

Raquel Abadía del Olmo

Efecto renoprotector de los ARAs  
y la dieta hipocalórica en un  
modelo experimental de lesión  
renal precoz en ratas obesas y  
diabéticas (fa/fa)

Departamento  
Medicina, Psiquiatría y Dermatología

Director/es  
Íñigo Gil, Pablo Javier

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>





**Universidad**  
Zaragoza

1542

Tesis Doctoral

# EFECTO RENOPROTECTOR DE LOS ARAS Y LA DIETA HIPOCALÓRICA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE LESIÓN RENAL PRECOZ EN RATAS OBESAS Y DIABÉTICAS (FA/FA)

Autor

Raquel Abadía del Olmo

Director/es

Íñigo Gil, Pablo Javier

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**  
Medicina, Psiquiatría y Dermatología



UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA, PSIQUIATRIA Y DERMATOLOGIA



**Universidad** Zaragoza

“ EFECTO RENOPROTECTOR DE LOS ARAs  
Y LA DIETA HIPOCALÓRICA  
EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE LESIÓN RENAL PRECOZ  
EN RATAS OBESAS Y DIABÉTICAS (fa/fa) “

---

TESIS DOCTORAL

**Autor: RAQUEL ABADIA DEL OLMO**

Licenciado en Medicina. Médico Especialista en Nefrología

**Director: Pablo Javier Iñigo Gil**

Profesor Titular Universidad de Zaragoza.

Médico Especialista Nefrología en HCU Lozano Blesa.

Director Departamento Medicina, Psiquiatría y Dermatología.



*“La ciencia se compone de errores, que a su vez,  
son los pasos hacia la verdad”*

Julio Verne



# AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Iñigo, mi director, por haberme hecho participe de este proyecto y poder plasmar en papel parte del trabajo experimental realizado durante varios años. Gracias por tu confianza, tus consejos, tu dedicación, porque sin tu ayuda no habría sido posible todo esto.

Gracias a Ana Larraga, bioquímica y becaria del proyecto, por todo el esfuerzo y trabajo puesto estos años.

Gracias al grupo de veterinaria de Jesus Osada y Javier Diez por todo el tiempo invertido.

Gracias al servicio de Nefrología del HCU, porque allí a empecé a conocer y querer mi especialidad.

Gracias a mis compañeras de residencia, Rocío, Isabel y Angélica porque no hubiera sido lo mismo sin vosotras.

Gracias a mi servicio del Hospital Militar, a mis compañero/as por aguantarme todos los días, hacer el trabajo mucho más llevadero y convertiros en mi segunda familia.

Gracias a mi familia, en especial a mis padres, por darme los valores que me han ayudado a crecer como persona y como profesional. Y por...todo.

Gracias a mis amigo/as por vuestro apoyo incondicional, y siempre ayudarme a sacar una sonrisa, hasta en los momentos bajos.



El abajo firmante: D. Pablo Javier Iñigo Gil, Profesor Titular de la Universidad de Zaragoza, Director del Departamento de Medicina, Psiquiatría y Dermatología de la Universidad de Zaragoza y Médico Especialista de Nefrología en el HCU Lozano Blesa,

HACE CONSTAR:

Que el trabajo original de investigación titulado: “Efecto renoprotector de los ARAs y la dieta hipocalórica en un modelo experimental de lesión renal precoz en ratas obesas y diabéticas (fa/fa)”, que presenta Dña. Raquel Abadía del Olmo, ha sido realizado bajo mi dirección y se considera adecuado para ser defendido como Tesis para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza.

Y que en cumplimiento de la normativa vigente establecida en los Artículos 21 y 22 del Real Decreto 1393/2007(BOE de 30 de Octubre), por el que se establece la ordenación de las enseñanzas universitarias oficiales, y en el Título II del Acuerdo del “Reglamento sobre Tesis Doctorales”, el trabajo mencionado en el apartado anterior se corresponde con el Proyecto de Tesis presentado por Raquel Abadía del Olmo y aprobado el 8 de Mayo de 2015. Así mismo se destacan los aspectos más notables del trabajo, que a juicio del abajo firmante, son los siguientes:

- La revisión bibliográfica es adecuada y esta actualizada.
- El motivo del estudio está justificado dada la alta frecuencia de obesidad y diabetes en la población general, siendo la búsqueda de medidas preventivas de sus complicaciones el tema principal de la presente Tesis.
- El estudio de este modelo precoz de enfermedad (obesidad/diabetes) y las intervenciones realizadas, suponen la obtención de datos interesantes en varias disciplinas médicas.
- Se presentan datos que se discuten en el contexto de la bibliografía nacional e internacional, y se finaliza con unas conclusiones que vienen respaldadas por los resultados hallados
- Estas conclusiones son importantes para la práctica médica y la salud pública.

En Zaragoza a 23 de septiembre de 2015

**Fdo. Pablo Javier Iñigo Gil**

Profesor Titular Universidad de Zaragoza

Director de la Tesis Doctoral



# ÍNDICE CONTENIDOS

PAG

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	18
I. DIABETES Y NEFROPATIA DIABÉTICA	19
A. Definición y Clasificación diabetes	19
B. Diagnóstico diabetes	23
C. Proteinuria y podocito	25
D. Fisiopatología Nefropatía diabética	29
II. OBESIDAD	34
A. Definición y Clasificación	34
B. Epidemiología	35
C. Adiposidad y Patología Renal	36
III. PROTEINURIA	41
A. Definición microalbuminuria	41
B. Métodos de medición	43
C. Microalbuminuria y disfunción endotelial	45
D. Microalbuminuria y riesgo cardiovascular	48
IV. FACTOR CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA (TGF- $\beta$ )	50
A. Definición	50
B. Mecanismo de acción	50
C. Efectos glomerulares	52
D. Efectos tubulares	55
V. FACTOR CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF)	57
A. Mecanismo de acción	57
B. VEGF y riñón	57
VI. TELMISARTAN	59
<b>2. HIPÓTESIS</b>	63
<b>3. OBJETIVOS</b>	67

<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	71
I. Infraestructura y animales de experimentación .....	73
a. Infraestructura de la actividad experimental .....	73
b. Animales de experimentación .....	73
II. Materiales .....	75
D. Productos para la determinación de parámetros bioquímicos en suero .....	75
E. Productos para la determinación de albumina y creatinina en orina .....	76
F. Productos para la determinación de TGF- $\beta$ 1 y VEGF en orina .....	76
G. Soluciones y reactivos empleados en la determinación cuantitativa del factor transformador del crecimiento (TGF- $\beta$ 1) .....	76
H. Soluciones y reactivos empleados en la determinación cuantitativa del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) .....	77
I. Productos para aislamiento de RNA total, RT-PCR y PCR control .....	77
J. Productos para electroforesis en gel de agarosa .....	78
K. Productos para Real-Time .....	78
III. Métodos .....	78
A. Cronograma recogida muestras .....	78
B. Proceso extracción sangre .....	81
C. Sacrificio y recogida muestras tisulares .....	81
D. Estudio piloto dosificación del fármaco .....	83
E. Tipo dietas y regímenes .....	84
F. Métodos analíticos y procesamiento de las muestras .....	85
IV. Estadística .....	93
<b>5. RESULTADOS</b> .....	95
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	109
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	127
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	133

## ÍNDICE TABLAS

Tabla 1: Cifras estimadas de personas con diabetes por regiones para el 2000 y 2030 y resumen de los cambios poblacionales .....	19
Tabla 2: Clasificación etiológica de la diabetes mellitus .....	21
Tabla 3: Situaciones de mayor riesgo de diabetes .....	23
Tabla 4: Criterios para el diagnóstico de diabetes .....	23
Tabla 5: Prevalencia de sobrepeso y obesidad en población adulta en Europa. Adaptado de IASO .....	35
Tabla 6: Definición de albuminuria .....	43
Tabla 7: Acciones del Telmisartan .....	61
Tabla 8: Composición dieta Purina 5008 .....	84
Tabla 9: Comparativa proteinuria basal y final. Incremento proteinuria .....	98
Tabla 10: Comparativa glucemia basal y final. Incremento glucemia .....	101
Tabla 11: Comparativa peso basal y final .....	103
Tabla 12: Comparativa creatinina basal y final .....	105
Tabla 13: Comparativa BUN basal y final .....	106
Tabla 14: Comparativa TGF-B en orina basal y final. Incremento medio .....	108
Tabla 15: Comparativa VEGF en orina basal y final. Incremento medio .....	109
Tabla 16: Comparativa resultados TGB y VEGF al final del estudio .....	111

## ÍNDICE FIGURAS

Figura 1: Estimaciones en número de personas entre 29 y 79 años enfermas de diabetes para los años 2010 y 2030 .....	20
Figura 2: Alteraciones de la glicemia: causas y fases .....	22
Figura 3: Barrera de filtración glomerular.....	26
Figura 4: Estructura del podocito .....	27
Figura 5: Esquema dominio apical .....	28
Figura 6: Esquema dominio basal .....	28
Figura 7: Esquema diafragma de filtración .....	29
Figura 8: Tendencias de Obesidad entre adultos en EEUU .....	36
Figura 9: Potencial relación entre adiposidad, respuesta renal y enfermedad cardiovascular .....	38
Figura 10: Relación entre MAU con Enfermedad Coronaria y ACV .....	49
Figura 11: Vías de señalización de la síntesis de TGF- $\beta$ /Smads .....	51
Figura 12: Visión integrativa de las consecuencias fisiopatológicas de los efectos glomerular, tubular y vascular del TGF- $\beta$ durante la Enfermedad Renal Crónica.....	56
Figura 13: Rata ZDF utilizada en el experimento .....	74
Figura 14.: Jaulas standard para pequeños roedores .....	74
Figura 15: Cronograma recogida de muestras .....	80
Figura 16.: Analizador Vetscan para análisis bioquímico de muestras séricas .....	84
Figura 17: Preparación de las diluciones a partir del estándar .....	85
Figura 18: Esquema procesamiento de muestras de tejido renal .....	90

Figura 19: Gráfico comparativo proteinuria inicial y final según poblaciones .....	98
Figura 20: Gráfico comparativo incremento proteinuria media .....	100
Figura 21: Gráfico comparativo glucemia inicial y final según poblaciones .....	101
Figura 22: Gráfico comparativo incremento glucemia media.....	102
Figura 23: Gráfico comparativo peso inicial y final según poblaciones .....	104
Figura 24: Gráfico comparativo creatinina inicial y final según poblaciones .....	105
Figura 25: Gráfico comparativo BUN inicial y final según poblaciones .....	107
Figura 26: Gráfico comparativo incremento medio TGF-B en orina .....	109
Figura 27: Gráfico comparativo incremento medio VEGF en orina .....	110
Figura 28: Gráfico comparativo TGF-B y VEGF al final del estudio .....	111
Figura 29: Diferencia volumen corporal entre SD y ZF .....	121
Figura 30: Diferencia entre volumen corporal entre ZF y ZDF .....	121
Figura 31: Comparación estimación FG según edad y masa muscular .....	125
Figura 32: TGF-B estimula al VEGF .....	129

