

Biomarcadores de síndrome cardiorenal em modelo animal de miocardiopatia urêmica

Biomarkers of cardio-renal syndrome in uremic myocardial pathology animal model

Autores

Laura Mattana Dionísio ¹
Mateus Justi Luvizoto ²
Caroline Gribner ¹
Danielle Carneiro ²
Viviane Carvalho ²
Franciele Robes ¹
Marcos Sheidemantel ²
Fabiane Rego ¹
Lúcia de Noronha ²
Roberto Pecoits-Filho ²
Aline Borsato Hauser ¹

¹ Departamento de Análise Clínica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

² Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

RESUMO

Introdução: A síndrome cardiorenal (SCR) tipo 4 é uma afecção da doença renal crônica primária que leva a redução da função cardíaca, hipertrofia ventricular e risco de eventos cardiovasculares. **Objetivo:** O objetivo do presente estudo foi compreender os mecanismos envolvidos no surgimento da SCR tipo 4. **Métodos:** Um modelo animal de nefrectomia 5/6 (DRC) foi comparado a animais de controle (Placebo). Biomarcadores séricos foram analisados no início do estudo e com quatro e oito semanas de estudo. Após eutanásia, foram realizados exames histológicos e de imunoistoquímica no tecido miocárdico. **Resultados:** Troponina I (TnI) estava aumentada nas semanas quatro (S4) e oito (S8), mas o NT-proBNP não apresentou diferenças. O diâmetro maior dos cardiomiócitos indicava hipertrofia ventricular esquerda. Os níveis mais elevados de TNF- α foram identificados na S4 com redução na S8, enquanto fibrose foi mais intensa na S8. A expressão de angiotensina mostrou elevação na S8. **Conclusões:** TnI parece sugerir lesões cardíacas em consequência da DRC, porém o NT-proBNP não sofreu alterações por refletir alongamento. O TNF- α evidenciou um pico inflamatório e a fibrose aumentou ao longo do tempo devido ao processo de conexão entre rins e coração. A angiotensina mostrou aumento da atividade do eixo renina-angiotensina, corroborando a hipótese do processo inflamatório e seu envolvimento com SCR tipo 4. Portanto, o presente estudo em modelo animal reforça a necessidade de adotar estratégias com bloqueadores de renina-angiotensina e controle da DRC para evitar o desenvolvimento de SCR tipo 4.

Palavras-chave: Doenças Renais; Síndrome Cardiorenal; Análises Imunoistoquímicas, Marcadores Cardíacos.

ABSTRACT

Introduction: Cardio-renal syndrome subtype 4 (CRS4) is a condition of primary chronic kidney disease that leads to reduction of cardiac function, ventricular hypertrophy, and risk of cardiovascular events. **Objective:** Our aim was to understand the mechanisms involved on the onset of CRS4. **Methods:** We used the nephrectomy 5/6 (CKD) animal model and compared to control (SHAM). Serum biomarkers were analyzed at baseline, 4, and 8 weeks. After euthanasia, histology and immunohistochemistry were performed in the myocardium. **Results:** Troponin I (TnI) was increased at 4 weeks (W) and 8W, but nt-proBNP showed no difference. The greater diameter of cardiomyocytes indicated left ventricular hypertrophy and the highest levels of TNF- α were found at 4W declining in 8W while fibrosis was more intense in 8W. Angiotensin expression showed an increase at 8W. **Conclusions:** TnI seems to reflect cardiac injury as a consequence of the CKD however nt-proBNP did not change because it reflects stretching. TNF- α characterized an inflammatory peak and fibrosis increased over time in a process connecting heart and kidneys. The angiotensin showed increased activity of the renin-angiotensin axis and corroborates the hypothesis that the inflammatory process and its involvement with CRS4. Therefore, this animal study reinforces the need for renin-angiotensin blockade strategies and the control of CKD to avoid the development of CRS4.

Keywords: Kidney Diseases; Cardio-renal syndrome; Tissue Microarray, Cardiac Biomarkers.

Data de submissão: 28/07/2017.
Data de aprovação: 28/09/2017.

