periférica sensorial producida por antitumorales (Illias et al., 2022; Yan Li, Zhang, et al., 2015). En relación a la segunda premisa, no se han encontrado estudios que evalúen de manera directa el efecto que estos antagonistas TLR4 tienen sobre el sistema cardiovascular, sin embargo hay autores que describen el efecto hipertensivo de los antagonistas TLR4, TAK-242 y eritoran, en la hipotensión generada en situaciones de endotoxemia (Kuno et al., 2009; Stefan Ehrentraut et al., 2011). Por el contrario, también hay estudios que indican que los antagonistas TLR4 disminuyen la presión arterial en modelos de hipertensión, proponiendo que el efecto hipotensor de estos fármacos se debe a su efecto sobre el remodelado vascular (Paz-García et al., 2023). Es posible que este efecto directo de los antagonistas de TLR4 sobre el sistema cardiovascular dependa del tipo de mecanismos involucrados en la fisiopatología de la alteración cardiovascular. De hecho, estudios recientes muestran que el TAK-242 es capaz de atenuar la progresión de incremento en la presión arterial media de ratas SHR y que atenúa la disfunción autonómica en este modelo en estadios tempranos del desarrollo de la enfermedad (Mowry et al., 2021).

En cuanto a las modificaciones en la función cardíaca basal, el tratamiento con TLR4-PA1 corrigió la disfunción ventricular izquierda en los animales tratados con Cisplatino 3 mg/kg, aumentando incluso la función vasodilatadora ventricular izquierda en animales tratados con Cisplatino 2 mg/Kg. De nuevo, no se han encontrado estudios que evalúen el efecto de antagonistas TLR4 en las alteraciones cardíacas en modelos de administración de antitumorales. Sin embargo, nuestros resultados estarían de acuerdo con los descritos en otros estudios que demuestran que la administración del antagonista TLR4, eritoran, mejora la disfunción cardíaca en modelos de sepsis (Stefan Ehrentraut et al., 2011), así como el daño cardíaco producido por estrés (R.-P. Wang et al., 2011; N.-C. Wu & Wang, 2020). Hay que señalar que los cambios funcionales observados en esta Tesis Doctoral a nivel cardíaco tras el tratamiento con TLR4-PA1, en los animales tratados con Cisplatino, no fueron suficientes para producir un cambio en los índices de masa cardíacos analizados. Otros autores sí han descrito cambios en el remodelado cardíaco en modelos de hipertrofia tras el tratamiento con antagonistas TLR4 (H. Ehrentraut et al., 2011), pero no ha sido así en el caso del modelo llevado a cabo en esta Tesis Doctoral. En cualquier caso, no resulta extraño que el tratamiento durante 2 semanas con TLR4-PA1 sea capaz de afectar la función ventricular izquierda de forma rápida, y no lo sea de modificar los cambios estructurales cardíacos debidos la hipertrofia ventricular izquierda. De hecho, los fármacos que existen en clínica para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca también mejoran principalmente la función y no el remodelado cardíaco (Di Somma & Magrini, 2015). Por otra parte, la mejora de la función ventricular izquierda ocasionada por el antagonista TLR4-PA1 podría ser debida al efecto antiinflamatorio ocasionado por este fármaco. De hecho, se ha descrito que la administración de antagonistas del receptor TLR4 es capaz de disminuir los niveles citoquinas proinflamatorias en líneas celulares de cardiomiocitos, y a nivel cardíaco en modelos de isquemia-reperfusión cardíaca (Paz-García et al., 2023), en modelos de hipertrofia cardíaca por sobrepresión (S Ehrentraut et al., 2007; Stefan Ehrentraut et al., 2011), y en daño cardíaco por estrés (R.-P. Wang et al., 2011). De nuevo, la determinación de los niveles de citoquinas tras el tratamiento con TLR4-PA1 podría corroborar este mecanismo. Por último, es importante mencionar que el tratamiento con TLR4-PA1 provocó un aumento de la PPC en los animales tratados con ambas dosis de antitumoral. Este hecho vuelve a poner de manifiesto, como se ha mencionado antes, el posible efecto directo vasoconstrictor que este antagonista podría ejercer, en este caso, a nivel coronario.

En cuanto a la funcionalidad de los vasos sanguíneos, el tratamiento con el antagonista TLR4-PA1 provocó una disminución en la función contráctil y un aumento de la función vasodilatadora en la aorta de los animales tratados con Cisplatino; mientras que en el caso del territorio de resistencia, el tratamiento con este antagonista provocó un aumento en la función contráctil, mucho más clara en los animales tratados con la mayor dosis de Cisplatino, 3 mg/Kg, así como y un aumento en la función vasodilatadora más leve que el observado en la aorta. Estos resultados muestran que el antagonista TLR4-PA1 es capaz de revertir tanto la disfunción endotelial como la hiporreactividad vascular provocadas por la administración de Cisplatino en los diferentes territorios vasculares. De nuevo, el efecto de este antagonista podría estar mediado por varios mecanismos en función de la alteración fisiopatología de base. Se sabe que el estrés oxidativo y el estado inflamatorio generalizado, provocan alteraciones endoteliales que conducen a disfunción vascular, estando implicado en este daño el receptor TLR4 (Yu

Wang et al., 2016b). Así, la mejora ocasionada por el antagonista TLR4-PA1 podría deberse a su efecto antiinflamatorio en la aorta y no tanto al estrés oxidativo debido a que en este estudio los niveles plasmáticos de MDA son superiores en los animales tratados con el antagonista. De hecho, se sabe que el bloqueo del receptor TLR4 ha sido capaz de disminuir la producción de citoquinas inflamatorias, la expresión de moléculas de adhesión y el aumento de la actividad procoagulante en leucocitos y células en células endoteliales humanas tratadas con LPS (Nakamura et al., 2007). Otros estudios han mostrado también que anticuerpos monoclonales para TLR4, son capaces de mejorar la vasodilatación a nivel de arterial mesentérica en un modelo de arteriosclerosis de ratón (G. Chen et al., 2020). En el caso de los vasos de resistencia donde la alteración podría estar causada por la neuropatía autonómica, el antagonista TLR4 ejercería su efecto mejorando esta neuropatía, como ya ha sido mostrado en otras situaciones por distintos autores (Illias et al., 2022; Yan Li, Zhang, et al., 2015).

No hay que dejar de señalar que, en ambos territorios vasculares, el antagonista TLR4-PA1 ha sido capaz de potenciar tanto la relajación dependiente como independiente endotelio por encima incluso de la obtenida en situaciones control. Esto volvería a sugerir la existencia de un efecto directo de este fármaco a nivel vascular. De hecho, Liang y colaboradores han observado también este hecho, ya que en ratones *Knock-out* para el receptor TLR4 han observado un aumento de la respuesta de acetilcolina en aorta y en mesentérica respecto a ratones que si expresaban el receptor (C.-F. Liang et al., 2013). En cualquier caso, los datos disponibles en la literatura son escasos y más investigaciones serían necesarias para esclarecer este aspecto.

Por último y dado que, en el modelo experimental de complicaciones cardiovasculares por Cisplatino, se determinó si alteraciones en el eje TLR4/MyD88/NLRP3 estaban implicadas en las mismas, también se ha analizado en esta Tesis Doctoral si el tratamiento con el antagonista TLR4-PA1 modificaba la expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3 en los tejidos, cardiaco, vascular y renal tras el tratamiento con el antitumoral. Hay que recordar que no se incluye en esta Tesis Doctoral, el análisis de la expresión de estas proteínas, tras el tratamiento con TLR4-PA1, en la arteria mesentérica ya que no fue posible completarlos por problemas técnicos.

La administración del antagonista TLR4-PA1, en los animales tratados con Cisplatino, provocó cambios en la expresión de las proteínas TLR4 y MyD88 a nivel del ventrículo izquierdo y de la aorta que no seguían un patrón claro y definido, ni entre estos dos territorios cardiovasculares, ni dentro del mismo tejido a las distintas dosis de Cisplatino evaluadas. Así, el tratamiento con el antagonista TLR4-PA1, no parece modificar de manera importante la expresión de las proteínas TLR4 y MyD88 en la aorta de los animales tratados con Cisplatino, pero sin embargo, se puede sugerir, con los datos obtenidos, que el tratamiento con TLR4-PA1 aumenta la actividad del eje TLR4/MyD88 a nivel cardiaco ya que aumenta la expresión de TLR4 y/o MyD88 en ventrículo izquierdo. Hay que mencionar que los cambios en la expresión de estas proteínas tampoco se producían de manera paralela, lo que no resulta extraño porque como ya se ha comentado anteriormente, son muchos los receptores TLR involucrados en la vía de señalización en la que participa la proteína señalizadora MyD88 (Bayer & Alcaide, 2021; Yu & Feng, 2018b). Este aumento en la actividad de la vía TLR4/MyD88 observado tras el tratamiento con el antagonista TLR4-PA1 podría también deberse a

un mecanismo de compensación al bloquear el receptor TLR4 ya que en ningún caso se ha producido la disminución en la expresión de las proteínas analizadas. No se han encontrado estudios en la literatura que analicen si el tratamiento con antagonistas TLR4 ejerce este mecanismo compensador aumentando la expresión de la vía TLR/MyD88 en modelos de tratamiento con antitumorales. Sin embargo, se ha encontrado un estudio en el que se analizan los cambios de expresión de TLR4 y MyD88 en tejido cardíaco tras un tratamiento con TAK-242, en un modelo de embolia coronaria en ratón, en el que se describe la disminución de la expresión de estas proteínas tras el tratamiento con el antagonista TLR4 (Q. Su et al., 2018). Nuestros resultados no estarían de acuerdo con los descritos por estos autores, pero es posible que los distintos fármacos anti-TLR4 que se encuentran en desarrollo modulen de diferente manera este receptor y su expresión, lo que implica que todavía se necesita un conocimiento profundo de los efectos que supone bloquear/inhibir este sistema como una estrategia terapéutica eficaz para suprimir respuestas inflamatorias indeseadas asociadas a enfermedades (W. Gao et al., 2017b). Desde nuestro conocimiento, este es el primer estudio que muestra la modificación que el uso de un antagonista del receptor TLR4, TLR4-PA1, tiene sobre la expresión de receptores y proteínas implicadas en su regulación a nivel cardiovascular tras el tratamiento con antitumorales. Esta información podría ser de utilidad para caracterizar el efecto de este bloqueo en patologías cardiovasculares y sus posibles ventajas o desventajas.

En relación con la expresión de NLRP3 a nivel del tejido cardíaco y vascular, la administración del antagonista TLR4-PA1 en los animales tratados con Cisplatino fue capaz de revertir el aumento en la expresión de NLRP3 a nivel cardíaco observada en animales tratados con Cisplatino, sin modificar su expresión en aorta. Estos resultados estarían de acuerdo con el estudio descrito anteriormente llevado a cabo por Su y colaboradores, ya que estos autores muestran, en su modelo de embolia coronaria, la disminución en la expresión de los componentes del inflamasoma NLRP3 tras el tratamiento con el antagonista TLR4, TAK-242, que, a vez, también mejora la función cardíaca (Q. Su et al., 2018). Todos estos resultados también estaría en consonancia con el hecho de que una de las primeras etapas que promueve el cebado y la activación del NLRP3 a nivel celular es la activación de TLR4 (Boza et al., 2016; Pinar et al., 2020b; Takahashi, 2022), con lo que su bloqueo será lógico que produjese el efecto contrario. De nuevo, este sería el primer estudio que muestra que el bloqueo de la vía TLR4 es capaz de modular la expresión de la proteína NLRP3 a nivel cardíaco en un modelo de alteraciones cardiovasculares por el tratamiento con Cisplatino.

A nivel renal, la administración del antagonista TLR4-PA1, en los animales tratados con Cisplatino, disminuyó la expresión de los receptores TLR4 y de la proteína NLRP3, mientras que provocó un aumento en la expresión de la proteína señalizadora MyD88. Estos resultados sugieren que, a nivel renal, el bloqueo del receptor TLR4 revierte parcialmente la activación de la vía TLR4/MyD88 y disminuye también parcialmente la expresión de NLRP3 observada en los animales tratados con Cisplatino. De nuevo, son escasos los estudios en los que analicen el efecto que los antagonistas de TLR4 tienen sobre la expresión de proteínas de la vía TLR4/MyD88 o NLRP3 en tejido renal. No obstante, los resultados obtenidos están en consonancia con los descritos en un estudio reciente, en células tubulares renales humanas en las que causan un daño por inflamación, donde se demuestra que la administración de TAK-242, mejora su viabilidad y disminuye la tasa de apoptosis, la expresión de TLR4 y los

componentes relacionados con el inflamasoma NLRP3. Este estudio mencionado, sin embargo, no analiza la expresión de MyD88 en estas células tras el tratamiento con TAK-242 (Pei et al., 2022). El aumento que el tratamiento de TLR4-PA1 produce en la expresión renal de MyD88 podría, como ya se ha comentado, deberse a un mecanismo contrarregulador también en este tejido. Por otra parte, se ha demostrado que hay un aumento en la expresión del receptor TLR2 en el riñón tras la administración de Cisplatino, siendo posible que al bloquear la vía del receptor TLR4, pueda haber un aumento en la expresión de MyD88 debido a su intervención como señalizador en la activación de otras vías TLR (Q. Shen et al., 2019). De nuevo, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral serían los primeros en mostrar que el bloqueo del receptor TLR4 es capaz de modular los cambios en la expresión de proteínas de la vía TLR4/MyD88 y la expresión de NLRP3 en tejido renal ocasionados tras el tratamiento con Cisplatino. Con relación a si estos cambios en la expresión de estas vías inflamatorias pueden mejorar el daño renal ocasionado por Cisplatino, datos iniciales llevados a cabo en nuestro laboratorio muestran que el tratamiento con TLR4-PA1 es capaz de disminuir la hipertrofia renal ocasionada por el antitumoral (datos no mostrados), aunque todavía no se ha podido analizar si esto conlleva una disminución paralela en los niveles creatinina.

### **5.3. Alteraciones cardiovasculares inducidas por una dieta hipergrasa e hipercalórica, modelo de Síndrome Metabólico por dieta. Implicación del eje TLR4/MyD88/NLRP3.**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define el Síndrome Metabólico (SM) como un conjunto de factores de riesgo cardiovascular que incluyen la obesidad central, las dislipemias, las anormalidades en el metabolismo de la glucosa y la hipertensión arterial. El desarrollo de SM también está estrechamente asociado a la resistencia a la insulina, a la diabetes mellitus tipo 2 y a las enfermedades cardiovasculares (Belladelli et al., 2022; Hayden, 2023; Ren & Xu, 2015a).

Debido a su naturaleza multifactorial, seleccionar el modelo experimental adecuado que mejor represente la fisiopatología del SM en humanos puede ser todo un reto. Los roedores son los modelos animales más utilizados para investigar el SM y muchos de los modelos utilizados son con animales con modificaciones genéticas para favorecer el desarrollo de fenotipo similares al SM (Vatashchuk et al., 2022; Wong et al., 2016). Sin embargo, estos modelos no reflejan de forma fiel el desarrollo más frecuente SM en la población y que se debe a una compleja interacción de factores genéticos y ambientales entre los que se incluyen fundamentalmente los malos hábitos de alimentación. De hecho, se sabe que, dietas ricas en grasas saturadas, azúcar, jarabe de fructosa, granos refinados y con un consumo bajo de fibra, frutas y verduras, conjuntamente a un estilo de vida sedentario tienen un papel importante en la patogénesis del SM (Cordain et al., 2005; Janssen, 2023b). Por ello, algunos de los métodos utilizados para inducir el SM en roedores se basan en la intervención dietética. Así, existen modelos en los que el SM se desarrolla bien por una dieta hipergrasa (Bhaswant et al., 2015; Marques et al., 2015; Palachai et al., 2019), bien por una dieta hiperglucídica (Dupas et al., 2017; Kubyshkin et al., 2020; Matias et al., 2020) o bien por dietas en las que se combinan ambos factores, es decir, dietas hipergrasas e hiperglucídicas (Yanping Li et al., 2020; Moreno-Fernández et al., 2018; Panchal et al., 2011b, 2012; Poudyal et al., 2017; Sena et al., 2023; Senaphan et al., 2015; Yang Wang et al., 2019). El uso de una dieta combinada tiene la ventaja de reflejar con mayor fidelidad la complejidad detrás del consumo hipercalórico por los seres humanos, y permite analizar la sinergia en los efectos de ambas dietas. Sin embargo, la combinación de ambas dietas también hace más difícil discernir la contribución de los componentes individuales al desarrollo del SM (Mugica et al., 2022; Pinheiro-Castro et al., 2019).

En esta Tesis Doctoral se ha inducido un modelo de Síndrome Metabólico, sometiendo a los animales a una alimentación hipergrasa e hiperglucídica durante 20 semanas. Este régimen consistía en una dieta sólida hipergrasa, en la cual el 46% de la energía era procedente de las grasas, y un suplemento con dieta líquida hiperglucídica, que contenía un 25% de dextrosa. En términos globales el seguimiento de esta dieta suponía un incremento en la ingesta calórica de los animales de cerca de 35 Kcal/día respecto a una dieta normocalórica. Otros autores han desarrollado modelos experimentales de SM con intervenciones dietéticas similares a la nuestra, con algunas pequeñas diferencias en el tipo de grasa, el azúcar utilizado en el mismo y el tiempo de alimentación entre los distintos modelos experimentales desarrollados (Mugica et al.,

2022; Pinheiro-Castro et al., 2019; Vatashchuk et al., 2022; Wong et al., 2016; Bhaswant et al., 2015; Melo et al., 2019),.

La obesidad central es una de las principales características del SM y está relacionada con el desarrollo de posibles complicaciones cardiovasculares asociadas al mismo (Davis & Nolan, 2021; Korac et al., 2021; Persic, 2013; Tran et al., 2020). La obesidad abdominal se define como una acumulación excesiva de tejido adiposo a nivel subcutáneo abdominal y visceral. La evaluación del peso y de distintos parámetros antropométricos es útil en el diagnóstico de esta obesidad tanto en humanos como en animales de experimentación (Novelli et al., 2007). En esta Tesis Doctoral se ha analizado, en el modelo de SM por dieta, el peso de los animales junto a su IMC y perímetro abdominal al finalizar el periodo de alimentación de 20 semanas. Los resultados obtenidos muestran en los animales, tras la alimentación con dieta hipergrasa e hipercalórica, no solo un aumento significativo de su peso corporal, sino también del IMC y del perímetro abdominal, lo que indica que los animales del modelo desarrollado de SM en esta Tesis Doctoral presentan obesidad abdominal. Nuestros resultados están de acuerdo con los descritos por otros autores que también han observado tras periodos similares de alimentación con dietas hipercalóricas este aumento de peso y de IMC (Hao et al., 2015; Marques et al., 2015; Palachai et al., 2019; Poudyal et al., 2017; Wong, Chin, Suhaimi, Ahmad, Jamil, et al., 2018). Hay que señalar que el perímetro abdominal es un fiel reflejo de la grasa visceral (Moreno-Fernández et al., 2018), y a su vez, el aumento del tejido adiposo visceral es un factor de riesgo conocido para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Bryce-Moncloa et al., 2017; Lahera, 2018). El incremento en este parámetro observado en los animales del modelo de SM desarrollado en esta Tesis Doctoral indicaría la existencia de un aumento de grasa visceral en los mismos y, por tanto, la existencia en los animales de un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

Por otra parte, los animales del modelo de SM mostraron menores ingestas de dieta sólida y mayores ingestas de dieta líquida que los animales del grupo Control. Este comportamiento alimentario resulta en un incremento neto de su ingesta calórica, de aproximadamente 35 Kcal/día, que correlaciona con el desarrollo de la obesidad central mencionada anteriormente. De hecho, se ha descrito que el éxito de la intervención con una dieta hiperglucídica depende del modo de administración del azúcar. Así, éste debe ofrecerse separado del alimento estándar, bien en el agua de bebida bien como suplemento. Si se mezcla con la dieta sólida, el animal puede reducir su ingesta de alimento sólido y no ingerir el exceso de azúcar necesario para el incremento de peso (Marques et al., 2015; Mugica et al., 2022; Panchal et al., 2011a; Pinheiro-Castro et al., 2019; Poudyal et al., 2017). Más aún, estudios experimentales han mostrado que las dietas altas en grasa, debido a su mayor densidad calórica, tienen un efecto saciante alto y los animales comen menos alimento en compensación (Castro-Barquero et al., 2020; Marques et al., 2015; Poudyal et al., 2017)(Mugica et al., 2022; Pinheiro-Castro et al., 2019). Los modelos animales de SM que utilizan suplementos líquidos de azúcares también observan un aumento de consumo de la dieta líquida en los animales ya que al ofrecer el azúcar diluido en el agua consumen más cantidad porque no se sienten saciados (Dupas et al., 2017; Matias et al., 2020; Mugica et al., 2022; Pinheiro-Castro et al., 2019).

Como se ha mencionado anteriormente, además de la obesidad abdominal, otras de las características del SM son las alteraciones en la homeostasis de la glucosa y la existencia de hiperlipemias (Castoldi et al., 2015; Prattichizzo et al., 2018a). Estos factores están también directamente relacionados con la aparición de complicaciones cardiovasculares en los pacientes (Bekkering et al., 2020; Lahera, 2018). Los animales del modelo experimental de SM desarrollado en esta Tesis Doctoral presentaron alteraciones tanto en el perfil glucídico como lipídico. A las 20 semanas de alimentación con dieta hipergrasa a hiperglucídica, los animales presentaron un aumento significativo de los niveles de glucemia e insulinemia. Más aun, presentaron un ligero aumento del HOMA-IR y una disminución significativa del HOMA- $\beta$ . Todos estos datos del metabolismo glucídico indicarían la presencia de diabetes tipo 2 en los animales de nuestro modelo. Otros autores también han observado estas alteraciones en la homeostasis de la glucosa utilizando modelos con una dieta y periodo de alimentación similar al nuestro, lo que indica que nuestro modelo está de acuerdo con estos estudios (Dupas et al., 2017; Melo et al., 2019; Moreno-Fernández et al., 2018; Muller et al., 2021; Vatashchuk et al., 2022; Wong et al., 2016; Hao et al., 2015; Marques et al., 2015). Por otra parte, en los animales del modelo de SM por dieta desarrollado en esta Tesis Doctoral se observó un aumento en los niveles plasmáticos de triglicéridos, colesterol y LDL. Esta existencia de dislipemia tras una alimentación con dietas hipercalóricas e hipergrasas ha sido también descrita por otros autores (Marques et al., 2015; Melo et al., 2019; Sena et al., 2023). Hay que señalar, que sorprendentemente, también se ha observado un aumento significativo en los niveles plasmáticos de HDL en los animales tras 20 semanas de dieta hipergrasa e hipercalórica. Nuestros resultados difieren de los descritos por otros autores en los que se ha descrito una disminución en los niveles plasmáticos de HDL en modelos animales de SM con dieta de cafetería (Hao et al., 2015). Por ello, podemos concluir que, en los modelos experimentales de SM por dieta, producir alteraciones en todos los parámetros es complejo, ya que depende de la edad de comienzo del experimento, la cantidad de grasa en la dieta y tipo de ácido graso. Siendo común observar diferencias entre los diferentes modelos de SM por dieta con protocolos distintos (Abe, 2022; Pinheiro-Castro et al., 2019; Vatashchuk et al., 2022; Wong et al., 2016).

Estudios recientes han puesto de manifiesto la relación entre el estrés oxidativo, la inflamación crónica y las alteraciones cardiovasculares en el SM, observándose también una relación directa entre el aumento de especies reactivas de oxígeno y el desarrollo de SM (Carrier, 2017; Christ et al., 2019; Korac et al., 2021; Raut & Khullar, 2022). El estrés oxidativo puede ser evaluado a través de la determinación de la peroxidación lipídica, mediante la valoración plasmática de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico como el Malondialdehído (MDA) (Hao et al., 2015; Sena et al., 2017). Los resultados de esta Tesis Doctoral muestran que los animales en los que se ha desarrollado en SM por dieta tienen valores plasmáticos de MDA significativamente mayores a los de los animales del grupo Control, confirmando la presencia de peroxidación lipídica y estrés oxidativo. Estos resultados están de acuerdo con lo observado en otros estudios experimentales en los que el uso de dietas de cafetería, dietas hipergrasas o dietas hipergrasa e hipercalóricas en periodos de tiempo similares a los de nuestro estudio (Hao et al., 2015; Sena et al., 2023; Silves et al., 2019). Este aumento de MDA también se ha observado en pacientes con SM, donde esta situación prooxidante favorece la aparición y desarrollo de alteraciones cardiovasculares

(Akhigbe & Ajayi, 2021; Najafi et al., 2021; S. S. Wu et al., 2019). Más aún, estudios experimentales demuestran que la suplementación con dietas ricas en grasas reduce la capacidad antioxidante en los animales y favorece la acumulación de MDA (Nikolopoulou & Kadoglou, 2012; Otani, 2011). El MDA influye en el complejo de la cadena respiratoria mitocondrial y en la actividad de las enzimas clave mitocondriales lo que conlleva a daños tisulares. La progresión de la resistencia a la insulina, la disfunción de las células  $\beta$ , la disfunción mitocondrial y las complicaciones del SM son algunos de los trastornos que se han relacionado con el estrés oxidativo (Newsholme et al., 2019).

El SM y la enfermedad renal crónica se influyen mutuamente. Diferentes estudios han confirmado que el SM puede provocar cambios en la estructura y la función renal que incluyen entre otros, hiperfiltración glomerular, proteinuria y/o microalbuminuria, disfunción tubular renal, anomalías ecográficas (aumento de los índices resistivos intrarrenales) y anomalías histopatológicas (S. Chen et al., 2021). Además, se sabe que el riesgo de enfermedad renal en los pacientes con SM es 1,34 veces superior al de los pacientes sin SM (Joyce et al., 2018). Más aun, el SM aumenta el riesgo de nefropatías en un 50% (Hashimoto et al., 2020). Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral están en consonancia con lo mencionado anteriormente y confirman la existencia de daño renal en los animales que seguían una dieta hipergrasa e hipercalórica, ya que sus niveles plasmáticos de creatinina fueron significativamente superiores a los de los animales Control. Por último, hay que señalar que la patogénesis del daño renal relacionado con la SM es compleja, incluyendo resistencia a la insulina, obesidad, hipertensión, dislipidemia, inflamación, estrés oxidativo y disfunción endotelial (Hashimoto et al., 2020; Joyce et al., 2018; Kaesler et al., 2020; Lakkis & Weir, 2018).

La inflamación crónica de bajo grado está implicada en el desarrollo de complicaciones metabólicas (F. Wang et al., 2017; Williams et al., 2019b). La inflamación del tejido adiposo aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno, lo que a su vez altera la producción de adipoquinas, y puede desencadenar la patología asociada al SM (Prattichizzo et al., 2018a; Stoian et al., 2022). La adiposidad visceral es la condición de partida a través de la cual se produce la liberación de citoquinas proinflamatorias (Roger & Calder, 2018). Varios estudios, tanto en animales de experimentación como en humanos, han demostrado que, en las primeras fases de la expansión del tejido adiposo, ligada a la hipertrofia de los adipocitos, se desarrollan zonas de hipoxia, que conllevan a la secreción por parte de estos adipocitos hipóxicos de adipoquinas proinflamatorias (Bekkering et al., 2020; Prattichizzo et al., 2018a). Al mismo tiempo, la falta de oxígeno provoca la muerte de los adipocitos más periféricos, lo que desencadena un aumento de la reacción inflamatoria a través de DAMPs (Akhigbe & Ajayi, 2021; Gargiulo et al., 2020). Por todo ello, en el SM existe un estado inflamatorio sistémico de bajo grado (Sigrist-Flores et al., 2019). En esta Tesis Doctoral se han estudiado los niveles plasmáticos de 23 citoquinas proinflamatorias en los animales del modelo de SM por dieta. Hay que señalar que, aunque solamente se produjo un aumento significativo en los niveles plasmáticos de TNF- $\alpha$ , IL-12p70, IL-18 e IFN- $\gamma$ , en la mayoría de las citoquinas analizadas los niveles fueron superiores a los de los animales que no tenían SM. Estos resultados están en consonancia con lo señalado anteriormente y confirman también la existencia de un estado inflamación generalizado en el modelo desarrollado. Con relación a las citoquinas que más claramente se han

visto aumentadas en nuestro modelo de SM, hay que mencionar que la mayoría de los estudios que analizan estas citoquinas en modelos experimentales de SM, lo hacen a nivel tisular no a nivel plasmático, mostrándose resultados en el mismo sentido, es decir con un aumento de citoquinas proinflamatorias a nivel tisular. Así el aumento en los niveles de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , IL-18 han sido descritos en modelos animales de SM a nivel del tejido adiposo blando visceral, a nivel cardiovascular y a nivel renal, entre otros (Bekkering et al., 2020; Jaishy & Abel, 2016; Prattichizzo et al., 2018b; Rogero & Calder, 2018; Stoian et al., 2022). En relación a los niveles plasmáticos de IFN- $\gamma$  no se han encontrado otros estudios en modelos de dieta hipergrasa e hipercalórica que evalúen los niveles de IFN- $\gamma$ , pero este aumento si se ha observado en modelos de obesidad y diabetes tipo 2 (Hazman & Ovalı, 2015; Martin-Cordero et al., 2009), relacionándose esta citoquina con las alteraciones endocrino metabólicas en situaciones de obesidad (Carbone et al., 2012). El aumento de IL-12p70 a nivel plasmático se ha observado en un modelo de obesidad por dieta hipergrasa (Ibrahim et al., 2010). Por último, hay que señalar que en los animales con SM se observó un leve descenso en los niveles plasmáticos de IL-10. Este hecho resulta interesante dado que esta citoquina tiene una función anti-inflamatoria y su descenso también se ha descrito en estudios con modelos experimentales similares (Gil-Cardoso et al., 2022). Más aún, esta disminución se ha observado en niños y adultos obesos (Bekkering et al., 2020; Stoian et al., 2022). Todo lo señalado anteriormente confirma que en este modelo de SM inducido por una dieta hipergrasa e hipercalórica, se produce una inflamación crónica de bajo grado. El aumento de IL-12p70, IL-18 e IFN- $\gamma$  parecen indicar que está produciendo un aumento de la actividad del sistema inmune innato (Zundler & Neurath, 2015). Esto podría explicar porque se observa un ligero aumento en las citoquinas pro-inflamatorias que no llega a ser significativo, puesto que se ha descrito que cuando la reacción inflamatoria aguda finaliza, la expresión de estas citoquinas disminuye (Thomas & Grisanti, 2020).

Por otra parte, en esta Tesis Doctoral se han analizado la aparición de posibles alteraciones cardiovasculares en el modelo de SM por dieta desarrollado. Para ello se han evaluado tantos parámetros generales de presión arterial y frecuencia cardiaca como parámetros más específicos como la función cardiaca basal y la reactividad vascular en vasos de conductancia y resistencia.