## ABREVIATURAS:

ACV	Accidente Cerebrovascular
ADA	American Diabetes Association
AGE	Productos Glucosilación Avanzada
ALCR	Cociente Albumina/Creatinina en orina
AMPK	Protein Kinasa activada ppor AMP
ARA-II	Antagonista del receptor de la angiotensina II
AT1,2	Angiotensina 1,2
DM	Diabetes Mellitus
EndoMT	Transición epitelio mesangial
EMT	Transición epitelio mesangial
ERC	Enfermedad Renal Crónica
ERCT	Enfermedad Renal Crónica Terminal
EUA	Excreción Urinaria de Albumina
FG	Filtrado glomerular
HbA <sub>1</sub> C	Hemoglobina Glicosilada
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HTA	Hipertensión Arterial
IECA	Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina
IDF	Federación Internacional de la Diabetes
IL-6	Interleuquina 6
ILK	Quinasa ligada a integrina
IMC	Índice masa corporal
LAP	Proteina asociada a latencia
LTBP	Proteina ligante del TGB latente
MAPK	Mitogen activated protein kinasa
MBG	Membrana Basal Glomerular
MEC	Matriz Extracelular

MAU	Microalbuminuria
NADPH	Fosfato dinucleótido de adenina y nicotinamida oxidasa
ND	Nefropatía Diabética
NF-KB	Factor nuclear Kappa B
OMS	Organización Mundial de la Salud
ON	Oxido Nítrico
PCR	Proteína C reactiva
PAI-1	Inhibidor-Activador del Plasminógeno-1
PKC	Proteína kinasa C
PM	Peso Molecular
PPAR- $\gamma$	Peroxisome Proliferator-activated gamma
RCV	Riesgo cardiovascular
RR	Riesgo Relativo
SD	Sprague-Dawley
SMAD	Small mothers against decapentaplegic
SRAA	Sistema Renina Angiotensina Aldosterona
TA	Tensión Arterial
TGF- $\beta$	Factor Crecimiento Transformante $\beta$
TNF- $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral $\alpha$
VEGF	Factor Crecimiento Vascular Endotelial
Z/ZF	Zucker fatty
ZDF	Zucker Diabética y Obesa
ZO-1	Zónula Occludens 1



# 1. INTRODUCCIÓN



# I. DIABETES MELLITUS Y NEFROPATÍA DIABÉTICA

## A. Definición y Clasificación de Diabetes

La Diabetes Mellitus (DM) es un proceso crónico y progresivo constituido por un grupo de enfermedades metabólicas que se caracteriza por hiperglucemia debida a defectos en la secreción de insulina, de su acción o de ambos<sup>1</sup>.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el número de casos de DM en el mundo en el año 2000 en adultos se estimaba en cerca de 171 millones de personas afectadas, un 2.8% de la población mundial (151 millones eran las estimaciones de la International Diabetes Federation, IDF, incluyendo el 90% de los países del mundo – 172 miembros-). Como muestran las figuras, el incremento para el año 2030 se espera que llegue hasta los 366 millones de enfermos; un 4.4% de la población mundial para la OMS, 438 millones, un 5.4% para la IDF<sup>2, 3</sup>.

Region (all ages)	2000	2030	2000–2030		
	Number of people with diabetes	Number of people with diabetes	Percentage of change in number of people with diabetes*	Percentage of change in total population*	Percentage of change in population >65 years of age*
Established market economies	44,268	68,156	54	9	80
Former socialist economies	11,665	13,960	20	-14	42
India	31,705	79,441	151	40	168
China	20,757	42,321	104	16	168
Other Asia and Islands	22,328	58,109	148	42	198
Sub-Saharan Africa	7,146	18,645	161	97	147
Latin America and the Caribbean	13,307	32,959	148	40	194
Middle Eastern Crescent	20,051	52,794	163	67	194
World	171,228	366,212	114	37	134

Tabla 1. Cifras estimadas de personas con diabetes por regiones para el 2000 y 2030 y resumen de los cambios poblacionales. Adaptado de Wild et al. Diabetes Care 2004

Estas previsiones calculadas por grupos de expertos de la OMS y la IDF están probablemente infraestimadas ya que se basan solamente en la progresión de la demografía esperada y no tienen en cuenta la evolución de la obesidad en las próximas décadas. Teniendo en cuenta el esperado incremento en la prevalencia de la obesidad como un factor de riesgo para DM, el número de casos de DM podría ser incluso mayor del estimado.

El aumento de la evidencia a favor de intervenciones efectivas, que incluyen cambios en la dieta y la actividad física, o tratamientos farmacológicos para reducir la prevalencia de DM, da un impulso para una más amplia introducción de enfoques preventivos<sup>4</sup>.

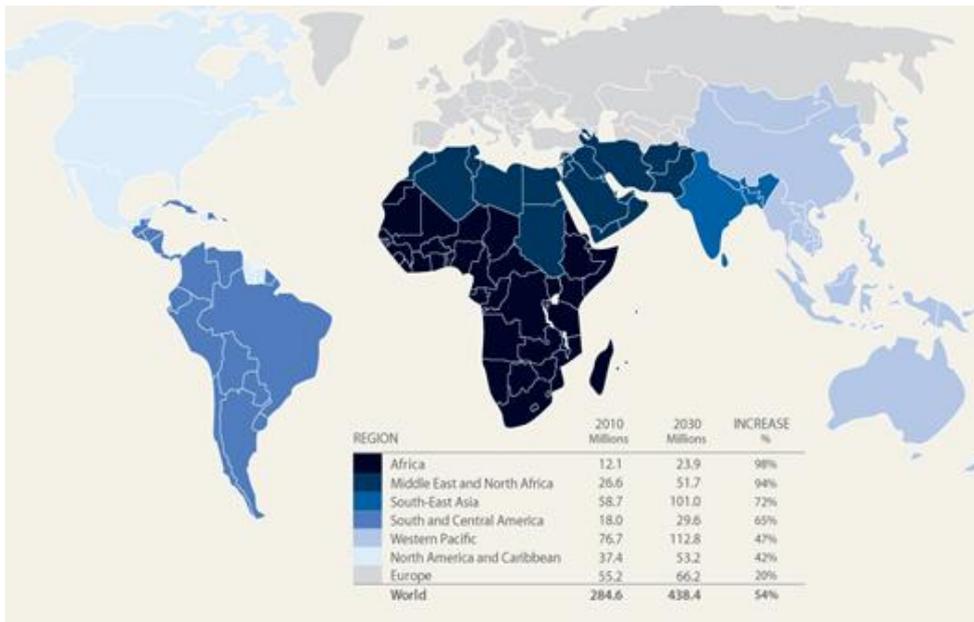


Figura 1. Estimaciones en número de personas entre 29 y 79 años enfermas de diabetes para los años 2010 y 2030. Adaptado de IDF Diabetes Atlas 4th ed. 2009.

Referente a las intervenciones en el estilo de vida capaces de incidir en la aparición de DM, el Finnish Diabetes Prevention Study (DPS) fue el primer estudio controlado, aleatorizado que mostró que la DM-2 es prevenible. El riesgo de Diabetes fue reducido en un 58% en el grupo de intervención intensiva sobre el estilo de vida comparado con el grupo control<sup>5</sup>.

Estos resultados han sido reproducidos por el Diabetes Prevention Program (DPP) en el cual las intervenciones en el estilo de vida produjeron una reducción similar del riesgo (58%) siendo esta, incluso mayor que en el grupo tratado con Metformina<sup>6</sup>.

Según la American Diabetes Association (ADA) podemos clasificar la DM en 4 grupos<sup>7</sup>:

1. Diabetes Mellitus tipo 1: Cursa con déficit absoluto de insulina, por destrucción de las células beta pancreáticas por un proceso autoinmune o de causa idiopática.
2. Diabetes Mellitus tipo 2: Se caracteriza por una resistencia a la acción tisular de la insulina.
3. Otros tipos específicos de diabetes asociados a defectos genéticos de la célula beta, defectos genéticos en la acción de la insulina, enfermedades asociadas a procesos que afectan al páncreas exocrino, endocrinopatías, fármacos o sustancias químicas, infecciones, formas infrecuentes de diabetes autoinmunes y otros síndromes que a veces se asocian a la enfermedad.
4. Diabetes gestacional

<p>I. Diabetes tipo 1 (destrucción de las células beta, que lleva habitualmente al déficit absoluto de insulina)</p> <p>A. De mecanismo inmune</p> <p>B. Idiopática</p>	<p>5. Hipertiroidismo</p> <p>6. Somatostatina</p> <p>7. Aldosterona</p> <p>8. Otras</p>
<p>II. Diabetes tipo 2 (que abarca desde la resistencia a la insulina predominante con déficit de insulina relativo hasta el déficit predominante de secreción con resistencia a la insulina)</p>	<p>E. Fármacos o tóxicos</p> <p>1. Vacor</p> <p>2. Pentamidina</p> <p>3. Ácido nicotínico</p> <p>4. Glucocorticoides</p> <p>5. Hormona tiroidea</p> <p>6. Diazóxido</p> <p>7. Agonistas betaadrenérgicos</p> <p>8. Tiazidas</p> <p>9. Difenilhidantolna</p> <p>10. Interferón gamma</p> <p>11. Otros</p>
<p>III. Otros tipos específicos</p> <p>A. Defectos genéticos de la función de las células beta</p> <p>1. Cromosoma 12, HNF-1<math>\alpha</math> (MODY3)</p> <p>2. Cromosoma 7, glucokinasa (MODY2)</p> <p>3. Cromosoma 20, HNF-4<math>\alpha</math> (MODY1)</p> <p>4. Cromosoma 13, factor promotor de insulina -1 (IPF-1; MODY4)</p> <p>5. Cromosoma 17, HNF-1<math>\beta</math> (MODY5)</p> <p>6. Cromosoma 2, <i>NeuroD1</i> (MODY6)</p> <p>7. ADN mitocondrial</p> <p>8. Otros</p> <p>B. Defectos genéticos de la acción de la insulina</p> <p>1. Resistencia a la insulina de tipo A</p> <p>2. Leprechaunismo</p> <p>3. Síndrome de Rabson-Mendenhall</p> <p>4. Diabetes lipoatrófica</p> <p>5. Otros</p> <p>C. Enfermedades del páncreas exocrino</p> <p>1. Pancreatitis</p> <p>2. Traumatismo/pancreatectomía</p> <p>3. Neoplasia</p> <p>4. Fibrosis quística</p> <p>5. Hemocromatosis</p> <p>6. Pancreatopatía fibrocalculosa</p> <p>7. Otras</p> <p>D. Endocrinopatías</p> <p>1. Acromegalia</p> <p>2. Síndrome de Cushing</p> <p>3. Glucagonoma</p> <p>4. Feocromocitoma</p>	<p>F. Infecciones</p> <p>1. Rubéola congénita</p> <p>2. Citomegalovirus</p> <p>3. Otras</p> <p>G. Formas raras de diabetes de mecanismo inmune</p> <p>1. Síndrome de la «persona rígida»</p> <p>2. Anticuerpos anti-receptor de insulina</p> <p>3. Otras</p> <p>H. Otros síndromes genéticos que pueden asociarse con diabetes</p> <p>1. Síndrome de Down</p> <p>2. Síndrome de Klinefelter</p> <p>3. Síndrome de Turner</p> <p>4. Síndrome de Wolfram</p> <p>5. Ataxia de Friedreich</p> <p>6. Corea de Huntington</p> <p>7. Síndrome de Laurence-Moon-Biedl</p> <p>8. Distrofia miotónica</p> <p>9. Porfiria</p> <p>10. Síndrome de Prader-Willi</p> <p>11. Otros</p>
	<p>IV. Diabetes mellitus gestacional</p>

Cualquiera de las formas de diabetes puede requerir tratamiento con insulina en algún momento de la evolución. La necesidad de insulina no clasifica al paciente por sí misma.

Tabla 2. Clasificación etiológica de la diabetes mellitus.