Correspondência para:
Aline Borsato Hauser.
E-mail: alinehauser@ufpr.br

DOI: 10.1590/2175-8239-JBN-3878



INTRODUÇÃO

A síndrome cardiorenal (SCR) inclui uma variedade de condições agudas ou crônicas em que o órgão em insuficiência primária pode ser o coração ou os rins.¹ Os efeitos disfuncionais diretos ou indiretos de cada órgão podem iniciar e perpetuar um distúrbio multifuncional através de uma complexa combinação de mecanismos de feedback neuro-hormonais. De forma a cobrir a vasta gama de distúrbios inter-relacionados e enfatizar a natureza bidirecional das interações cardiorenais, Ronco et al. apresentaram uma classificação para SCR com cinco subtipos baseados na fisiopatologia, tempo de desenvolvimento e natureza da disfunção cardiorenal concomitante, proporcionando uma abordagem mais concisa e lógica.² O foco do presente estudo foi a SCR tipo 4, caracterizada por doença renal crônica (DRC) primária que induz redução da função cardíaca, hipertrofia ventricular, disfunção diastólica e aumento do risco de eventos cardiovasculares adversos. Pacientes com DRC apresentam risco cardiovascular extremamente elevado. A DRC é dividida em cinco estágios em função da combinação de gravidade do dano renal e redução da taxa de filtração glomerular (TFG). Mais de 50% dos óbitos ocorridos em coortes com DRC estágio 5 são atribuídos a doenças cardiovasculares,¹ mas os mecanismos subjacentes à SCR no contexto da DRC ainda não são bem compreendidos.

O presente estudo em modelo animal objetivou estabelecer um modelo de miocardiopatia urêmica para avaliação da história natural da SCR. Alguns autores sugerem que a maioria dos avanços recentes na compreensão da SCR tipo 4 se concentram na aterosclerose e na arteriosclerose, tendo sido envidados esforços muito menos intensos na avaliação dos mecanismos das intervenções relacionadas à disfunção miocárdica. A avaliação ecocardiográfica desempenha um papel fundamental no estabelecimento do diagnóstico de miocardiopatia, bem como na estratificação do risco e na definição do impacto das intervenções.² No entanto, ainda se fazem necessárias a investigação dos biomarcadores e a melhoria das tecnologias relacionadas à SCR tipo 4.

Dos biomarcadores estudados, o NT-proBNP é produzido nos ventrículos após o estímulo do alongamento dos miócitos cardíacos em resposta à tensão aumentada da parede cardíaca.^{3,4} A isoforma da troponina I (TnI), uma proteína específica do músculo cardíaco, utilizada como biomarcador auxiliar

no diagnóstico de patologias que envolvem necrose e lesão das células miocárdicas.⁵ Em relação à análise do tecido cardíaco, estudos mostram que pacientes com DRC podem desenvolver hipertrofia ventricular esquerda (HVE) e fibrose miocárdica independente dos fatores tradicionais, com envolvimento do sistema renina-angiotensina-aldosterona. Resposta inflamatória é citada como fator importante na DRC. Um estudo com modelo animal encontrou níveis mais elevados de TNF- α no grupo urêmico, enquanto outros autores relataram uma relação entre citocinas e efeitos deletérios no ventrículo esquerdo, acelerando o desenvolvimento da insuficiência cardíaca e induzindo uma resposta hipertrófica nos miócitos.⁶⁻⁸ Assim, espécies reativas de oxigênio com alto potencial oxidativo são geradas, levando ao estresse oxidativo.^{9,10,11} Em tal contexto, o objetivo do presente estudo em modelo animal foi aprimorar o entendimento dos mecanismos envolvidos no início da patogênese da SCR tipo 4.

MATERIAIS E MÉTODOS

MODELO ANIMAL

Utilizamos um modelo animal de disfunção renal para analisar o dano miocárdico em um experimento sobre SCR. Todos os procedimentos experimentais estavam em estrita conformidade com nossas diretrizes institucionais e padrões internacionais de manipulação e cuidado para animais de laboratório e foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa de nossa instituição. Foram utilizados ratos Wistar machos com peso de cerca de 250 g. A indução da DRC foi realizada sob anestesia com quetamina (Vetanarcol[®] 50 mg/Kg, König) e xilazina (Anasedan[®] 10 mg/Kg, Vetbands). A nefrectomia 5/6 foi realizada por remoção do rim direito e ligadura de ramos específicos da artéria renal esquerda, garantindo assim o infarto de pelo menos dois terços do rim esquerdo e a indução da DRC num procedimento em tempo único. Os ratos do grupo placebo foram anestesiados e submetidos a laparotomia ventral e manipulação dos pedículos renais, sem remoção de massa renal. Após a recuperação anestésica os animais foram devolvidos às suas gaiolas originais, com acesso livre a água de torneira e ração padrão (0,5% Na, 22% proteína) e mantidos a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ em ciclo de 12h de claridade e escuridão durante o seguimento de oito semanas. Os animais foram separados em dois grupos, Placebo (n = 10) e DRC (n = 31). Uma parte dos animais no

grupo DRC foi sacrificada quatro (S4) e outra parte oito semanas (S8) após a cirurgia.