Es sabido que el desarrollo de hipertensión arterial es frecuente en pacientes con SM y que su desarrollo se ha relacionado con las alteraciones metabólicas presentes en este síndrome como son la resistencia a la insulina, la obesidad central, el aumento de la actividad del sistema nervioso simpático, el estrés oxidativo o el aumento de mediadores inflamatorios, entre otros (da Silva et al., 2020; Gonzalez-Chávez et al., 2018; Stanciu et al., 2023). En el modelo de SM por dieta desarrollado en esta Tesis Doctoral no se ha observado el desarrollo de hipertensión arterial tras alimentar a los animales con una dieta hipergrasa e hipercalórica durante 20 semanas, sino que lo que se ha observado en los animales es una hipotensión sin afectación de la FC. Estos datos difieren de los descritos por otros investigadores que en este tipo de modelos experimentales sí han observado el desarrollo de hipertensión arterial, a pesar de hacer tratamientos dietéticos durante periodos menores de tiempo, 16 semanas (Hao et al., 2015; Palachai et al., 2019; Senaphan et al., 2015; Wong, Chin, Suhaimi, Ahmad, & Ima-Nirwana, 2018). Es posible que las diferencias en la composición en el tipo de grasa y/o azúcares puedan ocasionar estas diferencias. De hecho, los estudios mencionados anteriormente desarrollan el SM mediante dieta de cafetería, es decir, alimentando a los

animales con distintas combinaciones de alimentos humanos convencionales ricos en grasas y azúcares lo que además incrementa en casi un 30% la ingesta calórica respecto a otros modelos de SM por dieta (Pinheiro et al., 2020), consiguiendo un desarrollo más rápido del SM y sus posibles complicaciones. Hay que mencionar, sin embargo, que como se comentó en la Introducción de esta Tesis Doctoral, en las etapas tempranas del SM también se ha descrito la presencia de una neuropatía autonómica cardiovascular (Bakkar et al., 2020; Williams et al., 2019c). Esta neuropatía conlleva daño en las fibras que inervan el corazón y los vasos sanguíneos, teniendo como consecuencia un mal control, del ritmo cardíaco y la presión arterial (Spallone, 2019). Nuestros resultados muestran una hipotensión en los animales que es compatible con la existencia de esta neuropatía autonómica, aunque no se hayan detectado cambios en el ritmo cardíaco. Además, se sabe que la neuropatía autonómica es previa al desarrollo de otras complicaciones cardiovasculares (Zilliox & Russell, 2020), con lo que es posible que en nuestro modelo experimental nos encontremos en estadios iniciales de las posibles alteraciones cardiovasculares más graves.

Se sabe que la combinación de las distintas alteraciones metabólicas presentes en el SM es un conjunto de factores de riesgo independientes en el desarrollo de daño cardíaco, siendo común que los individuos que desarrollan SM presenten una mayor morbilidad y mortalidad cardiovascular (Ren & Xu, 2015b). En esta Tesis Doctoral, cuando se ha analizado la función cardíaca basal en animales con SM no se han observado modificaciones ni en la presión de perfusión coronaria ni en la función ventricular izquierda. Estos resultados están en consonancia con lo descrito por otros autores en los que dietas similares y durante los mismos periodos de tiempo no ocasionaron cambios en la función cardíaca de los animales (Matias et al., 2020). Incluso, otros autores han descrito que las alteraciones cardíacas en los animales alimentados con una dieta de cafetería aparecen tras 48 semanas de alimentación (Wilson et al., 2007). De nuevo, es posible que las modificaciones dietéticas llevadas a cabo en esta Tesis Doctoral no sean suficientes para desarrollar todas las complicaciones asociadas al SM, y de hecho hay autores que han observado que una mayor incidencia y/o severidad en el fallo cardíaco en los modelos experimentales se observa con dieta con muy alto contenido en azúcares (Chess & Stanley, 2008; Matias et al., 2020; Vasanthi et al., 2006). Por otra parte, hay que mencionar que, hay autores que, en ausencia de valoración de alteraciones funcionales, sí han observado un remodelamiento cardíaco a nivel ventricular izquierdo en animales tras 20 semanas de alimentación con una dieta hipergrasa e hipercalórica. En esta Tesis Doctoral, no hemos analizado de forma directa este remodelado cardíaco, pero en los animales con SM se ha observado una disminución tanto del IMc como del IMVI, con lo que es posible que nuestro modelo de SM no tengamos aún ni un daño funcional ni un daño estructural a nivel cardíaco.

Para terminar de caracterizar las posibles alteraciones cardiovasculares en nuestro modelo de SM, se evaluó la reactividad vascular en vasos de conductancia y de resistencia, concretamente en aorta y arteria mesentérica. En el caso de la aorta, se observó una hiporreactividad contráctil, sin modificaciones en la respuesta vasodilatadora. En el caso de la arteria mesentérica, no se produjeron cambios en la función contráctil y sí se observó una disminución en la capacidad vasodilatadora dependiente de endotelio. Por tanto, nuestros resultados muestran que la situación de SM afecta, al menos en sus etapas iniciales, de manera diferente a los vasos de

conductancia y resistencia. El descenso en la función contráctil de la aorta puede estar relacionado con la neuropatía autonómica cardiovascular mencionada anteriormente (Bakkar et al., 2020; Serhiyenko & Serhiyenko, 2018) y correlaciona con el descenso de la presión arterial que se observó en estos animales. Numerosos investigadores han señalado que situaciones de hiperinsulinemia, hiperglucemia favorecen el desarrollo de una neuropatía autonómica cardiovascular (Bakkar et al., 2020; Bodman & Varacallo, 2023; Serhiyenko & Serhiyenko, 2018; Williams et al., 2019c), que afecta a los vasos en primer lugar debido a que las fibras del sistema nervioso periférico son más susceptibles a la falta de oxígeno y nutrientes (Williams et al., 2019c). Es posible pensar entonces, que en este modelo se ha desarrollado una neuropatía autonómica cardiovascular que afecta al control del tono vascular. Otros autores también han observado esta hiporreactividad vascular tras el desarrollo de obesidad en ratas tras solo siete semanas de alimentación con una dieta hipergrasa, y fue asociada a una alteración en la función del receptor  $\alpha$ -1 (Juarez et al., 2017). Este descenso de la contractilidad vascular también ha sido asociado con el exceso de tejido adiposo perivascular el cual en una situación de SM produce citoquinas como TNF- $\alpha$  e IL-6 que reducen la contractilidad del músculo liso vascular al promover la inflamación de bajo grado y el estrés oxidativo (Loader et al., 2019). En el caso de los vasos de resistencia, la principal alteración observada fue una disminución de la vasodilatación endotelial dependiente que se correlaciona con una disfunción endotelial. Esta disfunción endotelial también ha sido observada por otros investigadores utilizando dietas hipergrasas durante 10 semanas de alimentación, periodo más cortos que el desarrollado en nuestro modelo (Crawford et al., 2019). Entre los mecanismos para esta disfunción endotelial se han propuesto alteraciones en la homeostasis vascular del óxido nítrico debida al estrés oxidativo, y citoquinas proinflamatorias como por ejemplo TNF- $\alpha$  e IL-18 que están presentes en situaciones de SM (Incalza et al., 2018). En nuestro modelo hemos demostrado un aumento plasmático significativo de las citoquinas proinflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-18 que podría explicar, al menos, en parte la disfunción endotelial observada en arterias de resistencia.

Es también importante señalar que los resultados obtenidos en este trabajo indican que en situaciones endocrino-metabólicas los daños vasculares son previos a los daños cardíacos, como se ha descrito en humanos. Así, en un metaanálisis Loader y colaboradores evaluaron el cambio en la reactividad vascular en todo el espectro de la salud cardiometabólica analizando datos de 193 estudios que incluían más de 20.000 pacientes, demostrando que la reactividad vascular puede verse alterada precozmente, incluso antes de manifestaciones clínicas de otras enfermedades cardiovasculares (Loader et al., 2019). Sin embargo, se conoce aún poco sobre la progresión del daño vascular en el SM y se necesitan más investigaciones para evaluar si las alteraciones transitorias de la reactividad vascular, mediadas por varios factores dietéticos y de estilo de vida, se convierten en alteraciones vasculares crónicas que desencadenan complicaciones más graves.

Como ya se ha indicado, en esta Tesis Doctoral, se planteó también como objetivo conocer si las alteraciones en el eje TLR4/MyD88/NLRP3 estaban implicadas en las complicaciones cardiovasculares desarrolladas en un modelo de SM inducido por una dieta hipergrasa e hipercalórica. Para ello, se analizaron, de nuevo, como primera aproximación, los niveles de expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3 en los tejidos, cardíaco, vascular y renal tras el tratamiento con el antitumoral.

La activación del receptor TLR4 se ha relacionado con el desarrollo de alteraciones cardiovasculares y renales en estas situaciones de SM (Ali et al., 2021; Liu et al., 2021; Vallés et al., 2023; Yu Wang et al., 2016a; Yu & Feng, 2018a). De hecho, este receptor ha atraído la atención como posible diana farmacológica en situaciones de SM, ya que su modulación podría corregir las alteraciones cardiometabólicas en situaciones de SM (Fresno et al., 2011; D. M. Rocha et al., 2016).

En esta Tesis Doctoral, se analizó la expresión de TLR4 y MyD88 en tejido cardiaco, vascular y renal tras el desarrollo de SM por una dieta hipergrasa e hipercalórica. Los resultados obtenidos muestran que la expresión del receptor TLR4 no aumentó a nivel cardiaco, ni renal, pero se produjo una disminución clara en sus niveles de expresión tanto a nivel de la aorta como de las arterias mesentéricas. En el caso del mediador intracelular MyD88, los resultados obtenidos muestran un aumento en su expresión a nivel renal y aórtico, sin ocasionarse modificaciones a nivel cardiaco y mesentérico. En relación a los resultados a nivel cardiaco, se podría concluir que este receptor y su vía de señalización intracelular no están activadas en las etapas tempranas de desarrollo de SM. Estos resultados serían compatibles con la ausencia de alteraciones funcionales a este nivel que se han observado en esta Tesis Doctoral. Nuestros resultados difieren de los descritos por otros autores que han descrito, en un modelo de diabetes, un aumento de la expresión de TLR4 y de MyD88 a nivel cardiaco (Xiuyue Huo et al., 2019). Es más, otros autores también han observado este aumento a nivel de cardiomiocitos aislados de ratas con SM por dieta de cafetería (H.-J. Yang et al., 2020). Otros autores, sin embargo, han descrito que situaciones de hiperinsulinemia provocan la disminución en la expresión de TLR4 a nivel cardiaco, como un mecanismo contrarregulador para proteger al miocardio frente a los efectos deletéreos de esa situación (De Laat et al., 2014). Por tanto, es posible que el tipo de intervención dietética y el grado de severidad en las alteraciones metabólicas desarrolladas permitan explicar estas diferencias. Mas estudios son necesarios para identificar el papel que juega la activación de la vía de TLR4 en las alteraciones cardíacas por SM por dieta.

A nivel vascular, en la aorta, la disminución en la expresión de TLR4 podría ser debida a que este receptor se internaliza una vez que ha sido activado, puesto que su dimerización inactiva la señalización extracelular (Westphal et al., 2017). Más aún, la expresión de MyD88 está significativamente aumentada en este tejido, lo que implica que esta vía de señalización intracelular esta activada. Este hecho indicaría que esta vía podría estar estimulada en nuestro modelo de SM y estar implicada en las alteraciones vasculares observadas. Otros autores han mostrado, sin embargo, un aumento en la expresión de TLR4 y MyD88 en aorta en ratas hembra alimentadas con una dieta similar a la de esta Tesis Doctoral, relacionando dicha disfunción con estas modificaciones (Kramer et al., 2018). También en otros modelos de enfermedades cardiovasculares, como un modelo de hipertensión en ratón, se observó que la inflamación derivada del aumento de expresión de TLR4 y MyD88 estaba relacionada con las alteraciones en la contracción y relajación dependiente de endotelio de la aorta (Raquel Hernanz et al., 2012). En nuestro modelo, no se ha observado como daño funcional esta alteración en la vasodilatación endotelio dependiente en la aorta de los animales, sino una disfunción contráctil. Esto sugiere además que el receptor TLR4 tiene un papel distinto en el desarrollo de las diferentes patologías cardiovasculares y podría justificar que nuestros resultados difieran de los mostrados en este estudio. En cuanto al aumento del MyD88, como ya se ha mencionado anteriormente para la neuropatía

causada por antitumorales, la activación de MyD88 se ha involucrado también en la neuropatía autonómica en situaciones de SM o diabetes mellitus tipo 2 (Zhao et al., 2021). Por último, el hecho de que se haya observado un aumento de la expresión de MyD88 existiendo una disminución de TLR4 no es extraño, ya que se sabe que esta proteína adaptadora regula la señalización de las cascadas inflamatorias de varios receptores TLR y de citoquinas (Bayer & Alcaide, 2021). Como se ha comentado anteriormente, en nuestro modelo de SM por dieta se produce un aumento de citoquinas proinflamatorias que a nivel de la aorta podría estar produciendo este aumento por rutas distintas a TLR4 que activen MyD88. Sin embargo, en el territorio vascular de resistencia, aunque la expresión de TLR4 también estaba ligeramente disminuida, la expresión proteica de MyD88 no se modificó. Estos datos sugieren que las alteraciones de esta vía de señalización no están involucradas en la disfunción endotelial observada en estas arterias en el modelo de SM por dieta desarrollado. Nuestros datos difieren con los descritos por otros autores en los que se relacionó la presencia y/o activación del receptor TLR4 y MyD88 con la existencia de disfunción endotelial en arterias cerebrales en modelos de SM por dietas hipergrasas durante periodos de, al menos 16 semanas de alimentación (Jackson et al., 2015). De nuevo es posible que la alimentación que hayan recibido estos animales pueda haber influido en la gravedad y cronología del desarrollo de las complicaciones vasculares en los modelos de SM puesto que ácidos grasos saturados presentes en la dieta como el láurico, pueden activar el receptor (D. M. Rocha et al., 2016; Rogero & Calder, 2018).

Por último, al analizar la expresión de TLR4 y MyD88 en el tejido renal de los animales del modelo de SM, se observó que no se produjeron cambios en la expresión del receptor TLR4, sin embargo, aumentó significativamente la expresión de MyD88. De nuevo, nuestros resultados difieren parcialmente de los descritos por otros autores en los que en estudios con modelos de obesidad y SM sí que se ha observado un aumento de la expresión de TLR4 y MyD88 a nivel renal (B. Zhang et al., 2008; M. Zhang et al., 2015) y se ha relacionado con el daño observado. En nuestros resultados sí existe un aumento claro en la expresión de MyD88, lo que indica que esta vía está activada a nivel renal en los animales de nuestro modelo experimental. Como se ha comentado antes, el MyD88 es una ruta a la que se le están atribuyendo numerosas funciones ya que coordina las cascadas inflamatorias de varios receptores TLR y de citoquinas (Bayer & Alcaide, 2021), con lo que se podría sugerir que existe una activación de la vía de los TLR pero que el TLR4 de forma concreta no está afectando al daño renal observado en los animales de nuestro modelo experimental. Mas estudios serían necesarios para identificar qué receptor TLR está implicado en el daño renal.

El papel de la activación del NLRP3 en alteraciones cardiovasculares y renales asociadas a las alteraciones metabólicas del SM se ha descrito recientemente (Pinar et al., 2020a; A. Sharma et al., 2018). Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral muestran que la expresión de NLRP3 no se ha modificado en el tejido cardiaco, vascular de resistencia y renal en los animales con SM por dieta. Sin embargo, en la aorta de estos animales se observó un aumento significativo de su expresión. No se han encontrado estudios en los que se analice la expresión de NLRP3 en modelos de SM por dieta similares al desarrollado en esta Tesis Doctoral, sin embargo, otros estudios llevados a cabo con modelos animales de diabetes mellitus tipo 2 han observado un

aumento en la expresión de NLRP3 tanto en cardiomiocitos (L. Chen et al., 2022) como a nivel renal (Ding et al., 2018; C.-H. Ma et al., 2015; W. Wang et al., 2015). Nuestros resultados difieren de los de estos estudios y de nuevo, la complejidad de los mecanismos y la cronología en la que se ponen en marcha las complicaciones cardiovasculares en los diferentes modelos animales podría explicar esta diferencia (cita). De hecho, nuestros resultados indicarían que la vía de NLRP3 no estaría involucrada en las alteraciones funcionales en arterias mesentéricas y función renal observadas en estos animales. En relación al aumento de expresión de NLRP3 en aorta de los animales con SM por dieta, los resultados están de acuerdo con lo observado por otros autores, que en un modelo de dieta hipergrasa en ratones observaron que el NLRP3 había aumentado su expresión en las zonas de la aorta donde se habían desarrollado placas ateroscleróticas (L.-H. Wang et al., 2023). De hecho, se ha señalado que la activación del inflamasoma del NLRP3 puede ser una etapa inicial en el proceso inflamatorio que ocurre en los vasos sanguíneos (Pavillard et al., 2018). Por otra parte, este aumento en la expresión de NLRP3 podría estar involucrado en la disfunción contráctil observada en este vaso. De hecho, un aumento en la expresión de NLRP3 se ha relacionado con el desarrollo de la neuropatía diabética (Dwivedi et al., 2022). Este aumento en la expresión de NLRP3 se correlacionaría con el aumento en los niveles de IL-18 observados en los animales con SM de nuestro modelo experimental.

#### **5.4. Efecto de la administración de TLR4-PA1 en las alteraciones cardiovasculares inducidas en el modelo de Síndrome Metabólico por dieta. Implicación del eje TLR4/MyD88/NLRP3**

En esta Tesis Doctoral, se ha planteado también como objetivo, analizar el efecto que el antagonista de receptores TLR4, TLR4-PA1, tiene sobre las alteraciones cardiovasculares observadas en el modelo de SM por dieta. Además, y dada la relevancia que los cambios metabólicos tienen en el desarrollo de las alteraciones cardiovasculares asociadas a SM, se ha evaluado también como afecta la administración de este antagonista TLR4 en parámetros generales como el peso, ingesta, biomarcadores del metabolismo de la glucosa, biomarcadores del metabolismo de los lípidos, estrés oxidativo y función renal. Por último, se ha analizado si este tratamiento con el fármaco TLR4-PA1 era capaz de modificar los cambios en la expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3 ocasionada por el desarrollo de SM por dieta en tejidos cardiovasculares y renal. Como ya hemos comentado, hay estudios que muestran que antagonistas del receptor TLR4 mejoran los signos y síntomas asociados a distintas enfermedades cardiovasculares, muchas de ellas relacionadas con el SM (hipertensión, aterosclerosis, isquemia cardiaca) (Haj-Mirzaian et al., 2021; R. Hernanz et al., 2015; Paz-García et al., 2023). Sin embargo, no hay estudios, hasta el momento, que evalúen el efecto del fármaco ensayado en esta Tesis Doctoral, el antagonista TLR4-PA1, para corregir las alteraciones en el sistema cardiovascular ocasionadas por antitumorales, con lo que esta Tesis Doctoral es el primer estudio que analiza esta posibilidad. Debido al número tan reducido de sustancias químicas en fase clínica de desarrollo como terapéuticas basadas en TLR4 (W. Gao et al., 2017b), los investigadores señalan la necesidad de avanzar en la caracterización preclínica de nuevos compuestos. Paralelamente, sigue siendo importante ampliar la variedad química de moduladores de TLR4 descubriendo nuevas moléculas activas (Zaffaroni & Peri, 2018). Esta Tesis Doctoral, por tanto, contribuiría a poder identificar un nuevo fármaco antagonista TLR4 como posible herramienta terapéutica para el tratamiento conjunto de todas las alteraciones cardiometabólicas presentes en el SM.

Como se ha mencionado en otros apartados de esta Tesis Doctoral, el SM es una pluripatología que constituye un factor de riesgo cardiovascular, siendo ejes centrales de la misma la obesidad central, las alteraciones en la homeostasis de la glucosa, las dislipemias y la hipertensión arterial (Belladelli et al., 2022; Hayden, 2023; Ren & Xu, 2015a). Por ello, resulta de interés analizar el efecto del antagonista TLR4-PA1 sobre todos estos factores, con el fin de conocer su influencia sobre los mismos.

Los animales del modelo experimental de SM por dieta, llevado a cabo en esta Tesis Doctoral, desarrollaron cambios en los patrones alimentarios que condujeron a una ingesta calórica excesiva y, con ello, al desarrollo de obesidad abdominal. El tratamiento con el antagonista TLR4 provocó una normalización en los patrones alimentarios, reduciendo la ingesta calórica en aproximadamente 37 Kcal/día, y con ello provocó una normalización del peso, produciendo una disminución de alrededor del 3% la ganancia del mismo en los animales. Más aun, esta reducción de peso se tradujo también en una normalización de los parámetros antropométricos, a valores similares a

los animales que no tenían SM. Nuestros resultados difieren de los obtenidos por otros autores en diferentes modelos de obesidad, en los que el tratamiento de los animales con el antagonista TAK-242, no produce cambios ni en el peso corporal de los animales, ni en los índices de adiposidad, ni en la ingesta calórica (Hong et al., 2020; Moser et al., 2018; N. Zhang et al., 2015; Zhou et al., 2019). Hay que señalar que estos estudios mencionados se llevan a cabo con dosis más bajas (1.5 mg/Kg - 5 mg/Kg) y por menores periodos de tiempo (desde administración aguda a periodo de 1 semana) que la pauta de administración utilizada en esta Tesis doctoral (10 mg/Kg durante 2 semanas). En cualquier caso, hay autores que señalan que la inhibición del receptor TLR4 con modelos transgénicos, ocasiona modificaciones muy variables en el peso corporal y la adiposidad en respuesta a una dieta hipercalórica e hipergrasa, encontrándose tanto estudios en los que la ausencia de este receptor provoca un aumento de peso (Poggi et al., 2007; Vijay-Kumar et al., 2011) como estudios en los que se describe una disminución del mismo (Pierre et al., 2013; Saberi et al., 2009), indicando que los mecanismos pueden implicar en algunos casos alteraciones en la ingesta de alimentos (Poggi et al., 2007; Shi et al., 2006) y en otros cambios en el gasto energético (Pierre et al., 2013; Saberi et al., 2009). Estas discrepancias pueden deberse a la alteración genética de TLR4, al sexo o cepa del ratón utilizado y/o diferencias en la composición o duración de la dieta hipercalórica (N. Zhang et al., 2015). Además, también se sabe que el antagonista TAK-242 se une al dominio intracelular del receptor TLR4 (Ono et al., 2020) y el TLR4-PA1 a la proteína correceptora CD14 a nivel extracelular (Piazza et al., 2010) pudiendo inhibir de distinta manera este receptor. En cualquier caso, el efecto que el antagonista TLR4-PA1 utilizado en esta Tesis Doctoral provoca en el comportamiento alimentario y ganancia de peso de los animales en situación de SM es claro, y podría sugerirse como una buena herramienta farmacológica para la modulación de estos parámetros.

En cuanto a las alteraciones de la homeostasis de la glucosa, los animales del modelo de SM por dieta desarrollado en esta Tesis Doctoral mostraron un perfil glucídico compatible con la existencia de diabetes mellitus de tipo 2. Además, presentaron un índice HOMA-IR y HOMA- $\beta$  indicativos de resistencia a la insulina. El bloqueo del receptor TLR4 en los animales con SM corrigió este perfil glucídico, ya que disminuyó los niveles de glucemia mejorando también el índice HOMA- $\beta$ , lo que sugiere un mejor funcionamiento de las células  $\beta$  pancreáticas. Hay que mencionar que el tratamiento con el antagonista TLR4-PA1 no logró mejorar los niveles plasmáticos de insulina y la resistencia a ésta. No se han encontrado estudios que analicen el efecto hipoglucemiante de antagonistas del receptor TLR4 en modelos experimentales de diabetes de tipo 2 o de SM. Únicamente un estudio menciona que ratones diabéticos en los que se ha realizado un trasplante con células pancreáticas previamente tratadas con TAK-242 tiene mejores niveles de glucemia que los trasplantados con islotes no tratados con este antagonista (Chang et al., 2018). Nuestros resultados también muestran que el bloqueo del receptor TLR4 puede ejercer este efecto hipoglucemiante, siendo el primer estudio en mostrar este efecto en un modelo de SM por dieta. Por otra parte, se sabe que el receptor TLR4 juega un papel importante en la resistencia a la insulina, y que tanto en animales como en sujetos con resistencia a la insulina existe un aumento en la expresión de TLR4 en los tejidos sensible a la acción de la misma (Reyna et al., 2008; Shi et al., 2006). Sin embargo, tampoco hay muchos estudios que analicen el efecto del bloqueo del receptor TLR4 sobre el perfil insulínico en situaciones de SM. Los

escasos trabajos que se encuentran muestran que, tanto en líneas celulares como en modelos de obesidad por dieta, el antagonista TAK-242 es capaz de mejorar la capacidad de la insulina para suprimir la producción hepática de glucosa, y que este antagonista mejora resistencia a la insulina también a nivel muscular (Hussey et al., 2012; N. Zhang et al., 2015). Otros estudios con ratones *knock out* para el receptor TLR4 indican que la ausencia de esta proteína mejora también la sensibilidad a la insulina (Jia et al., 2014; Poggi et al., 2007; Radin et al., 2008) Nuestros resultados no permiten determinar de forma clara si el antagonista TLR4-PA1 mejora la resistencia la insulina ya que no corrige ni la hiperinsulinemia ni el índice HOMA-IR en los animales con SM, sin embargo, sí parece mejorar la función  $\beta$  pancreática. En general, los estudios señalan que existe también aun cierta controversia al efecto que este bloqueo TLR4 puede tener sobre la sensibilidad o resistencia a la insulina. Mientras que algunos estudios informan de un aumento de la acción de la insulina en el tejido adiposo, el músculo y el hígado en modelos animales *Knock out* para el receptor TLR4 (Jia et al., 2014; Shi et al., 2006), otros cuestionan estas mejoras (Poggi et al., 2007; Galbo et al., 2013). De nuevo, las discrepancias pueden ser explicadas por el diferente mecanismo de acción de los fármacos para bloquear los receptores TLR4 o por las diferencias en el peso molecular y la solubilidad lipídica de los compuestos, ya que estas propiedades físicas y químicas podrían afectar a la biodisponibilidad, solubilidad, capacidad de absorción y/o distribución en los tejidos. También otros factores como el modelo animal, o la naturaleza de la intervención dietética puede introducir factores que contribuyen a las diferencias observadas entre los distintos estudios (N. Zhang et al., 2015).

Por otra parte, en los animales del modelo de SM por dieta se observó un aumento en los niveles plasmáticos de triglicéridos, colesterol y LDL, junto con un aumento en los niveles de HDL. El tratamiento con el antagonista de receptores TLR4, TLR4-PA1 corrigió la dislipemia observada en los animales con SM, sin afectar a los niveles plasmáticos de HDL. Este efecto sobre el perfil lipídico ocasionado por el antagonista TLR4-PA1 podría estar relacionado con los cambios producidos por este fármaco en los patrones de alimentación y la disminución en la ingesta calórica. Aunque, ya se ha comentado anteriormente, los resultados sobre los cambios que en la ingesta calórica y patrones alimentarios producen tanto con el bloqueo de TLR4, como con la ausencia de este receptor son controvertidos (Galbo et al., 2013; Jia et al., 2014; Poggi et al., 2007; Shi et al., 2006) y hacen difícil comparar nuestros resultados con los existentes. Sin embargo, hay estudios en los que se demuestra que la reducción en el peso corporal y cambios en la ingesta calórica en modelos animales de SM modifican este perfil lipídico (Bejarano & Cuixart, 2011). Pero también es posible que el bloqueo del receptor TLR4 ocasione estos cambios en el metabolismo lipídico de manera directa. Así, diferentes estudios han mostrado que inhibidores de TLR4 pueden mejorar el perfil lipídico y las lesiones ateroscleróticas en modelos de obesidad, indicando que esta mejora se debe a su efecto antiinflamatorio (Gu et al., 2019; L. Xiao et al., 2020; G. Ye et al., 2022; K. Zhang et al., 2023). Estos efectos beneficiosos en el perfil lipídico también se han visto en modelos de arterosclerosis con ratones *Knock out* para receptor TLR4 (Cao et al., 2017). Nuestros resultados están de acuerdo con estos autores y muestran, por primera vez, el efecto beneficioso del antagonista TLR4-PA1 sobre el metabolismo lipídico en situaciones de SM.

Los trastornos del equilibrio oxidativo-antioxidante contribuyen en gran medida a la patogénesis de las enfermedades metabólicas y a sus complicaciones

cardiovasculares asociadas, ya que el aumento y la alteración de la generación de especies reactivas de oxígeno por el tejido adiposo excedente puede conducir a un mayor estrés oxidativo (Manzoor et al., 2022; Świątkiewicz et al., 2023). Los resultados de esta Tesis Doctoral muestran que los animales en los que se ha desarrollado SM por dieta presentan un estado generalizado de estrés oxidativo, confirmado por los altos niveles plasmáticos de MDA que poseen. El tratamiento con el antagonista de receptores TLR4-PA1 revirtió este aumento en los niveles plasmáticos de MDA en los animales con SM, corrigiendo este estado oxidativo. Se sabe que la activación de la vía del receptor TLR4 puede causar inflamación crónica y una mayor producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno; por lo que los fármacos o sustancias que actúen sobre ella pueden prevenir o mejorar este estrés oxidativo (Lucas & Maes, 2013a)). Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral muestran que el fármaco TLR4-PA1 que bloquea esta vía es capaz de tener este efecto. Otros autores también han demostrado que el bloqueo con antagonistas de TLR4 disminuye los niveles de MDA plasmáticos o tisulares en modelos de neuroinflamación por estrés (Gárate et al., 2014), daño cardíaco por ferroptosis (D. Chen et al., 2023), o daño retinocoroideo por endotoxemia (Ekici et al., 2014). Más aun, distintos estudios también han demostrado que el antagonista TAK-242 puede disminuir los niveles de MDA tisular en pancreatitis o daño retiniano causados por dietas altas en grasa o diabetes tipo 1 (Hong et al., 2020; W. Zhang et al., 2019). Nuestros datos están en consonancia con los descritos por estos autores, y son los primeros en identificar este efecto antioxidante del antagonista TLR4-PA1 en un modelo de SM por dieta en ratas. El efecto antioxidante ocasionado por antagonistas TLR4 descrito en los estudios mencionados va muy unido al efecto antiinflamatorio que ejercen estos fármacos (D. Chen et al., 2023; Ekici et al., 2014; Gárate et al., 2014; Hong et al., 2020; W. Zhang et al., 2019). Sin embargo, los resultados de esta Tesis Doctoral no han podido confirmar este paralelismo del efecto antioxidante con el posible efecto antiinflamatorio del fármaco TLR4-PA1 ya que no se han determinado los niveles de citoquinas proinflamatorias en los animales con SM tras el tratamiento en este antagonista. Mas estudios serían necesarios para confirmar este hecho.