Es frecuente que durante un largo período de tiempo antes de que se detecte la DM exista cierto grado de hiperglucemia, suficiente como para causar cambios patológicos y funcionales en diversos tejidos, pero sin mostrar síntomas clínicos. Durante este período asintomático es posible demostrar alteraciones del metabolismo de los carbohidratos mediante la determinación de la glucemia en ayunas o tras sobrecarga con glucosa oral<sup>8</sup>.

Fases Tipos	Normoglucemia	Hiperglucemia		
	Normoglucemia	Intolerancia a la glucosa o glucemia basal anormal (prediabetes)	No requiere insulina	Diabetes mellitus Requiere insulina para control Requiere insulina para sobrevivir
Tipo 1 <sup>a</sup>	←			→
Tipo 2 <sup>a</sup>	←		→	
Otros tipos específicos <sup>b</sup>	←		→	
Diabetes gestacional <sup>b</sup>	←		→	

Figura 2. Alteraciones de la glicemia: causas y fases

En los años 1997 y 2003, el Expert Committee on Diagnosis and Classification of DM reconoció la existencia de un grupo intermedio de individuos cuyos niveles de glucosa no reunían los criterios para el diagnóstico de DM pero superaban los considerados normales<sup>9,10</sup>.

Estos individuos se clasifican como glucemia anormal en ayunas (glucemia en ayunas entre 100 y 125 mg/dl) o intolerancia a la glucosa (glucemia a las dos horas en el test de tolerancia oral a la glucosa entre 140 y 199 mg/dl), incluyéndose en un grupo denominado “prediabetes” para señalar el alto riesgo que tienen de desarrollar DM más adelante.

Glucemia en ayunas anormal: Entre 100 y 125 mg/dl
Intolerancia a la glucosa: glicemia a las 2 horas de sobrecarga oral con 75 g de glucosa entre 140 y 199 mg/dl.
HbA1c entre 5.7 y 6.4%

Tabla 3. Situaciones de mayor riesgo de diabetes

La glucemia anormal en ayunas y la intolerancia a la glucosa se relacionan con la obesidad (en especial, con la obesidad abdominal o visceral), la dislipemia con elevación de triglicéridos y disminución del colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad (HDL), y la hipertensión<sup>11</sup>. Las intervenciones sobre el estilo de vida, con la pretensión de aumentar la actividad física y reducir en un 5-10 % el peso corporal, así como algunos fármacos, han demostrado prevenir o retardar el desarrollo de diabetes en individuos con intolerancia a la glucosa<sup>12, 13, 14</sup>.

## B. Diagnóstico de Diabetes

Hb A1c $\geq$ 6.5% (el análisis debe practicarse con un método certificado por el NGSP y estandarizado por el análisis DCCT) <sup>a</sup> .
o
Glucemia en ayunas $\geq$ 126 mg/dl (ayunas significa abstención de ingesta calórica durante al menos ocho horas) <sup>a</sup>
o
Glucemia a las 2 horas tras la sobrecarga oral de glucosa $\geq$ 200 mg/dl (la prueba debe realizarse tal y como señala la OMS con 75 g de glucosa anhidra disueltos en agua) <sup>a</sup>
o
En un paciente con los síntomas clásicos de la hiperglucemia o con crisis hiperglucémicas, una glucemia aleatoria $\geq$ 200 mg/dl

<sup>a</sup> En ausencia de hiperglucemia, los criterios 1-3 deben comprobarse una segunda vez.

Tabla 4. Criterios para el diagnóstico de diabetes

La HbA1C se utiliza como marcador de la glucemia crónica, pues refleja el promedio de los niveles de glucosa a lo largo de un período de 2-3 meses, por lo que parece adecuado utilizar un marcador de disglucosis crónica frente a un análisis que refleja solamente un momento agudo, en especial desde que los clínicos se han familiarizado con la HbA1C como marcador de control glucémico<sup>15</sup>.

Además la HbA1C tiene varias ventajas sobre la glucemia en ayunas:

- Es más fácil de practicar, puesto que no se requiere estar en ayunas.
- La estabilidad previa al análisis es mayor.
- Se altera menos durante períodos de estrés o enfermedad.

Los inconvenientes serían:

- Su mayor coste.
- La limitada disponibilidad en ciertos países en desarrollo.
- La correlación incompleta entre esta cifra y la glucemia promedio en ciertos individuos.

Al igual que sucede con la mayoría de los métodos diagnósticos, el resultado de un procedimiento en base al cual se confirma la presencia de DM debe repetirse para descartar errores del laboratorio, a menos que el diagnóstico esté claro en términos clínicos, como en los pacientes con los síntomas clásicos de hiperglucemia o crisis hiperglucémicas. Es preferible que la confirmación se haga con el mismo procedimiento inicial, pues hay más probabilidades de que los resultados sean concordantes<sup>16</sup>.

La DM representa la séptima causa de muerte en USA y la principal de Enfermedad Renal; Según datos de US Renal Data Set (USRDS) la incidencia de Enfermedad Renal Crónica ha aumentado de 18,000 personas en 1990 a 51,000 en 2009<sup>17</sup>.

De las 398.061 personas que precisaron Terapia Sustitutiva Renal en 2009, 44% fueron secundarios a Nefropatía Diabética (ND), la cual como ha quedado demostrado en múltiples estudios es un factor de Riesgo de eventos cardiovasculares y muerte

prematura<sup>18, 19</sup>; Pacientes con Enfermedad Renal Terminal secundaria a ND tienen una mortalidad 22% mayor que cuando se les compara con No Diabéticos durante el primer año de Terapia sustitutiva<sup>20</sup>.

La DM-2 supone en torno al 90 % de todos los casos de diabetes, y su prevalencia está aumentando en todo el mundo occidental como consecuencia del envejecimiento de la población, el aumento de la Obesidad, los hábitos de vida sedentarios y las mejoras en el cribado y diagnóstico<sup>21</sup>.

### C. Proteinuria y podocito

En una persona sana, la excreción urinaria de proteínas es menor de 150 mg/día y está formada principalmente por Proteínas plasmáticas filtradas (60%) y Proteína Tubular Tamm-Horsfall (40%).

Los glomérulos que junto al sistema tubular conforman la Nefrona, unidad anatomofuncional del Riñón, retienen las proteínas que se filtran directamente a través de la sangre en particular las de Peso Molecular (PM) superior a 67 kD, las proteínas con un PM inferior a este atraviesan la barrera de filtración glomerular, pero son reabsorbidas a nivel tubular<sup>22</sup>.

Hay varios tipos de proteinuria<sup>23</sup>:

Tipo	Características
Glomerular	Más común (90%) Pérdida de albúmina y proteínas de PM elevado
Tubular	Por alteración en la reabsorción Proteínas de PM bajo como $\beta$ 2-microglobulina
Sobreproducción	Producción aumentada (Mieloma Múltiple)
Post-ejercicio	Benigna transitoria, puede ser hasta de 10 g/día
Post-prandial	Proteinuria fisiológica transitoria

El glomérulo renal es un lecho vascular altamente especializado que se encarga de la ultrafiltración selectiva del plasma manteniendo las proteínas esenciales en la sangre.

La Membrana Basal Glomerular (MBG) provee el soporte estructural primario del ovillo glomerular y junto con la pared del endotelio capilar y los pedicelos de los podocitos forman la llamada Barrera de Filtración Glomerular<sup>24, 25</sup>.

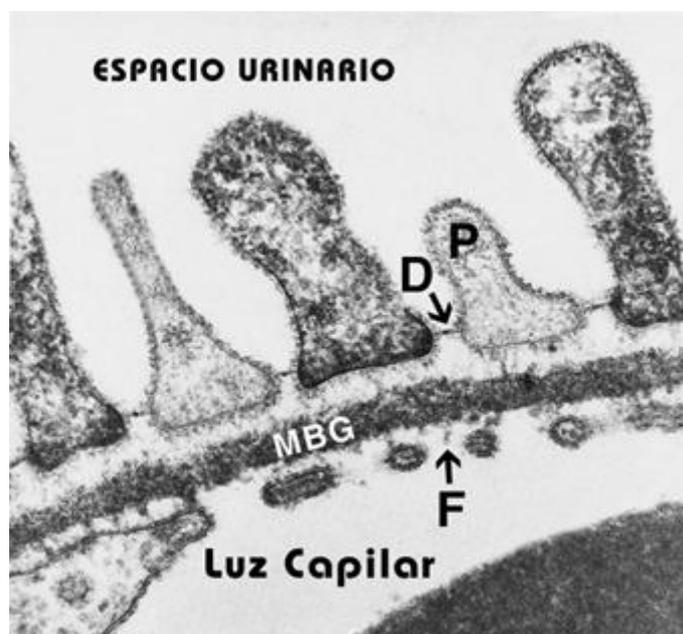


Figura 3: Barrera de filtración glomerular

Los podocitos son células altamente especializadas, que pierden su capacidad de división tras la etapa embrionaria<sup>26</sup>. Sus principales funciones consisten en ofrecer estabilidad al glomérulo contrarrestando las distensiones de la MBG, oponiéndose a la alta presión hidrostática necesaria para la filtración en el glomérulo, participando además en la síntesis y mantenimiento de la MBG<sup>2</sup>

La estructura del podocito consta de tres partes:

1. El cuerpo celular
2. Unas prolongaciones principales (procesos mayores)
3. Unas prolongaciones finales (los pedicelos).

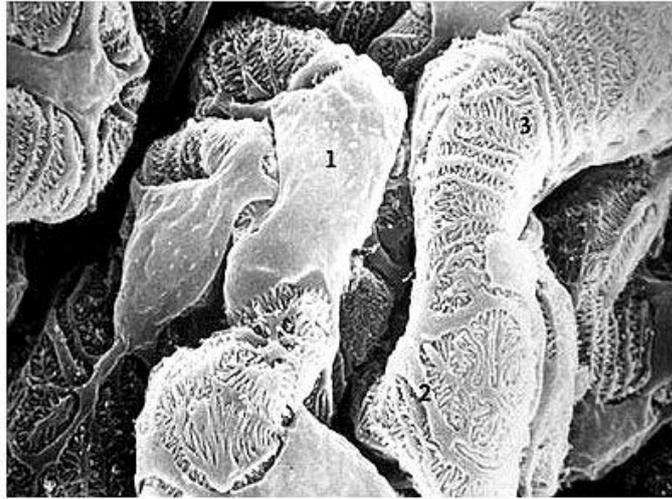


Figura 4: Estructura del podocito

El cuerpo celular del podocito presenta un núcleo, aparato de Golgi y un retículo endoplásmico desarrollado lo que indica una alta actividad anabólica/catabólica en la célula. Los procesos mayores se caracterizan por escasas organelas citoplasmáticas con un citoesqueleto muy desarrollado formado mayoritariamente por tubulina y filamentos de actina que se continúan con los pedicelos cuya estructura está basada en microfilamentos contráctiles de actina asociados con miosina-II y  $\alpha$ -actinina<sup>28</sup>.

Se encuentran anclados a la MBG a través de diferentes complejos de unión como la  $\alpha3\beta1$ -integrina y los  $\alpha$  y  $\beta$ -dextróglicanos. Los pedicelos se interdigitan con los pedicelos de los podocitos vecinos formando entre ellos la hendidura de filtración, que presenta una anchura constante de entre 30 – 40 nm<sup>28</sup>.