ANÁLISE BIOQUÍMICA

Amostras de sangue foram colhidas por punção da cauda após anestesia tópica no início do estudo e nos tempos S4 e S8 após as cirurgias. O soro foi obtido por centrifugação e as amostras foram armazenadas em frascos apropriados (*endotoxinfree*) a -20°C até sua análise. Os níveis de ureia foram determinados em todas as amostras por ensaio colorimétrico de *endpoint* (Labtest[®]). A quantificação dos níveis séricos de NT-proBNP e IL-6 foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA - Elabscience Biotechnology BioLegend Inc., San Diego, CA) utilizando densidade óptica a 450 nm (leitor ThermoplateMicroplate-TP). A isoforma TnI foi medida por imunoenensaio de micropartículas por quimioluminescência (STAT hs troponin - Abbott Diagnostis).¹²

ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os animais foram sacrificados e seus corações removidos e armazenados em formaldeído. Os cortes histológicos foram preparados para avaliar fibrose miocárdica e hipertrofia. *Microarrays* de tecidos foram utilizados para avaliar a expressão de TNF- α , nitrotirosina e angiotensina.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram relatados como médias \pm EPM. Diferenças com $p < 0,05$ foram considerada significativas. O teste de Tukey para comparações múltiplas e os testes não-paramétricos de Friedman e Mann-Whitney foram utilizados nas comparações das diferenças

entre grupos. Além disso, o alfa foi fixado em 0.05 e todos os testes foram bicaudais. O programa IBM SPSS Statistics 20 foi utilizado na análise. O programa GaphPad Prism 6 (GraphPad software, Inc, San Diego, CA) foi usado para a produção de gráficos.

RESULTADOS

Não houve diferença significativa no peso corporal dos animais ao longo do experimento entre os grupos DRC e Placebo. O nível de ureia ao longo do tempo foi mais elevado no grupo DRC em relação ao grupo de controle ($p < 0,05$). A análise para NT-proBNP não revelou diferença significativa entre os grupos e entre os tempos S4 e S8. A comparação dos níveis de TnI revelou diferença significativa entre os tempos S4 e S8 ($p < 0,05$) para os dados dos grupos DRC e Placebo (Figura 1).

O peso cardíaco foi mais elevado no grupo DRC ($1,79 \pm 0,35$ g) em relação ao grupo Placebo ($1,46 \pm 0,15$ g) ($p < 0,043$). A Figura 2 mostra a hipertrofia miocárdica observada no grupo DRC com maiores diâmetros de cardiomiócitos do que o grupo Placebo ($p < 0,001$).

No tocante à expressão de TNF- α , os níveis mais elevados ocorreram no tempo S4, com redução na avaliação na S8. Segundo a Figura 3, o aumento de TNF- α em animais urêmicos foi estatisticamente significativo quatro semanas após o início do estudo ($p < 0,001$). A análise estatística da nitrotirosina por imunistoquímica não revelou diferença significativa entre S4 e S8.

Conforme observado na Figura 4, foi encontrada diferença significativa na angiotensina em S8 para o grupo DRC ($p < 0,001$).

Figura 1. Níveis de A) NT-proBNP e B) TnI.

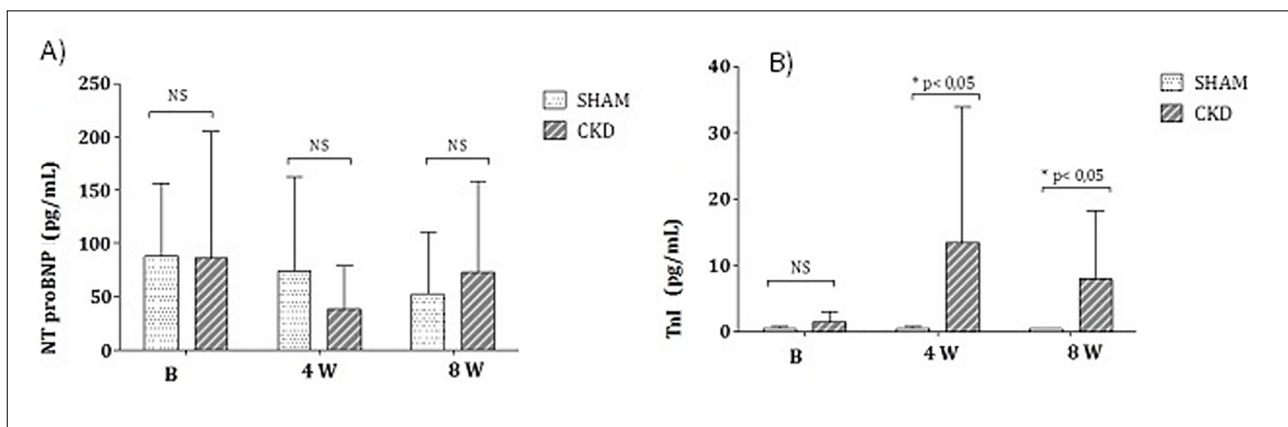


Figura 2. Comparação da hipertrofia miocárdica entre os grupos DRC e Placebo.