Como se ha comentado anteriormente en esta sección de “Discusión” de la Tesis Doctoral, el SM provoca daños renales que incluyen cambios tanto morfológicos como funcionales (S. Chen et al., 2021). Los animales del modelo de SM por dieta desarrollado en esta Tesis Doctoral presentaron este daño renal, mostrando niveles plasmáticos elevados de creatinina. El tratamiento de estos animales con SM con el antagonista de receptores TLR4, TLR4-PA1, corrige la elevación en los niveles de creatinina que presentaban, indicando una mejora en la función renal de estos animales. Otros autores también han descrito que el bloqueo con antagonistas de TLR4 restaura el daño renal ocasionado en situaciones de endotoxemia (Fenhammar et al., 2011, 2014), en lesiones renales agudas (Mohammad et al., 2018), o en daño hepato-renal por acetaminofeno (Salama et al., 2015), disminuyendo tanto marcadores plasmáticos como tisulares de este daño. Aunque no se han encontrado estudios que analicen el efecto de antagonistas TLR4 en modelos de SM o similares como diabetes mellitus de tipo 2, sí hay algunos estudios que describe, en el daño renal ocasionado en diabetes mellitus de tipo 1 la mejora de la nefropatía por antagonistas TLR4 (Kajiwara et al., 2017; Yiyang Wang et al., 2023; Zhou et al., 2019). Por otra parte, los principales mecanismos propuestos en estos estudios para los efectos de mejora en el daño renal son la

capacidad antiinflamatoria y antioxidante de estos fármacos antagonistas. Nuestros datos están en consonancia con los descritos por estos autores, y son, de nuevo, los primeros en identificar la mejora en la función renal por un antagonista TLR4 en un modelo de SM por dieta en ratas. Sin embargo, no hemos podido confirmar si la mejora en los niveles de creatinina por parte del antagonista TLR4-PA1 se deben a su efecto antiinflamatorio o antioxidante como han propuesto otros estudios ya que, como se ha comentado en el párrafo anterior, no se han determinado los niveles de citoquinas proinflamatorias en los animales con SM tras el tratamiento en este antagonista. Tampoco se han determinado los niveles de MDA u otras enzimas implicadas en el estrés oxidativo a nivel renal, para confirmar que esta mejora se debe a su efecto antioxidante. Mas estudios serían necesarios para confirmar estos mecanismos.

Dentro de esta Tesis Doctoral, otro de los objetivos principales planteados fue evaluar el efecto que el antagonista de receptores TLR4, TLR4-PA1, tiene sobre las alteraciones cardiovasculares observadas en el modelo de SM por dieta. Para ello se han evaluado, de la misma manera que en el modelo de administración por Cisplatino, tanto parámetros generales de presión arterial y frecuencia cardiaca, como otros más específicos como la función cardiaca basal y la reactividad vascular en vasos de conductancia y resistencia tras el tratamiento con este antagonista en los animales que a su vez habían desarrollado SM.

En el modelo de SM por dieta llevado a cabo en esta Tesis Doctoral, los animales desarrollaron una hipotensión arterial compatible con una disfunción autonómica cardiovascular, que no se acompañó con una afectación de la FC. El tratamiento con el antagonista TLR4-PA1 corrigió esta hipotensión, provocando también un aumento en la FC de los animales. Como ya se ha comentado con anterioridad, estos cambios en la presión arterial de los animales con SM podría ser debida a la existencia de una neuropatía autonómica cardiovascular, consecuencia de la neuroinflamación en esta patología (Bakkar et al., 2020; Rochlani et al., 2017; Williams et al., 2019c). En los últimos años, se ha identificado la activación de vía de señalización del receptor TLR4 como un mecanismo clave en este proceso de neuroinflamación (MacDowell et al., 2014; McCauley & Baloh, 2019; Y. Peng et al., 2019), siendo los antagonistas de esta vía propuestos como estrategias farmacológicas prometedoras para su control y el de las patologías asociadas a ella (Oo et al., 2020). Revisando la literatura no se han encontrado estudios que analicen el papel de los antagonistas TLR4 en la neuropatía autonómica cardiovascular asociada a SM o diabetes, es más, solo se ha encontrado un estudio que involucra la activación de la vía TLR4 en la neuropatía autonómica entérica causada por una dieta de cafetería en ratones (L. Ye et al., 2020). Sí se han encontrado estudios que demuestran el uso de antagonistas TLR4 en la mejora de la neuropatía sensorial de distintos orígenes, tales como, la causada por antitumorales (Yan Li, Adamek, et al., 2015; Yan Li, Zhang, et al., 2015; Hongmei Zhang et al., 2016), por fenómenos de autoinmunidad (Oladiran et al., 2021), o de origen neuropático (Jurga et al., 2016, 2018), e incluso en las alteraciones sensoriales ocasionadas por la neuroinflamación en la obesidad (Moser et al., 2018; Tramullas et al., 2016). También existen en la literatura estudios en los que la hipotensión ocasionada por neuropatías por endotoxemia es restaurada con el uso de antagonistas TLR4 (Stefan Ehrentraut et al., 2011; Fenhammar et al., 2011), mejorando los daños microcirculatorios que ocasiona la inflamación generada por la sepsis a ese nivel (Yeh et al., 2012) y potenciando las respuestas contráctiles vasculares (S Ehrentraut et al., 2007). Nuestros

resultados, aunque en un modelo experimental diferente, estarían de acuerdo con los mencionados en estos estudios, siendo de nuevo la primera vez que se demuestra que un antagonista de receptores TLR4 podría restaurar la disfunción autonómica cardiovascular en las etapas iniciales del SM. Los efectos observados que el antagonista TLR4-PA1 ejerce sobre la frecuencia cardíaca podrían deberse también a un efecto sobre el tomo simpático cardíaco. Hay, también que mencionar que, estudios en modelos experimentales de hipertensión en los que existe una disfunción autonómica de sistema nervioso simpático (diferente a la que se observa en nuestro modelo) los antagonistas TLR4 también han sido capaces de corregir la hipertensión arterial asociada a la misma por su efecto modulador de esta actividad simpática tanto a nivel periférico como disminuyendo la activación de la glía a nivel centro paraventricular (Mowry et al., 2021; M.-L. Wang et al., 2018).

La función cardíaca basal en los animales del modelo de SM por dieta desarrollado en esta Tesis Doctoral no mostraron modificaciones en la misma, ni presentaron cambios relevantes a nivel de los índices de masa cardíacos. El tratamiento con TLR4-PA1 tampoco produjo ningún cambio en esta función cardíaca basal de los animales ni en los índices de masa cardíacos. Numerosos estudios han demostrado que la activación del receptor TLR4 aumenta la liberación de citocinas proinflamatorias que desempeñan un papel fundamental en la inflamación miocárdica, en particular en la miocarditis, el infarto de miocardio, la lesión por isquemia-reperfusión y la insuficiencia cardíaca (Di et al., 2016; Z. Xiao et al., 2020). De hecho, distintos autores han descrito la mejora en la disfunción miocárdica, y en el remodelado cardíaco tras la administración de antagonistas TLR4 en distintos modelos de alteraciones cardíacas (Paz-García et al., 2023; X. Zhang et al., 2014), y también en ratones *Knock out* para el receptor TLR4 (Avlas et al., 2011; Dong et al., 2012; Theobald et al., 2023). Más aún, también se ha visto este efecto beneficioso en modelos *Knock out* para el receptor TLR4 en los que se había desarrollado SM por dieta (N. Hu & Zhang, 2017). En nuestro modelo experimental al no haber ningún daño a nivel cardíaco no se ha podido confirmar si el antagonista TLR4 ensayado, TLR4-PA1, podría ejercer efectos beneficiosos en patologías cardíacas asociadas a SM. Lo que si podemos afirmar es que el antagonista TLR4-PA1 no ocasionaría alteraciones cardíacas relevantes en situaciones en las cuales la función cardíaca fuera normal.

Respecto a la funcionalidad de los vasos sanguíneos, los animales del modelo de SM por dieta llevado a cabo en esta Tesis Doctoral presentaron afectaciones distintas en vasos de conductancia o de resistencia. Así, en los territorios de conductancia se observó una hiporreactividad contráctil y en los de resistencia una disfunción endotelial. El tratamiento con el antagonista TLR4-PA1 no fue capaz de revertir la hiporreactividad en aorta, pero si corrigió la disfunción endotelial observada en la arteria mesentérica. Más aún, fue también capaz de potenciar la vasodilatación no dependiente de endotelio en este vaso de resistencia por encima de la observada en animales sin SM. El receptor TLR4 está expresado en el endotelio y se ha demostrado que desempeña un papel clave en el desarrollo de la disfunción endotelial y la inflamación vascular (Theofilis et al., 2021; Yu Wang et al., 2016b). En los últimos años se ha analizado la utilidad del bloqueo del receptor TLR4 en el tratamiento de la disfunción endotelial en distintos modelos animales tanto de Diabetes de tipo 1 como Diabetes de tipo 2, analizándose su efecto además en distintos territorios vasculares (aorta, mesentérica, arterial

peneanas, o carótida) (Carrillo-Sepulveda et al., 2015; Kramer et al., 2018; Matsumoto et al., 2020; Nunes et al., 2018; Romacho et al., 2020) , y de células sometidas a situaciones de hiperglucemia (Carrillo-Sepulveda et al., 2015). En todos estos estudios los resultados son similares mostrando la mejora en la disfunción endotelial en los distintos territorios vasculares, así como señalando que este efecto beneficioso se debe tanto al efecto antioxidante como antiinflamatorio del antagonista, lo que mejora la disponibilidad de óxido nítrico a nivel vascular. También se ha descrito que estos antagonistas son capaces de reducir las respuestas contráctiles dependientes del endotelio y de reducir el tono vascular (Carrillo-Sepulveda et al., 2015). También estudios en ratones *Knock out* para el receptor TLR4 han demostrado que la ausencia de éste protege frente al daño endotelial en situaciones de diabetes u obesidad (citadas; Kim et al., 2007; Liang et al., 2013). Nuestros resultados también han mostrado que el antagonista TLR4-PA1 es capaz de corregir la disfunción endotelial en arterias de resistencia en animales con SM. Más aun, este antagonista es capaz de aumentar también en este territorio vascular la vasodilatación endotelio independiente. Este último hecho también ha sido observado por otros autores (Matsumoto et al., 2020) y corroboraría el posible efecto directo de este fármaco a nivel vascular que se ha comentado en ocasiones anteriores en esta “Discusión”. Por último, el hecho de que este antagonista TLR4-PA1 no haya sido capaz de restaurar la hiporreactividad observada en aorta puede deberse bien a que los cambios en esta función contráctil no son significativos o bien a que la densidad o grado de activación de los receptores TLR4 antes la situación de SM sea diferente entre los distintos territorios vasculares (de Kleijn & Pasterkamp, 2003; S. Sharma et al., 2016b).

Dentro de los objetivos planteados en esta Tesis Doctoral, se quiso evaluar el efecto que el antagonista de receptores TLR4, TLR4-PA1, tiene sobre las alteraciones en la expresión de proteínas del eje TLR4/MyD88/NLRP3 observadas en el modelo de SM por dieta. Para ello, se ha evaluado la expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3 en los tejidos cardíaco, vascular y renal en el SM. Hay que mencionar que en este modelo de SM por dieta tampoco se incluye en esta Tesis Doctoral, el análisis de la expresión de estas proteínas, tras el tratamiento con TLR4-PA1, en la arteria mesentérica ya que como mencionamos en el apartado de “Resultados” no fue posible completarlos por problemas técnicos.

Como se ha comentado en apartados anteriores, la expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3 en tejido cardíaco, vascular y renal tras el desarrollo de SM por dieta no siguió un patrón claro. Así, en el ventrículo izquierdo de los animales con SM por dieta, la expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3 no se modificó. En la aorta de animales con SM por dieta, la expresión de TLR4 disminuyó, aumentándose ligeramente la de MyD88 y NLRP3. Por último, a nivel renal, los animales con SM por dieta no modificaron la expresión de TLR4 ni NLRP3, aumentando ligeramente la de MyD88. El efecto ejercido por el tratamiento con el antagonista TLR4-PA1 en la expresión de estas proteínas tampoco siguió un patrón definido. Así, este antagonista no modificó la expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3 a nivel cardíaco ni modificó tampoco la expresión de TLR4 en la aorta de los animales con SM, pero sí fue capaz de disminuir la expresión de MyD88 y NLRP3, siendo esta disminución más marcada en la primera de estas proteínas. Por último, a nivel renal, el antagonista TLR4-PA1 no modificó la expresión de TLR4 de los animales con SM por dieta, pero ocasionó un aumento claro en la expresión de MyD88

y NLRP3 en este tejido. Al revisar la literatura científica, no se han encontrado estudios en los que se analizaran cambios en la expresión de estas proteínas a nivel cardiovascular y renal tras el tratamiento con antagonista TLR4 en modelos animales de SM. Sin embargo, sí se ha descrito la disminución en la expresión de receptores TLR4, tras el tratamiento con antagonistas TLR4, en tejido renal o podocitos en modelos animales de nefropatía por diabetes mellitus de tipos 1 (Zhou et al., 2019; Zhu et al., 2018), en macrófagos y cultivos celulares de células musculares lisas de aorta en modelos de arteriosclerosis por dietas altas en grasas (Gu et al., 2019; L. Xiao et al., 2020; G. Ye et al., 2022), o en cardiomiocitos en modelos de ferropotosis (D. Chen et al., 2023). Nuestros resultados difieren de los mostrados en los estudios mencionados, ya que el tratamiento con el antagonista TLR4-PA1 no modificó la expresión de los receptores TLR4 en ninguno de los tejidos analizados. Esta diferencia puede deberse a que en los modelos descritos por otros autores la expresión de esta proteína estaba significativamente aumentada por la situación patológica provocada, pero no sucede así en nuestro modelo experimental. En relación a la expresión de MyD88, solo se han encontrado dos estudios en los que se analicen los cambios en la expresión de esta proteína tras el tratamiento con antagonistas TLR4, que muestran que estos antagonistas causan una disminución en la expresión de MyD88 en la arteria mesentérica en un modelo de diabetes mellitus de tipo 1 (Carrillo-Sepulveda et al., 2015) y a nivel del núcleo paraventricular en un modelo de ratas prehipertensas (M.-L. Wang et al., 2018). Los datos obtenidos en esta Tesis Doctoral estarían en consonancia con lo mencionado por estos trabajos, ya que el tratamiento con el antagonista TLR4-PA1 disminuye la expresión de esta proteína a nivel del tejido aórtico. Sin embargo, este fármaco produjo un inesperado aumento en la expresión de esta proteína a nivel renal, que no parece correlacionar tampoco con los datos funcionales obtenidos. Se sabe que la proteína MyD88 media los efectos de diferentes subtipos de receptores TLR y podría ser posible que a nivel renal sea la participación de otro receptor diferente al subtipo TLR4 la que active esta vía. De hecho, en el daño renal en modelos animales de diabetes mellitus de tipo 1, se ha involucrado también la activación de la vía TLR2/MyD88 (Kajiwara et al., 2017). Son, por tanto, necesarios más estudios para poder explicar este hecho. En cuanto a la expresión de la proteína NLRP3 en los tejidos analizados tras el tratamiento con el antagonista TLR4-PA1, de nuevo se obtuvo un resultado inesperado ya que este antagonista aumentó significativamente la expresión de la proteína NLRP3 a nivel renal. De la misma forma que hemos comentado antes, es posible que la activación de esta vía no se deba a la participación del receptor TLR4 sino a otras citoquinas y/o mediadores que la puedan activarla (Pinar et al., 2020b). No se han encontrado estudios en la literatura que analicen los cambios en la expresión de este inflamasoma en tejidos tras el bloqueo de los receptores TLR4 que permitan comparar el resultado obtenido en esta Tesis Doctoral. Son, por tanto, necesario más estudios para analizar el resultado obtenido.

Para finalizar, hay que comentar, que el análisis de todos los estudios sobre las modificaciones en la expresión de proteínas implicadas en la activación de la vía TLR4/MyD88, así como la de la vía NLRP3, muestran que se trata de vías de señalización muy complejas, ya que estos sistemas están muy interrelacionados. Así, el bloqueo de una de las rutas de activación podría ocasionar cambios en otras. Además, son vías que pueden estimularse por múltiples ligandos que en ocasiones pueden actuar en función del estado de la vía por uno o varios mecanismos. Todo ello, hace complejo

un análisis exhaustivo de las consecuencias del bloqueo farmacológico. Por estas razones, según nuestro punto de vista, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral sobre los cambios en la expresión de las proteínas TLR4, MyD88 y NLRP3 tras el bloqueo con un antagonista TLR4, servirían para poder seguir identificando la farmacología de estos compuestos y permitir identificar si el uso de estos antagonistas es una buena herramienta para el tratamiento o prevención de las patologías cardiovasculares asociadas a una situación de SM.

# **6. Conclusiones**

**Modelo de complicaciones cardiovasculares por administración crónica de Cisplatino y su modulación por el antagonista TLR4, TLR4-PA1.**

1. El tratamiento crónico con Cisplatino ocasiona alteraciones cardiovasculares, dosis-dependientes, que afectan de manera diferente a los distintos territorios cardiovasculares.
2. Durante el tratamiento crónico con Cisplatino la disfunción endotelial en vasos de conductancia y el daño renal aparecen desde dosis bajas, mientras que la existencia de hipotensión, disfunción ventricular izquierda, disfunción endotelial en vasos de conductancia e hiporreactividad en vasos de resistencia requiere dosis más altas para su aparición.
3. El tratamiento crónico con Cisplatino produce una situación de estrés oxidativo y un estado inflamatorio generalizado que cursa con un aumento en los niveles plasmáticos de IL-18. El efecto pro-oxidativo y pro-oxidante del Cisplatino es dosis-dependiente.
4. El tratamiento crónico con Cisplatino provoca cambios en la expresión de los receptores TLR4 y NLRP3, así como en el MyD88 en tejidos cardiovasculares y renal que son dosis- dependientes. Estos cambios son mucho más importantes a nivel renal que en los tejidos cardíaco o vascular, siendo la expresión de NLRP3 la más afectada en los tres tejidos. Estos cambios se correlacionan con las alteraciones funcionales cardiovasculares y renales desencadenadas por el tratamiento crónico con Cisplatino.
5. El tratamiento con el antagonista de receptores TLR4, TLR4-PA1, es capaz de corregir las alteraciones cardiovasculares ocasionadas por el tratamiento crónico con Cisplatino.
6. El tratamiento con el antagonista de receptores TLR4, TLR4-PA1 no mejora el estado oxidativo de los animales tras el tratamiento crónico con Cisplatino.
7. El tratamiento con el antagonista de receptores TLR4, TLR4-PA1, disminuye la expresión de NLRP3 a nivel cardíaco, lo que puede estar relacionado con la mejora en la disfunción ventricular izquierda que ocasiona.
8. El tratamiento con el antagonista de receptores TLR4, TLR4-PA1, no modifica la expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3 a nivel vascular, por lo que esta vía no parece estar involucrada en sus efectos a este nivel.
9. El tratamiento con el antagonista de receptores TLR4, TLR4-PA1, disminuye la expresión de TLR4 y NLRP3 a nivel renal, lo que podría tener consecuencias en la función renal.

**Modelo de complicaciones cardiovasculares de Síndrome Metabólico (SM) por dieta y su modulación por el antagonista TLR4, TLR4-PA1.**

10. El tratamiento de los animales con una dieta hipergrasa e hipercalórica durante 20 semanas ocasiona los principales factores que caracterizan el SM: obesidad central, dislipemias y alteraciones en el metabolismo de la glucosa, confirmándose el modelo desarrollado como un modelo válido de SM por dieta.
11. El modelo de SM por dieta no ocasiona todas las alteraciones cardiovasculares descritas en estas situaciones, provocando hipotensión, alteraciones a nivel renal, y únicamente afectación en los vasos de resistencia en los que aparece disfunción endotelial. En el modelo de SM por dieta no se desarrollan ni alteraciones cardíacas, ni alteraciones en vasos de conductancia.
12. El desarrollo de SM por dieta produce una situación de estrés oxidativo y un estado inflamatorio, que cursa con un aumento en los niveles plasmáticos IL-12p7, IL-18, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ .
13. Las características endocrinometabólicas, de estado oxidativo e inflamatorio, y las alteraciones observadas a nivel cardiovascular y renal permiten considerar el modelo de SM por dieta como un modelo de SM en sus etapas tempranas de desarrollo.
14. El desarrollo de SM por dieta únicamente ocasiona cambios en la expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3 en vasos de conductancia, no modificando su expresión ni en corazón, ni en riñón, ni en vasos de resistencia. Estos cambios no parecen correlacionarse con las alteraciones funcionales cardiovasculares y renales observadas en este modelo.
15. El tratamiento con el antagonista de receptores TLR4, TLR4-PA1, es capaz de corregir las alteraciones endocrinometabólicas, renales y cardiovasculares ocasionadas por el SM por dieta.
16. El tratamiento con el antagonista de receptores TLR4, TLR4-PA1, mejora el estado oxidativo de los animales en el modelo de SM por dieta.
17. El tratamiento con el antagonista de receptores TLR4, TLR4-PA1 corrige parcialmente las alteraciones en la expresión de MyD88 y NLRP3 en vasos de conductancia, no afectando la expresión de TLR4, MyD88 y NLRP3 en corazón. El tratamiento con este antagonista sí ocasiona cambios en la expresión de MyD88 y NLRP3 a nivel renal que requieren un estudio más profundo para identificar su implicación en las complicaciones renales en este modelo experimental.

# **7. Bibliografía**

- Abdel-Wahab, W. M., & Moussa, F. I. (2019). Neuroprotective effect of N-acetylcysteine against cisplatin-induced toxicity in rat brain by modulation of oxidative stress and inflammation. *Drug Design, Development and Therapy*, *13*, 1155–1162. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S191240>
- Abdelkader, N. F., Saad, M. A., & Abdelsalam, R. M. (2017). Neuroprotective effect of nebivolol against cisplatin-associated depressive-like behavior in rats. *Journal of Neurochemistry*, *141*(3), 449–460. <https://doi.org/10.1111/jnc.13978>
- Abe, T. (2022). Timing of Medium-Chain Triglyceride Consumption Modulates Effects in Mice with Obesity Induced by a High-Fat High-Sucrose Diet. *Nutrients*, *14*(23). <https://doi.org/10.3390/NU14235096>
- Abramavicius, S., Zemaitis, M., Pilvinis, V., & Kadusevicius, E. (2017). Cisplatin-induced sudden cardiac death with hemodynamic collapse: a severe adverse drug reaction: Case report. *Medicine*, *96*(48), e8995. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000008995>
- Achek, A., Yesudhas, D., & Choi, S. (2016). Toll-like receptors: promising therapeutic targets for inflammatory diseases. *Archives of Pharmacal Research*, *39*(8), 1032–1049. <https://doi.org/10.1007/s12272-016-0806-9>
- Adamczak, D., Adamczak, & M., D. (2017). The Role of Toll-Like Receptors and Vitamin D in Cardiovascular Diseases—A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(11), 2252. <https://doi.org/10.3390/ijms18112252>
- Ahmadi, S.-A., Boroumand, M.-A., Gohari-Moghaddam, K., Tajik, P., & Dibaj, S.-M. (2008). The impact of low serum triglyceride on LDL-cholesterol estimation. *Archives of Iranian Medicine*, *11*(3), 318–321.
- Ai, D., Banchs, J., Owusu-Agyemang, P., & Cata, J. P. (2014). Chemotherapy-induced cardiovascular toxicity: beyond anthracyclines. *Minerva Anestesiologica*, *80*(5), 586–594.
- Akcilar, R., Kocak, F. E., Simsek, H., Akcilar, A., Bayat, Z., Ece, E., & Kokdasgil, H. (2016). Antidiabetic and hypolipidemic effects of adropinin streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. *Bratislavske Lekarske Listy*, *117*(2), 100–105. [https://doi.org/10.4149/bll\\_2016\\_020](https://doi.org/10.4149/bll_2016_020)
- Akhigbe, R., & Ajayi, A. (2021). The impact of reactive oxygen species in the development of cardiometabolic disorders: a review. *Lipids in Health and Disease*, *20*(1). <https://doi.org/10.1186/S12944-021-01435-7>
- Akhter, J., Khan, J., Baghel, M., Beg, M. M. A., Goswami, P., Afjal, M. A., Ahmad, S., Habib, H., Najmi, A. K., & Raisuddin, S. (2022). NLRP3 inflammasome in rosmarinic acid-afforded attenuation of acute kidney injury in mice. *Scientific Reports* *2022* *12*:1, *12*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-04785-z>
- Akhter, J., Khan, J., Baghel, M., Masroor, M., Beg, A., Goswami, P., Afjal, M. A., Ahmad, S., Habib, H., & Kalam Najmi, A. (123 C.E.). NLRP3

- inflammasome in rosmarinic acid-afforded attenuation of acute kidney injury in mice. *Scientific Reports* |, 12, 1313. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-04785-z>
- Al Za'abi, M., Al Salam, S., Al Suleimani, Y., Ashique, M., Manoj, P., Nemmar, A., & Ali, B. H. (2021). Effects of repeated increasing doses of cisplatin as models of acute kidney injury and chronic kidney disease in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 394(2), 249–259. <https://doi.org/10.1007/S00210-020-01976-1>
- Aladaileh, S. H., Al-Swailmi, F. K., Abukhalil, M. H., Ahmeda, A. F., & Mahmoud, A. M. (2021). Punicalagin prevents cisplatin-induced nephrotoxicity by attenuating oxidative stress, inflammatory response, and apoptosis in rats. *Life Sciences*, 286, 120071. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2021.120071>
- Alberti, K. G., & Zimmet, P. Z. (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabetic Medicine : A Journal of the British Diabetic Association*, 15(7), 539–553. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9136\(199807\)15:7<539::AID-DIA668>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9136(199807)15:7<539::AID-DIA668>3.0.CO;2-S)
- Ali, S., Mallocci, M., Safiedeen, Z., Soleti, R., Vergori, L., Vidal-Gómez, X., Besnard, C., Dubois, S., Le Lay, S., Boursier, J., Chevrollier, A., Gagnadoux, F., Simard, G., Andriantsitohaina, R., & Martinez, M. C. (2021). LPS-enriched small extracellular vesicles from metabolic syndrome patients trigger endothelial dysfunction by activation of TLR4. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 118. <https://doi.org/10.1016/J.METABOL.2021.154727>
- Aljuhani, N., Ismail, R. S., El-Awady, M. S., & Hassan, M. H. (2020). Modulatory effects of perindopril on cisplatin-induced nephrotoxicity in mice: Implication of inflammatory cytokines and caspase-3 mediated apoptosis. *Acta Pharmaceutica*, 70(4), 515–525. <https://doi.org/10.2478/acph-2020-0033>
- Álvarez, Y., Pérez-Girón, J. V., Hernanz, R., Briones, A. M., García-Redondo, A., Beltrán, A., Alonso, M. J., & Salaices, M. (2007). Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2-derived products in vascular responses of hypertensive rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 321(1), 381–388. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.115287>
- Amin, M. N., Siddiqui, S. A., Ibrahim, M., Hakim, M. L., Ahammed, M. S., Kabir, A., & Sultana, F. (2020). Inflammatory cytokines in the pathogenesis of cardiovascular disease and cancer. *SAGE Open Medicine*, 8, 205031212096575. <https://doi.org/10.1177/2050312120965752>
- Aroor, A. R., Jia, G., & Sowers, J. R. (2018). Cellular mechanisms underlying obesity-induced arterial stiffness. In *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* (Vol.