La hendidura de filtración se puede dividir en 3 dominios funcionales:

- Dominio apical: Zona luminal de la célula que se encuentra suspendida en el espacio urinario, su superficie se encuentra cargada negativamente por la presencia de proteínas aniónicas, principalmente: podocalixina, podoplanina y podoendina que tienen como función: repeler el paso de proteínas, mantener los pedicelos adyacentes separados y evitar las adherencias con las células parietales.

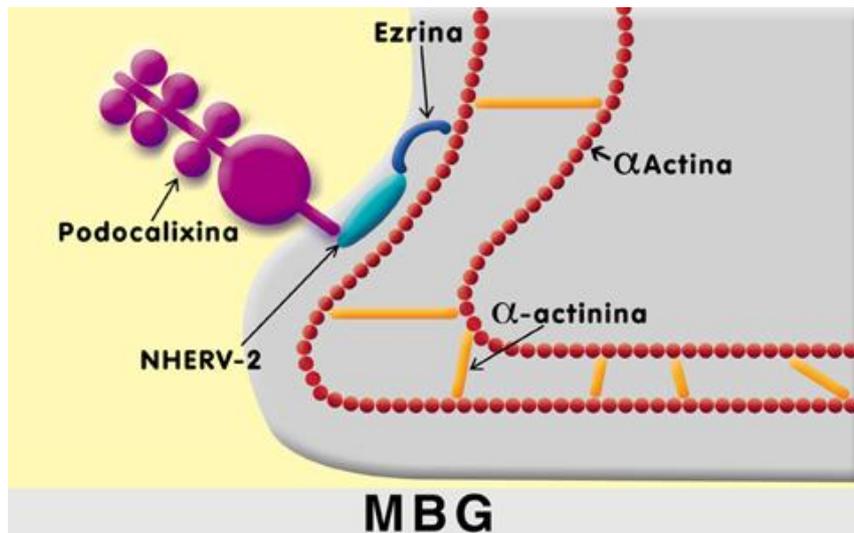
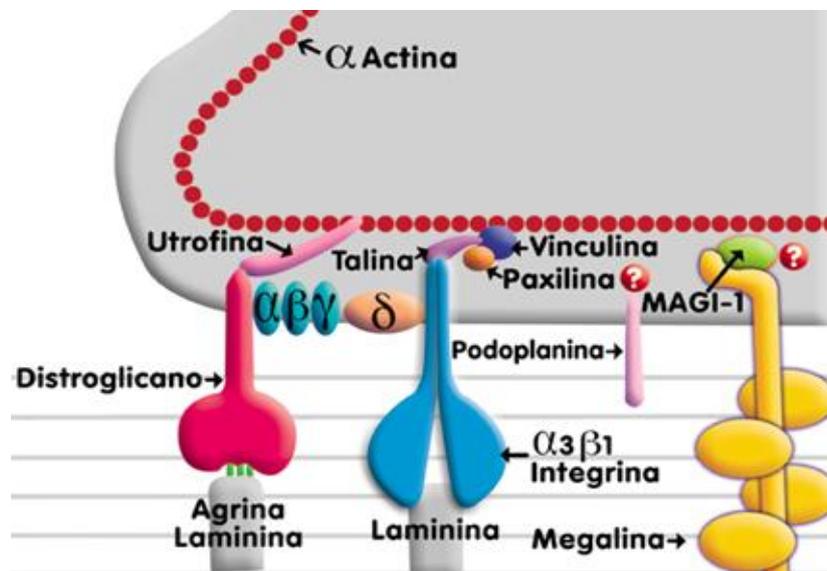


Figura 5: esquema dominio apical

- Dominio Basal: Zona de anclaje a la MBG. Este anclaje se realiza a través de diferentes complejos proteicos:  $\alpha 3\beta 1$ -integrinas y  $\alpha/\beta$ -dístroglicanos.

Figura 6: esquema dominio basal



- Diafragma de filtración: Complejo proteico formado por varias proteínas entre las que destacan la nefrina, podocina, proteína adaptadora CD2AP y la zónula ocludens 1 (ZO-1)<sup>29</sup>.

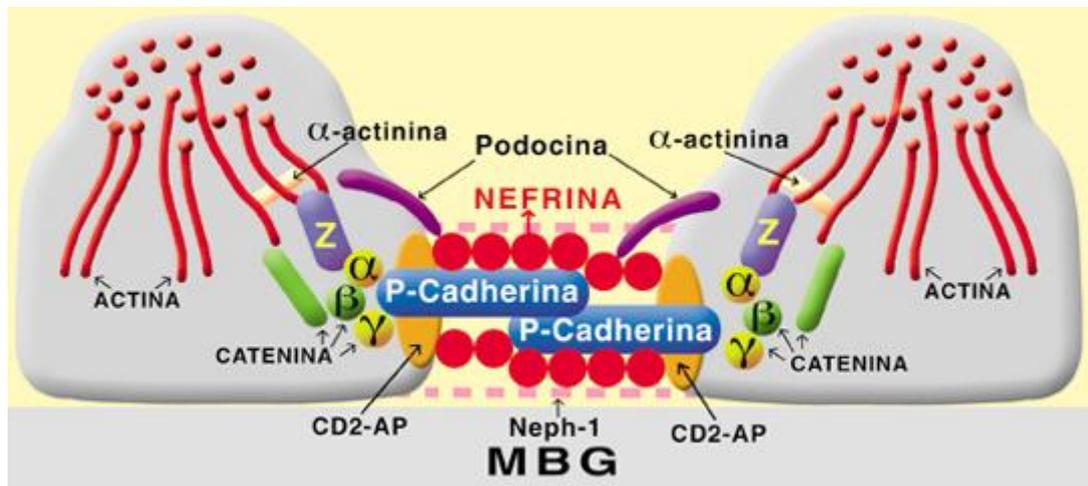


Figura 7: Esquema diafragma de filtración

## D. Fisiopatología de la nefropatía diabética

Los mecanismos fisiopatológicos básicos que llevan al desarrollo de ND son similares tanto en la Diabetes tipo 1 como en la 2.

Dentro de los primeros cambios observados en la ND se encuentra el aumento de tamaño glomerular que puede llevar a cambios del tamaño renal de hasta centímetros. Este crecimiento ocurre por proliferación de células mesangiales, expansión de podocitos y aumento de capilares, lo que lleva a un agrandamiento de la superficie glomerular favoreciendo la hiperfiltración que se aprecia en la etapa inicial de esta entidad. Esta fase dura aproximadamente 5 años durante los cuales se genera un engrosamiento de la MBG, hipertrofia glomerular y expansión mesangial, todos estos cambios son previos al desarrollo de microalbuminuria<sup>30, 31</sup>.

A medida que la ND avanza, la matriz mesangial prolifera; lo que puede explicarse por la acción de Productos de glucosilación avanzada (AGE) que no son más que un grupo de macromoléculas formadas por la interacción de la glucosa con proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, cuya aparición se ve favorecida en ambientes hiperglucémicos, proceso

reversible en su inicio pero que al persistir la hiperglucemia, se unen de manera permanente al colágeno<sup>32</sup>.

A nivel renal los AGE:

1. Disminuyen la expresión de nefrina<sup>33</sup>.
2. Favorecen la apoptosis celular a través de la activación de MAP cinasa y la alteración de la proteína reguladora del ciclo celular p27<sup>34</sup>.
3. Disminuyen la expresión de proteoglicanos del dominio apical del podocito<sup>35</sup>.
4. Incrementan los niveles de varias citocinas proinflamatorias como el Factor de Crecimiento Transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y la producción de especies reactivas de Oxígeno<sup>33</sup>.

Los AGE también interactúan con el Receptor de la Enzima Convertidora de Angiotensina en podocitos y células tubulares causando una disminución en la producción de Oxido Nítrico (ON).

La hiperglucemia también favorece la formación de especies reactivas de Oxígeno (Superóxido) que a nivel podocitario:

- Favorece el desprendimiento celular ya que causa dimerización del colágeno tipo IV de la MBG<sup>36</sup>.
- Produce polimerización de los filamentos de actina del podocito lo que lleva a una disfunción del citoesqueleto con cambios estructurales en los pedicelos y ensanchamiento del Diafragma de filtración<sup>33</sup>.
- Disminuye la síntesis de proteoglicanos perdiéndose la carga negativa superficial<sup>37</sup>.
- Favorece la transición epiteliomesenquimal<sup>38</sup>.
- Incrementa los niveles de TGF- $\beta$ <sup>34</sup>.

El stress oxidativo junto con los AGE llevan a la formación de Proteína cinasa C (PKC), la cual es un regulador de múltiples funciones vasculares y activación de factores de crecimiento<sup>39</sup>.

A nivel renal la activación de PKC aumenta la producción de angiotensina causando hiperfiltración así como la fosforilación de proteínas del citoesqueleto de uniones intercelulares lo que lleva a una mayor permeabilidad de las paredes vasculares, a su vez también contribuye a la producción de TGF- $\beta$  por parte del podocito<sup>40</sup>.

El TGF- $\beta$  produce varias alteraciones a este nivel:

1. Estimula la síntesis de MEC por parte de los podocitos de un modo autocrino o paracrino induciendo la síntesis por parte de las células mesangiales<sup>41</sup>.
2. Disminuye la síntesis de nefrina y ZO-1, lo que produce una alteración estructural del Diafragma de filtración con el consiguiente desprendimiento y pérdida de podocitos<sup>38</sup>.
3. Induce apoptosis de los podocitos por activación de la cascada de la MAP-cinasa y de la caspasa 3, así como por inhibición de la señal del nuclear factor KB (NF -KB) que es un factor de supervivencia celular<sup>42</sup>.

A nivel celular los tres principales procesos responsables de la ND incluyen cambios hemodinámicos intraglomerulares, alteraciones metabólicas incluyendo hiperglicemia y activación de factores de crecimiento. Estos son procesos interdependientes que crean cambios patológicos.

1. Cambios Hemodinámicos:

La Hipertensión Arterial (HTA) es un factor predictor establecido para el desarrollo de ND. En los riñones sanos el aparato yuxtaglomerular y la retroalimentación túbulo-glomerular se encargan de regular estrechamente el flujo sanguíneo a cada glomérulo en un amplio margen de cifras tensionales para prevenir daño<sup>43, 44</sup>.

En el inicio de la ND la dilatación de la Arteriola Aferente es más marcada que la de la Eferente lo que lleva a un mayor flujo sanguíneo a través del glomérulo, esto causa un aumento en la presión hidrostática transcáptica y en última instancia lleva a hiperfiltración. Una presión glomerular aumentada genera shear-stress que lleva a que las células mesangiales, endoteliales y podocitos activen procesos de transducción y liberen citocinas y factores de crecimiento.

El TGF- $\beta$  que se encuentra aumentado por la hiperglicemia y por la hiperfiltración lleva a una mayor dilatación de la arteriola aferente, expansión de matriz mesangial, daño podocitario y engrosamiento de MBG<sup>30, 31</sup>.

En la hiperfiltración, al aumentar el ultrafiltrado se aumenta también la presión Osmótica causando una reabsorción acelerada de Sodio en el túbulo proximal. La producción de Angiotensina II está aumentada causando hipertrofia de células proximal y aumentando la reabsorción de Sodio, debido a este aumento neto en la reabsorción de dicho ion se aumenta la Tensión arterial y más aumenta el shear-stress<sup>45</sup>.

## 2. Alteraciones Metabólicas: Hiperglucemia

### 3. Activación de Factores de crecimiento:

- TGF- $\beta$  (Factor de crecimiento transformante  $\beta$ ): Su producción está aumentada por Angiotensina II, AGE, hiperglucemia y Shear-stress. Este factor es responsable del aumento en la producción de matriz por parte de las células mesangiales, apoptosis de podocitos y transición de células tubulares a fibroblastos.