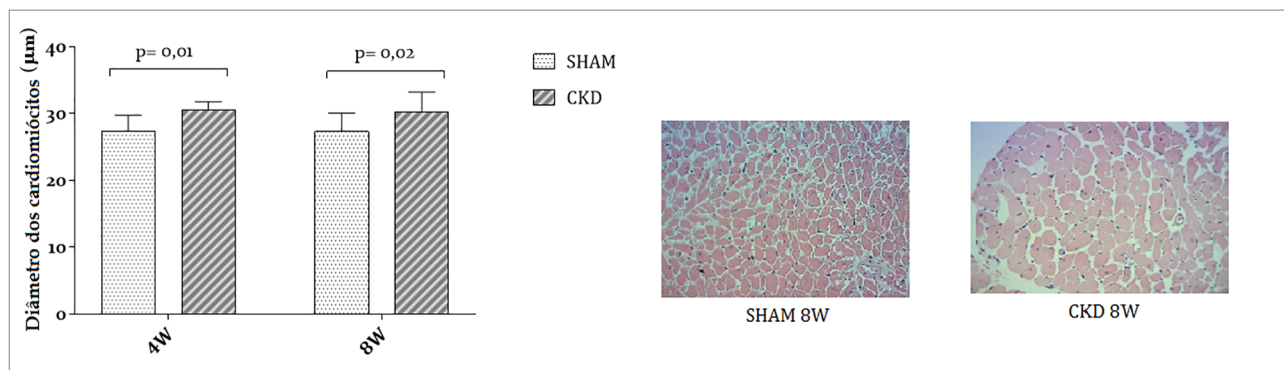


Figura 3. Expressões de TNF-α e nitrorosina nos grupos DRC e Placebo.

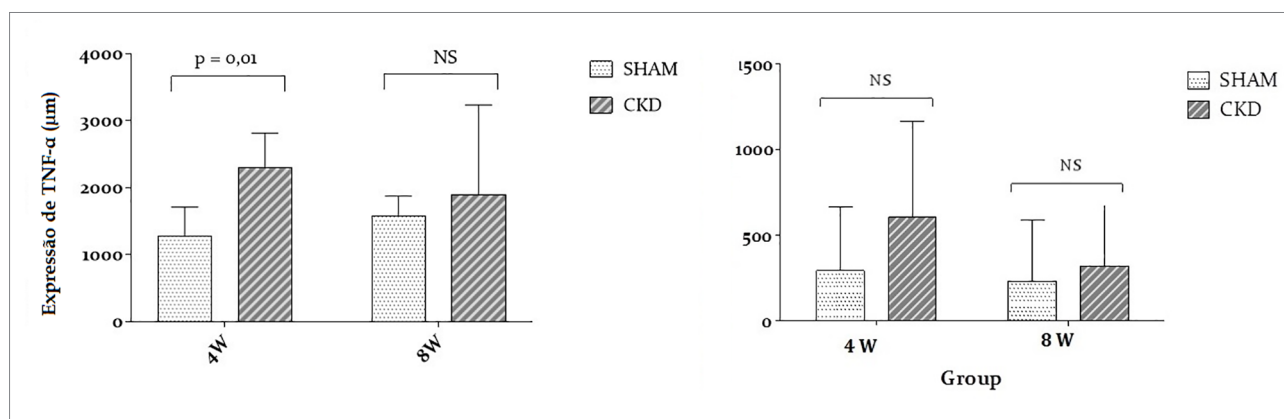
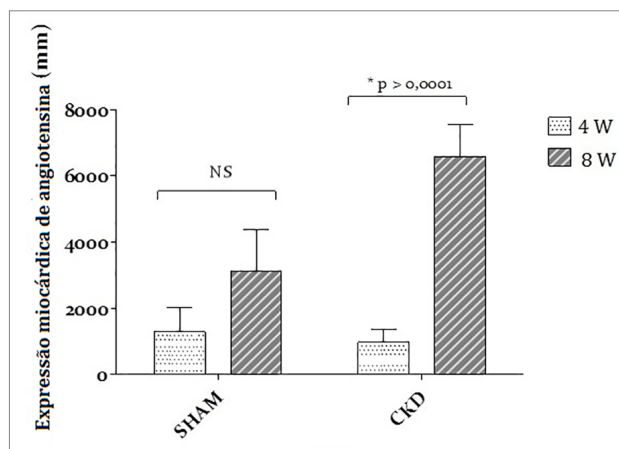


Figura 4. Expressão de angiotensina.