- 314, Issue 3, pp. R387–R398). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00235.2016>
- Arora, S., Tagde, P., Alam, S., Akram, W., Naved, T., & Gupta, S. (2023). Influence of toll-like receptor-4 antagonist on bacterial load of asthma in Swiss albino mice: targeting TLR4/MD2 complex pathway. *Environmental Science and Pollution Research International*, *30*(12), 32854–32865. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-24521-4>
- Arslan, F., Houtgraaf, J. H., Keogh, B., Kazemi, K., de Jong, R., McCormack, W. J., O'Neill, L. A. J., McGuirk, P., Timmers, L., Smeets, M. B., Akeroyd, L., Reilly, M., Pasterkamp, G., & de Kleijn, D. P. V. (2012). Treatment with OPN-305, a humanized anti-Toll-Like receptor-2 antibody, reduces myocardial ischemia/reperfusion injury in pigs. *Circulation. Cardiovascular Interventions*, *5*(2), 279–287. <https://doi.org/10.1161/CIRCINTERVENTIONS.111.967596>
- Atabi, F., & Mohammadi, R. (2020). Clinical Validation of Eleven Formulas for Calculating LDL-C in Iran. *IRANIAN JOURNAL OF PATHOLOGY*, *15*(4), 261–267. <https://doi.org/10.30699/ijp.2020.110379.2174>
- Authier, N., Gillet, J. P., Fialip, J., Eschalier, A., & Coudore, F. (2003). An animal model of nociceptive peripheral neuropathy following repeated cisplatin injections. *Experimental Neurology*, *182*(1), 12–20. [https://doi.org/10.1016/S0014-4886\(03\)00003-7](https://doi.org/10.1016/S0014-4886(03)00003-7)
- Avlas, O., Fallach, R., Shainberg, A., Porat, E., & Hochhauser, E. (2011). Toll-like receptor 4 stimulation initiates an inflammatory response that decreases cardiomyocyte contractility. *Antioxidants & Redox Signaling*, *15*(7), 1895–1909. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3728>
- Babazada, H., Yamashita, F., Yanamoto, S., & Hashida, M. (2014). Self-assembling lipid modified glycol-split heparin nanoparticles suppress lipopolysaccharide-induced inflammation through TLR4-NF-κB signaling. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, *194*, 332–340. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.09.011>
- Bakkar, N. M. Z., Dwaib, H. S., Fares, S., Eid, A. H., Al-Dhaheeri, Y., & El-Yazbi, A. F. (2020). Cardiac autonomic neuropathy: A progressive consequence of chronic low-grade inflammation in type 2 diabetes and related metabolic disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(23), 1–20. <https://doi.org/10.3390/IJMS21239005>
- Barakat, L. A. A., Barakat, N., Zakaria, M. M., & Khirallah, S. M. (2020). Protective role of zinc oxide nanoparticles in kidney injury induced by cisplatin in rats. *Life Sciences*, *262*. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2020.118503>
- Barral, J.-P., & Croibier, A. (2011). General organization of the cardiovascular system. *Visceral Vascular Manipulations*, 3–26. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4351-2.00001-6>
- Barrat, F. J., Meeker, T., Chan, J. H., Guiducci, C., & Coffman, R. L. (2007). Treatment of lupus-prone mice with a dual inhibitor of TLR7 and TLR9

- leads to reduction of autoantibody production and amelioration of disease symptoms. *European Journal of Immunology*, 37(12), 3582–3586. <https://doi.org/10.1002/eji.200737815>
- Barrat, F. J., Meeker, T., Gregorio, J., Chan, J. H., Uematsu, S., Akira, S., Chang, B., Duramad, O., & Coffman, R. L. (2005). Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *The Journal of Experimental Medicine*, 202(8), 1131–1139. <https://doi.org/10.1084/jem.20050914>
- Bartekova, M., Radosinska, J., Jelemensky, M., & Dhalla, N. S. (2018). Role of cytokines and inflammation in heart function during health and disease. In *Heart Failure Reviews* (Vol. 23, Issue 5, pp. 733–758). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s10741-018-9716-x>
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2), 215–233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>
- Bayer, A. L., & Alcaide, P. (2021). MyD88: At the heart of inflammatory signaling and cardiovascular disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 161, 75–85. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2021.08.001>
- Bejarano, J. M. L., & Cuixart, C. B. (2011). [Cardiovascular risk factors and Primary Care: evaluation and intervention]. *Atencion primaria*, 43(12), 668–677. <https://doi.org/10.1016/j.aprim.2011.10.002>
- Bekkering, S., Saner, C., Riksen, N. P., Netea, M. G., Sabin, M. A., Saffery, R., Stienstra, R., & Burgner, D. P. (2020). Trained Immunity: Linking Obesity and Cardiovascular Disease across the Life-Course? In *Trends in Endocrinology and Metabolism* (Vol. 31, Issue 5, pp. 378–389). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2020.01.008>
- Belladelli, F., Montorsi, F., & Martini, A. (2022). Metabolic syndrome, obesity and cancer risk. *Current Opinion in Urology*, 32(6), 594–597. <https://doi.org/10.1097/MOU.0000000000001041>
- Berdichevski, A., Meiry, G., Milman, F., Reiter, I., Sedan, O., Eliyahu, S., Duffy, H. S., Youdim, M. B., & Binah, O. (2010). TVP1022 protects neonatal rat ventricular myocytes against doxorubicin-induced functional derangements. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 332(2), 413–420. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.161158>
- Berwick, Z. C., Dick, G. M., & Tune, J. D. (2012). Heart of the matter: Coronary dysfunction in metabolic syndrome. In *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* (Vol. 52, Issue 4, pp. 848–856). J Mol Cell Cardiol. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.06.025>
- Bhaswant, M., Poudyal, H., Mathai, M. L., Ward, L. C., Mouatt, P., & Brown, L. (2015). Green and Black Cardamom in a Diet-Induced Rat Model of Metabolic Syndrome. *Nutrients*, 7(9), 7691. <https://doi.org/10.3390/NU7095360>

- Biganzoli, L., Cufer, T., Bruning, P., Coleman, R. E., Duchateau, L., Rapoport, B., Nooij, M., Delhaye, F., Miles, D., Sulkes, A., Hamilton, A., & Piccart, M. (2003). Doxorubicin-paclitaxel: a safe regimen in terms of cardiac toxicity in metastatic breast carcinoma patients. Results from a European Organization for Research and Treatment of Cancer multicenter trial. *Cancer*, 97(1), 40–45. <https://doi.org/10.1002/cncr.10914>
- Bin Naeem, S., Azhar, M., Baloch, N. U., Abbas, M., Waheed, M., & Masood Sheikh, R. (2021). Cisplatin-Induced Bradycardia: A Silent Risk Observed in Two Different Clinical Cases. In *Cureus* (Vol. 13, Issue 11, p. e19769). <https://doi.org/10.7759/cureus.19769>
- Bodman, M. A., & Varacallo, M. (2023). *Peripheral Diabetic Neuropathy, in: StatPearls. 2021, StatPearls Publishing, Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).*
- Boldin, M. P., Taganov, K. D., Rao, D. S., Yang, L., Zhao, J. L., Kalwani, M., Garcia-Flores, Y., Luong, M., Devrekanli, A., Xu, J., Sun, G., Tay, J., Linsley, P. S., & Baltimore, D. (2011). miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 208(6), 1189–1201. <https://doi.org/10.1084/jem.20101823>
- Bomfim, G. F., Echem, C., Martins, C. B., Costa, T. J., Sartoretto, S. M., Dos Santos, R. A., Oliveira, M. A., Akamine, E. H., Fortes, Z. B., Tostes, R. C., Webb, R. C., & Carvalho, M. H. C. (2015). Toll-like receptor 4 inhibition reduces vascular inflammation in spontaneously hypertensive rats. *Life Sciences*, 122, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.12.001>
- Boogerd, W., ten Bokkel Huinink, W. W., Dalesio, O., Hoppenbrouwers, W. J., & van der Sande, J. J. (1990). Cisplatin induced neuropathy: central, peripheral and autonomic nerve involvement. *Journal of Neuro-Oncology*, 9(3), 255–263. <https://doi.org/10.1007/BF02341156>
- Boza, P., Ayala, P., Vivar, R., Humeres, C., Cáceres, F. T., Muñoz, C., García, L., Hermoso, M. A., & Díaz-Araya, G. (2016). Expression and function of toll-like receptor 4 and inflammasomes in cardiac fibroblasts and myofibroblasts: IL-1 $\beta$  synthesis, secretion, and degradation. *Molecular Immunology*, 74, 96–105. <https://doi.org/10.1016/J.MOLIMM.2016.05.001>
- Bradshaw, P. T., Stevens, J., Khankari, N., Teitelbaum, S. L., Neugut, A. I., & Gammon, M. D. (2016). Cardiovascular Disease Mortality Among Breast Cancer Survivors. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 27(1), 6–13. <https://doi.org/10.1097/EDE.0000000000000394>
- Bregagnollo, E. A., Mestrinel, M. A., Okoshi, K., Carvalho, F. C., Bregagnollo, I. F., Padovani, C. R., & Cicogna, A. C. (2007). Relative role of left ventricular geometric remodeling and of morphological and functional myocardial remodeling in the transition from compensated hypertrophy to heart failure in rats with supraaortic stenosis.

- Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 88(2), 225–233.  
<https://doi.org/10.1590/s0066-782x2007000200015>
- Breuille, D., Voisin, L., Contrepois, M., Arnal, M., Rose, F., & Obled, C. (1999). A sustained rat model for studying the long-lasting catabolic state of sepsis. *Infection and Immunity*, 67(3), 1079–1085.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.67.3.1079-1085.1999>
- Briasoulis, A., Androulakis, E., Christophides, T., & Tousoulis, D. (2016). The role of inflammation and cell death in the pathogenesis, progression and treatment of heart failure. *Heart Failure Reviews*, 21(2), 169–176. <https://doi.org/10.1007/s10741-016-9533-z>
- Bryce-Moncloa, A., Alegría-Valdivia, E., & San Martín-San Martín, M. G. (2017). Obesidad y riesgo de enfermedad cardiovascular. In *Anales de la Facultad de Medicina* (Vol. 78, pp. 202–206). scielo.
- Bychowski, J., & Sobiczewski, W. (2023). Current perspectives of cardio-oncology: Epidemiology, adverse effects, pre-treatment screening and prevention strategies. *Cancer Medicine*.  
<https://doi.org/10.1002/cam4.5980>
- Cabezos, P. A., Vera, G., Castillo, M., Fernández-Pujol, R., Martín, M. I., & Abalo, R. (2008). Radiological study of gastrointestinal motor activity after acute cisplatin in the rat. Temporal relationship with pica. *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical*, 141(1–2), 54–65.  
<https://doi.org/10.1016/j.autneu.2008.05.004>
- Cabezos, P., Vera, G., Martín-Fontelles, M. I., Fernández-Pujol, R., & Abalo, R. (2010). Cisplatin-induced gastrointestinal dysmotility is aggravated after chronic administration in the rat. Comparison with pica. *Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 22(7), 797–805, e224-5.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2010.01483.x>
- Cameron, A. C., McMahon, K., Hall, M., Neves, K. B., Rios, F. J., Montezano, A. C., Welsh, P., Waterston, A., White, J., Mark, P. B., Touyz, R. M., & Lang, N. N. (2020). Comprehensive Characterization of the Vascular Effects of Cisplatin-Based Chemotherapy in Patients With Testicular Cancer. *JACC: CardioOncology*, 2(3), 443–455.  
<https://doi.org/10.1016/J.JACCAO.2020.06.004>
- Cameron, A. C., Touyz, R. M., & Lang, N. N. (2016). Vascular Complications of Cancer Chemotherapy. *Canadian Journal of Cardiology*, 32(7), 852–862. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2015.12.023>
- Cao, X., Zhang, L., Chen, C., Wang, Q., Guo, L., Ma, Q., Deng, P., Zhu, G., Li, B., Pi, Y., Long, C., Zhang, L., Yu, Z., Zhou, Z., & Li, J. (2017). The critical role of ABCG1 and PPAR $\gamma$ /LXR $\alpha$  signaling in TLR4 mediates inflammatory responses and lipid accumulation in vascular smooth muscle cells. *Cell and Tissue Research*, 368(1), 145–157.  
<https://doi.org/10.1007/s00441-016-2518-3>
- Capolunghi, F., Rosado, M. M., Cascioli, S., Girolami, E., Bordasco, S., Vivarelli, M., Ruggiero, B., Cortis, E., Insalaco, A., Fantò, N., Gallo, G.,

- Nucera, E., Loiarro, M., Sette, C., De Santis, R., Carsetti, R., & Ruggiero, V. (2010). Pharmacological inhibition of TLR9 activation blocks autoantibody production in human B cells from SLE patients. *Rheumatology (Oxford, England)*, 49(12), 2281–2289. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keq226>
- Caputi, V., Marsilio, I., Cerantola, S., Roozfarakh, M., Lante, I., Galuppini, F., Rugge, M., Napoli, E., Giulivi, C., Orso, G., & Giron, M. C. (2017). Toll-Like Receptor 4 Modulates Small Intestine Neuromuscular Function through Nitrergic and Purinergic Pathways. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 350. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00350>
- Carbone, F., La Rocca, C., & Matarese, G. (2012). Immunological functions of leptin and adiponectin. *Biochimie*, 94(10), 2082–2088. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2012.05.018>
- Cardinale, D., Iacopo, F., & Cipolla, C. M. (2020). Cardiotoxicity of Anthracyclines . In *Frontiers in Cardiovascular Medicine* (Vol. 7). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcvm.2020.00026>
- Carrier, A. (2017). Metabolic Syndrome and Oxidative Stress: A Complex Relationship. In *Antioxidants & redox signaling* (Vol. 26, Issue 9, pp. 429–431). <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6929>
- Carrillo-Sepulveda, M. A., Spitler, K., Pandey, D., Berkowitz, D. E., & Matsumoto, T. (2015). Inhibition of TLR4 attenuates vascular dysfunction and oxidative stress in diabetic rats. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 93(12), 1341–1354. <https://doi.org/10.1007/s00109-015-1318-7>
- Castoldi, A., Naffah de Souza, C., Câmara, N. O. S., & Moraes-Vieira, P. M. (2015). The Macrophage Switch in Obesity Development. *Frontiers in Immunology*, 6(JAN), 637. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00637>
- Castro-Barquero, S., Ruiz-León, A. M., Sierra-Pérez, M., Estruch, R., & Casas, R. (2020). Dietary strategies for metabolic syndrome: A comprehensive review. In *Nutrients* (Vol. 12, Issue 10, pp. 1–21). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu12102983>
- Centola, M., Lucreziotti, S., Cazzaniga, S., Salerno-Uriarte, D., Sponzilli, C., & Carugo, S. (2016). A rare case of large intracoronary thrombosis in advanced breast cancer patient treated with epirubicin and cisplatin. *Journal of Cardiovascular Medicine (Hagerstown, Md.)*, 17 Suppl 2, e241–e243. <https://doi.org/10.2459/JCM.0000000000000444>
- Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E., & Baty, D. (2009). Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *British Journal of Pharmacology*, 157(2), 220–233. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00190.x>
- Chang, C. A., Murphy, K., Kane, R. R., Lawrence, M. C., & Naziruddin, B. (2018). Early TLR4 Blockade Attenuates Sterile Inflammation-mediated Stress in Islets During Isolation and Promotes Successful Transplant Outcomes. *Transplantation*, 102(9), 1505–1513.

- <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000002287>
- Chen, B., & Frangogiannis, N. G. (2020). Chemokines in Myocardial Infarction. In *Journal of Cardiovascular Translational Research*. Springer. <https://doi.org/10.1007/s12265-020-10006-7>
- Chen, D., Geng, Y., Deng, Z., Li, P., Xue, S., Xu, T., & Li, G. (2023). Inhibition of TLR4 Alleviates Heat Stroke-Induced Cardiomyocyte Injury by Down-Regulating Inflammation and Ferroptosis. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(5). <https://doi.org/10.3390/molecules28052297>
- Chen, G., Chen, X.-L., Xu, C.-B., Lin, J., Luo, H.-L., Xie, X., & Li, J. (2020). Toll-like receptor protein 4 monoclonal antibody inhibits mmLDL-induced endothelium-dependent vasodilation dysfunction of mouse mesenteric arteries. *Microvascular Research*, 127, 103923. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2019.103923>
- Chen, L., Yin, Z., Qin, X., Zhu, X., Chen, X., Ding, G., Sun, D., Wu, N. N., Fei, J., Bi, Y., Zhang, J., Bucala, R., Ren, J., & Zheng, Q. (2022). CD74 ablation rescues type 2 diabetes mellitus-induced cardiac remodeling and contractile dysfunction through pyroptosis-evoked regulation of ferroptosis. *Pharmacological Research*, 176, 106086. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106086>
- Chen, S., Chen, J., Li, S., Guo, F., Li, A., Wu, H., Chen, J., Pan, Q., Liao, S., Liu, H.-F., & Pan, Q. (2021). High-Fat Diet-Induced Renal Proximal Tubular Inflammatory Injury: Emerging Risk Factor of Chronic Kidney Disease. *Frontiers in Physiology*, 12, 786599. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.786599>
- Cheng, Y., Wu, X., Nie, X., Wu, Y., Zhang, C., Lee, S. M.-Y., Lv, K., Leung, G. P.-H., Fu, C., Zhang, J., & Li, J. (2022). Natural compound glycyrrhetic acid protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity by activating the Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 106, 154407. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2022.154407>
- Chess, D. J., & Stanley, W. C. (2008). Role of diet and fuel overabundance in the development and progression of heart failure. *Cardiovascular Research*, 79(2), 269–278. <https://doi.org/10.1093/CVR/CVN074>
- Chowdhury, S., Sinha, K., Banerjee, S., & Sil, P. C. (2016). Taurine protects cisplatin induced cardiotoxicity by modulating inflammatory and endoplasmic reticulum stress responses. *BioFactors*, 42(6), 647–664. <https://doi.org/10.1002/biof.1301>
- Christ, A., Lauterbach, M., & Latz, E. (2019). Western Diet and the Immune System: An Inflammatory Connection. *Immunity*, 51(5), 794–811. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.09.020>
- Ciftci, O., Ozdemir, I., Vardi, N., & Gurbuz, N. (2011). Novel platinum-N-heterocyclic carbene complex is more cardiotoxic than cis-platin in rats. *Human & Experimental Toxicology*, 30(9), 1342–1349. <https://doi.org/10.1177/0960327110390064>

- Conklin, D. J., Haberzettl, P., Jagatheesan, G., Baba, S., Merchant, M. L., Prough, R. A., Williams, J. D., Prabhu, S. D., & Bhatnagar, A. (2015). Glutathione S-transferase P protects against cyclophosphamide-induced cardiotoxicity in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 285(2), 136–148. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.03.029>
- Cordain, L., Eaton, S. B., Sebastian, A., Mann, N., Lindeberg, S., Watkins, B. A., O'Keefe, J. H., & Brand-Miller, J. (2005). Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(2), 341–354. <https://doi.org/10.1093/AJCN.81.2.341>
- Coskun, R., Turan, M. I., Turan, I. S., & Gulapoglu, M. (2014). The protective effect of thiamine pyrophosphate, but not thiamine, against cardiotoxicity induced with cisplatin in rats. *Drug and Chemical Toxicology*, 37(3), 290–294. <https://doi.org/10.3109/01480545.2013.851688>
- Crawford, M. S., Gumprich, E., & Sweazea, K. L. (2019). A novel organic mineral complex prevented high fat diet-induced hyperglycemia, endotoxemia, liver injury and endothelial dysfunction in young male Sprague-Dawley rats. *PloS One*, 14(8), e0221392. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221392>
- Cui, G., Ye, X., Zuo, T., Zhao, H., Zhao, Q., Chen, W., & Hua, F. (2013). Chloroquine pretreatment inhibits toll-like receptor 3 signaling after stroke. *Neuroscience Letters*, 548, 101–104. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.02.072>
- Curigliano, G., Cardinale, D., Dent, S., Criscitiello, C., Aseyev, O., Lenihan, D., & Cipolla, C. M. (2016). Cardiotoxicity of anticancer treatments: Epidemiology, detection, and management. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 66(4), 309–325. <https://doi.org/10.3322/caac.21341>
- da Silva, A. A., do Carmo, J. M., Li, X., Wang, Z., Mouton, A. J., & Hall, J. E. (2020). Role of Hyperinsulinemia and Insulin Resistance in Hypertension: Metabolic Syndrome Revisited. *The Canadian Journal of Cardiology*, 36(5), 671–682. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2020.02.066>
- Daiber, A., Steven, S., Weber, A., Shuvaev, V. V., Muzykantov, V. R., Laher, I., Li, H., Lamas, S., & Münzel, T. (2017). Targeting vascular (endothelial) dysfunction. *British Journal of Pharmacology*, 174(12), 1591–1619. <https://doi.org/10.1111/BPH.13517>
- Dasari, S., & Bernard Tchounwou, P. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. In *European Journal of Pharmacology* (Vol. 740, pp. 364–378). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>
- Dasu, M. R., Riosvelasco, A. C., & Jialal, I. (2009). Candesartan inhibits Toll-like receptor expression and activity both in vitro and in vivo. *Atherosclerosis*, 202(1), 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.04.010>

- Davis, L. L., & Nolan, M. Z. (2021). The Influence of Obesity on Care of Adults with Cardiovascular Disease. *The Nursing Clinics of North America*, 56(4), 511–525. <https://doi.org/10.1016/J.CNUR.2021.07.002>
- de Forni, M., Malet-Martino, M. C., Jaillais, P., Shubinski, R. E., Bachaud, J. M., Lemaire, L., Canal, P., Chevreau, C., Carrié, D., & Soulié, P. (1992). Cardiotoxicity of high-dose continuous infusion fluorouracil: a prospective clinical study. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 10(11), 1795–1801. <https://doi.org/10.1200/JCO.1992.10.11.1795>
- de Jager, S. C. A., Bongaerts, B. W. C., Weber, M., Kraaijeveld, A. O., Rousch, M., Dimmeler, S., van Diejen-Visser, M. P., Cleutjens, K. B. J. M., Nelemans, P. J., van Berkel, T. J. C., & Biessen, E. A. L. (2012). Chemokines CCL3/MIP1 $\alpha$ , CCL5/RANTES and CCL18/PARC are Independent Risk Predictors of Short-Term Mortality in Patients with Acute Coronary Syndromes. *PLoS ONE*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045804>
- de Kleijn, D., & Pasterkamp, G. (2003). Toll-like receptors in cardiovascular diseases. *Cardiovascular Research*, 60(1), 58–67. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(03\)00348-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(03)00348-1)
- De Laat, M. A., Gruntmeir, K. J., Pollitt, C. C., McGowan, C. M., Sillence, M. N., & Lacombe, V. A. (2014). Hyperinsulinemia down-regulates TLR4 expression in the mammalian heart. *Frontiers in Endocrinology*, 5(JUL), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00120>
- de Zoete, M. R., Palm, N. W., Zhu, S., & Flavé, R. A. (2014). Inflammasomes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(12). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016287>
- Deng, J.-S., Jiang, W.-P., Chen, C.-C., Lee, L.-Y., Li, P.-Y., Huang, W.-C., Liao, J.-C., Chen, H.-Y., Huang, S.-S., & Huang, G.-J. (2020). Cordyceps cicadae Mycelia Ameliorate Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury by Suppressing the TLR4/NF- $\kappa$ B/MAPK and Activating the HO-1/Nrf2 and Sirt-1/AMPK Pathways in Mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/7912763>
- Di Lisi, D., Madonna, R., Zito, C., Bronte, E., Badalamenti, G., Parrella, P., Monte, I., Tocchetti, C. G., Russo, A., & Novo, G. (2017). Anticancer therapy-induced vascular toxicity: VEGF inhibition and beyond. *International Journal of Cardiology*, 227, 11–17. <https://doi.org/10.1016/J.IJCARD.2016.11.174>
- Di, S., Jiang, S., Ma, Z., Lv, J., Yi, W., Wang, D., Fan, C., Hu, W., Deng, C., Sun, Y., & Yang, Y. (2016). The emerging role of Toll-like receptor 4 in myocardial inflammation. *Cell Death & Disease*, 7(5), e2234–e2234. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.140>
- Di Somma, S., & Magrini, L. (2015). Tratamiento farmacológico en la insuficiencia cardiaca aguda. *Revista Española de Cardiología*, 68(8), 706–713. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.recesp.2015.02.019>

- Diab, A., Dastmalchi, L. N., Gulati, M., & Michos, E. D. (2023). A Heart-Healthy Diet for Cardiovascular Disease Prevention: Where Are We Now? *Vascular Health and Risk Management*, *19*, 237–253. <https://doi.org/10.2147/VHRM.S379874>
- Ding, T., Wang, S., Zhang, X., Zai, W., Fan, J., Chen, W., Bian, Q., Luan, J., Shen, Y., Zhang, Y., Ju, D., & Mei, X. (2018). Kidney protection effects of dihydroquercetin on diabetic nephropathy through suppressing ROS and NLRP3 inflammasome. *Phytomedicine*, *41*, 45–53. <https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2018.01.026>
- Dong, B., Qi, D., Yang, L., Huang, Y., Xiao, X., Tai, N., Wen, L., & Wong, F. S. (2012). TLR4 regulates cardiac lipid accumulation and diabetic heart disease in the nonobese diabetic mouse model of type 1 diabetes. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *303*(6), H732-42. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00948.2011>
- Drewnowski, A., & Shultz, J. M. (2001). *Impact of aging on eating behaviors, food choices, nutrition, and health status*. Journal of Nutrition, Health and Aging.
- Dugbartey, G. J., Peppone, L. J., & De Graaf, I. A. M. (2016). An integrative view of cisplatin-induced renal and cardiac toxicities: molecular mechanisms, current treatment challenges and potential protective measures HHS Public Access. *Toxicology*, *371*, 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.10.001>
- Dupas, J., Feray, A., Goanvec, C., Guernec, A., Samson, N., Bougaran, P., Guerrero, F., & Mansourati, J. (2017). *Metabolic Syndrome and Hypertension Resulting from Fructose Enriched Diet in Wistar Rats*. <https://doi.org/10.1155/2017/2494067>
- Dwivedi, S., Gottipati, A., Ganugula, R., Arora, M., Friend, R., Osburne, R., Rodrigues-Hoffman, A., Basu, R., Pan, H.-L., & Kumar, M. N. V. R. (2022). Oral Nanocurcumin Alone or in Combination with Insulin Alleviates STZ-Induced Diabetic Neuropathy in Rats. *Molecular Pharmaceutics*, *19*(12), 4612–4624. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.2c00465>
- Ehrentraut, H., Weber, C., Ehrentraut, S., Schwederski, M., Boehm, O., Knuefermann, P., Meyer, R., & Baumgarten, G. (2011). The toll-like receptor 4-antagonist eritoran reduces murine cardiac hypertrophy. *European Journal of Heart Failure*, *13*(6), 602–610. <https://doi.org/10.1093/eurjhf/hfr035>
- Ehrentraut, S., Frede, S., Stapel, H., Mengden, T., Grohé, C., Fandrey, J., Meyer, R., & Baumgarten, G. (2007). Antagonism of lipopolysaccharide-induced blood pressure attenuation and vascular contractility. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *27*(10), 2170–2176. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.146100>
- Ehrentraut, Stefan, Lohner, R., Schwederski, M., Ehrentraut, H., Boehm, O., Noga, S., Langhoff, P., Baumgarten, G., Meyer, R., &

- Knuefermann, P. (2011). In vivo Toll-like receptor 4 antagonism restores cardiac function during endotoxemia. *Shock (Augusta, Ga.)*, 36(6), 613–620. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e318235805f>
- Ekici, F., Karaca, E. E., Korkmaz, S., Yüksel, O., Gülbahar, Ö., Alper, M., Ercan, S., & Or, M. (2014). Effect of the Toll-like receptor 4 antagonist eritoran on retinochoroidal inflammatory damage in a rat model of endotoxin-induced inflammation. *Mediators of Inflammation*, 2014, 643525. <https://doi.org/10.1155/2014/643525>
- El-Awady, E. S. E., Moustafa, Y. M., Abo-Elmatty, D. M., & Radwan, A. (2011). Cisplatin-induced cardiotoxicity: Mechanisms and cardioprotective strategies. *European Journal of Pharmacology*, 650(1), 335–341. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2010.09.085>
- El-Hawwary, A. A., & Omar, N. M. (2019). The influence of ginger administration on cisplatin-induced cardiotoxicity in rat: Light and electron microscopic study. *Acta Histochemica*, 121(5), 553–562. <https://doi.org/10.1016/J.ACTHIS.2019.04.013>
- El-Sawalhi, M. M., & Ahmed, L. A. (2014). Exploring the protective role of apocynin, a specific NADPH oxidase inhibitor, in cisplatin-induced cardiotoxicity in rats. *Chemico-Biological Interactions*, 207, 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2013.11.008>
- Engin, A. (2017). Endothelial dysfunction in obesity. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 960, pp. 345–379). Springer New York LLC. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_15)
- Eskandari, M. R., Moghaddam, F., Shahraki, J., & Pourahmad, J. (2015). A comparison of cardiomyocyte cytotoxic mechanisms for 5-fluorouracil and its pro-drug capecitabine. *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems*, 45(1), 79–87. <https://doi.org/10.3109/00498254.2014.942809>
- Esser, N., Paquot, N., & Scheen, A. J. (2015). Anti-inflammatory agents to treat or prevent type 2 diabetes, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 24(3), 283–307. <https://doi.org/10.1517/13543784.2015.974804>
- Etchecopar-Chevreuril, C., François, B., Clavel, M., Pichon, N., Gastinne, H., & Vignon, P. (2008). Cardiac morphological and functional changes during early septic shock: a transesophageal echocardiographic study. *Intensive Care Medicine*, 34(2), 250–256. <https://doi.org/10.1007/s00134-007-0929-z>
- Fang, D., Yang, S., Quan, W., Jia, H., Quan, Z., & Qu, Z. (2014). Atorvastatin suppresses Toll-like receptor 4 expression and NF-κB activation in rabbit atherosclerotic plaques. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 18(2), 242–246.
- Farrar, C. A., Keogh, B., McCormack, W., O'Shaughnessy, A., Parker, A., Reilly, M., & Sacks, S. H. (2012). Inhibition of TLR2 promotes graft function in a murine model of renal transplant ischemia-reperfusion injury. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of*

- American Societies for Experimental Biology*, 26(2), 799–807.  
<https://doi.org/10.1096/fj.11-195396>
- Fenhammar, J., Rundgren, M., Forestier, J., Kalman, S., Eriksson, S., & Frithiof, R. (2011). Toll-like receptor 4 inhibitor TAK-242 attenuates acute kidney injury in endotoxemic sheep. *Anesthesiology*, 114(5), 1130–1137. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e31820b8b44>
- Fenhammar, J., Rundgren, M., Hultenby, K., Forestier, J., Taavo, M., Kenne, E., Weitzberg, E., Eriksson, S., Ozenci, V., Wernerson, A., & Frithiof, R. (2014). Renal effects of treatment with a TLR4 inhibitor in conscious septic sheep. *Critical Care (London, England)*, 18(5), 488. <https://doi.org/10.1186/s13054-014-0488-y>
- Fernández-Bergés, D., Cabrera de León, A., Sanz, H., Elosua, R., Guembe, M. J., Alzamora, M., Vega-Alonso, T., Félix-Redondo, F. J., Ortiz-Marrón, H., Rigo, F., Lama, C., Gavrilá, D., Segura-Fragoso, A., Lozano, L., & Marrugat, J. (2012). Síndrome metabólico en España: prevalencia y riesgo coronario asociado a la definición armonizada y a la propuesta por la OMS. Estudio DARIOS. *Revista Española de Cardiología*, 65(3), 241–248. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.recesp.2011.10.015>
- Ferreira-Gomes, J., Garcia, M. M., Nascimento, D., Almeida, L., Quesada, E., Castro-Lopes, J. M., Pascual, D., Goicoechea, C., & Neto, F. L. (2021). TLR4 Antagonism Reduces Movement-Induced Nociception and ATF-3 Expression in Experimental Osteoarthritis. *Journal of Pain Research*, 14, 2615–2627. <https://doi.org/10.2147/JPR.S317877>
- Finsterer, J., & Ohnsorge, P. (2013). Influence of mitochondrion-toxic agents on the cardiovascular system. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 67(3), 434–445. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2013.09.002>
- Flora, G. D., & Nayak, M. K. (2019). A Brief Review of Cardiovascular Diseases, Associated Risk Factors and Current Treatment Regimes. *Current Pharmaceutical Design*, 25(38), 4063–4084. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190925163827>
- Florido, R., Daya, N. R., Ndumele, C. E., Koton, S., Russell, S. D., Prizment, A., Blumenthal, R. S., Matsushita, K., Mok, Y., Felix, A. S., Coresh, J., Joshi, C. E., Platz, E. A., & Selvin, E. (2022). Cardiovascular Disease Risk Among Cancer Survivors: The Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) Study. *Journal of the American College of Cardiology*, 80(1), 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2022.04.042>
- Földes, G., von Haehling, S., Okonko, D. O., Jankowska, E. A., Poole-Wilson, P. A., & Anker, S. D. (2008). Fluvastatin reduces increased blood monocyte Toll-like receptor 4 expression in whole blood from patients with chronic heart failure. *International Journal of Cardiology*, 124(1), 80–85. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2006.12.024>
- Fox, R. (1996). Anti-malarial drugs: possible mechanisms of action in