- VEGF (Factor de crecimiento vascular endotelial): Citocina que estimula la proliferación endotelial y aumenta la permeabilidad vascular. A nivel renal se expresa en podocitos y células tubulares<sup>46</sup>. La expresión del VEGF podocitario se ve incrementada en presencia de hiperglucemia, los AGE, TGF- $\beta$  y Angiotensina II, también se ha demostrado que esta citocina estimula la producción de la cadena  $\alpha 3$

del colágeno tipo IV, contribuyendo a las alteraciones de la MBG observadas en la ND<sup>47</sup>.

- Angiotensina II: Los podocitos presentan un sistema renina-angiotensina propio descrito tanto en células humanas<sup>48</sup> como de ratón<sup>49</sup>.

La hiperglucemia, así como los mayores niveles de stress oxidativo llevan a un incremento en los niveles de angiotensinógeno y consecuentemente un aumento de Angiotensina II lo que da lugar a:

- Alteración del Diafragma de filtración por reorganización del citoesqueleto, con redistribución de ZO-1<sup>50</sup>.
- Favorece la apoptosis celular, actuando a través de receptores AT1 y AT2<sup>51</sup>.
- Disminuye la cantidad de proteoglicanos en superficie, por lo que altera la carga negativa de esta<sup>33</sup>.
- Activa la fosfato de dinucleótido de adenina y nicotinamida (NADPH) oxidasa, lo que aumenta el estrés oxidativo<sup>31</sup>.

## II. OBESIDAD

### A. Definición y Clasificación

El sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que es perjudicial para la salud<sup>52</sup>

El índice de masa corporal (IMC) es un indicador simple de la relación entre el peso y la talla que se utiliza frecuentemente para identificar el sobrepeso y la obesidad en los adultos. Se calcula dividiendo el peso de una persona en kilos por el cuadrado de su talla en metros (kg/m<sup>2</sup>)

La clasificación de la OMS<sup>52</sup>, una de las más usadas es la siguiente:

	IMC (Kg/m <sup>2</sup> )
Bajo Peso	< 18.5
Normal	18.5-24.9
Sobrepeso	25.0-29.9
Obesidad grado I	30.0-34.9
Obesidad grado II	35.0-39.9
Obesidad extrema o grado III	≥ 40

- Un IMC igual o superior a 25 determina sobrepeso.
- Un IMC igual o superior a 30 determina obesidad.

Cada año fallecen por lo menos 2,8 millones de personas adultas como consecuencia del sobrepeso o la obesidad. Además del 44% de la carga de DM, el 23% de la carga de cardiopatías isquémicas y entre el 7 y el 41 % de la carga de algunos cánceres son atribuibles al sobrepeso y la obesidad<sup>53, 54</sup>.

La causa fundamental del sobrepeso y la obesidad es un desequilibrio energético entre calorías consumidas y gastadas<sup>55</sup>. En el mundo, se ha producido:

- ❖ un aumento en la ingesta de alimentos hipercalóricos que son ricos en grasa, sal y azúcares pero pobres en vitaminas, minerales y otros micronutrientes, y
- ❖ un descenso en la actividad física como resultado de la naturaleza cada vez más sedentaria de muchas formas de trabajo, de los nuevos modos de desplazamiento y de una creciente urbanización.

## B. Epidemiología

La prevalencia de Obesidad se ha triplicado en las últimas 2 décadas<sup>56</sup>. Según cifras de la OMS, se estima que 1.7 billones de personas alrededor del mundo padecen sobrepeso y 310 millones son obesos. Al igual que la DM, la Obesidad no sólo afecta a los países catalogados como desarrollados, sino que también está afectando a muchos países en vías de desarrollo, habiéndose triplicado el número de personas que padecen Obesidad en los últimos veinte años<sup>57</sup>.

Los datos que revelan las estimaciones de la International Obesity Task Force son de 1.1 billones de adultos en el nivel de sobrepeso y 312 millones obesos. Bibbins-Domingo y colaboradores, en el año 2007, estimaron la prevalencia de la obesidad en las personas de 35 años para el 2020 basándose en los datos de sobrepeso en adolescentes en el año 2000.

Predecían que para entonces, la prevalencia de la obesidad entre los adultos de 35 años, sería del 30-37% entre los hombres y del 34-44% entre las mujeres. Como consecuencia, ellos proyectaban que la prevalencia de la enfermedad arterial coronaria se incrementaría entre un 5 y un 16% con un exceso de más de 100.000 casos atribuibles a la obesidad<sup>58</sup>.

En Europa se estima que el 35.9% de los adultos padecen sobrepeso y un 17.2% son obesos, resultando en un 53% de población europea. En total se estima que >143 millones de adultos están en la franja del sobrepeso y un 68.5 millones son obesos. Más hombres que mujeres tienen sobrepeso (>82 millones frente a 61 millones respectivamente) y, al contrario, más mujeres son obesas (37 millones comparados con 31 millones respectivamente)<sup>59</sup>.

	Number obese (BMI $\geq$ 30 kg/m <sup>2</sup> )	Number overweight (BMI 25-29.9 k/m <sup>2</sup> )	Number either overweight or obese (BMI $\geq$ 25 kg/m <sup>2</sup> )
All Adults	68,520,922	143,047,617	211,568,538
Males	31,219,305	82,230,544	113,449,850
Females	37,301,616	60,817,072	98,118,689

Tabla 5. Prevalencia de sobrepeso y obesidad en población adulta en Europa. Adaptado de IASO

Igual que en Europa, la prevalencia de Obesidad en Estados Unidos se duplicó entre 1980 y 2004, manteniéndose estable en el periodo 2005-2006. Según los datos del registro NHANES (The National Health and Nutrition Examination Survey), el 17.1% de los niños y adolescentes padecían sobrepeso, y el 32.2% de los adultos eran obesos, con un incremento sustancial en la última década (del 27.5% en 1999 al 31.1% del año 2004)<sup>60</sup>.

En los años 2006-2008, las estimaciones seguían siendo similares, aproximadamente un tercio de la población adulta obesa, lo que suponía más de 72 millones de personas. (<http://www.cdc.gov/nchs/about/major/nhanes/datalink.htm>).

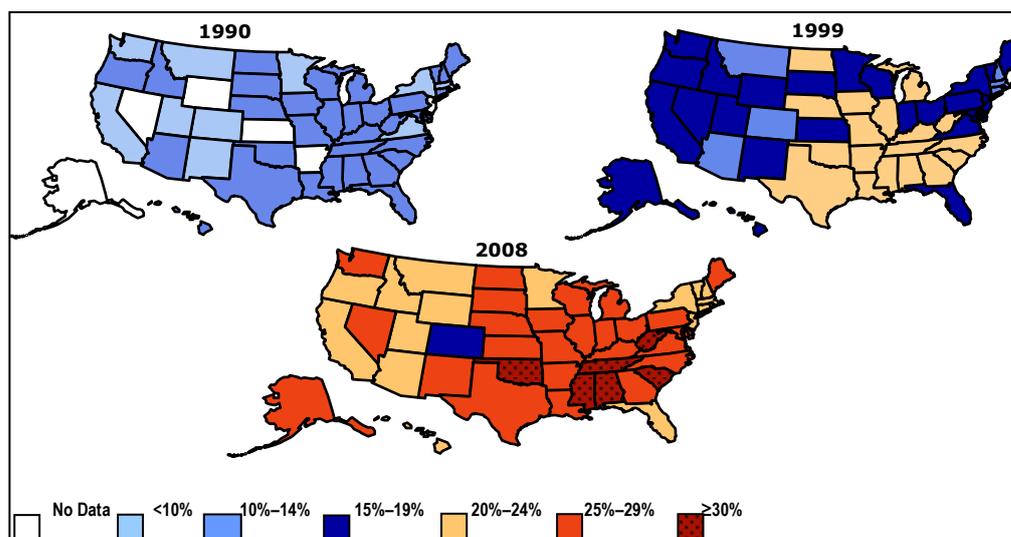


Figura 8. Tendencias de Obesidad entre adultos en EEUU. Adaptado del Behavioral Risk Factor Surveillance System, BRFS, años 1990,1999, y 2008.

### C. Adiposidad y patología renal

El aumento paralelo de la prevalencia de Enfermedad Renal Crónica y Obesidad en particular en Estados Unidos llevó a valorar de una manera más precisa si el riesgo renal se relacionaba con el sobrepeso independientemente de la Hipertensión Arterial y DM.

Los diseños de estos estudios se podían clasificar en 2 categorías: 1. Relación entre el IMC y Riesgo Renal y 2. Riesgo renal ligado a la existencia de Síndrome metabólico, así varios estudios demostraron que había una correlación entre la presencia de Síndrome metabólico, MAU e Insuficiencia Renal. Los riesgos relativos para un FG < 60 mL/min eran de 1.24 y 2.6 y para una relación Albúmina/Creatinina > 30 mg/g de 1.9<sup>61, 62</sup>.

La cronología del exceso de peso también parece tener un papel clave en el desarrollo de daño renal ya que pacientes que a la edad de 20 años no eran ni hipertensos ni diabéticos pero tenían un IMC > 25 Kg/m<sup>2</sup> presentaban un aumento de hasta tres veces en el riesgo de desarrollar Enfermedad Renal Crónica<sup>63, 64</sup>.

El sobrepeso y la obesidad son el quinto factor principal de riesgo de defunción en el mundo y a nivel renal específicamente la obesidad se ha relacionado con disminución de la función renal y albuminuria la cual es actualmente aceptada como un marcador de disfunción endotelial que representa una alteración vascular sistémica<sup>65</sup>.

Fox y colaboradores demostraron en un estudio epidemiológico llevado a cabo en 2.585 participantes a los que se realizó un seguimiento por un tiempo promedio de 18 años, que el 9.4% de estos que tenían función renal normal al inicio del estudio desarrollaban Enfermedad Renal siendo el IMC un factor de riesgo significativo para el desarrollo de la misma; estos mismos datos fueron corroborados por otros estudios epidemiológicos en diferentes partes del mundo<sup>66</sup>.

Se reconoce actualmente que los adipocitos son células endocrinas activas, con un sistema renina-angiotensina propio y capaces de secretar diferentes tipos de sustancias entre las que se encuentran: TNF  $\alpha$ , IL-6, PAI 1 y TGF  $\beta$  así como hormonas específicas de los adipocitos como: Leptina, Resistina y Adiponectina<sup>67, 68</sup>. Esta última es una proteína de 30 kD que se encuentra disminuida en pacientes obesos y que presenta 2 receptores a saber: AdipoR1 que se distribuye de manera universal y es responsable de la activación de AMPK (Protein cinasa activada por AMP) y AdipoR2 presente en el hígado que media la activación de PPAR  $\alpha$ , ambos receptores son necesarios para la sensibilidad a la insulina mediada por adiponectina<sup>69, 70</sup>.

Diversos estudios han mostrado repetidamente una correlación negativa entre niveles de adiponectina y albuminuria<sup>71, 72</sup>, por lo que se diseñó uno con ratones knock-out de adiponectina para tratar de demostrar la relación causal entre estas, y mostró que los niveles de albuminuria basales estaban aumentados y había esfacelación de podocitos<sup>73</sup>.