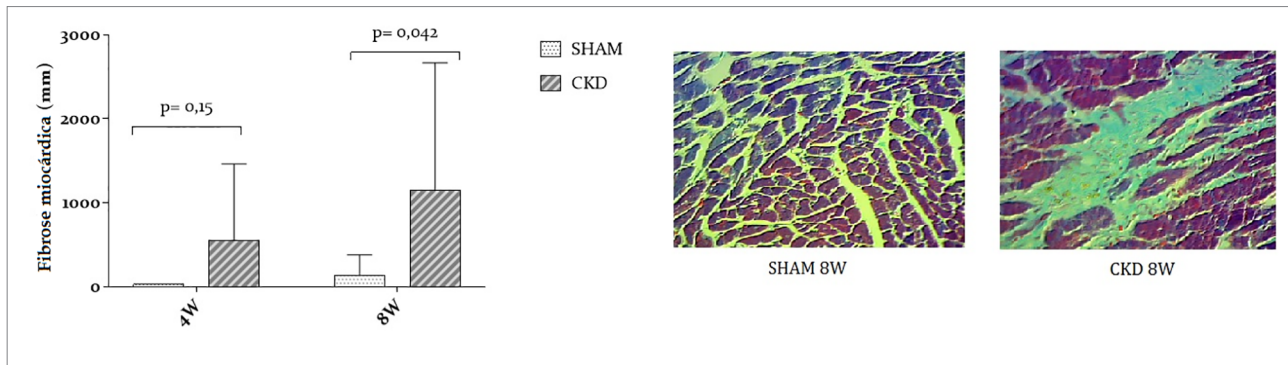
Fibrose miocárdica não apresentou diferença entre os grupos na S4 ($p = 0.15$), porém foi significativamente mais intensa no grupo DRC em comparação ao placebo na S8 ($p = 0.042$), sugerindo que a fibrose se acentuou com o passar do tempo (Figura 5).

DISCUSSÃO

O modelo animal de nefrectomia 5/6 leva a um processo adaptativo com hipertrofia estrutural e funcional dos néfrons remanescentes. Este é considerado um

modelo animal clássico para simular uma situação clínica.^{13,14} A resistência vascular sistêmica ou a expansão do volume intravascular resultam em espessamento e remodelação dos miócitos do ventrículo esquerdo. A SCR tipo 4 provavelmente independe de tais fatores, mas os mesmos levam à ativação da sinalização celular apoptótica e autofágica que culmina no aumento da produção de matriz extracelular e fibrose. Quando a hipertrofia atinge um limiar em que o aumento de massa muscular não consegue compensar o aumento de carga, ocorre um endurecimento da parede miocárdica que leva a fibrilação ventricular, fibrose, hipertrofia e desenvolvimento de SCR TIPO 4.¹⁵⁻¹⁷

O aumento dos níveis de biomarcadores cardíacos pode ser um importante preditor de mortalidade na SCR tipo 4.¹⁸ Em nosso estudo, não houve diferença nos níveis de NT-proBNP em S4 e S8 quando os grupos Placebo e DRC foram comparados. O NT-proBNP é um marcador de alongamento cardíaco e insuficiência, provocado pela hipervolemia resultante da insuficiência cardíaca. Sua elevação é relatada em vários estágios de DRC, com ou sem sintomas cardiovasculares.¹⁹⁻²² Os níveis aumentam à medida que a GFR diminui, sendo mais elevados na presença de insuficiência cardíaca.¹⁷ Contudo, tal alteração não se

Figura 5. Avaliações de fibrose miocárdica nos grupos DRC e Placebo.

manifestou ou não foi detectada no modelo animal de nefrectomia 5/6.