- autoimmune disease and prospects for drug development. *Lupus*, 5 Suppl 1, S4-10.
- Francisqueti, F. V., Nascimento, A. F., Minatel, I. O., Dias, M. C., Luvizotto, R. D. A. M., Berchieri-Ronchi, C., Ferreira, A. L. A., & Corrêa, C. R. (2017). Metabolic syndrome and inflammation in adipose tissue occur at different times in animals submitted to a high-sugar/fat diet. *Journal of Nutritional Science*, 6. <https://doi.org/10.1017/jns.2017.42>
- Frantz, S., Falcao-Pires, I., Balligand, J. L., Bauersachs, J., Brutsaert, D., Ciccarelli, M., Dawson, D., de Windt, L. J., Giacca, M., Hamdani, N., Hilfiker-Kleiner, D., Hirsch, E., Leite-Moreira, A., Mayr, M., Thum, T., Tocchetti, C. G., van der Velden, J., Varricchi, G., & Heymans, S. (2018). The innate immune system in chronic cardiomyopathy: a European Society of Cardiology (ESC) scientific statement from the Working Group on Myocardial Function of the ESC. *European Journal of Heart Failure*, 20(3), 445–459. <https://doi.org/10.1002/EJHF.1138>
- Fresno, M., Alvarez, R., & Cuesta, N. (2011). Toll-like receptors, inflammation, metabolism and obesity. <Http://Dx.Doi.Org/10.3109/13813455.2011.562514>, 117(3), 151–164. <https://doi.org/10.3109/13813455.2011.562514>
- Galbo, T., Perry, R. J., Jurczak, M. J., Camporez, J.-P. G., Alves, T. C., Kahn, M., Guigni, B. A., Serr, J., Zhang, D., Bhanot, S., Samuel, V. T., & Shulman, G. I. (2013). Saturated and unsaturated fat induce hepatic insulin resistance independently of TLR-4 signaling and ceramide synthesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(31), 12780–12785. <https://doi.org/10.1073/pnas.1311176110>
- Gao, R., Shi, H., Chang, S., Gao, Y., Li, X., Lv, C., Yang, H., Xiang, H., Yang, J., Xu, L., & Tang, Y. (2019). The selective NLRP3-inflammasome inhibitor MCC950 reduces myocardial fibrosis and improves cardiac remodeling in a mouse model of myocardial infarction. *International Immunopharmacology*, 74, 105575. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.04.022>
- Gao, W., Xiong, Y., Li, Q., & Yang, H. (2017a). Inhibition of Toll-Like Receptor Signaling as a Promising Therapy for Inflammatory Diseases: A Journey from Molecular to Nano Therapeutics. *Frontiers in Physiology*, 8, 508. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00508>
- Gao, W., Xiong, Y., Li, Q., & Yang, H. (2017b). Inhibition of Toll-Like Receptor Signaling as a Promising Therapy for Inflammatory Diseases: A Journey from Molecular to Nano Therapeutics. *Frontiers in Physiology*, 8, 508. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00508>
- Gárate, I., García-Bueno, B., Madrigal, J. L. M., Caso, J. R., Alou, L., Gómez-Lus, M. L., & Leza, J. C. (2014). Toll-like 4 receptor inhibitor TAK-242 decreases neuroinflammation in rat brain frontal cortex after stress. *Journal of Neuroinflammation*, 11, 8. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-8>

- Garcia, M M, Pascual, D., Quesada, E., Uranga, J. A., & Goicoechea, C. (2017). Early toll-like receptor 4 blockade impedes the behavioural and histological characteristics observed in a mia-induced animal model of osteoarthritic pain. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 76(Suppl 2), 962 LP – 962. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2017-eular.6022>
- Garcia, Miguel M, Goicoechea, C., Molina-Álvarez, M., & Pascual, D. (2020). Toll-like receptor 4: A promising crossroads in the diagnosis and treatment of several pathologies. *European Journal of Pharmacology*, 874, 172975. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.172975>
- Gargiulo, P., Marsico, F., Renga, F., Dell'Aversana, S., Esposito, I., Marciano, C., Dellegrottaglie, S., Perrone-Filardi, P., & Paolillo, S. (2020). The metabolic syndrome in heart failure: insights to specific mechanisms. In *Heart Failure Reviews* (Vol. 25, Issue 1). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10741-019-09838-6>
- Ghofran, O., Safari, T., & Shahraki, M. R. (2019). Effects of Eugenol on Pain Response to the Formalin Test and Plasma Antioxidant Activity in High Fructose Drinking Water in Male Rats. *International Journal of Preventive Medicine*, 10, 151. [https://doi.org/10.4103/ijpvm.IJPVM\\_348\\_17](https://doi.org/10.4103/ijpvm.IJPVM_348_17)
- Gil-Cardoso, K., Del Bas, J. M., Caimari, A., Lama, C., Torres, S., Mantecón, L., & Infante, C. (2022). TetraSOD®, a Unique Marine Microalgae Ingredient, Promotes an Antioxidant and Anti-Inflammatory Status in a Metabolic Syndrome-Induced Model in Rats. *Nutrients*, 14(19). <https://doi.org/10.3390/NU14194028>
- Goldberger, J. J., Arora, R., Buckley, U., & Shivkumar, K. (2019). Autonomic Nervous System Dysfunction: JACC Focus Seminar. *Journal of the American College of Cardiology*, 73(10), 1189. <https://doi.org/10.1016/J.JACC.2018.12.064>
- Gómez-Guzmán, M., Jiménez, R., Romero, M., Sánchez, M., Zarzuelo, M. J., Gómez-Morales, M., O'Valle, F., López-Farré, A. J., Algieri, F., Gálvez, J., Pérez-Vizcaino, F., Sabio, J. M., & Duarte, J. (2014). Chronic hydroxychloroquine improves endothelial dysfunction and protects kidney in a mouse model of systemic lupus erythematosus. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 64(2), 330–337. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03587>
- Gómez-Sierra, T., Eugenio-Pérez, D., Sánchez-Chinchillas, A., & Pedraza-Chaverri, J. (2018). Role of food-derived antioxidants against cisplatin induced-nephrotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 120, 230–242. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2018.07.018>
- Gonzales-Vitale, J. C., Hayes, D. M., Cvitkovic, E., & Sternberg, S. S. (1977). The renal pathology in clinical trials of cis-platinum (II) diamminedichloride. *Cancer*, 39(4), 1362–1371. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197704\)39:4<1362::aid-cncr2820390403>3.0.co;2-n](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197704)39:4<1362::aid-cncr2820390403>3.0.co;2-n)

- Gonzalez-Chávez, A., Chávez-Fernández, J. A., Elizondo-Argueta, S., González-Tapia, A., León-Pedroza, J. I., & Ochoa, C. (2018). Metabolic Syndrome and Cardiovascular Disease: A Health Challenge. *Archives of Medical Research*, 49(8), 516–521. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2018.10.003>
- González, C., Herradón, E., Abalo, R., Vera, G., Pérez-Nievas, B. G., Leza, J. C., Martín, M. I., & López-Miranda, V. (2011). Cannabinoid/agonist WIN 55,212-2 reduces cardiac ischaemia–reperfusion injury in Zucker diabetic fatty rats: role of CB2 receptors and iNOS/eNOS. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 27(4), 331–340. <https://doi.org/10.1002/dmrr.1176>
- Goulopoulou, S., McCarthy, C. G., & Webb, R. C. (2016). Toll-like Receptors in the Vascular System: Sensing the Dangers Within. *Pharmacological Reviews*, 68(1), 142–167. <https://doi.org/10.1124/pr.114.010090>
- Grossman, S. C., & Porth, C. M. (2014). *Fisiopatología-a : alteraciones de la salud / [editoras] Sheila C. Grossman, Carol Mattson Porth* (9th ed.). Philadelphia etc. : Wolters Kluwer.
- Gu, H.-F., Li, N., Xu, Z.-Q., Hu, L., Li, H., Zhang, R.-J., Chen, R.-M., Zheng, X.-L., Tang, Y.-L., & Liao, D.-F. (2019). Chronic Unpredictable Mild Stress Promotes Atherosclerosis via HMGB1/TLR4-Mediated Downregulation of PPAR $\gamma$ /LXR $\alpha$ /ABCA1 in ApoE(-/-) Mice. *Frontiers in Physiology*, 10, 165. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00165>
- Gui, X. Y., & Rabkin, S. W. (2023). C-Reactive Protein, Interleukin-6, Trimethylamine-N-Oxide, Syndecan-1, Nitric Oxide, and Tumor Necrosis Factor Receptor-1 in Heart Failure with Preserved Versus Reduced Ejection Fraction: a Meta-Analysis. *Current Heart Failure Reports*, 20(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11897-022-00584-9>
- Guiducci, C., Gong, M., Xu, Z., Gill, M., Chaussabel, D., Meeker, T., Chan, J. H., Wright, T., Punaro, M., Bolland, S., Soumelis, V., Banchereau, J., Coffman, R. L., Pascual, V., & Barrat, F. J. (2010). TLR recognition of self nucleic acids hampers glucocorticoid activity in lupus. *Nature*, 465(7300), 937–941. <https://doi.org/10.1038/nature09102>
- Gullestad, L., Ueland, T., Vinge, L. E., Finsen, A., Yndestad, A., & Aukrust, P. (2012). Inflammatory Cytokines in Heart Failure: Mediators and Markers. *Cardiology*, 122(1), 23–35. <https://doi.org/10.1159/000338166>
- Guo, L., Ai, J., Zheng, Z., Howatt, D. A., Daugherty, A., Huang, B., & Li, X.-A. (2013). High density lipoprotein protects against polymicrobe-induced sepsis in mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(25), 17947–17953. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.442699>
- Guo, Y., Wang, M., Mou, J., Zhao, Z., Yang, J., Zhu, F., Pei, G., Zhu, H., Wang, Y., Xu, G., Zeng, R., & Yao, Y. (2018). Pretreatment of Huaqihuang extractum protects against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Scientific Reports*, 8(1), 7333.

- <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25610-6>
- Gupta, A., Fei, Y. D., Kim, T. Y., Xie, A., Batai, K., Greener, I., Tang, H., Ciftci-Yilmaz, S., Juneman, E., Indik, J. H., Shi, G., Christensen, J., Gupta, G., Hillery, C., Kansal, M. M., Parikh, D. S., Zhou, T., Yuan, J. X. J., Kanthi, Y., ... Desai, A. A. (2021). IL-18 mediates sickle cell cardiomyopathy and ventricular arrhythmias. *Blood*, *137*(9), 1208–1218. <https://doi.org/10.1182/blood.2020005944>
- Gupta, P., Makkar, T. K., Goel, L., & Pahuja, M. (2022). Role of inflammation and oxidative stress in chemotherapy-induced neurotoxicity. *Immunologic Research*, *70*(6), 725–741. <https://doi.org/10.1007/s12026-022-09307-7>
- Haj-Mirzaian, A., Ramezanzadeh, K., Shariatzadeh, S., Tajik, M., Khalafi, F., Tafazolimoghadam, A., Radmard, M., Rahbar, A., Pirri, F., Kazemi, K., Khosravi, A., Shababi, N., & Dehpour, A. R. (2021). Role of hypothalamic-pituitary adrenal-axis, toll-like receptors, and macrophage polarization in pre-atherosclerotic changes induced by social isolation stress in mice. *Scientific Reports*, *11*(1), 19091. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98276-2>
- Hanna, A., & Frangogiannis, N. G. (2020). Inflammatory Cytokines and Chemokines as Therapeutic Targets in Heart Failure. In *Cardiovascular Drugs and Therapy* (Vol. 34, Issue 6, pp. 849–863). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10557-020-07071-0>
- Hao, L., Lu, X., Sun, M., Li, K., Shen, L., & Wu, T. (2015). Protective effects of L-arabinose in high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats. *Food & Nutrition Research*, *59*, 28886. <https://doi.org/10.3402/fnr.v59.28886>
- Hashimoto, S., Maoka, T., Kawata, T., Mochizuki, T., Koike, T., & Shigematsu, T. (2020). Roles of Insulin Receptor Substrates (IRS) in renal function and renal hemodynamics. *PloS One*, *15*(12), e0242332. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242332>
- Hatterer, E., Shang, L., Simonet, P., Herren, S., Daubeuf, B., Teixeira, S., Reilly, J., Elson, G., Nelson, R., Gabay, C., Sokolove, J., McInnes, I. B., Kosco-Vilbois, M., Ferlin, W., Monnet, E., & De Min, C. (2016). A specific anti-citrullinated protein antibody profile identifies a group of rheumatoid arthritis patients with a toll-like receptor 4-mediated disease. *Arthritis Research & Therapy*, *18*(1), 224. <https://doi.org/10.1186/s13075-016-1128-5>
- Haybar, H., Shahrabi, S., Rezaeeyan, H., Shirzad, R., & Saki, N. (2019). Endothelial Cells: From Dysfunction Mechanism to Pharmacological Effect in Cardiovascular Disease. *Cardiovascular Toxicology*, *19*(1), 13–22. <https://doi.org/10.1007/s12012-018-9493-8>
- Hayden, M. R. (2023). Overview and New Insights into the Metabolic Syndrome: Risk Factors and Emerging Variables in the Development of Type 2 Diabetes and Cerebrocardiovascular Disease. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, *59*(3). <https://doi.org/10.3390/medicina59030561>

- Hazman, Ö., & Ovalı, S. (2015). Investigation of the anti-inflammatory effects of safranal on high-fat diet and multiple low-dose streptozotocin induced type 2 diabetes rat model. *Inflammation*, 38(3), 1012–1019. <https://doi.org/10.1007/s10753-014-0065-1>
- He, X., Jing, Z., & Cheng, G. (2014). MicroRNAs: new regulators of Toll-like receptor signalling pathways. *BioMed Research International*, 2014, 945169. <https://doi.org/10.1155/2014/945169>
- Hemalatha, T., Balachandran, C., Manohar, B. M., Nayeem, M., Subramaniam, S., Sharma, H. S., & Puvanakrishnan, R. (2010). Myocardial expression of PDECGF is associated with extracellular matrix remodeling in experimental myocardial infarction in rats. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*, 88(3), 491–503. <https://doi.org/10.1139/o09-165>
- Hernanz, R., Martínez-Revelles, S., Palacios, R., Martín, A., Cachofeiro, V., Aguado, A., García-Redondo, L., Barrús, M. T., De Batista, P. R., Briones, A. M., Salaices, M., & Alonso, M. J. (2015). Toll-like receptor 4 contributes to vascular remodelling and endothelial dysfunction in angiotensin II-induced hypertension. *British Journal of Pharmacology*, 172(12), 3159–3176. <https://doi.org/10.1111/bph.13117>
- Hernanz, Raquel, Martín, Á., Pérez-Girón, J. V, Palacios, R., Briones, A. M., Miguel, M., Salaices, M., & Alonso, M. J. (2012). Pioglitazone treatment increases COX-2-derived prostacyclin production and reduces oxidative stress in hypertensive rats: role in vascular function. *British Journal of Pharmacology*, 166(4), 1303–1319. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01825.x>
- Herradón, E., González, C., González, A., Uranga, J. A., & López-Miranda, V. (2021). Cardiovascular Toxicity Induced by Chronic Vincristine Treatment. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.692970>
- Herradón, E., González, C., Uranga, J. A., Abalo, R., Martín, M. I., & López-Miranda, V. (2017). Characterization of Cardiovascular Alterations Induced by Different Chronic Cisplatin Treatments. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 196. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00196>
- Herrmann, J. (2020). Vascular toxic effects of cancer therapies. *Nature Reviews. Cardiology*, 17(8), 503–522. <https://doi.org/10.1038/s41569-020-0347-2>
- Herrmann, J., Lerman, A., Sandhu, N. P., Villarraga, H. R., Mulvagh, S. L., & Kohli, M. (2014). Evaluation and management of patients with heart disease and cancer: cardio-oncology. *Mayo Clinic Proceedings*, 89(9), 1287–1306. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2014.05.013>
- Hirano, S., Wakazono, K., Agata, N., Iguchi, H., & Tone, H. (1994). Comparison of cardiotoxicity of pirarubicin, epirubicin and doxorubicin in the rat. *Drugs under Experimental and Clinical Research*, 20(4), 153–160.
- Holditch, S. J., Brown, C. N., Lombardi, A. M., Nguyen, K. N., & Edelstein,

- C. L. (2019). Recent advances in models, mechanisms, biomarkers, and interventions in Cisplatin-Induced acute kidney injury. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 12). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20123011>
- Hong, Y.-P., Yu, J., Su, Y.-R., Mei, F.-C., Li, M., Zhao, K.-L., Zhao, L., Deng, W.-H., Chen, C., & Wang, W.-X. (2020). High-Fat Diet Aggravates Acute Pancreatitis via TLR4-Mediated Necroptosis and Inflammation in Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 8172714. <https://doi.org/10.1155/2020/8172714>
- Hoseini, Z., Sepahvand, F., Rashidi, B., Sahebkar, A., Masoudifar, A., & Mirzaei, H. (2018). NLRP3 inflammasome: Its regulation and involvement in atherosclerosis. *Journal of Cellular Physiology*, 233(3), 2116–2132. <https://doi.org/10.1002/jcp.25930>
- Hou, L.-F., He, S.-J., Li, X., Yang, Y., He, P.-L., Zhou, Y., Zhu, F.-H., Yang, Y.-F., Li, Y., Tang, W., & Zuo, J.-P. (2011). Oral administration of artemisinin analog SM934 ameliorates lupus syndromes in MRL/lpr mice by inhibiting Th1 and Th17 cell responses. *Arthritis and Rheumatism*, 63(8), 2445–2455. <https://doi.org/10.1002/art.30392>
- Hu, D., Yang, X., Xiang, Y., Li, H., Yan, H., Zhou, J., Caudle, Y., Zhang, X., & Yin, D. (2015). Inhibition of Toll-like receptor 9 attenuates sepsis-induced mortality through suppressing excessive inflammatory response. *Cellular Immunology*, 295(2), 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2015.03.009>
- Hu, N., & Zhang, Y. (2017). TLR4 knockout attenuated high fat diet-induced cardiac dysfunction via NF- $\kappa$ B/JNK-dependent activation of autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, 1863(8), 2001–2011. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.01.010>
- Hu, S., Liu, B., Yang, M., Mao, S., Ju, H., Liu, Z., Huang, M., & Wu, G. (2023). Carnosic acid protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity through enhancing the Nrf2/HO-1 pathway. *Food & Function*, 14(8), 3849–3862. <https://doi.org/10.1039/d2fo03904d>
- Huo, Xiaowei, Sun, X., Cao, Z., Qiao, J., Yang, S., Meng, X., & Zhao, Y. (2019). Optimal ratio of 18 $\alpha$ - and 18 $\beta$ -glycyrrhizic acid for preventing alcoholic hepatitis in rats. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 18(1), 172–178. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7572>
- Huo, Xiuyue, Zhang, T., Meng, Q., Li, C., & You, B. (2019). Resveratrol Effects on a Diabetic Rat Model with Coronary Heart Disease. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 25, 540. <https://doi.org/10.12659/MSM.910996>
- Hussein. (2012). Ameliorating effect of DL- $\alpha$ -lipoic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity and cardiotoxicity in experimental animals. *Drug Discoveries & Therapeutics*. <https://doi.org/10.5582/ddt.2012.v6.3.147>
- Hussey, S. E., Liang, H., Costford, S. R., Klip, A., DeFronzo, R. A.,

- Sanchez-Avila, A., Ely, B., & Musi, N. (2012). TAK-242, a small-molecule inhibitor of Toll-like receptor 4 signalling, unveils similarities and differences in lipopolysaccharide- and lipid-induced inflammation and insulin resistance in muscle cells. *Bioscience Reports*, 33(1), 37–47. <https://doi.org/10.1042/BSR20120098>
- Ibrahim, N. A., Asalah, A. K., Ibrahim, S. S., & Elbahaie, E. S. (n.d.). CALORIC RESTRICTION OR PURSLANE EXTRACT ALLEVIATE HIGH FAT DIET EFFECTS ON THE RELEASE OF PRO-AND ANTI INFLAMMATORY CYTO-OR ADIPOKINES IN OBESE RAT.
- Illias, A. M., Yu, K.-J., Hwang, S.-H., Solis, J., Zhang, H., Velasquez, J. F., Cata, J. P., & Dougherty, P. M. (2022). Dorsal root ganglion toll-like receptor 4 signaling contributes to oxaliplatin-induced peripheral neuropathy. *Pain*, 163(5), 923–935. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002454>
- Incalza, M. A., D’Oria, R., Natalicchio, A., Perrini, S., Laviola, L., & Giorgino, F. (2018). Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascular Pharmacology*, 100, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2017.05.005>
- Ishioka, J.-I., Fujii, Y., Kageyama, Y., Fukuda, H., Higashi, Y., & Kihara, K. (2008). Cardiovascular events in survivors of high-dose chemotherapy for germ cell tumors. *International Journal of Urology : Official Journal of the Japanese Urological Association*, 15(7), 642–645. <https://doi.org/10.1111/j.1442-2042.2008.02066.x>
- Jackson, E. E., Rendina-Ruedy, E., Smith, B. J., & Lacombe, V. A. (2015). Loss of Toll-Like Receptor 4 Function Partially Protects against Peripheral and Cardiac Glucose Metabolic Derangements During a Long-Term High-Fat Diet. *PloS One*, 10(11), e0142077. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142077>
- Jahng, J. W. S., Song, E., & Sweeney, G. (2016). Crosstalk between the heart and peripheral organs in heart failure. In *Experimental and Molecular Medicine* (Vol. 48, Issue 3). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.20>
- Jaishy, B., & Abel, E. D. (2016). Thematic review series: Lipotoxicity: Many roads to cell dysfunction and cell death lipids, lysosomes, and autophagy. In *Journal of Lipid Research* (Vol. 57, Issue 9, pp. 1619–1635). American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc. <https://doi.org/10.1194/jlr.R067520>
- Janssen, J. A. M. J. L. (2023a). The Impact of Westernization on the Insulin/IGF-I Signaling Pathway and the Metabolic Syndrome: It Is Time for Change. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5). <https://doi.org/10.3390/IJMS24054551>
- Janssen, J. A. M. J. L. (2023b). The Impact of Westernization on the Insulin/IGF-I Signaling Pathway and the Metabolic Syndrome: It Is Time for Change. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5).

- <https://doi.org/10.3390/IJMS24054551>
- Jha, A. K., Gairola, S., Kundu, S., Doye, P., Syed, A. M., Ram, C., Murty, U. S., Naidu, V. G. M., & Sahu, B. D. (2021). Toll-like receptor 4: An attractive therapeutic target for acute kidney injury. *Life Sciences*, *271*, 119155. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119155>
- Jia, L., Vianna, C. R., Fukuda, M., Berglund, E. D., Liu, C., Tao, C., Sun, K., Liu, T., Harper, M. J., Lee, C. E., Lee, S., Scherer, P. E., & Elmquist, J. K. (2014). Hepatocyte Toll-like receptor 4 regulates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nature Communications*, *5*, 3878. <https://doi.org/10.1038/ncomms4878>
- Jiang, S., Zhang, H., Li, X., Yi, B., Huang, L., Hu, Z., Li, A., Du, J., Li, Y., & Zhang, W. (2021). Vitamin D/VDR attenuate cisplatin-induced AKI by down-regulating NLRP3/Caspase-1/GSDMD pyroptosis pathway. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *206*, 105789. <https://doi.org/10.1016/J.JSBMB.2020.105789>
- Jiang, Y., SHAN, S., GAN, T., ZHANG, X., LU, X., HU, H., WU, Y., SHENG, J., & YANG, J. (2014). Effects of cisplatin on the contractile function of thoracic aorta of Sprague-Dawley rats. *Biomedical Reports*, *2*(6), 893–897. <https://doi.org/10.3892/BR.2014.349/HTML>
- Jing, T., Liao, J., Shen, K., Chen, X., Xu, Z., Tian, W., Wang, Y., Jin, B., & Pan, H. (2019). Protective effect of urolithin a on cisplatin-induced nephrotoxicity in mice via modulation of inflammation and oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, *129*, 108–114. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2019.04.031>
- Joyce, T., Chirino, Y. I., Natalia, M.-T., & Jose, P.-C. (2018). Renal damage in the metabolic syndrome (MetSx): Disorders implicated. *European Journal of Pharmacology*, *818*, 554–568. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.11.032>
- Juarez, E., Tufiño, C., Querejeta, E., Bracho-Valdes, I., & Bobadilla-Lugo, R. A. (2017). Evidence of changes in alpha-1/AT1 receptor function generated by diet-induced obesity. *Diabetes & Vascular Disease Research*, *14*(6), 485–493. <https://doi.org/10.1177/1479164117722069>
- Jurga, A. M., Rojewska, E., Makuch, W., & Mika, J. (2018). Lipopolysaccharide from *Rhodobacter sphaeroides* (TLR4 antagonist) attenuates hypersensitivity and modulates nociceptive factors. *Pharmaceutical Biology*, *56*(1), 275–286. <https://doi.org/10.1080/13880209.2018.1457061>
- Jurga, A. M., Rojewska, E., Piotrowska, A., Makuch, W., Pilat, D., Przewlocka, B., & Mika, J. (2016). Blockade of Toll-Like Receptors (TLR2, TLR4) Attenuates Pain and Potentiates Buprenorphine Analgesia in a Rat Neuropathic Pain Model. *Neural Plasticity*, *2016*, 5238730. <https://doi.org/10.1155/2016/5238730>
- Kaesler, N., Babler, A., Floege, J., & Kramann, R. (2020). Cardiac

- Remodeling in Chronic Kidney Disease. *Toxins*, 12(3).  
<https://doi.org/10.3390/toxins12030161>
- Kajiwara, K., Takata, S., To, T. T., Takara, K., Hatakeyama, Y., Tamaoki, S., Darveau, R. P., Ishikawa, H., & Sawa, Y. (2017). The promotion of nephropathy by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide via toll-like receptors. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 9, 73.  
<https://doi.org/10.1186/s13098-017-0271-8>
- Karabay, K. O., Yildiz, O., & Aytakin, V. (2014). Multiple coronary thrombi with cisplatin. *The Journal of Invasive Cardiology*, 26(2), E18-20.
- Karan, D. (2018). Inflammasomes: Emerging Central Players in Cancer Immunology and Immunotherapy. In *Frontiers in immunology* (Vol. 9, p. 3028). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03028>
- Kashani, B., Zandi, Z., Karimzadeh, M. R., Bashash, D., Nasrollahzadeh, A., & Ghaffari, S. H. (2019). Blockade of TLR4 using TAK-242 (resatorvid) enhances anti-cancer effects of chemotherapeutic agents: a novel synergistic approach for breast and ovarian cancers. *Immunologic Research*, 67(6), 505–516.  
<https://doi.org/10.1007/s12026-019-09113-8>
- Kaur, D., Tiwana, H., Stino, A., & Sandroni, P. (2021). Autonomic neuropathies. *Muscle & Nerve*, 63(1), 10–21.  
<https://doi.org/10.1002/MUS.27048>
- Khedr, M., Barakat, N., Mohey El-Deen, I., & Zahran, F. (2022). Impact of preconditioning stem cells with all-trans retinoic acid signaling pathway on cisplatin-induced nephrotoxicity by down-regulation of TGFβ1, IL-6, and caspase-3 and up-regulation of HIF1α and VEGF. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(2), 831–839.  
<https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2021.10.024>
- Kim, W.-U., Yoo, S.-A., Min, S.-Y., Park, S.-H., Koh, H.-S., Song, S.-W., & Cho, C.-S. (2006). Hydroxychloroquine potentiates Fas-mediated apoptosis of rheumatoid synoviocytes. *Clinical and Experimental Immunology*, 144(3), 503–511. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03070.x>
- Korac, B., Kalezic, A., Pekovic-Vaughan, V., Korac, A., & Jankovic, A. (2021). Redox changes in obesity, metabolic syndrome, and diabetes. *Redox Biology*, 42. <https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2021.101887>
- Kounis, N. G., Cervellin, G., & Lippi, G. (2016). Cisplatin-induced bradycardia: Cardiac toxicity or cardiac hypersensitivity and Kounis syndrome? In *International journal of cardiology* (Vol. 202, pp. 817–818). <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.10.027>
- Kramer, B., França, L. M., Zhang, Y., Paes, A. M. de A., Gerdes, A. M., & Carrillo-Sepulveda, M. A. (2018). Western diet triggers Toll-like receptor 4 signaling-induced endothelial dysfunction in female Wistar rats. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 315(6), H1735–H1747.  
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00218.2018>

- Krüger-Genge, A., Blocki, A., Franke, R. P., & Jung, F. (2019). Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18). <https://doi.org/10.3390/IJMS20184411>
- Kubyshevkin, A., Shevandova, A., Petrenko, V., Fomochkina, I., Sorokina, L., Kucherenko, A., Gordienko, A., Khimich, N., Zyablitskaya, E., Makalish, T., Aliev, L., Kornienko, N., & Fomochkin, I. (2020). Anti-inflammatory and antidiabetic effects of grape-derived stilbene concentrate in the experimental metabolic syndrome. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, 19(2), 1205–1214. <https://doi.org/10.1007/s40200-020-00626-w>
- Kucharz, J., Michalowska-Kaczmarczyk, A., Zygulska, A. L., Wojtak, J., Pawlik, W., Herman, R. M., & Krzemieniecki, K. (2016). Bradycardia as a rare symptom of cisplatin cardiotoxicity: A case report. *Oncology Letters*, 11(3), 2297–2299. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4195>
- Kumar, V., Abbas, A. K., & Aster, J. C. (2015). *Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional*. Elsevier Health Sciences Spain - T. [https://brain.urjc.es/primo-explore/fulldisplay?docid=34URJC\\_ALMA2150383340004216&context=L&vid=34URJC\\_VU1&lang=es\\_ES&search\\_scope=TAB1\\_SCOPE1&adaptor=LocalSearchEngine&isFrbr=true&tab=tab1&query=any,contains,patologiaestructuralyfuncional&sortby=date&facet=frbrgroupid,include,98165196&offset=0](https://brain.urjc.es/primo-explore/fulldisplay?docid=34URJC_ALMA2150383340004216&context=L&vid=34URJC_VU1&lang=es_ES&search_scope=TAB1_SCOPE1&adaptor=LocalSearchEngine&isFrbr=true&tab=tab1&query=any,contains,patologiaestructuralyfuncional&sortby=date&facet=frbrgroupid,include,98165196&offset=0)
- Kumar, V., Abbas, A. K., Aster, J. C., & Perkins, J. A. (2021). Robbins y Cotran, patología estructural y funcional. In V. Kumar, A. K. Abbas, & J. C. Aster (Eds.), *Elsevier Wordmark*. <https://www.elsevier.com/books/robbins-y-cotran-patologia-estructural-y-funcional/kumar/978-84-9113-911-9>
- Kuno, M., Nemoto, K., Ninomiya, N., Inagaki, E., Kubota, M., Matsumoto, T., & Yokota, H. (2009). The novel selective toll-like receptor 4 signal transduction inhibitor tak-242 prevents endotoxaemia in conscious Guinea-pigs. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 36(5–6), 589–593. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2008.05121.x>
- Kunz, M., Götzinger, F., Emrich, I., Schwenger, V., Böhm, M., & Mahfoud, F. (2022). Cardio-renal interaction - Clinical trials update 2022. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases : NMCD*, 32(11), 2451–2458. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2022.07.002>
- Kursunluoglu, G., Taskiran, D., & Kayali, H. A. (2018). The Investigation of the Antitumor Agent Toxicity and Capsaicin Effect on the Electron Transport Chain Enzymes, Catalase Activities and Lipid Peroxidation Levels in Lung, Heart and Brain Tissues of Rats. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(12). <https://doi.org/10.3390/molecules23123267>
- Kuznik, A., Bencina, M., Svajger, U., Jeras, M., Rozman, B., & Jerala, R. (2011). Mechanism of endosomal TLR inhibition by antimalarial drugs and imidazoquinolines. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. :*