Estos expresaban el receptor AdipoR1 y recordemos que la adiponectina regula una isoforma de Oxidasa NADPH (NOX4) a través de AMPK, el tratamiento de estos ratones con Adiponectina normalizó los niveles de albúmina y la alteración podocitaria, por lo que los autores proponen que con el aumento de masa grasa, los adipocitos viscerales disminuyen la síntesis de adiponectina circulante y aumentan la producción de adipocinas que favorecen la resistencia a la insulina.

Los niveles más bajos de adiponectina llevan a alteración en la función del podocito por aumento de la producción de Nox4 que contribuirá a la liberación de especies reactivas de Oxígeno a nivel renal y sistémico<sup>74</sup>.

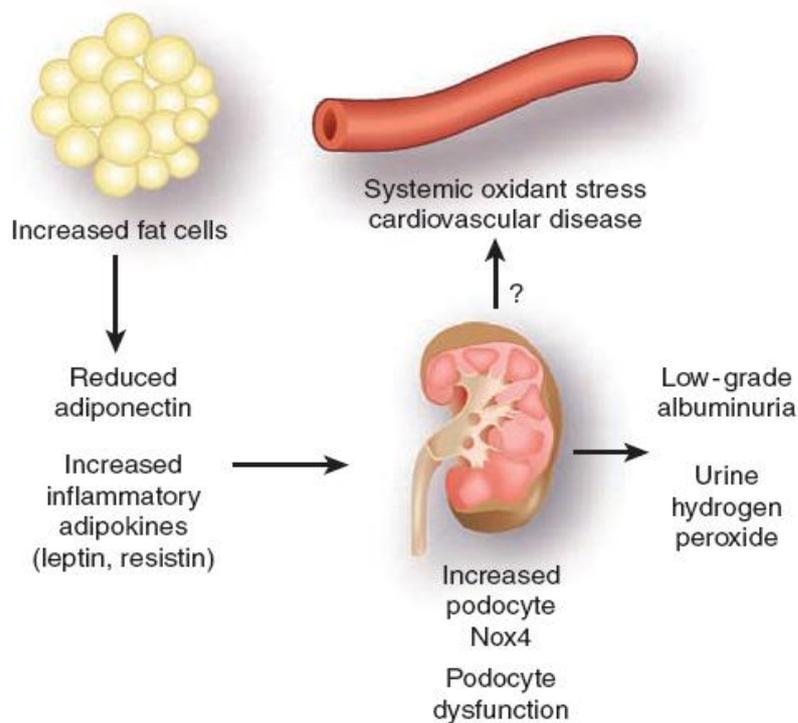


Figura 9: Potencial relación entre adiposidad, respuesta renal y enfermedad cardiovascular.

Estudios experimentales han demostrado que la obesidad induce cambios renales consistentes en hiperfiltración e hiperperfusión, el mecanismo mediante el cual se producen estas alteraciones parece ser un aumento en la reabsorción de Sodio que desempeñaría un papel clave en la dilatación de la arteriola aferente y la consecuente transmisión de la presión arterial aumentada al glomérulo<sup>75, 76</sup>.

Otros factores que también se encuentran relacionados con la alteración de la natriuresis son la actividad simpática renal aumentada y la activación del sistema Renina Angiotensina Aldosterona<sup>77</sup>; los adipocitos humanos secretan factores caracterizados parcialmente que inducen directamente la secreción de aldosterona por parte de las glándulas adrenales.

Ya que la hiperlipidemia es un hallazgo común en los pacientes obesos y esta tiene relación con la progresión del daño renal, algunos estudios experimentales han tratado de relacionar las alteraciones lipídicas con anomalías glomerulares inducidas por la obesidad.

Jiang y colaboradores tomaron Ratonos C57BL/6J y los sometieron a dieta rica en grasas desarrollando estos obesidad, hiperglicemia e hiperinsulinemia en comparación con el grupo control. La expresión de SREBP-1 y SREBP-2 (Proteína unida a elementos reguladores de esterol) aumento significativamente en el grupo de la dieta rica en grasa y este aumento se tradujo en acumulación renal de Colesterol y Triglicéridos así cómo un aumento de PAI-1, VEGF, Colágeno tipo IV y fibronectina todos estos relacionados con la aparición de glomeruloesclerosis y proteinuria<sup>78</sup>.

La leptina, una hormona peptídica producida de manera principal aunque no exclusiva por los adipocitos y que se encuentra elevada en sujetos obesos, también parece desempeñar un papel en las alteraciones renales secundarias a esta.

La leptina es metabolizada en el riñón, en donde encontramos receptores (Ob-Ra)<sup>79</sup>, la estimulación de estos provoca proliferación de células endoteliales glomerulares e induce estrés oxidativo en estas mismas, aumento en la síntesis de TGF- $\beta$ 1 y Colágeno tipo IV<sup>80</sup>,<sup>81</sup>. La infusión de Leptina a ratas produce un incremento de la activación simpática renal, que cómo ya hemos explicado anteriormente forma parte de los cambios hemodinámicos renales que llevan a hiperfiltración y en última instancia a glomeruloesclerosis<sup>82</sup>.

Enfermedades renales caracterizadas por reducción de la masa renal (Nefropatía por reflujo, Agenesia renal, Resección quirúrgica extensa de parénquima renal) son consideradas el equivalente clínico de los modelos experimentales de Hiperfiltración

(Nefrectomía 3/4 ó 5/6), mientras que algunos pacientes con esta enfermedad renal muestran aumento de proteinuria e insuficiencia renal otros sin embargo mantienen una función renal dentro de la normalidad y algunos estudios clínicos sugieren que la obesidad puede ser el factor clave que explique esta discrepancia<sup>83</sup>.

Praga y colaboradores reportaron en su estudio, que los pacientes obesos tienen alto riesgo de desarrollar proteinuria y Enfermedad Renal Crónica después de Nefrectomía unilateral, entre 14 pacientes obesos con IMC > 30 Kg/m<sup>2</sup>, 13 desarrollaron proteinuria e IRC después de una nefrectomía mientras que sólo el 12% desarrollaron estas complicaciones cuando el IMC < 30 Kg/m<sup>2</sup><sup>84</sup>. La Leptina puede favorecer aún más el daño renal ya que al ser metabolizada por vía renal, la Nefrectomía llevará a niveles séricos elevados que contribuyen a la aparición de glomerulosclerosis.

González y colaboradores, en una serie de 54 pacientes con agenesia renal unilateral o riñón remanente encontraron que el IMC era la única variable estadísticamente asociada con el riesgo de desarrollar proteinuria y progresión de enfermedad renal. El seguimiento a largo plazo permitió la detección de proteinuria e insuficiencia renal en 45% de estos pacientes que presentaban función renal normal al comienzo. El IMC fue la diferencia más importante entre estos pacientes y aquellos que mantenían una función renal normal durante el seguimiento:  $27 \pm 3.6$  kg/m<sup>2</sup> comparado con  $21.6 \pm 2.6$  kg/m<sup>2</sup> respectivamente<sup>85</sup>.

La influencia deletérea de la obesidad en pacientes con masa renal disminuida puede también jugar un papel importante en los receptores de trasplante renal, Ducloux y colaboradores valoraron el impacto de la ganancia de peso postrasplante en 292 pacientes y aquellos con un aumento mayor al 5% de IMC en un año tenían riesgo incrementado de pérdida del injerto<sup>86</sup>.

### **III. PROTEINURIA**

La presencia de cantidades variables y persistentes de proteínas en la orina constituye un signo de daño renal y junto con la estimación del filtrado glomerular constituyen la base de la valoración de la enfermedad renal crónica<sup>87, 88</sup>.

#### **A. Definición Microalbuminuria**

El término Microalbuminuria (MAU) se emplea por primera vez en la literatura médica hacia 1981 por Svendsen<sup>89</sup> y col y Viberti<sup>90</sup> y col para describir la presencia de albuminuria por debajo del límite standard, pero a un nivel (entre 20-200 mg/min) que era altamente predictivo de futura aparición de proteinuria en pacientes diabéticos.

El glomérulo produce orina al filtrar la sangre y retener la mayoría de las proteínas en el suero incluyendo la albúmina (PM 67kd). Las proteínas con un PM < 60 kd usualmente atraviesan libremente la MBG y son reabsorbidas en su mayoría por el sistema tubular<sup>91</sup>. Los humanos excretamos aproximadamente 40 a 80 mg de proteína al día, de los cuales 10-15 mg (30-40%) son albúmina y el resto está formado por proteína de Tamm-Horsfall, derivados de células epiteliales de la porción ascendente de Henle y pequeñas cantidades de proteínas de bajo peso molecular ( $\beta$ 2-microglobulina,  $\alpha$ 1-microglobulina, etc.)<sup>92</sup>.

Aunque para la definición de albuminuria y proteinuria se han usado parámetros cuantitativos y el límite inferior se ha escogido porque el 95% de los individuos normales tienen una ratio de excreción por debajo de ese rango, debemos considerarla una variable continua con un aumento del riesgo cardiovascular y renal paralelo al aumento de la excreción de proteína urinaria a niveles tan bajos como 8-10 mg/día<sup>93</sup>.

Estudios europeos revelan una prevalencia de 2.2 a 19% de MAU en la población general. El estudio PREVEND (Prevention of Renal and Vascular End-stage Disease) un estudio de cohorte que incluyó 40.856 personas a las que se les invitó a rellenar un cuestionario y enviar una muestra de la primera orina de la mañana, MAU definida como una concentración de albúmina entre 20-200 mg/l fue detectada en 7.2 % de los individuos, los resultados mostraron que la MAU tenía una prevalencia de 6.6 % incluso

después de excluir individuos con Diabetes e Hipertensión. Los factores de riesgo cardiovascular estaban elevados incluso con niveles de albuminuria considerados actualmente normales (10-20 mg/l o 15-30 mg/24h) <sup>94</sup>.

Datos del US National Health and Nutrition Examination Surveys (NHANES) mostraron un aumento en la prevalencia de MAU (ALCR: 30-300 mg/g) de 7.1 a 8.2 % durante el periodo de estudio de 1988-1994 y 1999-2004. El aumento fue atribuido a una mayor edad, mayor proporción de grupos minoritarios, mayor prevalencia de HTA y DM y mayor IMC<sup>95</sup>.

En el REHDY (Renal Dysfunction in Hypertension) que se llevo a cabo en 1856 individuos no diabéticos, hipertensos sin complicaciones cardiovasculares o enfermedad renal conocida la MAU tuvo una prevalencia del 22.7 %<sup>96</sup>.

Más aún en el I-DEMAND (Italy Developing Education and awareness on Microalbuminuria in patients with hypertensive Disease) un estudio observacional realizado en 87 centros de especialidades (Medicina Interna, Cardiología, Nefrología y Diabetología) MAU fue encontrada en 27% de la población general y 37% de los que tenían Diabetes<sup>97</sup>.

Una excreción urinaria de albúmina de menos de 30 mg/día se considera normal. La albuminuria se define como la eliminación de albúmina urinaria por encima de 30 mg/24h, equivalente a 20 mg/min en una muestra de orina recolectada en un periodo determinado o 30 mg/g creatinina en una muestra única. K/DOQI recomienda límites de 17 mg/g en hombres y 25 mg/g en mujeres para la definición de MAU<sup>87</sup> y la ESC-ESH proponen 22 mg/g en hombres y 31 mg/g en mujeres<sup>98</sup>.