Pacientes com DRC têm níveis mais elevados de troponinas cardíacas quando comparados a indivíduos sem DRC; elevações estão ligadas a pior prognóstico.²³ Poucos estudos utilizaram troponinas como marcadores de lesão miocárdica em DRC.²⁴ Alguns autores observaram alta prevalência de níveis aumentados de troponinas na DRC na ausência de sintomas cardiovasculares.²⁵ Não existe uma etiologia estabelecida definitiva para tal elevação. No entanto, ela ser o resultado de necrose miocárdica silenciosa, hipertrofia ventricular esquerda, disfunção endotelial secundária a estresse oxidativo e inflamação, sobrecarga cardíaca com distensão e outros fatores.²⁶ Em nosso estudo houve aumento nos níveis de TnI em S8 no grupo DRC em comparação ao grupo Placebo. A elevação coincidiu com a diminuição da função renal, caracterizada por uremia expressiva. Em um estudo de Fredericks *et al.* (2002), oito semanas após a nefrectomia 5/6 os ratos mostraram níveis significativamente aumentados de TnI.²⁴ Apesar de controvérsias, níveis persistentemente elevados de troponinas cardíacas observadas em indivíduos com DRC não estão ligados a redução da depuração renal, uma característica amplamente conhecida dessa patologia, mas representam um biomarcador de lesão do miocárdio. Além disso, a molécula de troponina é relativamente grande, o que indica que o rim não é a sua principal via de depuração.²³ A melhora da função renal após terapia substitutiva não altera os altos níveis de troponina cardíaca vistos na DRC.²⁴ Além disso, um estudo retrospectivo em que foram avaliados os níveis de TnI após necrose miocárdica identificou que a eliminação e a meia-vida aparente da TnI não diferiram entre indivíduos com função renal normal e pacientes com doença renal terminal.²⁷ Sugerimos que o aumento dos níveis de TnI na S8 em nosso estudo reflete

a lesão cardíaca produzida em consequência da progressão da DRC na SCR tipo 4. Os níveis aumentados de TnI, mas não de NT-proBNP na S8, podem ser explicados por suas ações específicas e alterações cardíacas. A TnI está ligada à lesão miocárdica, enquanto o NT-proBNP reflete o alongamento dos cardiomiócitos com mecanismos e causas distintos.^{3,28} As mudanças adaptativas que ocorrem nos néfrons remanescentes e que resultam em hiperfiltração podem influenciar os níveis de NT-proBNP. As alterações hemodinâmicas após a nefrectomia 5/6 estão ligadas a lesões glomerulares estruturais, que podem ser seguidas de proteinúria.¹³

O desenvolvimento da hipertrofia ventricular esquerda (HVE) envolve fatores clássicos tais como anemia, alterações no sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e hipertensão, além dos mecanismos independentes da mTOR, fósforo e paratormônio (PTH). Em nosso estudo, o peso cardíaco aumentou e os resultados mostraram hipertrofia quando foram comparados os grupos DRC e Placebo. Esses dados corroboram a literatura sobre o desenvolvimento da hipertrofia na DRC, independente da pré-carga cardíaca e dos fatores pós-carga, mas na ausência de hipertensão ou expansão de volume por ativação da via celular da mTOR. Um modelo animal de HVE relacionado a DRC identificou ativação da via celular da mTOR, mesmo na ausência de pressão ou expansão de volume.¹⁶ Outros estudos com modelos experimentais e pacientes transplantados renais mostraram que a via celular da mTOR foi inibida pelo uso de rapamicina (inibidor parcial da mTOR), o que levou a uma redução significativa na massa do VE. Hiperparatireoidismo e hiperfosfatemia secundária têm sido associados a HVE e provavelmente envolvem vias semelhantes de ativação da mTOR.^{29,16,15}

Vários fatores como inflamação, estresse oxidativo e lesão podem estar ligados à SCR tipo 4. Disfunção

imunológica em pacientes com DRC leva a degeneração tecidual acelerada (em consequência da inflamação crônica) e aumento da taxa de sepse (por conta da deficiente resposta imunológica), tornando-se um alvo importante para a redução da mortalidade,⁶ uma vez que a inflamação é um conector cardiorenal para o desenvolvimento da SCR tipo 4.^{30,31} A citocina TNF- α é um importante marcador para processos inflamatórios, podendo prever a mortalidade associada a doenças cardiovasculares em pacientes em diálise.³² Em nosso estudo, a expressão de TNF α foi aumentada no grupo DRC, com um pico na S4 e redução na S8. O mesmo ocorreu com os níveis séricos de TnI que caracterizam a conexão cardiorenal presente na SCR tipo 4. O desenvolvimento de um processo inflamatório crônico é um dos pontos-chave da conexão entre esses dois órgãos, uma vez que a lesão de um pode induzir o comprometimento progressivo do outro, com desequilíbrios entre óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio.³⁰ Nossos resultados não mostraram aumento significativo na nitrotirosina, mas revelaram níveis plasmáticos elevados de peroxidação lipídica e proteína. Redução da atividade antioxidante foi identificada no estresse oxidativo causado pelo estado urêmico.^{33,34} De acordo com outros estudos, várias condições patológicas tais como isquemia e inflamação podem gerar um alto potencial oxidante do peroxinitrito.^{9-11,35} Acreditamos que outros biomarcadores possam ser utilizados para avaliar o estresse oxidativo que sejam tecnicamente mais sensíveis do que a nitrotirosina para avaliar a SCR tipo 4.