- 1950), 186(8), 4794–4804. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000702>
- Lacolley, P., Regnault, V., Segers, P., & Laurent, S. (2017). Vascular Smooth Muscle Cells and Arterial Stiffening: Relevance in Development, Aging, and Disease. *Physiological Reviews*, 97(4), 1555–1617. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00003.2017>
- Lahera, V. (2018). GRASA EPICÁRDICA Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR. *Clínica e Investigación En Arteriosclerosis*, 30(3), 118–119. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2018.05.001>
- Lakkis, J. I., & Weir, M. R. (2018). Obesity and Kidney Disease. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 61(2), 157–167. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2018.07.005>
- Lenneman, C. G., & Sawyer, D. B. (2016). Cardio-Oncology: An Update on Cardiotoxicity of Cancer-Related Treatment. *Circulation Research*, 118(6), 1008–1020. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.303633>
- Lesiak, A., Narbutt, J., Sysa-Jedrzejowska, A., Lukamowicz, J., McCauliffe, D. P., & Wóznicka, A. (2010). Effect of chloroquine phosphate treatment on serum MMP-9 and TIMP-1 levels in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 19(6), 683–688. <https://doi.org/10.1177/0961203309356455>
- Li, L., Tang, W., & Yi, F. (2019). Role of Inflammasome in Chronic Kidney Disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1165, 407–421. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-8871-2\\_19](https://doi.org/10.1007/978-981-13-8871-2_19)
- Li, Yan, Adamek, P., Zhang, H., Tatsui, C. E., Rhines, L. D., Mrozkova, P., Li, Q., Kosturakis, A. K., Cassidy, R. M., Harrison, D. S., Cata, J. P., Sapire, K., Zhang, H., Kennamer-Chapman, R. M., Jawad, A. B., Ghetti, A., Yan, J., Palecek, J., & Dougherty, P. M. (2015). The Cancer Chemotherapeutic Paclitaxel Increases Human and Rodent Sensory Neuron Responses to TRPV1 by Activation of TLR4. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 35(39), 13487–13500. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1956-15.2015>
- Li, Yan, Marri, T., North, R. Y., Rhodes, H. R., Uhelski, M. L., Tatsui, C. E., Rhines, L. D., Rao, G., Corrales, G., Abercrombie, T. J., Johansson, C. A., & Dougherty, P. M. (2021). Chemotherapy-induced peripheral neuropathy in a dish: dorsal root ganglion cells treated in vitro with paclitaxel show biochemical and physiological responses parallel to that seen in vivo. *Pain*, 162(1), 84–96. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002005>
- Li, Yan, Zhang, H., Kosturakis, A. K., Cassidy, R. M., Zhang, H., Kennamer-Chapman, R. M., Jawad, A. B., Colomand, C. M., Harrison, D. S., & Dougherty, P. M. (2015). MAPK signaling downstream to TLR4 contributes to paclitaxel-induced peripheral neuropathy. *Brain, Behavior, and Immunity*, 49, 255–266. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.06.003>

- Li, Yanping, Schoufour, J., Wang, D. D., Dhana, K., Pan, A., Liu, X., Song, M., Liu, G., Shin, H. J., Sun, Q., Al-Shaar, L., Wang, M., Rimm, E. B., Hertzmark, E., Stampfer, M. J., Willett, W. C., Franco, O. H., & Hu, F. B. (2020). Healthy lifestyle and life expectancy free of cancer, cardiovascular disease, and type 2 diabetes: Prospective cohort study. *The BMJ*, 368. <https://doi.org/10.1136/bmj.l6669>
- Li, Yue, Klein, C., & Kotlarz, D. (2020). Dysregulation of Cell Death in Human Chronic Inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 12(7), 1–20. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A037036>
- Liang, C.-F., Liu, J. T., Wang, Y., Xu, A., & Vanhoutte, P. M. (2013). Toll-like receptor 4 mutation protects obese mice against endothelial dysfunction by decreasing NADPH oxidase isoforms 1 and 4. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(4), 777–784. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.301087>
- Liang, H., Liu, H. Z., Wang, H. B., Zhong, J. Y., Yang, C. X., & Zhang, B. (2017). Dexmedetomidine protects against cisplatin-induced acute kidney injury in mice through regulating apoptosis and inflammation. *Inflammation Research*, 66(5), 399–411. <https://doi.org/10.1007/s00011-017-1023-9>
- Liang, Y., Zhou, H. F., Tong, M., Chen, L., Ren, K., & Zhao, G. J. (2019). Colchicine inhibits endothelial inflammation via NLRP3/CRP pathway. In *International Journal of Cardiology* (Vol. 294, p. 55). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2019.06.070>
- Liao, P. C., Lai, M. H., Hsu, K. P., Kuo, Y. H., Chen, J., Tsai, M. C., Li, C. X., Yin, X. J., Jeyashoke, N., & Chao, L. K. P. (2018). Identification of  $\beta$ -Sitosterol as in Vitro Anti-Inflammatory Constituent in *Moringa oleifera*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(41), 10748–10759. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04555>
- Lima, C. X., Souza, D. G., Amaral, F. A., Fagundes, C. T., Rodrigues, I. P. S., Alves-Filho, J. C., Kosco-Vilbois, M., Ferlin, W., Shang, L., Elson, G., & Teixeira, M. M. (2015). Therapeutic Effects of Treatment with Anti-TLR2 and Anti-TLR4 Monoclonal Antibodies in Polymicrobial Sepsis. *PLoS One*, 10(7), e0132336. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132336>
- Liu, P., Zhang, Z., & Li, Y. (2021). Relevance of the Pyroptosis-Related Inflammasome Pathway in the Pathogenesis of Diabetic Kidney Disease. *Frontiers in Immunology*, 12, 603416. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.603416>
- Loader, J., Khouri, C., Taylor, F., Stewart, S., Lorenzen, C., Cracowski, J. L., Walther, G., & Roustit, M. (2019). The continuums of impairment in vascular reactivity across the spectrum of cardiometabolic health: A systematic review and network meta-analysis. In *Obesity Reviews* (Vol. 20, Issue 6, pp. 906–920). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/obr.12831>

- Löffler, B. M., Bohn, E., Hesse, B., & Kunze, H. (1985). Effects of antimalarial drugs on phospholipase A and lysophospholipase activities in plasma membrane, mitochondrial, microsomal and cytosolic subcellular fractions of rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta*, 835(3), 448–455. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(85\)90114-6](https://doi.org/10.1016/0005-2760(85)90114-6)
- Loiarro, M., Capolunghi, F., Fantò, N., Gallo, G., Campo, S., Arseni, B., Carsetti, R., Carminati, P., De Santis, R., Ruggiero, V., & Sette, C. (2007). Pivotal Advance: Inhibition of MyD88 dimerization and recruitment of IRAK1 and IRAK4 by a novel peptidomimetic compound. *Journal of Leukocyte Biology*, 82(4), 801–810. <https://doi.org/10.1189/jlb.1206746>
- López-Miranda, V., Herradón, E., Dannert, M. T., Alsasua, A., & Martín, M. I. (2004). Anandamide vehicles: a comparative study. *European Journal of Pharmacology*, 505(1–3), 151–161. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.10.017>
- López-Tofiño, Y., Vera, G., López-Gómez, L., Girón, R., Nurgali, K., Uranga, J. A., & Abalo, R. (2021). Effects of the food additive monosodium glutamate on cisplatin-induced gastrointestinal dysmotility and peripheral neuropathy in the rat. *Neurogastroenterology & Motility*, 33(4), e14020. <https://doi.org/10.1111/NMO.14020>
- Lucas, K., & Maes, M. (2013a). Role of the toll like receptor (TLR) radical cycle in chronic inflammation: Possible treatments targeting the TLR4 pathway. In *Molecular Neurobiology* (Vol. 48, Issue 1, pp. 190–204). Humana Press Inc. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8425-7>
- Lucas, K., & Maes, M. (2013b). Role of the Toll Like receptor (TLR) radical cycle in chronic inflammation: possible treatments targeting the TLR4 pathway. *Molecular Neurobiology*, 48(1), 190–204. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8425-7>
- Lykkesfeldt, J. (2007). Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clinica Chimica Acta*, 380(1), 50–58. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.01.028>
- Lyon, A. R., López-Fernández, T., Couch, L. S., Asteggiano, R., Aznar, M. C., Bergler-Klein, J., Boriani, G., Cardinale, D., Cordoba, R., Cosyns, B., Cutter, D. J., de Azambuja, E., de Boer, R. A., Dent, S. F., Farmakis, D., Gevaert, S. A., Gorog, D. A., Herrmann, J., Lenihan, D., ... van der Pal, H. J. H. (2022). 2022 ESC Guidelines on cardio-oncology developed in collaboration with the European Hematology Association (EHA), the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology (ESTRO) and the International Cardio-Oncology Society (IC-OS). *European Heart Journal*, 43(41), 4229–4361. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehac244>
- Ma, C.-H., Kang, L.-L., Ren, H.-M., Zhang, D.-M., & Kong, L.-D. (2015). Simiao pill ameliorates renal glomerular injury via increasing Sirt1 expression and suppressing NF- $\kappa$ B/NLRP3 inflammasome activation

- in high fructose-fed rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 172, 108–117. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.06.015>
- Ma, H., Jones, K. R., Guo, R., Xu, P., Shen, Y., & Ren, J. (2010). Cisplatin compromises myocardial contractile function and mitochondrial ultrastructure: role of endoplasmic reticulum stress. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 37(4), 460–465. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2009.05323.x>
- Ma, X., Yan, L., Zhu, Q., & Shao, F. (2017). Puerarin attenuates cisplatin-induced rat nephrotoxicity: The involvement of TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway. *PloS One*, 12(2), e0171612. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171612>
- MacDowell, K. S., Caso, J. R., Martín-Hernández, D., Madrigal, J. L., Leza, J. C., & García-Bueno, B. (2014). Paliperidone prevents brain toll-like receptor 4 pathway activation and neuroinflammation in rat models of acute and chronic restraint stress. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 18(3). <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyu070>
- Madeddu, C., Deidda, M., Piras, A., Cadeddu, C., Demurtas, L., Puzzone, M., Piscopo, G., Scartozzi, M., & Mercurio, G. (2016). Pathophysiology of cardiotoxicity induced by nonanthracycline chemotherapy. *Journal of Cardiovascular Medicine*, 17, e12–e18. <https://doi.org/10.2459/JCM.0000000000000376>
- Maihöfner, C., Diel, I., Tesch, H., Quandt, T., & Baron, R. (2021). Chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN): current therapies and topical treatment option with high-concentration capsaicin. *Supportive Care in Cancer: Official Journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer*, 29(8), 4223–4238. <https://doi.org/10.1007/s00520-021-06042-x>
- Malvezzi, M., Carioli, G., Bertuccio, P., Boffetta, P., Levi, F., La Vecchia, C., & Negri, E. (2019). European cancer mortality predictions for the year 2019 with focus on breast cancer. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 30(5), 781–787. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz051>
- Mangan, M. S. J., Olhava, E. J., Roush, W. R., Seidel, H. M., Glick, G. D., & Latz, E. (2018). Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 17(8), 588–606. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.97>
- Mann, D. L. (2015). Innate immunity and the failing heart: The cytokine hypothesis revisited. In *Circulation Research* (Vol. 116, Issue 7, pp. 1254–1268). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.302317>
- Manzoor, M. F., Arif, Z., Kabir, A., Mehmood, I., Munir, D., Razzaq, A., Ali, A., Goksen, G., Coşier, V., Ahmad, N., Ali, M., & Rusu, A. (2022). Oxidative stress and metabolic diseases: Relevance and therapeutic strategies. *Frontiers in Nutrition*, 9, 994309. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.994309>

- Marques, C., Meireles, M., Norberto, S., Leite, J., Freitas, J., Pestana, D., Faria, A., & Calhau, C. (2015). High-fat diet-induced obesity Rat model: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley Rat. *Https://Doi.Org/10.1080/21623945.2015.1061723*, 5(1), 11–21. <https://doi.org/10.1080/21623945.2015.1061723>
- Martin-Cordero, L., Garcia, J. J., Giraldo, E., De la Fuente, M., Manso, R., & Ortega, E. (2009). Influence of exercise on the circulating levels and macrophage production of IL-1beta and IFNgamma affected by metabolic syndrome: an obese Zucker rat experimental animal model. *European Journal of Applied Physiology*, 107(5), 535–543. <https://doi.org/10.1007/S00421-009-1140-4>
- Matias, A. M., Coelho, P. M., Marques, V. B., dos Santos, L., de Assis, A. L. E. M., Nogueira, B. V., Lima-Leopoldo, A. P., & Leopoldo, A. S. (2020). Hypercaloric diet models do not develop heart failure, but the excess sucrose promotes contractility dysfunction. *PloS One*, 15(2). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0228860>
- Matsumoto, T., Takayanagi, K., Kojima, M., Taguchi, K., & Kobayashi, T. (2020). Toll-Like Receptor 4 Inhibitor TAK-242 Augments Acetylcholine-Induced Relaxation in Superior Mesenteric Arteries of the Streptozotocin-Induced Diabetic Rat. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 43(8), 1283–1287. <https://doi.org/10.1248/bpb.b20-00328>
- Matsunaga, N., Tsuchimori, N., Matsumoto, T., & Ii, M. (2011). TAK-242 (resatorvid), a small-molecule inhibitor of Toll-like receptor (TLR) 4 signaling, binds selectively to TLR4 and interferes with interactions between TLR4 and its adaptor molecules. *Molecular Pharmacology*, 79(1), 34–41. <https://doi.org/10.1124/mol.110.068064>
- Mazurek, J. A., & Jessup, M. (2017). Understanding Heart Failure. *Heart Failure Clinics*, 13(1), 1–19. <https://doi.org/10.1016/J.HFC.2016.07.001>
- McCarthy, C. G., Wenceslau, C. F., Goulopoulou, S., Ogbi, S., Baban, B., Sullivan, J. C., Matsumoto, T., & Webb, R. C. (2015). Circulating mitochondrial DNA and Toll-like receptor 9 are associated with vascular dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovascular Research*, 107(1), 119–130. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv137>
- McCauley, M. E., & Baloh, R. H. (2019). Inflammation in ALS/FTD pathogenesis. *Acta Neuropathologica*, 137(5), 715–730. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1933-9>
- Melo, B. F., Sacramento, J. F., Ribeiro, M. J., Prego, C. S., Correia, M. C., Coelho, J. C., Cunha-Guimaraes, J. P., Rodrigues, T., Martins, I. B., Guarino, M. P., Seica, R. M., Matafome, P., & Conde, S. V. (2019). Evaluating the Impact of Different Hypercaloric Diets on Weight Gain, Insulin Resistance, Glucose Intolerance, and its Comorbidities in Rats. *Nutrients*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/NU11061197>
- Meng, G., Rutz, M., Schiemann, M., Metzger, J., Grabiec, A., Schwandner,

- R., Luppa, P. B., Ebel, F., Busch, D. H., Bauer, S., Wagner, H., & Kirschning, C. J. (2004). Antagonistic antibody prevents toll-like receptor 2-driven lethal shock-like syndromes. *The Journal of Clinical Investigation*, *113*(10), 1473–1481. <https://doi.org/10.1172/JCI20762>
- Meng, H., Fu, G., Shen, J., Shen, K., Xu, Z., Wang, Y., Jin, B., & Pan, H. (2017). Ameliorative Effect of Daidzein on Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Mice via Modulation of Inflammation, Oxidative Stress, and Cell Death. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2017*. <https://doi.org/10.1155/2017/3140680>
- Menna, P., Salvatorelli, E., & Minotti, G. (2008). Cardiotoxicity of antitumor drugs. *Chemical Research in Toxicology*, *21*(5), 978–989. <https://doi.org/10.1021/tx800002r>
- Methe, H., Kim, J.-O., Kofler, S., Nabauer, M., & Weis, M. (2005). Statins decrease Toll-like receptor 4 expression and downstream signaling in human CD14+ monocytes. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *25*(7), 1439–1445. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000168410.44722.86>
- Mian, M. O. R., He, Y., Bertagnolli, M., Mai-Vo, T.-A., Fernandes, R. O., Boudreau, F., Cloutier, A., Luu, T. M., & Nuyt, A. M. (2019). TLR (Toll-Like Receptor) 4 Antagonism Prevents Left Ventricular Hypertrophy and Dysfunction Caused by Neonatal Hyperoxia Exposure in Rats. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, *74*(4), 843–853. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.13022>
- Michel, H. E., & Menze, E. T. (2019). Tetramethylpyrazine guards against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats through inhibiting HMGB1/TLR4/NF-κB and activating Nrf2 and PPAR-γ signaling pathways. *European Journal of Pharmacology*, *857*. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172422>
- Miller, R. P., Tadagavadi, R. K., Ramesh, G., & Reeves, W. B. (2010). Mechanisms of Cisplatin nephrotoxicity. *Toxins*, *2*(11), 2490–2518. <https://doi.org/10.3390/toxins2112490>
- Mishra, V., & Pathak, C. (2019). Human Toll-Like Receptor 4 (hTLR4): Structural and functional dynamics in cancer. In *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 122, pp. 425–451). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.142>
- Miyoshi, T., & Ito, H. (2021). Arterial stiffness in health and disease: The role of cardio-ankle vascular index. *Journal of Cardiology*, *78*(6), 493–501. <https://doi.org/10.1016/J.JJCC.2021.07.011>
- Mohammad, B. I., Raheem, A. K., Hadi, N. R., Jamil, D. A., & Al-Aubaidy, H. A. (2018). Reno-protective effects of TAK-242 on acute kidney injury in a rat model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *503*(1), 304–308. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.06.020>
- Molteni, M., Bosi, A., & Rossetti, C. (2018). Natural Products with Toll-Like Receptor 4 Antagonist Activity. *International Journal of Inflammation*,

2018. <https://doi.org/10.1155/2018/2859135>
- Moreno-Fernández, S., Garcés-Rimón, M., Vera, G., Astier, J., Landrier, J. F., & Miguel, M. (2018). High fat/high glucose diet induces metabolic syndrome in an experimental rat model. *Nutrients*, *10*(10). <https://doi.org/10.3390/nu10101502>
- Moser, V. A., Uchoa, M. F., & Pike, C. J. (2018). TLR4 inhibitor TAK-242 attenuates the adverse neural effects of diet-induced obesity. *Journal of Neuroinflammation*, *15*(1), 306. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1340-0>
- Mowry, F. E., Peadar, S. C., Stern, J. E., & Biancardi, V. C. (2021). TLR4 and AT1R mediate blood-brain barrier disruption, neuroinflammation, and autonomic dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacological Research*, *174*, 105877. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105877>
- Mugica, J. R. E., Martínez, A. B., Becerril, O. A. A., Rojo, F. E., Castellanos, M. Á., & Ubaldo-Reyes, L. M. (2022). Modelos animales en el estudio del síndrome metabólico. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, *24*(1).
- Mullarkey, M., Rose, J. R., Bristol, J., Kawata, T., Kimura, A., Kobayashi, S., Przetak, M., Chow, J., Gusovsky, F., Christ, W. J., & Rossignol, D. P. (2003). Inhibition of endotoxin response by e5564, a novel Toll-like receptor 4-directed endotoxin antagonist. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *304*(3), 1093–1102. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.044487>
- Muller, C. R., Williams, A. T., Eaker, A. M., Santos, F. Dos, Palmer, A. F., & Cabrales, P. (2021). High fat high sucrose diet-induced dyslipidemia in guinea pigs. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, *130*(4), 1226–1234. <https://doi.org/10.1152/JAPPLPHYSIOL.00013.2021>
- Mulvany, M. J., & Halpern, W. (1977). Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circulation Research*, *41*(1), 19–26. <https://doi.org/10.1161/01.res.41.1.19>
- Najafi, A., Pourfarzam, M., & Zadhoush, F. (2021). Oxidant/antioxidant status in Type-2 diabetes mellitus patients with metabolic syndrome. *Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences*, *26*(1). [https://doi.org/10.4103/JRMS.JRMS\\_249\\_20](https://doi.org/10.4103/JRMS.JRMS_249_20)
- Nakamura, M., Shimizu, Y., Sato, Y., Miyazaki, Y., Satoh, T., Mizuno, M., Kato, Y., Hosaka, Y., & Furusako, S. (2007). Toll-like receptor 4 signal transduction inhibitor, M62812, suppresses endothelial cell and leukocyte activation and prevents lethal septic shock in mice. *European Journal of Pharmacology*, *569*(3), 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.05.013>
- Newsholme, P., Keane, K. N., Carlessi, R., & Cruzat, V. (2019). Oxidative

- stress pathways in pancreatic  $\beta$ -cells and insulin-sensitive cells and tissues: importance to cell metabolism, function, and dysfunction. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 317(3), C420–C433. <https://doi.org/10.1152/AJPCELL.00141.2019>
- Nguyen, T. D., & Schulze, P. C. (2023). Cardiac Metabolism in Heart Failure and Implications for Uremic Cardiomyopathy. *Circulation Research*, 132(8), 1034–1049. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.123.321759>
- Nikolopoulou, A., & Kadoglou, N. P. E. (2012). Obesity and metabolic syndrome as related to cardiovascular disease. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 10(7), 933–939. <https://doi.org/10.1586/erc.12.74>
- Novelli, E. L. B., Diniz, Y. S., Galhardi, C. M., Ebaid, G. M. X., Rodrigues, H. G., Mani, F., Fernandes, A. A. H., Cicogna, A. C., & Novelli Filho, J. L. V. B. (2007). Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Laboratory Animals*, 41(1), 111–119. <https://doi.org/10.1258/002367707779399518>
- Nozaki, Y., Kinoshita, K., Yano, T., Asato, K., Shiga, T., Hino, S., Niki, K., Nagare, Y., Kishimoto, K., Shimazu, H., Funauchi, M., & Matsumura, I. (2012). Signaling through the interleukin-18 receptor  $\alpha$  attenuates inflammation in cisplatin-induced acute kidney injury. *Kidney International*, 82(8), 892–902. <https://doi.org/10.1038/KI.2012.226>
- Nunes, K. P., de Oliveira, A. A., Szasz, T., Biancardi, V. C., & Webb, R. C. (2018). Blockade of Toll-Like Receptor 4 Attenuates Erectile Dysfunction in Diabetic Rats. *The Journal of Sexual Medicine*, 15(9), 1235–1245. <https://doi.org/10.1016/j.jsxm.2018.07.005>
- O'Connell, R. M., Kahn, D., Gibson, W. S. J., Round, J. L., Scholz, R. L., Chaudhuri, A. A., Kahn, M. E., Rao, D. S., & Baltimore, D. (2010). MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development. *Immunity*, 33(4), 607–619. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.09.009>
- Obadia, N., Andrade, G., Leardini-Tristão, M., Albuquerque, L., Garcia, C., Lima, F., Daleprane, J., Castro-Faria-Neto, H. C., Tibiriçá, E., & Estado, V. (2022). TLR4 mutation protects neurovascular function and cognitive decline in high-fat diet-fed mice. *Journal of Neuroinflammation*, 19(1), 104. <https://doi.org/10.1186/s12974-022-02465-3>
- Oladiran, O., Shi, X. Q., Yang, M., Fournier, S., & Zhang, J. (2021). Inhibition of TLR4 signaling protects mice from sensory and motor dysfunction in an animal model of autoimmune peripheral neuropathy. *Journal of Neuroinflammation*, 18(1), 77. <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02126-x>
- Oltman, C. L., Coppey, L. J., Gellert, J. S., Davidson, E. P., Lund, D. D., & Yorek, M. A. (2005). Progression of vascular and neural dysfunction in sciatic nerves of Zucker diabetic fatty and Zucker rats. *American*

- Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 289(1), E113-22. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00594.2004>
- Ono, Y., Maejima, Y., Saito, M., Sakamoto, K., Horita, S., Shimomura, K., Inoue, S., & Kotani, J. (2020). TAK-242, a specific inhibitor of Toll-like receptor 4 signalling, prevents endotoxemia-induced skeletal muscle wasting in mice. *Scientific Reports*, 10(1), 694. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57714-3>
- Oo, T. T., Pratchayasakul, W., Chattipakorn, N., & Chattipakorn, S. C. (2020). Potential Roles of Myeloid Differentiation Factor 2 on Neuroinflammation and Its Possible Interventions. *Molecular Neurobiology*, 57(11), 4825–4844. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02066-2>
- Oo, T. T., Pratchayasakul, W., Chattipakorn, N., & Chattipakorn, S. C. (2022). Emerging roles of toll-like receptor 4 in chemotherapy-induced neurotoxicity. *Neurotoxicology*, 93, 112–127. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2022.09.006>
- Opal, S. M., Laterre, P.-F., Francois, B., LaRosa, S. P., Angus, D. C., Mira, J.-P., Wittebole, X., Dugernier, T., Perrotin, D., Tidswell, M., Jauregui, L., Krell, K., Pachel, J., Takahashi, T., Peckelsen, C., Cordasco, E., Chang, C.-S., Oeyen, S., Aikawa, N., ... Vincent, J.-L. (2013). Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial. *JAMA*, 309(11), 1154–1162. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.2194>
- Otani, H. (2011). Oxidative stress as pathogenesis of cardiovascular risk associated with metabolic syndrome. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(7), 1911–1926. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3739>
- Ozaki, E., Campbell, M., & Doyle, S. L. (2015). Targeting the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases: Current perspectives. In *Journal of Inflammation Research* (Vol. 8, pp. 15–27). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/JIR.S51250>
- Ozkok, A., & Edelstein, C. L. (2014). Pathophysiology of cisplatin-induced acute kidney injury. In *BioMed Research International* (Vol. 2014). Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2014/967826>
- Pai, V. B., & Nahata, M. C. (2000). Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents: incidence, treatment and prevention. *Drug Safety*, 22(4), 263–302. <https://doi.org/10.2165/00002018-200022040-00002>
- Pajkrt, D., Doran, J. E., Koster, F., Lerch, P. G., Arnet, B., van der Poll, T., ten Cate, J. W., & van Deventer, S. J. (1996). Antiinflammatory effects of reconstituted high-density lipoprotein during human endotoxemia. *The Journal of Experimental Medicine*, 184(5), 1601–1608. <https://doi.org/10.1084/jem.184.5.1601>
- Palachai, N., Wattanathorn, J., Muchimapura, S., & Thukham-Mee, W. (2019). Antimetabolic Syndrome Effect of Phytosome Containing the Combined Extracts of Mulberry and Ginger in an Animal Model of Metabolic Syndrome. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*,

- 2019, 5972575. <https://doi.org/10.1155/2019/5972575>
- Pan, Y., Jia, T., Zhang, Y., Zhang, K., Zhang, R., Li, J., & Wang, L. (2012). MS2 VLP-based delivery of microRNA-146a inhibits autoantibody production in lupus-prone mice. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 5957–5967. <https://doi.org/10.2147/IJN.S37990>
- Panchal, S. K., Poudyal, H., Iyer, A., Nazer, R., Alam, A., Diwan, V., Kauter, K., Sernia, C., Campbell, F., Ward, L., Gobe, G., Fenning, A., & Brown, L. (2011a). High-carbohydrate high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 57(1), 51–64. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e3181feb90a>
- Panchal, S. K., Poudyal, H., Iyer, A., Nazer, R., Alam, A., Diwan, V., Kauter, K., Sernia, C., Campbell, F., Ward, L., Gobe, G., Fenning, A., & Brown, L. (2011b). High-carbohydrate high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 57(1), 51–64. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e3181feb90a>
- Panchal, S. K., Wong, W. Y., Kauter, K., Ward, L. C., & Brown, L. (2012). Caffeine attenuates metabolic syndrome in diet-induced obese rats. *Nutrition*, 28(10), 1055–1062. <https://doi.org/10.1016/J.NUT.2012.02.013>
- Paniagua, N., Goicoechea, C., Abalo, R., López-Miranda, V., Vela, J. M., Merlos, M., Martín Fontelles, M. I., & Girón, R. (2019). May a sigma-1 antagonist improve neuropathic signs induced by cisplatin and vincristine in rats? *European Journal of Pain (United Kingdom)*, 23(3), 603–620. <https://doi.org/10.1002/EJP.1333>
- Parizadeh, S. M., Ghandehari, M., Heydari-majd, M., Seifi, S., Mardani, R., Parizadeh, S. M., Ghayour-Mobarhan, M., Ferns, G. A., Hassanian, S. M., & Avan, A. (2018). Toll-like Receptors Signaling Pathways as a Potential Therapeutic Target in Cardiovascular Disease. *Current Pharmaceutical Design*, 24(17), 1887–1898. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180614090224>
- Pauletto, M., Giantin, M., Tolosi, R., Bassan, I., Barbarossa, A., Zaghini, A., & Dacasto, M. (2020). Curcumin mitigates a<sub>1</sub>b<sub>1</sub>-induced hepatic toxicity by triggering cattle antioxidant and anti-inflammatory pathways: A whole transcriptomic in vitro study. *Antioxidants*, 9(11), 1–27. <https://doi.org/10.3390/antiox9111059>
- Pavillard, L. E., Marín-Aguilar, F., Bullon, P., & Cordero, M. D. (2018). Cardiovascular diseases, NLRP3 inflammasome, and western dietary patterns. In *Pharmacological Research* (Vol. 131, pp. 44–50). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.03.018>
- Paz-García, M., Povo-Retana, A., Jaén, R. I., Prieto, P., Peraza, D. A., Zaragoza, C., Hernandez-Jimenez, M., Pineiro, D., Regadera, J., García-Bermejo, M. L., Rodríguez-Serrano, E. M., Sánchez-García, S., Moro, M. A., Lizasoáin, I., Delgado, C., Valenzuela, C., & Boscá, L.