Table 1 Definitions of albuminuria, as recently proposed in a workshop, cosponsored by the National Kidney Foundation and US Food and Drug Administration, entitled 'Proteinuria as a Surrogate Outcome in Chronic Kidney Disease' [39]

Method of urine collection	Normal	Low albuminuria	High albuminuria (MAU)	Very high albuminuria (macroalbuminuria)
24-h excretion	<10 mg/day	10–29 mg/day	30–300 mg/day	>300 mg/day
Spot urine ACR (sex-specific values)	<10 mg/g	10–29 mg/g	30–300 mg/g (17–250 mg/g for men, 25–355 mg/g for women)	>300 mg/g (>250 mg/g for men, >355 mg/g for women)

ACR, urinary albumin-creatinine ratio; MAU, microalbuminuria.

Tabla 6. Definición de albuminuria.

De todos modos, como hemos dicho anteriormente, la albuminuria es una variable continua y por lo tanto mientras más baja mejor, ya que incluso en el rango considerado normal los valores más bajos están asociados con menos riesgo de eventos cardiovasculares.

Si tomamos una muestra aleatoria la concentración puede ser expresada en relación a la concentración de creatinina en orina (albumin/creatinine ratio, ALCR). El consenso internacional estima que 22 mg/g en hombres y 26 mg/g en mujeres puede ser considerado normal<sup>99</sup>.

## **B. Métodos de medición**

- **ORINA DE 24 HORAS**

Es un método incomodo para los pacientes y se asocia con errores importantes debido a la recolección incompleta, por lo que no se recomienda como método de screening para enfermedad cardiovascular. Es útil en pacientes con proteinuria tubular o seguimiento de pacientes con enfermedad glomerular o trasplante renal<sup>100</sup>.

- **Dipstick para screening proteínas**

Una superficie de celulosa con Bromotetrafenol a un pH 3.0<sup>101</sup> produce un cambio de color al contacto con las proteínas, el uso de una escala cromática reduce la variabilidad en la interpretación, usualmente 1+ o más indican una concentración entre 150 -300 mg/L sin poder detectar valores más bajos. Los falsos negativos son frecuentes<sup>102</sup>, por lo que varias guías desaconsejan su uso como método de screening.

- **Dipstick para screening albúmina**

Una superficie de celulosa impregnada con tetrabromosulfotaleina es capaz de detectar pequeñas concentraciones de albúmina (30-40 mg/L) en orina y existe la posibilidad de medir creatinina en orina (actividad de peroxidasa) y dar una medición de la ALCR semicuantitativa. Aunque hay escasos estudios, parece ser de utilidad en enfermos renales crónicos y población general.

La cuantificación de proteínas en orina presenta una amplia variabilidad por la posible interferencia de sustancias no proteicas. Los métodos más usados son: turbidimetría, métodos de benzetonium los cuales se basan en la unión de proteínas a ácido tricloroacético o métodos de fijación de color (Ponceau-S, Coomassie, pyrogallol molybdate)<sup>103</sup>.

- Medición cuantitativa de albúmina

Los métodos más usados son la inmunoturbidimetría y nefelometría.

La mayoría de las guías recomiendan la ALCR en la primera orina de la mañana como la mejor opción para screening de nefropatía en pacientes diabéticos y no diabéticos. Los inconvenientes asociados con la diferencia en volumen urinario o estado de hidratación pueden ser mitigados usando este método. La excreción en 24h de creatinina es constante y no depende del volumen, por lo que la ALCR estima la excreción de albúmina en 24 horas aumentando la sensibilidad y especificidad a 85% cuando se compara con la recolección de orina en 24 horas<sup>87</sup>.

Por la variabilidad intraindividual de albuminuria que puede ser hasta del 40%, 2 de 3 muestras positivas son necesarias para el diagnóstico de albuminuria, recordemos que durante la noche la excreción urinaria de albúmina se reduce hasta en un 20% en relación con la diurna por la disminución en la presión de filtración renal. El ejercicio físico intenso, las infecciones, hematuria, fiebre, alteraciones de la glucosa y otras situaciones pueden alterar la excreción urinaria de albúmina, por lo que deben ser consideradas antes de hacer un diagnóstico de albuminuria<sup>104</sup>.

Las guías KDOQI recomiendan la ALCR para diagnóstico y seguimiento de nefropatía en adultos, sin embargo cuando esta ALCR es > 500 mg/g recomiendan la relación Proteína/creatinina<sup>87</sup>.

## C. Microalbuminuria y disfunción endotelial

Las proteínas en la orina provienen de diferentes sitios:

1. Atraviesan la barrera de filtración glomerular y la reabsorción tubular modifica su concentración final.
2. Hay una secreción tubular de proteínas desde la sangre.
3. Las proteínas pueden ser sintetizadas por las propias células y liberadas a la orina.
4. Las proteínas pueden ser añadidas a la orina en un fase posterior (excreción de la glándula prostática en hombres).

La presencia de MAU implica disfunción de la barrera de filtración glomerular, puede ser resultado de mecanismos mediados hemodinámicamente o secundaria a alteraciones funcionales/estructurales de la barrera glomerular<sup>105, 106</sup>.

Una variedad de sustancias endocrinas, paracrinas y autocrinas y agentes farmacológicos pueden influir en la hemodinámica glomerular independientemente de su acción en la Presión arterial sistémica, normalmente una elevación de la TA se asocia con vasoconstricción de la arteriola aferente glomerular, lo que previene la transmisión de una elevada presión hidrostática al glomérulo y mantiene la presión hidrostática glomerular sin cambios<sup>107</sup>. Esto protege al glomérulo de daños secundarios a la HTA. Si la autorregulación es defectuosa, sobreviene un aumento en la presión hidrostática glomerular llevando a la hiperfiltración y pérdida progresiva de nefronas funcionantes, a su vez una vasoconstricción exagerada de la arteriola eferente puede aumentar la presión hidrostática intraglomerular incluso en presencia de TA normal.

Actualmente es ampliamente aceptado que la MAU refleja un estado generalizado de disfunción endotelial y que esta se encuentra relacionado con estrés oxidativo.

Un estudio experimental fue llevado a cabo en ratas transgénicas (mRen2) que sobre expresaban el gen de la Renina desarrollando HTA y elevación en niveles de Angiotensina II tisular, en los niveles del receptor AT1 y en la unión de la Angiotensina II a su receptor en células mesangiales y del estrés oxidativo. En este estudio, el desarrollo de

albuminuria se acompaña de pérdida de integridad de la barrera de filtración glomerular. La Microscopia electrónica demostró borramiento del pie de los podocitos, pérdida de la integridad del diafragma de hendidura y ampliación de la base del pie del podocito. Los cambios estructurales se asociaron con aumento en stress oxidativo y la subunidad de la NADPH oxidasa en el tejido cortical renal. La documentación de anomalías de la barrera de filtración en los riñones de ratas ren2 proporciona evidencia que el estrés oxidativo conduce a disrupción de podocitos y pérdida de la integridad de la barrera de filtración<sup>108</sup>.

Con respecto a la disfunción endotelial sistémica, 100 pacientes con Hipertensión esencial sin Diabetes ni evidencia de aterosclerosis fueron estudiados y divididos después en 2 subgrupos: aquellos con una EUA > 20 mg/min (MAU) y los de EUA < 20 mg/min (NO MAU). Los individuos hipertensos con MAU tenían mayores niveles de moléculas de adhesión que los NO MAU. En múltiples modelos de regresión en personas hipertensas la excreción urinaria de albúmina se relaciona con ICAM-1 y VCAM-1. Estos hallazgos muestran que en la Hipertensión esencial existe una activación temprana del endotelio favoreciendo la aterosclerosis. Un dato muy interesante que también arrojó este estudio fue la diferencia significativa en las concentraciones plasmáticas de moléculas de adhesión cuando se comparan individuos hipertensos NO MAU con controles sanos, de hecho parece que la activación endotelial expresada por moléculas sería anterior a la MAU confirmando que la MAU puede ser considerada un marcador de disfunción endotelial sistémica<sup>109</sup>.

Se sabe que pacientes con proteinuria elevada como consecuencia de enfermedad glomerular es más probable que desarrollen fallo renal que pacientes con menos proteinuria o sin ella.

Dos aspectos que han llevado a considerar el daño túbulo intersticial como uno de los factores más influyentes en la progresión de daño renal son<sup>110</sup>:

1. El resultado de la función renal en pacientes con glomerulopatía crónica se predice mejor histológicamente por la gravedad del daño extraglomerular (pérdida de capilar peritubular, atrofia tubular y fibrosis intersticial)

2. La evidencia que las proteínas urinarias por si mismas pueden inducir efectos proinflamatorios y profibróticos que contribuyen directamente al daño túbulo intersticial crónico.

a) Efectos de proteinuria en túbulos renales: Proteinuria estimula las células tubulares proximales para sintetizar quimosinas (citoquinas proinflamatorias) (MCP-1, RANTES) que reclutan monocitos, células T e interleuquinas que atraen neutrófilos y moléculas promotoras de fibrosis (endotelina, Ang II, TGF- $\beta$ ). Luego el daño de la membrana basal tubular facilita el paso de productos derivados del túbulo al intersticio y capilares peritubulares. A lo largo de la nefrona distal, los cilindros proteicos pueden obstruir el flujo urinario y agravar el daño tubulointersticial<sup>111</sup>.

b) Otras vías del glomérulo al intersticio: Aunque la respuesta del túbulo proximal a un exceso de proteínas urinarias ha sido fuertemente asociada al desarrollo de proteinuria, inflamación intersticial y mediadores proinflamatorios adicionales pueden originar inflamación glomerular, bien por producción sistémica o localmente por células glomerulares o por células inflamatorias. Los productos derivados del glomérulo pueden promover una respuesta tubular adicional. A medida que la enfermedad glomerular progresa a una fase crónica se desarrollan lesiones de esclerosis en el ovillo, frecuentemente estas regiones se adhieren y alteran la capsula de Bowman, estas lesiones otorgan un sitio adicional para la fuga de proteínas del ultrafiltrado glomerular al espacio intersticial peritubular<sup>110</sup>.

## D. Microalbuminuria y riesgo cardiovascular

Klausen y col demostraron que en la población general una EUA, por debajo de la definición de MAU se asociaba con un aumento del riesgo de enfermedad coronaria, independientemente de HTA, por lo que los autores hipotetizaron que MAU emerge tarde en el proceso aterosclerótico<sup>112</sup>.

La albuminuria es predictor no sólo de nefropatía sino también de riesgo cardiovascular en pacientes diabéticos y no diabéticos, su reducción está asociada a disminución del riesgo de eventos renales y cardiovasculares.

El estudio PREVEND (The Prevention of Renal and vascular End Stage Disease) analizó 40548 individuos mostrando una relación lineal directa entre albuminuria y riesgo de muerte cardiovascular en la población general, incluso con niveles de albuminuria de 15-29 mg/día. El riesgo de muerte cardiovascular se aumentó más de 6 veces cuando la EUA era > de 300 mg/día<sup>113</sup>.

El ADVANCE (Action in Diabetes and vascular disease: preterAx and diamicroN-MR Controlled Evaluation) que incluyó 10 640 pacientes diabéticos con un seguimiento de 4 años mostró que la albuminuria y el filtrado glomerular reducido eran factores de riesgo continuos e independientes para eventos adversos renales y cardiovasculares en pacientes con Diabetes tipo 2<sup>114</sup>.

Datos del US National Health and Nutrition Examination Survey también mostraron un efecto independiente de la albuminuria en el riesgo de mortalidad cardiovascular y por todas las causas en todos los niveles de filtrado glomerular. En pacientes con Insuficiencia Cardíaca Congestiva sin diabetes, HTA o reducción del filtrado glomerular una EUA aumentada predice tanto mortalidad cardiovascular como asociada a todas las causas<sup>115</sup>.