A patogênese da SCR tipo 4 inclui a ativação crônica do SRAA e do sistema nervoso simpático com perfusão renal reduzida. A ativação crônica do SRAA pode prejudicar a função mitocondrial e aumentar o estresse oxidativo oriundo das mitocôndrias, o que por sua vez pode levar a lesão renal e retenção de sódio e água.³⁶ Em um estudo experimental de remodelamento cardíaco e uremia, os efeitos isolados do hiperparatireoidismo e do fósforo foram associados independentemente a alterações importantes no processo de remodelamento cardíaco e na fração de ejeção do ventrículo esquerdo na DRC, provavelmente envolvendo vias semelhantes às relacionados à ativação da mTOR.³⁷ Em nosso estudo, a expressão de angiotensina apresentou aumento, o que corrobora a hipótese de que o desenvolvimento de um processo inflamatório e o aumento da atividade do sistema renina-angiotensina podem causar SCR tipo 4. Nosso

estudo revelou fibrose miocárdica mais intensa na S8 no grupo DRC em comparação ao grupo Placebo e sugeriu que a fibrose se eleva com o passar do tempo durante o desenvolvimento da SCR tipo 4.

Portanto, o presente modelo mostrou que existe um fenômeno inflamatório que precede o desenvolvimento da fibrose na história natural da SCR tipo 4. Apesar dos achados para NT-proBNP, o uso de TnI pode ser uma poderosa ferramenta para monitorar as consequências cardiovasculares e inflamatórias em pacientes com DRC. Inflamação e ativação do SRAA parecem ser fenômenos importantes na indução de HVE e fibrose que caracterizam a SCR tipo 4. Concluindo, o presente estudo reforça a necessidade do uso de bloqueadores do SRAA como estratégia cardioprotetora e enfatiza a necessidade de se controlar esses fatores na DRC para evitar o desenvolvimento da SCR tipo 4.

CONFLITOS DE INTERESSES

Os autores declaram que o presente manuscrito não suscita conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

1. Herzog CA. Dismal long-term survival of dialysis patients after acute myocardial infarction: can we alter the outcome? *Nephrol Dial Transplant* 2002;17:7-10.
2. Pecoits-Filho R, Barberato SH. Echocardiography in chronic kidney disease: diagnostic and prognostic implications. *Nephron Clin Pract* 2010;114:c242-7.
3. Hall C. Essential biochemistry and physiology of (NT-pro) BNP. *Eur J Heart Fail* 2004;6:257-60.
4. Hemalatha T, Mala VV, Manohar BM, Nayeem M, Subramaniam S, Puvanakrishnan R. Studies on biochemical markers in cryoinfarction in rats. *Cryo Letters* 2006;27:311-8.
5. Katrukha IA. Human cardiac troponin complex. Structure and functions. *Biochemistry (Mosc)* 2013;78:1447-65.
6. Hauser AB, Stinghen AE, Kato S, Buchares S, Aita C, Yuzawa Y, et al. Characteristics and causes of immune dysfunction related to uremia and dialysis. *Perit Dial Int* 2008;28:S183-7.
7. Hauser AB, Azevedo IR, Gonçalves S, Stinghen A, Aita C, Pecoits-Filho R. Sevelamer carbonate reduces inflammation and endotoxemia in an animal model of uremia. *Blood Purif* 2010;30:153-8.
8. Seta Y, Shan K, Bozkurt B, Oral H, Mann DL. Basic mechanisms in heart failure: the cytokine hypothesis. *J Card Fail* 1996;2:243-9.
9. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000;87:840-4.
10. Kinlay S, Libby P, Ganz P. Endothelial function and coronary artery disease. *Curr Opin Lipidol* 2001;12:383-9.
11. Ignarro LJ, Napoli C, Loscalzo J. Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide: An overview. *Circ Res* 2002;90:21-28.
12. Apple FS, Murakami MM, Ler R, Walker D, York M; HESI Technical Committee of Biomarkers Working Group on Cardiac Troponins. Analytical characteristics of commercial cardiac troponin I and T immunoassays in serum from rats, dogs, and monkeys with induced acute myocardial injury. *Clin Chem* 2008;54:1982-9.