- (2023). Beneficial effect of TLR4 blockade by a specific aptamer antagonist after acute myocardial infarction. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 158, 114214. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114214>
- Pedrosa, P., Vinhas, R., Fernandes, A., & Baptista, P. V. (2015). Gold Nanotheranostics: Proof-of-Concept or Clinical Tool? *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 5(4), 1853–1879. <https://doi.org/10.3390/nano5041853>
- Pei, M. X., Dong, S. J., Gao, X. Y., Luo, T., Fan, D., Jin, J. F., Zhao, X. D., & Chen, Y. L. (2022). Salvianolic Acid B Attenuates Iopromide-Induced Renal Tubular Epithelial Cell Injury by Inhibiting the TLR4/NF- $\kappa$ B/NLRP3 Signaling Pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : ECAM*, 2022, 8400496. <https://doi.org/10.1155/2022/8400496>
- Peng, Y., Zhang, X., Zhang, T., Grace, P. M., Li, H., Wang, Y., Li, H., Chen, H., Watkins, L. R., Hutchinson, M. R., Yin, H., & Wang, X. (2019). Lovastatin inhibits Toll-like receptor 4 signaling in microglia by targeting its co-receptor myeloid differentiation protein 2 and attenuates neuropathic pain. *Brain, Behavior, and Immunity*, 82, 432–444. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.09.013>
- Peng, Z., Shu, B., Zhang, Y., & Wang, M. (2019). Endothelial Response to Pathophysiological Stress. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 39(11), e233–e243. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.312580>
- Pereira, C. A., Carlos, D., Ferreira, N. S., Silva, J. F., Zanotto, C. Z., Zamboni, D. S., Garcia, V. D., Ventura, D. F., Silva, J. S., & Tostes, R. C. (2020). Mitochondrial DNA Promotes NLRP3 Inflammasome Activation and Contributes to Endothelial Dysfunction and Inflammation in Type 1 Diabetes. *Frontiers in Physiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01557>
- Pereira, D. V., Petronilho, F., Pereira, H. R. S. B., Vuolo, F., Mina, F., Possato, J. C., Vitto, M. F., de Souza, D. R., da Silva, L., da Silva Paula, M. M., de Souza, C. T., & Dal-Pizzol, F. (2012). Effects of gold nanoparticles on endotoxin-induced uveitis in rats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53(13), 8036–8041. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-10743>
- Perše, M., & Večerić-Haler, Ž. (2018). Cisplatin-induced rodent model of kidney injury: Characteristics and challenges. In *BioMed Research International* (Vol. 2018). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2018/1462802>
- Persic, V. (2013). Obesity in the Cardiovascular Continuum. *Current Clinical Pharmacology*, 8(2), 159–163. <https://doi.org/10.2174/1574884711308020008>
- Piazza, M., Calabrese, V., Baruffa, C., Gioannini, T., Weiss, J., & Peri, F. (2010). The cationic amphiphile 3,4-bis(tetradecyloxy)benzylamine

- inhibits LPS signaling by competing with endotoxin for CD14 binding. *Biochemical Pharmacology*, 80(12), 2050–2056. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.06.019>
- Pierre, N., Deldicque, L., Barbé, C., Naslain, D., Cani, P. D., & Francaux, M. (2013). Toll-like receptor 4 knockout mice are protected against endoplasmic reticulum stress induced by a high-fat diet. *PLoS One*, 8(5), e65061. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065061>
- Pierson-Marchandise, M., Gras, V., Moragny, J., Micallef, J., Gaboriau, L., Picard, S., Choukroun, G., Masmoudi, K., & Liabeuf, S. (2017). The drugs that mostly frequently induce acute kidney injury: a case - noncase study of a pharmacovigilance database. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 83(6), 1341–1349. <https://doi.org/10.1111/bcp.13216>
- Pinar, A. A., Scott, T. E., Huuskes, B. M., Tapia Cáceres, F. E., Kemp-Harper, B. K., & Samuel, C. S. (2020a). Targeting the NLRP3 inflammasome to treat cardiovascular fibrosis. In *Pharmacology and Therapeutics*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107511>
- Pinar, A. A., Scott, T. E., Huuskes, B. M., Tapia Cáceres, F. E., Kemp-Harper, B. K., & Samuel, C. S. (2020b). Targeting the NLRP3 inflammasome to treat cardiovascular fibrosis. In *Pharmacology and Therapeutics* (p. 107511). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107511>
- Pinheiro-Castro, N., Silva, L. B. A. R., Novaes, G. M., & Ong, T. P. (2019). Hypercaloric Diet-Induced Obesity and Obesity-Related Metabolic Disorders in Experimental Models. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1134, 149–161. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-12668-1\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-030-12668-1_8)
- Poggi, M., Bastelica, D., Gual, P., Iglesias, M. A., Gremeaux, T., Knauf, C., Peiretti, F., Verdier, M., Juhan-Vague, I., Tanti, J. F., Burcelin, R., & Alessi, M. C. (2007). C3H/HeJ mice carrying a toll-like receptor 4 mutation are protected against the development of insulin resistance in white adipose tissue in response to a high-fat diet. *Diabetologia*, 50(6), 1267–1276. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0654-8>
- Poudyal, H., Campbell, F., & Brown, L. (2010). Olive leaf extract attenuates cardiac, hepatic, and metabolic changes in high carbohydrate-, high fat-fed rats. *The Journal of Nutrition*, 140(5), 946–953. <https://doi.org/10.3945/jn.109.117812>
- Poudyal, H., Lemonakis, N., Efentakis, P., Gikas, E., Halabalaki, M., Andreadou, I., Skaltsounis, L., & Brown, L. (2017). Hydroxytyrosol ameliorates metabolic, cardiovascular and liver changes in a rat model of diet-induced metabolic syndrome: Pharmacological and metabolism-based investigation. *Pharmacological Research*, 117, 32–45. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2016.12.002>
- Poudyal, H., Panchal, S. K., Ward, L. C., Waanders, J., & Brown, L. (2012).

- Chronic high-carbohydrate, high-fat feeding in rats induces reversible metabolic, cardiovascular, and liver changes. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 302(12), E1472-82. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00102.2012>
- Prattichizzo, F., De Nigris, V., Spiga, R., Mancuso, E., La Sala, L., Antonicelli, R., Testa, R., Procopio, A. D., Olivieri, F., & Ceriello, A. (2018a). Inflammageing and metaflammation: The yin and yang of type 2 diabetes. *Ageing Research Reviews*, 41, 1–17. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.10.003>
- Prattichizzo, F., De Nigris, V., Spiga, R., Mancuso, E., La Sala, L., Antonicelli, R., Testa, R., Procopio, A. D., Olivieri, F., & Ceriello, A. (2018b). Inflammageing and metaflammation: The yin and yang of type 2 diabetes. In *Ageing Research Reviews* (Vol. 41, pp. 1–17). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.10.003>
- Pretnar-Oblak, J., Zaletel, M., Jagodic, M., & Zaletel, M. (2007). Thrombosis of internal carotid artery after cisplatin-based chemotherapy. In *European neurology* (Vol. 57, Issue 2, pp. 109–110). <https://doi.org/10.1159/000098062>
- Quinn, S. R., & O'Neill, L. A. (2011). A trio of microRNAs that control Toll-like receptor signalling. *International Immunology*, 23(7), 421–425. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxr034>
- Rabinovich-Nikitin, I., Dhingra, R., & Kirshenbaum, L. A. (2019). Activation of Mitophagy in High-Fat Diet-Induced Diabetic Cardiomyopathy. In *Circulation Research* (Vol. 124, Issue 9, pp. 1288–1290). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.314967>
- Radin, M. S., Sinha, S., Bhatt, B. A., Dedousis, N., & O'Doherty, R. M. (2008). Inhibition or deletion of the lipopolysaccharide receptor Toll-like receptor-4 confers partial protection against lipid-induced insulin resistance in rodent skeletal muscle. *Diabetologia*, 51(2), 336–346. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0861-3>
- Raut, S. K., & Khullar, M. (2022). Oxidative stress in metabolic diseases: current scenario and therapeutic relevance. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2022 478:1, 478(1), 185–196. <https://doi.org/10.1007/S11010-022-04496-Z>
- Regnault, V., Raoul, A., Schellenberg, C., & Lacolley, P. (2021). Smooth Muscle Cell Molecular Underpinnings of Vascular Ageing. *Heart, Lung & Circulation*, 30(11), 1595–1598. <https://doi.org/10.1016/J.HLC.2021.09.002>
- Reilly, M., Miller, R. M., Thomson, M. H., Patris, V., Ryle, P., McLoughlin, L., Mutch, P., Gilboy, P., Miller, C., Broekema, M., Keogh, B., McCormack, W., & van de Wetering de Rooij, J. (2013). Randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating phase I, healthy subjects study of intravenous OPN-305, a humanized anti-TLR2 antibody. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 94(5), 593–600.

- <https://doi.org/10.1038/clpt.2013.150>
- Ren, S. Y., & Xu, X. (2015a). Role of autophagy in metabolic syndrome-associated heart disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1852(2), 225–231. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.04.029>
- Ren, S. Y., & Xu, X. (2015b). Role of autophagy in metabolic syndrome-associated heart disease. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (Vol. 1852, Issue 2, pp. 225–231). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.04.029>
- Reyna, S. M., Ghosh, S., Tantiwong, P., Meka, C. S. R., Eagan, P., Jenkinson, C. P., Cersosimo, E., Defronzo, R. A., Coletta, D. K., Sriwijitkamol, A., & Musi, N. (2008). Elevated toll-like receptor 4 expression and signaling in muscle from insulin-resistant subjects. *Diabetes*, 57(10), 2595–2602. <https://doi.org/10.2337/db08-0038>
- Rizzoni, D., Rizzoni, M., Nardin, M., Chiarini, G., Agabiti-Rosei, C., Aggiusti, C., Pains, A., Salvetti, M., & Muiesan, M. L. (2019). Vascular Aging and Disease of the Small Vessels. *High Blood Pressure and Cardiovascular Prevention*, 26(3), 183–189. <https://doi.org/10.1007/S40292-019-00320-W/FIGURES/3>
- Rocha, D. M., Caldas, A. P., Oliveira, L. L., Bressan, J., & Hermsdorff, H. H. (2016). Saturated fatty acids trigger TLR4-mediated inflammatory response. *Atherosclerosis*, 244, 211–215. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.11.015>
- Rocha, E. A., Mehta, N., Távora-Mehta, M. Z. P., Roncari, C. F., Cidrão, A. A. de L., & Neto, J. E. (2021). Dysautonomia: A Forgotten Condition - Part 1. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 116(4), 814–835. <https://doi.org/10.36660/ABC.20200420>
- Rochlani, Y., Pothineni, N. V., Kovelamudi, S., & Mehta, J. L. (2017). Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*, 11(8), 215–225. <https://doi.org/10.1177/1753944717711379>
- Rodrigues, S., Cepeda, F. X., Toschi-Dias, E., Dutra-Marques, A. C. B., Carvalho, J. C., Costa-Hong, V., Alves, M. J. N. N., Rondon, M. U. P. B., Bortolotto, L. A., & Trombetta, I. C. (2017). The role of increased glucose on neurovascular dysfunction in patients with the metabolic syndrome. *Journal of Clinical Hypertension*, 19(9), 840–847. <https://doi.org/10.1111/jch.13060>
- Rodriguez Lavado, J., Sestito, S. E., Cighetti, R., Aguilar Moncayo, E. M., Oblak, A., Lainšček, D., Jiménez Blanco, J. L., García Fernández, J. M., Ortiz Mellet, C., Jerala, R., Calabrese, V., & Peri, F. (2014). Trehalose- and glucose-derived glycoamphiphiles: small-molecule and nanoparticle Toll-like receptor 4 (TLR4) modulators. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(21), 9105–9123. <https://doi.org/10.1021/jm501182w>
- Rogero, M. M., & Calder, P. C. (2018). Obesity, inflammation, toll-like receptor 4 and fatty acids. In *Nutrients* (Vol. 10, Issue 4). MDPI AG.

- <https://doi.org/10.3390/nu10040432>
- Romacho, T., Valencia, I., Ramos-González, M., Vallejo, S., López-Esteban, M., Lorenzo, O., Cannata, P., Romero, A., San Hipólito-Luengo, A., Gómez-Cerezo, J. F., Peiró, C., & Sánchez-Ferrer, C. F. (2020). Visfatin/eNamt induces endothelial dysfunction in vivo: a role for Toll-Like Receptor 4 and NLRP3 inflammasome. *Scientific Reports*, *10*(1), 5386. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62190-w>
- Romero, L., Zamanillo, D., Nadal, X., Sánchez-Arroyos, R., Rivera-Arconada, I., Dordal, A., Montero, A., Muro, A., Bura, A., Segalés, C., Laloya, M., Hernández, E., Portillo-Salido, E., Escriche, M., Codony, X., Encina, G., Burgueño, J., Merlos, M., Baeyens, J. M., ... Vela, J. M. (2012). Pharmacological properties of S1RA, a new sigma-1 receptor antagonist that inhibits neuropathic pain and activity-induced spinal sensitization. *British Journal of Pharmacology*, *166*(8), 2289–2306. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01942.x>
- Römmeler, F., Hammel, M., Waldhuber, A., Müller, T., Jurk, M., Uhlmann, E., Wagner, H., Vollmer, J., & Miethke, T. (2015). Guanine-modified inhibitory oligonucleotides efficiently impair TLR7- and TLR9-mediated immune responses of human immune cells. *PLoS One*, *10*(2), e0116703. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116703>
- Rosenfeld, C. S., & Broder, L. E. (1984). Cisplatin-induced autonomic neuropathy. *Cancer Treatment Reports*, *68*(4), 659–660.
- Roshan, M. H. K., Tambo, A., & Pace, N. P. (2016a). The Role of TLR2, TLR4, and TLR9 in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *International Journal of Inflammation*, *2016*, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2016/1532832>
- Roshan, M. H. K., Tambo, A., & Pace, N. P. (2016b). The Role of TLR2, TLR4, and TLR9 in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *International Journal of Inflammation*, *2016*, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2016/1532832>
- Rosic, G., Joksimovic, J., Selakovic, D., Jakovljevic, V., Zivkovic, V., Srejovic, I., Djuric, M., & Djuric, D. (2018). The Beneficial Effects of Sulfur-containing Amino Acids on Cisplatin-induced Cardiotoxicity and Neurotoxicity in Rodents. *Current Medicinal Chemistry*, *25*(3). <https://doi.org/10.2174/0929867324666170705114456>
- Rosic, G., Selakovic, D., Joksimovic, J., Srejovic, I., Zivkovic, V., Tatalović, N., Orescanin-Dusic, Z., Mitrovic, S., Ilic, M., & Jakovljevic, V. (2016). The effects of N-acetylcysteine on cisplatin-induced changes of cardiodynamic parameters within coronary autoregulation range in isolated rat hearts. *Toxicology Letters*, *242*, 34–46. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.11.028>
- Rosic, G., Srejovic, I., Zivkovic, V., Selakovic, D., Joksimovic, J., & Jakovljevic, V. (2015). The effects of N-acetylcysteine on cisplatin-induced cardiotoxicity on isolated rat hearts after short-term global ischemia. *Toxicology Reports*, *2*, 996–1006.

- <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.07.009>
- Rossato, L. G., Costa, V. M., Dallegrave, E., Arbo, M., Silva, R., Ferreira, R., Amado, F., Dinis-Oliveira, R. J., Duarte, J. A., de Lourdes Bastos, M., Palmeira, C., & Remião, F. (2014). Mitochondrial cumulative damage induced by mitoxantrone: late onset cardiac energetic impairment. *Cardiovascular Toxicology*, *14*(1), 30–40. <https://doi.org/10.1007/s12012-013-9230-2>
- Rossato, L. G., Costa, V. M., Vilas-Boas, V., de Lourdes Bastos, M., Rolo, A., Palmeira, C., & Remião, F. (2013). Therapeutic concentrations of mitoxantrone elicit energetic imbalance in H9c2 cells as an earlier event. *Cardiovascular Toxicology*, *13*(4), 413–425. <https://doi.org/10.1007/s12012-013-9224-0>
- Rossignol, D. P., Wasan, K. M., Choo, E., Yau, E., Wong, N., Rose, J., Moran, J., & Lynn, M. (2004). Safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and plasma lipoprotein distribution of eritoran (E5564) during continuous intravenous infusion into healthy volunteers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *48*(9), 3233–3240. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.9.3233-3240.2004>
- Rossignol, D. P., Wong, N., Noveck, R., & Lynn, M. (2008). Continuous pharmacodynamic activity of eritoran tetrasodium, a TLR4 antagonist, during intermittent intravenous infusion into normal volunteers. *Innate Immunity*, *14*(6), 383–394. <https://doi.org/10.1177/1753425908099173>
- Rowinsky, E. K., McGuire, W. P., Guarnieri, T., Fisherman, J. S., Christian, M. C., & Donehower, R. C. (1991). Cardiac disturbances during the administration of taxol. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *9*(9), 1704–1712. <https://doi.org/10.1200/JCO.1991.9.9.1704>
- Saberi, M., Woods, N.-B., de Luca, C., Schenk, S., Lu, J. C., Bandyopadhyay, G., Verma, I. M., & Olefsky, J. M. (2009). Hematopoietic cell-specific deletion of toll-like receptor 4 ameliorates hepatic and adipose tissue insulin resistance in high-fat-fed mice. *Cell Metabolism*, *10*(5), 419–429. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.09.006>
- Saif, M. W., Shah, M. M., & Shah, A. R. (2009). Fluoropyrimidine-associated cardiotoxicity: revisited. *Expert Opinion on Drug Safety*, *8*(2), 191–202. <https://doi.org/10.1517/14740330902733961>
- Salama, M., Elgamal, M., Abdelaziz, A., Ellithy, M., Magdy, D., Ali, L., Fekry, E., Mohsen, Z., Mostafa, M., Elgamal, H., Sheashaa, H., & Sobh, M. (2015). Toll-like receptor 4 blocker as potential therapy for acetaminophen-induced organ failure in mice. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *10*(1), 241–246. <https://doi.org/10.3892/etm.2015.2442>
- Saleh, R. M., Awadin, W. F., El-Shafei, R. A., Elseady, Y. Y., Wehaish, F. E., & Elshal, M. F. (2015). Cardioprotective role of tadalafil against

- cisplatin-induced cardiovascular damage in rats. *European Journal of Pharmacology*, 765, 574–581. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.09.015>
- Samuels, B. L., Vogelzang, N. J., & Kennedy, B. J. (1987). Vascular toxicity following vinblastine, bleomycin, and cisplatin therapy for germ cell tumours. *International Journal of Andrology*, 10(1), 363–369. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1987.tb00204.x>
- Sánchez-González, P. D., López-Hernández, F. J., López-Novoa, J. M., & Morales, A. I. (2011). An integrative view of the pathophysiological events leading to cisplatin nephrotoxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, 41(10), 803–821. <https://doi.org/10.3109/10408444.2011.602662>
- Sánchez-Manso, J. C., Gujarathi, R., & Varacallo, M. (2021). Autonomic Dysfunction. *StatPearls*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28613638/>
- Sayed-Ahmed, M. M., Aldelemy, M. L., Al-Shabanah, O. A., Hafez, M. M., Al-Hosaini, K. A., Al-Harbi, N. O., Al-Sharary, S. D., & Al-Harbi, M. M. (2014). Inhibition of gene expression of carnitine palmitoyltransferase I and heart fatty acid binding protein in cyclophosphamide and ifosfamide-induced acute cardiotoxic rat models. *Cardiovascular Toxicology*, 14(3), 232–242. <https://doi.org/10.1007/s12012-014-9247-1>
- Schlumbrecht, M. P., & Hehr, K. (2015). Cisplatin-induced bradycardia and the importance of the QT interval. *Journal of Oncology Pharmacy Practice : Official Publication of the International Society of Oncology Pharmacy Practitioners*, 21(2), 157–160. <https://doi.org/10.1177/1078155214522314>
- Schuett, K., Marx, N., & Lehrke, M. (2023). The Cardio-Kidney Patient: Epidemiology, Clinical Characteristics and Therapy. *Circulation Research*, 132(8), 902–914. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.122.321748>
- Schultz, J. D., & Bader, D. M. (2017). Structure and Function of the Adult Vertebrate Cardiovascular System. In *Encyclopedia of Cardiovascular Research and Medicine*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809657-4.99544-9>
- Segiet, O. A., Piecuch, A., Mielańczyk, Ł., Michalski, M., & Nowalany-Kozielska, E. (2019). Role of interleukins in heart failure with reduced ejection fraction. In *Anatolian Journal of Cardiology* (Vol. 22, Issue 6, pp. 287–299). Turkish Society of Cardiology. <https://doi.org/10.14744/AnatolJCardiol.2019.32748>
- Sena, C. M., Pereira, A., Fernandes, R., Letra, L., & Seça, R. M. (2017). Adiponectin improves endothelial function in mesenteric arteries of rats fed a high-fat diet: role of perivascular adipose tissue. *British Journal of Pharmacology*, 174(20), 3514–3526. <https://doi.org/10.1111/bph.13756>
- Sena, C. M., Pereira, A., & Seça, R. M. (2023). Cinnamaldehyde

- Supplementation Reverts Endothelial Dysfunction in Rat Models of Diet-Induced Obesity: Role of NF-E2-Related Factor-2. *Antioxidants*, 12(1), 82. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX12010082/S1>
- Senaphan, K., Kukongviriyapan, U., Sangartit, W., Pakdeechote, P., Pannangpetch, P., Prachaney, P., Greenwald, S. E., & Kukongviriyapan, V. (2015). Ferulic Acid Alleviates Changes in a Rat Model of Metabolic Syndrome Induced by High-Carbohydrate, High-Fat Diet. *Nutrients*, 7(8), 6446–6464. <https://doi.org/10.3390/nu7085283>
- Serhiyenko, V. A., & Serhiyenko, A. A. (2018). Cardiac autonomic neuropathy: Risk factors, diagnosis and treatment. *World Journal of Diabetes*, 9(1), 1–24. <https://doi.org/10.4239/wjd.v9.i1.1>
- Serrano-Castro, P. J., Guardado-Santervás, P., & Olivares-Romero, J. (2000). Ischemic stroke following cisplatin and 5-fluorouracil therapy: a transcranial Doppler study. *European Neurology*, 44(1), 63–64. <https://doi.org/10.1159/000008197>
- Seto, Y., Okazaki, F., Horikawa, K., Zhang, J., Sasaki, H., & To, H. (2016). Influence of dosing times on cisplatin-induced peripheral neuropathy in rats. *BMC Cancer*, 16(1), 756. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2777-0>
- Shaker, O., & Sourour, D. A. (2010). How to protect doxorubicin-induced cardiomyopathy in male albino rats? *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 55(3), 262–268. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e3181cf91ac>
- Sharma, A., Tate, M., Mathew, G., Vince, J. E., Ritchie, R. H., & De Haan, J. B. (2018). Oxidative stress and NLRP3-inflammasome activity as significant drivers of diabetic cardiovascular complications: Therapeutic implications. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 9, Issue FEB, p. 114). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00114>
- Sharma, S., Garg, I., & Ashraf, M. Z. (2016a). TLR signalling and association of TLR polymorphism with cardiovascular diseases. *Vascular Pharmacology*, 87, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2016.10.008>
- Sharma, S., Garg, I., & Ashraf, M. Z. (2016b). TLR signalling and association of TLR polymorphism with cardiovascular diseases. *Vascular Pharmacology*, 87, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2016.10.008>
- Sheedy, F. J., Palsson-McDermott, E., Hennessy, E. J., Martin, C., O’Leary, J. J., Ruan, Q., Johnson, D. S., Chen, Y., & O’Neill, L. A. J. (2010). Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. *Nature Immunology*, 11(2), 141–147. <https://doi.org/10.1038/ni.1828>
- Shen, J., Wu, J. M., Hu, G. M., Li, M. Z., Cong, W. W., Feng, Y. N., Wang, S. X., Li, Z. J., Xu, M., Dong, E. D., Zhang, Y. Y., & Xiao, H. (2020).

- Membrane nanotubes facilitate the propagation of inflammatory injury in the heart upon overactivation of the  $\beta$ -adrenergic receptor. *Cell Death and Disease*, 11(11), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03157-7>
- Shen, N., Liang, D., Tang, Y., de Vries, N., & Tak, P.-P. (2012). MicroRNAs--novel regulators of systemic lupus erythematosus pathogenesis. *Nature Reviews. Rheumatology*, 8(12), 701–709. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2012.142>
- Shen, Q., Zhang, X., Li, Q., Zhang, J., Lai, H., Gan, H., Du, X., & Li, M. (2019). TLR2 protects cisplatin-induced acute kidney injury associated with autophagy via PI3K/Akt signaling pathway. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(3), 4366–4374. <https://doi.org/10.1002/jcb.27722>
- Shi, H., Kokoeva, M. V., Inouye, K., Tzameli, I., Yin, H., & Flier, J. S. (2006). TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(11), 3015–3025. <https://doi.org/10.1172/JCI28898>
- Sigrist-Flores, S. C., Ponciano-Gómez, A., Pedroza-González, A., Gallardo-Ortíz, I. A., Villalobos-Molina, R., Pardo-Vázquez, J. P., Saucedo-Campos, A. D., Jiménez-Flores, R., & Méndez-Cruz, A. R. (2019). Chronic intake of moderate fat-enriched diet induces fatty liver and low-grade inflammation without obesity in rabbits. *Chemico-Biological Interactions*, 300, 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.01.004>
- Silvaes, R. R., da Silva Pereira, E. N. G., Flores, E. E. I., Rodrigues, K. L., Silva, A. R., Gonçalves-de-Albuquerque, C. F., & Daliry, A. (2019). High-fat diet-induced kidney alterations in rats with metabolic syndrome: Endothelial dysfunction and decreased antioxidant defense. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*, 12, 1773–1781. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S211253>
- Silverthorn, D. U. (2019). *Fisiología humana : un enfoque integrado / Dee Unglaub Silverthorn con la colaboración de Bruce R. Johnson* (B. R. Johnson (ed.); 8<sup>ta</sup> ed.). Ciudad de México : Panamericana.
- Sjögren, B., Bigert, C., & Gustavsson, P. (2015). *Chapter 16 - Cardiovascular Disease* (G. F. Nordberg, B. A. Fowler, & M. B. T.-H. on the T. of M. (Fourth E. Nordberg (eds.); pp. 313–331). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59453-2.00016-0>
- Soga, M., Kamal, F. A., Watanabe, K., Ma, M., Palaniyandi, S., Prakash, P., Veeraveedu, P., Mito, S., Kunisaki, M., Tachikawa, H., Kodama, M., & Aizawa, Y. (2006). Effects of angiotensin II receptor blocker (candesartan) in daunorubicin-induced cardiomyopathic rats. *International Journal of Cardiology*, 110(3), 378–385. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2005.08.061>
- Sokol, C. L., & Luster, A. D. (2015). The chemokine system in innate immunity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(5), 1–20.

- <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016303>
- Soud, A.-K., Tacka, K. A., Galvan, K. A., & Penefsky, H. S. (2003). Immediate effects of anticancer drugs on mitochondrial oxygen consumption. *Biochemical Pharmacology*, 66(6), 977–987. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(03\)00418-0](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(03)00418-0)
- Soultati, A., Mountzios, G., Avgerinou, C., Papaxoinis, G., Pectasides, D., Dimopoulos, M.-A., & Papadimitriou, C. (2012). Endothelial vascular toxicity from chemotherapeutic agents: preclinical evidence and clinical implications. *Cancer Treatment Reviews*, 38(5), 473–483. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.09.002>
- Spallone, V. (2019). Update on the impact, diagnosis and management of cardiovascular autonomic neuropathy in diabetes: What is defined, what is new, and what is unmet. *Diabetes and Metabolism Journal*, 43(1), 3–30. <https://doi.org/10.4093/dmj.2018.0259>
- Spiller, S., Elson, G., Ferstl, R., Dreher, S., Mueller, T., Freudenberg, M., Daubeuf, B., Wagner, H., & Kirschning, C. J. (2008). TLR4-induced IFN-gamma production increases TLR2 sensitivity and drives Gram-negative sepsis in mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(8), 1747–1754. <https://doi.org/10.1084/jem.20071990>
- Stanciu, S., Rusu, E., Miricescu, D., Radu, A. C., Axinia, B., Vrabie, A. M., Ionescu, R., Jinga, M., & Sirbu, C. A. (2023). Links between Metabolic Syndrome and Hypertension: The Relationship with the Current Antidiabetic Drugs. *Metabolites*, 13(1). <https://doi.org/10.3390/metabo13010087>
- Stoian, A. P., Rizvi, A. A., Fahed, G., Aoun, L., Zerdan, M. B., Allam, S., Zerdan, M. B., Bouferraa, Y., & Assi, H. I. (2022). *Metabolic Syndrome: Updates on Pathophysiology and Management in 2021*. <https://doi.org/10.3390/ijms23020786>
- Stojic, I. M., Zivkovic, V. I., Srejovic, I. M., Nikolic, T. R., Jeremic, N. S., Jeremic, J. N., Djuric, D. M., Jovicic, N., Radonjic, K. G., Bugarcic, Z. D., Jakovljevic, V. L. J., & Novokmet, S. S. (2018). Cisplatin and cisplatin analogues perfusion through isolated rat heart: the effects of acute application on oxidative stress biomarkers. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 439(1–2), 19–33. <https://doi.org/10.1007/s11010-017-3132-8>
- Su, J. B. (2015). Vascular endothelial dysfunction and pharmacological treatment. *World Journal of Cardiology*, 7(11), 719–741. <https://doi.org/10.4330/wjc.v7.i11.719>
- Su, Q., Li, L., Sun, Y., Yang, H., Ye, Z., & Zhao, J. (2018). Effects of the TLR4/Myd88/NF-κB Signaling Pathway on NLRP3 Inflammasome in Coronary Microembolization-Induced Myocardial Injury. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 47(4), 1497–1508. <https://doi.org/10.1159/000490866>
- Suetomi, T., Willeford, A., Brand, C. S., Cho, Y., Ross, R. S., Miyamoto, S.,

- & Brown, J. H. (2018). Inflammation and NLRP3 Inflammasome Activation Initiated in Response to Pressure Overload by Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II  $\delta$  Signaling in Cardiomyocytes Are Essential for Adverse Cardiac Remodeling. *Circulation*, 138(22), 2530–2544. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.034621>
- Swanson, K. V., Deng, M., & Ting, J. P. Y. (2019). The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 19, Issue 8, pp. 477–489). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0165-0>
- Świątkiewicz, I., Wróblewski, M., Nuskiewicz, J., Sutkowy, P., Wróblewska, J., & Woźniak, A. (2023). The Role of Oxidative Stress Enhanced by Adiposity in Cardiometabolic Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(7). <https://doi.org/10.3390/ijms24076382>
- Taganov, K. D., Boldin, M. P., Chang, K.-J., & Baltimore, D. (2006). NF- $\kappa$ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(33), 12481–12486. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605298103>
- Takahashi, M. (2022). NLRP3 inflammasome as a key driver of vascular disease. *Cardiovascular Research*, 118(2), 372–385. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab010>
- Theobald, D., Nair, A. R., Sriramula, S., & Francis, J. (2023). Cardiomyocyte-specific deletion of TLR4 attenuates angiotensin II-induced hypertension and cardiac remodeling. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 10, 1074700. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2023.1074700>
- Theofilis, P., Sagris, M., Oikonomou, E., Antonopoulos, A. S., Siasos, G., Tsioufis, C., & Tousoulis, D. (2021). Inflammatory Mechanisms Contributing to Endothelial Dysfunction. *Biomedicines*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/biomedicines9070781>
- Thomas, T. P., & Grisanti, L. A. (2020). The Dynamic Interplay Between Cardiac Inflammation and Fibrosis. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 11, p. 1133). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.529075>
- Tidswell, M., Tillis, W., Larosa, S. P., Lynn, M., Wittek, A. E., Kao, R., Wheeler, J., Gogate, J., & Opal, S. M. (2010). Phase 2 trial of eritoran tetrasodium (E5564), a toll-like receptor 4 antagonist, in patients with severe sepsis. *Critical Care Medicine*, 38(1), 72–83. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181b07b78>
- Topal, İ., Özbek Bilgin, A., Keskin Çimen, F., Kurt, N., Süleyman, Z., Bilgin, Y., Özçiçek, A., & Altuner, D. (2018). The effect of rutin on cisplatin-induced oxidative cardiac damage in rats. *Anatolian Journal of*