13. Hostetter TH, Olson JL, Rennke HG, Venkatachalam MA, Brenner BM. Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:1315-25.
14. Hayslett JP. Functional adaptation to reduction in renal mass. *Physiol Rev* 1979;59:137-64.
15. Ritz E. Left ventricular hypertrophy in renal disease: beyond preload and afterload. *Kidney Int* 2009;75:771-3.
16. Siedlecki AM, Jin X, Muslin AJ. Uremic cardiac hypertrophy is reversed by rapamycin but not by lowering of blood pressure. *Kidney Int* 2009;75:800-8.
17. Jafri L, Kashif W, Tai J, Siddiqui I, Azam I, Shahzad H, et al. B-type natriuretic peptide versus amino terminal pro-B type natriuretic peptide: selecting the optimal heart failure marker in patients with impaired kidney function. *BMC Nephrol* 2013;14:117.
18. Zand Parsa AF, Abdolahi A, Mahdavi-mazdeh M. Is cardiac biomarkers and left ventricular function affected by chronic kidney disease? *Indian Heart J* 2012;64:479-83.
19. Horii M, Matsumoto T, Uemura S, Sugawara Y, Takitsume A, Ueda T, et al. Prognostic value of B-type natriuretic peptide and its amino-terminal proBNP fragment for cardiovascular events with stratification by renal function. *J Cardiol* 2013;61:410-6.
20. Dziedzic M, Petkowicz B, Bednarek-Skublewska A, Solski J, Buczaj A, Choina P. Relationship between renalase and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT pro-BNP) in haemodialysis patients. *Ann Agric Environ Med* 2014;21:132-5.
21. David S, Kumpers P, Seidler V, Biertz F, Haller H, Fliser D. Diagnostic value of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) for left ventricular dysfunction in patients with chronic kidney disease stage 5 on haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23:1370-7.
22. Khan IA, Fink J, Nass C, Chen H, Christenson R, deFilippi CR. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and B-type natriuretic peptide for identifying coronary artery disease and left ventricular hypertrophy in ambulatory chronic kidney disease patients. *Am J Cardiol* 2006;97:1530-4.
23. Michos ED, Wilson LM, Yeh HC, Berger Z, Suarez-Cuervo C, Stacy SR, et al. Prognostic value of cardiac troponin in patients with chronic kidney disease without suspected acute coronary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 2014;161:491-501.
24. Fredericks S, Murray JF, Carter ND, Chesser AM, Papachristou S, Yaqoob MM, et al. Cardiac troponin T and creatine kinase MB content in skeletal muscle of the uremic rat. *Clin Chem* 2002;48:859-68.
25. Kalaji FR, Albitar S. Predictive value of cardiac troponin T and I in hemodialysis patients. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2012;23:939-45.
26. Babuin L, Jaffe AS. Troponin: the biomarker of choice for the detection of cardiac injury. *CMAJ* 2005;173:1191-202.
27. Ellis K, Dreisbach AW, Lertora JL. Plasma elimination of cardiac troponin I in end-stage renal disease. *South Med J* 2001;94:993-6.
28. Bima A, Sikaris K. Towards appreciating appropriate clinical responses to highly sensitive cardiac troponin assays. *Intern Med J* 2012;42:16-22.
29. Paoletti E, Amidone M, Cassottana P, Gherzi M, Marsano L, Cannella G. Effect of sirolimus on left ventricular hypertrophy in kidney transplant recipients: a 1-year nonrandomized controlled trial. *Am J Kidney Dis* 2008;52:324-30.
30. Mahapatra HS, Lalmalsawma R, Singh NP, Kumar M, Tiwari SC. Cardiorenal syndrome. *Iran J Kidney Dis* 2009;3:61-70.
31. Vaziri ND. CKD impairs barrier function and alters microbial flora of the intestine: a major link to inflammation and uremic toxicity. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2012;21:587-92.
32. Zhang W, He J, Zhang F, Huang C, Wu Y, Han Y, et al. Prognostic role of C-reactive protein and interleukin-6 in dialysis patients: a systematic review and meta-analysis. *J Nephrol* 2013;26:243-53.
33. Drüeke TB, Nguyen Khoa T, Massy ZA, Witko-Sarsat V, Lacour B, Descamps-Latscha B. Role of oxidized low-density lipoprotein in the atherosclerosis of uremia. *Kidney Int Suppl* 2001;78:S114-9.
34. Herzog CA, Asinger RW, Berger AK, Charytan DM, Díez J, Hart RG, et al. Cardiovascular disease in chronic kidney disease. A clinical update from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int* 2011;80:572-86.
35. Peluffo G, Radi R. Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology. *Cardiovasc Res* 2007;75:291-302.
36. Giam B, Kaye DM, Rajapakse NW. Role of Renal Oxidative Stress in the Pathogenesis of the Cardiorenal Syndrome. *Heart Lung Circ* 2016;25:874-80.
37. Custódio MR, Koike MK, Neves KR, dos Reis LM, Gracioso FG, Neves CL, et al. Parathyroid hormone and phosphorus overload in uremia: impact on cardiovascular system. *Nephrol Dial Transplant* 2012;27:1437-45.