- Cardiology*, 20(3), 136–142.  
<https://doi.org/10.14744/AnatolJCardiol.2018.32708>
- Topouchian, J., Labat, C., Gautier, S., Bäck, M., Achimastos, A., Blacher, J., Cwynar, M., de la Sierra, A., Pall, D., Fantin, F., Farkas, K., Garcia-Ortiz, L., Hakobyan, Z., Jankowski, P., Jelakovic, A., Kobalava, Z., Konradi, A., Kotovskaya, Y., Kotsani, M., ... Asmar, R. (2018). Effects of metabolic syndrome on arterial function in different age groups: the Advanced Approach to Arterial Stiffness study. *Journal of Hypertension*, 36(4), 824–833.  
<https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000001631>
- Townsend, R. R., Wilkinson, I. B., Schiffrin, E. L., Avolio, A. P., Chirinos, J. A., Cockcroft, J. R., Heffernan, K. S., Lakatta, E. G., McEniery, C. M., Mitchell, G. F., Najjar, S. S., Nichols, W. W., Urbina, E. M., & Weber, T. (2015). Recommendations for Improving and Standardizing Vascular Research on Arterial Stiffness: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 66(3), 698–722. <https://doi.org/10.1161/HYP.0000000000000033>
- Tramullas, M., Finger, B. C., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2016). Obesity Takes Its Toll on Visceral Pain: High-Fat Diet Induces Toll-Like Receptor 4-Dependent Visceral Hypersensitivity. *PloS One*, 11(5), e0155367. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155367>
- Tran, V., De Silva, T. M., Sobey, C. G., Lim, K., Drummond, G. R., Vinh, A., & Jelinic, M. (2020). The Vascular Consequences of Metabolic Syndrome: Rodent Models, Endothelial Dysfunction, and Current Therapies. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00148>
- Turlapaty, P. D., & Altura, B. M. (1980). Magnesium deficiency produces spasms of coronary arteries: relationship to etiology of sudden death ischemic heart disease. *Science (New York, N.Y.)*, 208(4440), 198–200. <https://doi.org/10.1126/science.7361117>
- Vaez, H., Soraya, H., Garjani, A., & Gholikhani, T. (2023). Toll-Like Receptor 4 (TLR4) and AMPK Relevance in Cardiovascular Disease. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 13(1), 36–47. <https://doi.org/10.34172/apb.2023.004>
- Vallés, P. G., Gil Lorenzo, A. F., Garcia, R. D., Cacciamani, V., Benardon, M. E., & Costantino, V. V. (2023). Toll-like Receptor 4 in Acute Kidney Injury. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2). <https://doi.org/10.3390/ijms24021415>
- van den Belt-Dusebout, A. W., Nuver, J., de Wit, R., Gietema, J. A., ten Bokkel Huinink, W. W., Rodrigus, P. T. R., Schimmel, E. C., Aleman, B. M. P., & van Leeuwen, F. E. (2006). Long-term risk of cardiovascular disease in 5-year survivors of testicular cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24(3), 467–475. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.02.7193>
- Van Linthout, S., & Tschöpe, C. (2017). Inflammation – Cause or

- Consequence of Heart Failure or Both? In *Current Heart Failure Reports* (Vol. 14, Issue 4, pp. 251–265). Current Science Inc. <https://doi.org/10.1007/s11897-017-0337-9>
- Varela, M. L., Mogildea, M., Moreno, I., & Lopes, A. (2018). Acute Inflammation and Metabolism. *Inflammation*, 41(4), 1115–1127. <https://doi.org/10.1007/S10753-018-0739-1>
- Varga, Z. V, Ferdinandy, P., Liaudet, L., & Pacher, P. (2015). Drug-induced mitochondrial dysfunction and cardiotoxicity. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 309(9), H1453–H1467. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00554.2015>
- Vasaikar, N., Mahajan, U., Patil, K. R., Suchal, K., Patil, C. R., Ojha, S., & Goyal, S. N. (2018). D-pinitol attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity in rats: Impact on pro-inflammatory cytokines. *Chemico-Biological Interactions*, 290, 6–11. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2018.05.003>
- Vasanji, Z., Cantor, E. J. F., Juric, D., Moyen, M., & Netticadan, T. (2006). Alterations in cardiac contractile performance and sarcoplasmic reticulum function in sucrose-fed rats is associated with insulin resistance. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 291(4), C772-80. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00086.2005>
- Vatashchuk, M. V, Bayliak, M. M., Hurza, V. V, Storey, K. B., & Lushchak, V. I. (2022). Metabolic Syndrome: Lessons from Rodent and Drosophila Models. *BioMed Research International*, 2022, 5850507. <https://doi.org/10.1155/2022/5850507>
- Vaughn, D. J., Palmer, S. C., Carver, J. R., Jacobs, L. A., & Mohler, E. R. (2008). Cardiovascular risk in long-term survivors of testicular cancer. *Cancer*, 112(9), 1949–1953. <https://doi.org/10.1002/cncr.23389>
- Vázquez-Carballo, C., Guerrero-Hue, M., García-Caballero, C., Rayego-Mateos, S., Opazo-Ríos, L., Morgado-Pascual, J. L., Herencia-Bellido, C., Vallejo-Mudarra, M., Cortegano, I., Gaspar, M. L., De Andrés, B., Egido, J., & Moreno, J. A. (2021). Toll-Like Receptors in Acute Kidney Injury. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 1–27. <https://doi.org/10.3390/IJMS22020816>
- Velásquez, C. A., González, M., Berrouet, M. C., & Jaramillo, N. (2016). Cardiotoxicidad inducida por la quimioterapia desde las bases moleculares hasta la perspectiva clínica. *Revista Colombiana de Cardiología*, 23(2), 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.rccar.2015.10.002>
- Vera, Cabezos, P. A., Martín, M. I., & Abalo, R. (2013). Characterization of cannabinoid-induced relief of neuropathic pain in a rat model of cisplatin-induced neuropathy. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 105, 205–212. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.02.008>
- Vera, Castillo, M., Cabezos, P. A., Chiarlone, A., Martín, M. I., Gori, A., Pasquinelli, G., Barbara, G., Stanghellini, V., Corinaldesi, R., De Giorgio, R., & Abalo, R. (2011). Enteric neuropathy evoked by

- repeated cisplatin in the rat. *Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 23(4), 370–378, e162-3. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2011.01674.x>
- Vera, G., Chiarlone, A., Martín, M. I., & Abalo, R. (2006a). Altered feeding behaviour induced by long-term cisplatin in rats. *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical*, 126–127, 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2006.02.011>
- Vera, G., Chiarlone, A., Martín, M. I., & Abalo, R. (2006b). Altered feeding behaviour induced by long-term cisplatin in rats. *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical*, 126–127, 81–92. <https://doi.org/10.1016/J.AUTNEU.2006.02.011>
- Vijay-Kumar, M., Aitken, J. D., Carvalho, F. A., Ziegler, T. R., Gewirtz, A. T., & Ganji, V. (2011). Loss of function mutation in toll-like receptor-4 does not offer protection against obesity and insulin resistance induced by a diet high in trans fat in mice. *Journal of Inflammation (London, England)*, 8(1), 2. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-8-2>
- Volarevic, V., Djokovic, B., Jankovic, M. G., Harrell, C. R., Fellabaum, C., Djonov, V., & Arsenijevic, N. (2019). Molecular mechanisms of cisplatin-induced nephrotoxicity: A balance on the knife edge between renoprotection and tumor toxicity. In *Journal of Biomedical Science* (Vol. 26, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0518-9>
- Volkova, M., & Russell, R. 3rd. (2011). Anthracycline cardiotoxicity: prevalence, pathogenesis and treatment. *Current Cardiology Reviews*, 7(4), 214–220. <https://doi.org/10.2174/157340311799960645>
- Wang, F., Jia, J., & Rodrigues, B. (2017). Autophagy, Metabolic Disease, and Pathogenesis of Heart Dysfunction. In *Canadian Journal of Cardiology* (Vol. 33, Issue 7, pp. 850–859). Pulsus Group Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2017.01.002>
- Wang, H., Li, X., Dong, G., Yan, F., Zhang, J., Shi, H., Ning, Z., Gao, M., Cheng, D., Ma, Q., Wang, C., Zhao, M., Dai, J., Li, C., Li, Z., Zhang, H., & Xiong, H. (2021). Toll-like Receptor 4 Inhibitor TAK-242 Improves Fulminant Hepatitis by Regulating Accumulation of Myeloid-Derived Suppressor Cell. *Inflammation*, 44(2), 671–681. <https://doi.org/10.1007/s10753-020-01366-y>
- Wang, L.-H., Gu, Z.-W., Li, J., Yang, W.-Q., Li, Y.-L., Qi, D.-M., Wang, D.-Y., & Jiang, H.-Q. (2023). Isorhynchophylline inhibits inflammatory responses in endothelial cells and macrophages through the NF- $\kappa$ B/NLRP3 signaling pathway. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 23(1), 80. <https://doi.org/10.1186/s12906-023-03902-3>
- Wang, M.-L., Yu, X.-J., Li, X.-G., Pang, D.-Z., Su, Q., Saahene, R. O., Li, H.-B., Mao, X.-Y., Liu, K.-L., Fu, L.-Y., Li, Y., Zhu, G.-Q., & Kang, Y.-M. (2018). Blockade of TLR4 Within the Paraventricular Nucleus Attenuates Blood Pressure by Regulating ROS and Inflammatory Cytokines in Prehypertensive Rats. *American Journal of Hypertension*,

- 31(9), 1013–1023. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpy074>
- Wang, N., Guo, W., Liu, T., Chen, X., & Lin, M. (2023). Toll-like receptors (TLR2 and TLR4) antagonist mitigates the onset of cerebral small vessel disease through PI3K/Akt/GSK3 $\beta$  pathway in stroke-prone renovascular hypertensive rats. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, 1–21. <https://doi.org/10.1080/02648725.2023.2184961>
- Wang, R.-P., Yao, Q., Xiao, Y.-B., Zhu, S.-B., Yang, L., Feng, J.-M., Li, D.-Z., Li, X.-L., Wu, J.-J., & Chen, J. (2011). Toll-like receptor 4/nuclear factor-kappa B pathway is involved in myocardial injury in a rat chronic stress model. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, 14(5), 567–575. <https://doi.org/10.3109/10253890.2011.571729>
- Wang, W., Ding, X.-Q., Gu, T.-T., Song, L., Li, J.-M., Xue, Q.-C., & Kong, L.-D. (2015). Pterostilbene and allopurinol reduce fructose-induced podocyte oxidative stress and inflammation via microRNA-377. *Free Radical Biology & Medicine*, 83, 214–226. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.02.029>
- Wang, Yang, Fouret, G., Bonafos, B., Blachnio-Zabielska, A., Leroy, T., Crouzier, D., Barea, B., Gaillet, S., Moro, C., Lecomte, J., Coudray, C., & Feillet-Coudray, C. (2019). Long-term follow-up of muscle lipid accumulation, mitochondrial activity and oxidative stress and their relationship with impaired glucose homeostasis in high fat high fructose diet-fed rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 64, 182–197. <https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2018.10.021>
- Wang, Yiyang, Liao, J., Luo, Y., Li, M., Su, X., Yu, B., Teng, J., Wang, H., & Lv, X. (2023). Berberine Alleviates Doxorubicin-Induced Myocardial Injury and Fibrosis by Eliminating Oxidative Stress and Mitochondrial Damage via Promoting Nrf-2 Pathway Activation. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4). <https://doi.org/10.3390/ijms24043257>
- Wang, Yu, Song, E., Bai, B., & Vanhoutte, P. M. (2016a). Toll-like receptors mediating vascular malfunction: Lessons from receptor subtypes. *Pharmacology and Therapeutics*, 158, 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.12.005>
- Wang, Yu, Song, E., Bai, B., & Vanhoutte, P. M. (2016b). Toll-like receptors mediating vascular malfunction: Lessons from receptor subtypes. *Pharmacology & Therapeutics*, 158, 91–100. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2015.12.005>
- Wang, Z., Hu, W., Lu, C., Ma, Z., Jiang, S., Gu, C., Acuña-Castroviejo, D., & Yang, Y. (2018). Targeting NLRP3 (nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3) inflammasome in cardiovascular disorders. In *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* (Vol. 38, Issue 12, pp. 2765–2779). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.311916>
- Watanabe, S., Kumazaki, S., Kusunoki, K., Inoue, T., Maeda, Y., Usui, S., Shinohata, R., Ohtsuki, T., Hirohata, S., Kusachi, S., Kitamori, K., Mori,

- M., Yamori, Y., & Oka, H. (2018). A high-fat and high-cholesterol diet induces cardiac fibrosis, vascular endothelial, and left ventricular diastolic dysfunction in shrsp5/dmcr rats. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 25(5), 439–453. <https://doi.org/10.5551/jat.40956>
- Weber, S. M., Chen, J.-M., & Levitz, S. M. (2002). Inhibition of mitogen-activated protein kinase signaling by chloroquine. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 168(10), 5303–5309. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.10.5303>
- Wei, C., Zhang, Y., Zhong, X., Lu, S., Zou, X., Yang, Y., Huang, S., & Huang, Z. (2022). Ginkgo biloba leaf extract mitigates cisplatin-induced chronic renal interstitial fibrosis by inhibiting the epithelial-mesenchymal transition of renal tubular epithelial cells mediated by the Smad3/TGF- $\beta$ 1 and Smad3/p38 MAPK pathways. *Chinese Medicine*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/S13020-022-00574-Y>
- Westphal, A., Cheng, W., Yu, J., Grassl, G., Krautkrämer, M., Holst, O., Föger, N., & Lee, K. H. (2017). Lysosomal trafficking regulator Lyst links membrane trafficking to toll-like receptor-mediated inflammatory responses. *Journal of Experimental Medicine*, 214(1), 227–244. <https://doi.org/10.1084/jem.20141461>
- Williams, S. M., Eleftheriadou, A., Alam, U., Cuthbertson, D. J., & Wilding, J. P. H. (2019a). Cardiac Autonomic Neuropathy in Obesity, the Metabolic Syndrome and Prediabetes: A Narrative Review. *Diabetes Therapy: Research, Treatment and Education of Diabetes and Related Disorders*, 10(6), 1995–2021. <https://doi.org/10.1007/S13300-019-00693-0>
- Williams, S. M., Eleftheriadou, A., Alam, U., Cuthbertson, D. J., & Wilding, J. P. H. (2019b). Cardiac Autonomic Neuropathy in Obesity, the Metabolic Syndrome and Prediabetes: A Narrative Review. In *Diabetes Therapy* (Vol. 10, Issue 6, pp. 1995–2021). Springer Healthcare. <https://doi.org/10.1007/s13300-019-00693-0>
- Williams, S. M., Eleftheriadou, A., Alam, U., Cuthbertson, D. J., & Wilding, J. P. H. (2019c). Cardiac Autonomic Neuropathy in Obesity, the Metabolic Syndrome and Prediabetes: A Narrative Review. In *Diabetes Therapy* (Vol. 10, Issue 6, pp. 1995–2021). Springer Healthcare. <https://doi.org/10.1007/s13300-019-00693-0>
- Wilson, C. R., Tran, M. K., Salazar, K. L., Young, M. E., & Taegtmeyer, H. (2007). Western diet, but not high fat diet, causes derangements of fatty acid metabolism and contractile dysfunction in the heart of Wistar rats. *Biochemical Journal*, 406(3), 457–467. <https://doi.org/10.1042/BJ20070392>
- Wittekind, D. (2003). Traditional staining for routine diagnostic pathology including the role of tannic acid. 1. Value and limitations of the hematoxylin-eosin stain. *Biotechnic & Histochemistry: Official Publication of the Biological Stain Commission*, 78(5), 261–270. <https://doi.org/10.1080/10520290310001633725>

- Wong, S. K., Chin, K.-Y., Suhaimi, F. H., Ahmad, F., & Ima-Nirwana, S. (2018). The Effects of a Modified High-carbohydrate High-fat Diet on Metabolic Syndrome Parameters in Male Rats. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes: Official Journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, 126(4), 205–212. <https://doi.org/10.1055/s-0043-119352>
- Wong, S. K., Chin, K.-Y., Suhaimi, F. H., Fairus, A., & Ima-Nirwana, S. (2016). *Animal models of metabolic syndrome: a review*. <https://doi.org/10.1186/s12986-016-0123-9>
- Wong, S. K., Chin, K. Y., Suhaimi, F. H., Ahmad, F., Jamil, N. A., & Ima-Nirwana, S. (2018). Osteoporosis is associated with metabolic syndrome induced by high-carbohydrate high-fat diet in a rat model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 98, 191–200. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2017.12.042>
- Wozniacka, A., Lesiak, A., Boncela, J., Smolarczyk, K., McCauliffe, D. P., & Sysa-Jedrzejowska, A. (2008). The influence of antimalarial treatment on IL-1beta, IL-6 and TNF-alpha mRNA expression on UVB-irradiated skin in systemic lupus erythematosus. *The British Journal of Dermatology*, 159(5), 1124–1130. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08804.x>
- Wu, N.-C., & Wang, J.-J. (2020). Ibudilast, a Phosphodiesterase Inhibitor and Toll-Like Receptor-4 Antagonist, Improves Hemorrhagic Shock and Reperfusion-Induced Left Ventricular Dysfunction by Reducing Myocardial Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ . *Transplantation Proceedings*, 52(6), 1869–1874. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2020.02.145>
- Wu, S. S., Kor, C. T., Chen, T. Y., Liu, K. H., Shih, K. L., Su, W. W., & Wu, H. M. (2019). Relationships between Serum Uric Acid, Malondialdehyde Levels, and Carotid Intima-Media Thickness in the Patients with Metabolic Syndrome. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/6859757>
- Xiao, H., Li, H., Wang, J. J., Zhang, J. S., Shen, J., An, X. B., Zhang, C. C., Wu, J. M., Song, Y., Wang, X. Y., Yu, H. Y., Deng, X. N., Li, Z. J., Xu, M., Lu, Z. Z., Du, J., Gao, W., Zhang, A. H., Feng, Y., & Zhang, Y. Y. (2018). IL-18 cleavage triggers cardiac inflammation and fibrosis upon  $\beta$ -Adrenergic insult. *European Heart Journal*, 39(1), 60–69. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx261>
- Xiao, L., Luo, G., Guo, X., Jiang, C., Zeng, H., Zhou, F., Li, Y., Yu, J., & Yao, P. (2020). Macrophage iron retention aggravates atherosclerosis: Evidence for the role of autocrine formation of hepcidin in plaque macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1865(2), 158531. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.158531>
- Xiao, Z., Kong, B., Yang, H., Dai, C., Fang, J., Qin, T., & Huang, H. (2020). Key Player in Cardiac Hypertrophy, Emphasizing the Role of Toll-Like Receptor 4. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 7.

- <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.579036>
- Xin, J. zhou, Wu, J. min, Hu, G. min, Gu, H. jun, Feng, Y. nan, Wang, S. xing, Cong, W. wen, Li, M. zhe, Xu, W. li, Song, Y., Xiao, H., Zhang, Y. yi, & Wang, L. (2020).  $\alpha$ 1-AR overactivation induces cardiac inflammation through NLRP3 inflammasome activation. *Acta Pharmacologica Sinica*, 41(3), 311–318. <https://doi.org/10.1038/s41401-019-0305-x>
- Xing, J.-J., Mi, X.-J., Hou, J.-G., Cai, E.-B., Zheng, S.-W., Wang, S.-H., Wang, Z., Chen, C., & Li, W. (2022). Maltol mitigates cisplatin-evoked cardiotoxicity via inhibiting the PI3K/Akt signaling pathway in rodents in vivo and in vitro. *Phytotherapy Research : PTR*, 36(4), 1724–1735. <https://doi.org/10.1002/ptr.7405>
- Xu, J., Zhang, B., Chu, Z., Jiang, F., & Han, J. (2021). Wogonin Alleviates Cisplatin-induced Cardiotoxicity in Mice Via Inhibiting Gasdermin D-mediated Pyroptosis. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 78(4), 597. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000001085>
- Xu, S., Ilyas, I., Little, P. J., Li, H., Kamato, D., Zheng, X., Luo, S., Li, Z., Liu, P., Han, J., Harding, I. C., Ebong, E. E., Cameron, S. J., Stewart, A. G., & Weng, J. (2021). Endothelial Dysfunction in Atherosclerotic Cardiovascular Diseases and Beyond: From Mechanism to Pharmacotherapies. *Pharmacological Reviews*, 73(3), 924–967. <https://doi.org/10.1124/PHARMREV.120.000096>
- Yang, H.-J., Kong, B., Shuai, W., Zhang, J.-J., & Huang, H. (2020). Shensong Yangxin Protects Against Metabolic Syndrome-Induced Ventricular Arrhythmias by Inhibiting Electrical Remodeling. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 993. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00993>
- Yang, H., Fung, S.-Y., & Liu, M. (2011). Programming the cellular uptake of physiologically stable peptide-gold nanoparticle hybrids with single amino acids. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 50(41), 9643–9646. <https://doi.org/10.1002/anie.201102911>
- Yang, H., Kozicky, L., Saferali, A., Fung, S.-Y., Afacan, N., Cai, B., Falsafi, R., Gill, E., Liu, M., Kollmann, T. R., Hancock, R. E. W., Sly, L. M., & Turvey, S. E. (2016). Endosomal pH modulation by peptide-gold nanoparticle hybrids enables potent anti-inflammatory activity in phagocytic immune cells. *Biomaterials*, 111, 90–102. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.09.032>
- Yang, H., Zhou, Y., Fung, S.-Y., Wu, L., Tsai, K., Tan, R., Turvey, S. E., Machuca, T., de Perrot, M., Waddell, T. K., & Liu, M. (2013). Amino Acid Structure Determines the Immune Responses Generated by Peptide–Gold Nanoparticle Hybrids. *Particle & Particle Systems Characterization*, 30(12), 1039–1043. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ppsc.201300213>
- Yang, J., Jiang, H., Yang, J., Ding, J.-W., Chen, L.-H., Li, S., & Zhang, X.-D. (2009). Valsartan preconditioning protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through TLR4/NF-kappaB signaling

- pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 330(1–2), 39–46. <https://doi.org/10.1007/s11010-009-0098-1>
- Yang, Y., Lv, J., Jiang, S., Ma, Z., Wang, D., Hu, W., Deng, C., Fan, C., Di, S., Sun, Y., & Yi, W. (2016). The emerging role of Toll-like receptor 4 in myocardial inflammation. *Cell Death & Disease*, 7(5), e2234–e2234. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.140>
- Yasuda, H., Leelahavanichkul, A., Tsunoda, S., Dear, J. W., Takahashi, Y., Ito, S., Hu, X., Zhou, H., Doi, K., Childs, R., Klinman, D. M., Yuen, P. S. T., & Star, R. A. (2008). Chloroquine and inhibition of Toll-like receptor 9 protect from sepsis-induced acute kidney injury. In *American journal of physiology. Renal physiology* (Vol. 294, Issue 5, pp. F1050-8). <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00461.2007>
- Ye, G., Zhao, Y., Zhu, J., Zhang, Z., Wang, Q., Jiang, X., & Wang, Z. (2022). Synergistic Effect of Polydatin and Polygonatum sibiricum Polysaccharides in Combating Atherosclerosis via Suppressing TLR4-Mediated NF-κB Activation in ApoE-Deficient Mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2022, 3885153. <https://doi.org/10.1155/2022/3885153>
- Ye, L., Li, G., Goebel, A., Raju, A. V., Kong, F., Lv, Y., Li, K., Zhu, Y., Raja, S., He, P., Li, F., Mwangi, S. M., Hu, W., & Srinivasan, S. (2020). Caspase-11-mediated enteric neuronal pyroptosis underlies Western diet-induced colonic dysmotility. *The Journal of Clinical Investigation*, 130(7), 3621–3636. <https://doi.org/10.1172/JCI130176>
- Yeh, Y.-C., Ko, W.-J., Chan, K.-C., Fan, S.-Z., Tsai, J.-C., Cheng, Y.-J., & Sun, W.-Z. (2012). Effects of eritoran tetrasodium, a toll-like receptor 4 antagonist, on intestinal microcirculation in endotoxemic rats. *Shock (Augusta, Ga.)*, 37(5), 556–561. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e31824e20ef>
- Yin, Y., Zhou, Z., Liu, W., Chang, Q., Sun, G., & Dai, Y. (2017). Vascular endothelial cells senescence is associated with NOD-like receptor family pyrin domain-containing 3 (NLRP3) inflammasome activation via reactive oxygen species (ROS)/thioredoxin-interacting protein (TXNIP) pathway. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 84, 22–34. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.01.001>
- Yu, L., & Feng, Z. (2018a). The Role of Toll-Like Receptor Signaling in the Progression of Heart Failure. *Mediators of Inflammation*, 2018, 9874109. <https://doi.org/10.1155/2018/9874109>
- Yu, L., & Feng, Z. (2018b). The Role of Toll-Like Receptor Signaling in the Progression of Heart Failure. *Mediators of Inflammation*, 2018(Dcm), 1–11. <https://doi.org/10.1155/2018/9874109>
- Yu, L., & Feng, Z. (2018c). The Role of Toll-Like Receptor Signaling in the Progression of Heart Failure. *Mediators of Inflammation*, 2018, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2018/9874109>
- Zaffaroni, L., & Peri, F. (2018). Recent advances on Toll-like receptor 4 modulation: new therapeutic perspectives. *Future Medicinal*

- Chemistry*, 10(4), 461–476. <https://doi.org/10.4155/fmc-2017-0172>
- Zaniani, N. R., Roohbakhsh, A., Moghimi, A., & Mehri, S. (2022). Protective effect of Toll-like receptor 4 antagonist on inflammation, EEG, and memory changes following febrile seizure in Wistar rats. *Behavioural Brain Research*, 420, 113723. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113723>
- Zeng, C., Wang, R., & Tan, H. (2019). Role of pyroptosis in cardiovascular diseases and its therapeutic implications. *International Journal of Biological Sciences*, 15(7), 1345–1357. <https://doi.org/10.7150/ijbs.33568>
- Zhang, B., Ramesh, G., Uematsu, S., Akira, S., & Reeves, W. B. (2008). TLR4 signaling mediates inflammation and tissue injury in nephrotoxicity. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 19(5), 923–932. <https://doi.org/10.1681/ASN.2007090982>
- Zhang, Haixia, Yang, K., Chen, F., Liu, Q., Ni, J., Cao, W., Hua, Y., He, F., Liu, Z., Li, L., & Fan, G. (2022). Role of the CCL2-CCR2 axis in cardiovascular disease: Pathogenesis and clinical implications. *Frontiers in Immunology*, 13, 975367. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.975367>
- Zhang, Hongmei, Li, Y., de Carvalho-Barbosa, M., Kavelaars, A., Heijnen, C. J., Albrecht, P. J., & Dougherty, P. M. (2016). Dorsal Root Ganglion Infiltration by Macrophages Contributes to Paclitaxel Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *The Journal of Pain*, 17(7), 775–786. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2016.02.011>
- Zhang, K., Qin, X., Qiu, J., Sun, T., Qu, K., Din, A. U., Yan, W., Li, T., Chen, Y., Gu, W., Rao, X., & Wang, G. (2023). *Desulfovibrio desulfuricans* aggravates atherosclerosis by enhancing intestinal permeability and endothelial TLR4/NF-κB pathway in Apoe (-/-) mice. *Genes & Diseases*, 10(1), 239–253. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2021.09.007>
- Zhang, M., Zhang, B., Wang, L., Li, X., Hua, H., Tang, R., Zhang, P., & Zheng, K. (2015). [Increased expressions of TLR4 and related proinflammatory signaling molecules in the renal tissues of obese mice induced by high-fat diet]. *Xi bao yu fen zi mian yi xue za zhi = Chinese journal of cellular and molecular immunology*, 31(9), 1170–1174.
- Zhang, N., Liang, H., Farese, R. V, Li, J., Musi, N., & Hussey, S. E. (2015). Pharmacological TLR4 Inhibition Protects against Acute and Chronic Fat-Induced Insulin Resistance in Rats. *PLoS One*, 10(7), e0132575. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132575>
- Zhang, Q., Sun, Q., Tong, Y., Bi, X., Chen, L., Lu, J., & Ding, W. (2022). Leonurine attenuates cisplatin nephrotoxicity by suppressing the NLRP3 inflammasome, mitochondrial dysfunction, and endoplasmic reticulum stress. *International Urology and Nephrology*. <https://doi.org/10.1007/S11255-021-03093-1>

- Zhang, W., Dong, X., Wang, T., & Kong, Y. (2019). Exosomes derived from platelet-rich plasma mediate hyperglycemia-induced retinal endothelial injury via targeting the TLR4 signaling pathway. *Experimental Eye Research*, 189, 107813. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.107813>
- Zhang, X., Lu, C., Gao, M., Cao, X., Ha, T., Kalbfleisch, J. H., Williams, D. L., Li, C., & Kao, R. L. (2014). Toll-like receptor 4 plays a central role in cardiac dysfunction during trauma hemorrhage shock. *Shock (Augusta, Ga.)*, 42(1), 31–37. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000155>
- Zhang, Z.-M., Wang, Y.-C., Chen, L., & Li, Z. (2019). Protective effects of the suppressed NF- $\kappa$ B/TLR4 signaling pathway on oxidative stress of lung tissue in rat with acute lung injury. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 35(5), 265–276. <https://doi.org/10.1002/kjm2.12065>
- Zhao, B., Zhang, Q., Liang, X., Xie, J., & Sun, Q. (2021). Quercetin reduces inflammation in a rat model of diabetic peripheral neuropathy by regulating the TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signalling pathway. *European Journal of Pharmacology*, 912, 174607. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174607>
- Zhong, B., Rubinstein, J., Ma, S., & Wang, D. H. (2018). Genetic ablation of TRPV1 exacerbates pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 99, 261–270. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2018.01.065>
- Zhou, B., Li, Q., Wang, J., Chen, P., & Jiang, S. (2019). Ellagic acid attenuates streptozocin induced diabetic nephropathy via the regulation of oxidative stress and inflammatory signaling. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 123, 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.10.036>
- Zhu, L., Han, J., Yuan, R., Xue, L., & Pang, W. (2018). Berberine ameliorates diabetic nephropathy by inhibiting TLR4/NF- $\kappa$ B pathway. *Biological Research*, 51(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s40659-018-0157-8>
- Ziegler, G., Freyer, D., Harhausen, D., Khojasteh, U., Nietfeld, W., & Trendelenburg, G. (2011). Blocking TLR2 in vivo protects against accumulation of inflammatory cells and neuronal injury in experimental stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 31(2), 757–766. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2010.161>
- Zilliox, L. A., & Russell, J. W. (2020). Is there cardiac autonomic neuropathy in prediabetes? *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical*, 229. <https://doi.org/10.1016/J.AUTNEU.2020.102722>
- Zubowska, M., Wyka, K., Fendler, W., Młynarski, W., & Zalewska-Szewczyk, B. (2013). Interleukin 18 as a marker of chronic

- nephropathy in children after anticancer treatment. *Disease Markers*, 35(6), 811–818. <https://doi.org/10.1155/2013/369784>
- Zuchi, C., Tritto, I., Carluccio, E., Mattei, C., Cattadori, G., & Ambrosio, G. (2020). Role of endothelial dysfunction in heart failure. *Heart Failure Reviews*, 25(1), 21–30. <https://doi.org/10.1007/S10741-019-09881-3>
- Zundler, S., & Neurath, M. F. (2015). Interleukin-12: Functional activities and implications for disease. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 26(5), 559–568. <https://doi.org/10.1016/J.CYTOGFR.2015.07.003>