Múltiples estudios confirman que la proteinuria es un factor de riesgo cardiovascular independientemente del filtrado glomerular, HTA o Diabetes y que ese riesgo se extiende a rangos de albuminuria considerados normales<sup>93</sup>.

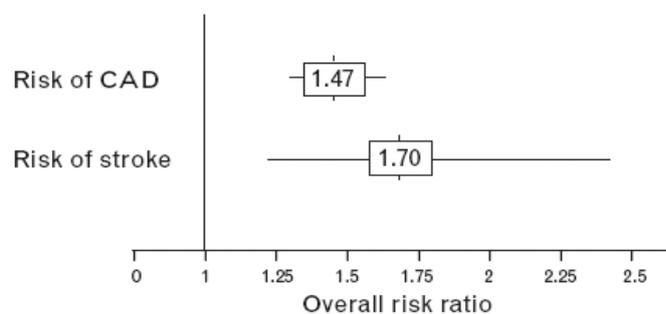
Un subestudio del Copenhagen Heart Study encontró que el riesgo cardiovascular aumentaba con niveles de ALCR > 6 mg/g, con aumento del riesgo de muerte paralelo al aumento de la ALCR, lo que pone de manifiesto que aún con valores considerados “dentro de la normalidad” a mayor presencia de proteínas en orina, mayor riesgo de muerte y enfermedad cardiovascular<sup>112</sup>.

Una asociación continua similar entre bajos niveles de albuminuria y enfermedad cardiovascular ha sido encontrada en el Framingham Heart Study que excluyó pacientes con HTA y Diabetes<sup>116</sup>.

Resultados análogos fueron obtenidos también en el estudio LIFE, llevado a cabo en pacientes hipertensos con evidencia electrocardiográfica de Hipertrofia del Ventrículo Izquierdo. En pacientes diabéticos y no diabéticos, el riesgo de evento cardiovascular compuesto aumentaba continuamente a medida que lo hacía la albuminuria.

Todos estos hallazgos son avalados por los resultados de un meta análisis que incluía un total de 26 estudios de cohorte con 169 949 sujetos y 7117 eventos coronarios. Pacientes con MAU tenían un 47% mayor riesgo de enfermedad arterial coronaria que aquellos que no la tenían; en aquellos con MAU el riesgo era más del doble<sup>117</sup>.

Más aún otro meta análisis que incluía 24 470 participantes documentó una fuerte relación independiente entre albuminuria y eventos cerebrovasculares. Pacientes con albuminuria tenían un 70% mayor riesgo de ACV comparado con los que no la tenían<sup>118</sup>.



Overall risk ratio for the association of microalbuminuria with coronary artery disease (CAD) and with stroke in two meta-analyses including respectively five [96] and two [97] population-based cohort studies.

Figura 10.: Relación entre MAU con Enfermedad Coronaria y ACV.

## **IV. FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE $\beta$**

### **A. Definición**

TGF- $\beta$  pertenece a la superfamilia de los TGF- $\beta$  que incluye: activinas, inhibinas, factores de crecimiento y proteína morfo genética ósea.

El TGF- $\beta$  tiene 3 isoformas llamadas del 1 al 3, de las cuales la más abundante en mamíferos es la isoforma TGF- $\beta$ 1, estas son sintetizadas por una variedad de células incluyendo todos los tipos de células renales y secretada como pro-citocina inactiva, conformada por TGF- $\beta$  maduro unido a proteína asociada de latencia (LAP) constituyendo el pequeño complejo latente, este se une a la proteína ligante de TGF- $\beta$  latente (LTBP) formando el gran complejo precursor latente (TGF- $\beta$ 1 latente) el cual es secretado y se une a la matriz extracelular. El TGF- $\beta$  se activa cuando es liberado del LAP y disociado de la LTBP por clivaje proteolítico por diferentes sustancias entre las que encontramos plasmina, trombospondina 1 y especies reactivas de oxígeno entre otras<sup>119</sup>.

### **B. Mecanismo de acción**

El TGF- $\beta$  activo se une a su receptor, que comprende dos familias de proteínas con actividad serina-treonina quinasa tipo II (T $\beta$ RII) y tipo I (T $\beta$ RI), este último incluye receptores activin-like quinasa (ALK). El TGF- $\beta$  se une a T $\beta$ RII el cual recluta después a T $\beta$ RI.

El complejo fosforila y activa varias cascadas de señal intracelular incluyendo:

- (1) Smads (small mothers against decapentaplegic) pequeñas madres contra decapentaplegic.
- (2) MAPKs (mitogen-activated protein kinases) proteína kinasa activada por mitógeno, como quinasa reguladas extracelularmente (ERKs), p38 y Jun quinasa.
- (3) ILK (integrin-linked kinase) quinasa ligada a la Integrina.

Estos efectores modulan la expresión de genes target involucrados en eventos fisiológicos y asociados a enfermedad renal<sup>120</sup>.

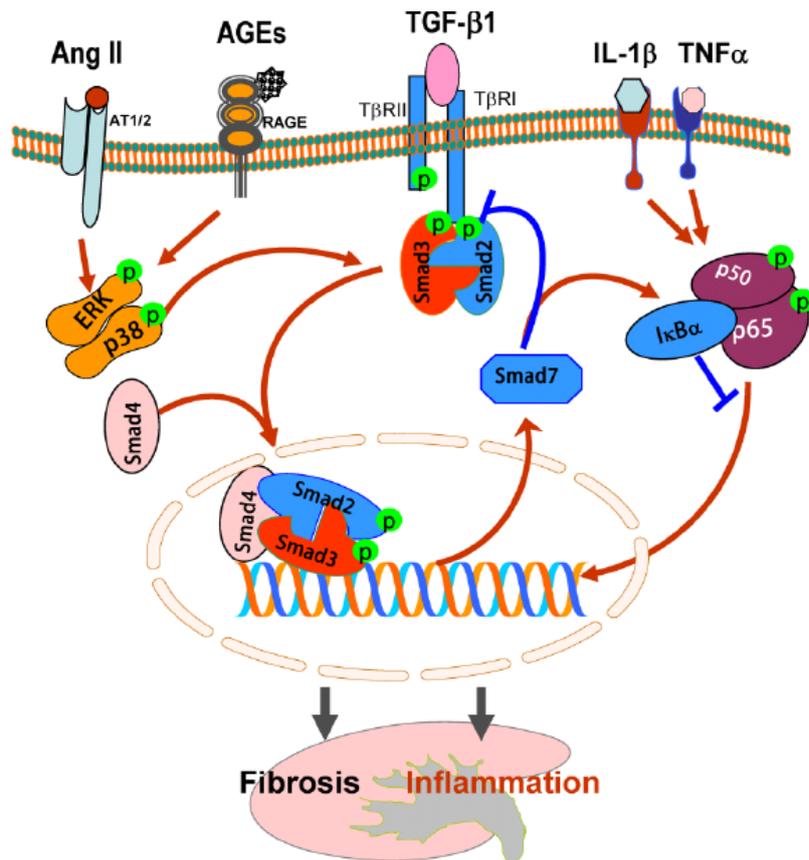


Figura 11: Vías de señalización de la síntesis de TGF-β/Smads

A concentraciones fisiológicas, TGF-β regula el factor de crecimiento derivado de plaquetas (en células musculo liso y fibroblastos), factor de crecimiento de fibroblastos (células endoteliales) y factor de necrosis tumoral e Interleuquina-1 (Monocitos) al estimular o inhibir su producción y modular sus acciones para sincronizar y controlar el proceso de reparación tisular<sup>121, 122</sup>.

La Matriz extracelular (MEC) es una estructura dinámica de macromoléculas auto agregada que incluyen: fibronectina, colágeno, proteoglicanos los cuales se unen a las células por medio de receptores de superficie llamados integrinas. La matriz alrededor de las células es continuamente degradada por proteasas.

Tanto en humanos como en animales, el daño agudo se acompaña de elevaciones transitorias de TGF-β y la fibrosis no ocurre, con una noxa repetida, el aumento en la

producción del TGF- $\beta$  es sostenido lo que conlleva a depósito de matriz extracelular y fibrosis del tejido<sup>123</sup>.

El TGF- $\beta$  es también mediador de efectos patológicos inducidos por otras hormonas y citoquinas, principalmente por el sistema renina-angiotensina. La angiotensina II una hormona proinflamatoria implicada en la progresión de Enfermedad Renal estimula la expresión de TGF- $\beta$  y a su vez el TGF- $\beta$  estimula directamente la expresión de otros factores tróficos y profibróticos como factor de crecimiento del tejido conectivo<sup>124</sup>.

Indirectamente el TGF- $\beta$  también induce la producción de otros mediadores patológicos como factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleuquinas, porque participa en la infiltración de células inflamatorias y en la activación y conversión de células epiteliales y fibroblastos en miofibroblastos<sup>125</sup>.

### **C. Efectos glomerulares del TGF- $\beta$**

Glomeruloesclerosis es un proceso por el cual tejido glomerular funcionalmente normal es reemplazado por depósitos de MEC lo que lleva a una excesiva ultrafiltración de proteínas y reducción del filtrado glomerular, representa una vía final común de pérdida de funcionamiento glomerular asociado con enfermedades primarias tan diversas como glomerulonefritis crónica, ND, hipertensión, uropatía obstructiva e infección retroviral<sup>126</sup>.

Todos los tres tipos celulares glomerulares: podocitos, células mesangiales y endoteliales participan en el proceso fibrótico y una sobreexpresión del TGF- $\beta$  activo en ratones transgénicos causa expansión mesangial, fibrosis intersticial, disminución del FG y proteinuria progresiva<sup>127</sup>.

Alteraciones en el número, estructura y función de los podocitos ha sido reportada en pacientes con glomerulopatías<sup>128</sup>, diabetes<sup>129</sup>, y en modelos de ratones transgénicos de

glomeruloesclerosis<sup>130</sup>. Esto sugiere que la pérdida de podocitos está muy involucrada en las enfermedades glomerulares.

El TGF- $\beta$  induce apoptosis de podocitos por activación de proteína quinasa asociado a mitógeno p38 y su efector la caspasa 3<sup>131</sup>

En pacientes con enfermedades podocitarias progresivas como glomeruloesclerosis focal y segmentaria y Nefropatía Membranosa la expresión de TGF- $\beta$  esta aumentada en los podocitos, la tensión biomecánica en estas enfermedades puede causar la sobreexpresión de TGF- $\beta$  y Ang II en estos mismos. El stress oxidativo inducido por angiotensina II puede también causar activación de TGF- $\beta$  latente. Un aumento en la actividad de TGF- $\beta$  en los podocitos puede inducir no solo el engrosamiento de la membrana basal sino también apoptosis y separación de la membrana basal, iniciando el desarrollo de glomeruloesclerosis<sup>132</sup>.

En podocitos cultivados de ratones, elevaciones en la glucosa y angiotensina II sobre regulan la expresión del receptor II de TGF- $\beta$ <sup>133, 134</sup> y esto hace al podocito más sensible a niveles elevados de TGF- $\beta$ , el cual es producido por células mesangiales y llega al podocito a través del ultrafiltrado glomerular<sup>135</sup>.

El TGF- $\beta$  parece ser también responsable de la separación de los podocitos de la membrana basal<sup>136</sup>, se ha suscitado cierto debate a cerca de cual mecanismo, si apoptosis o separación de podocitos es cuantitativamente más importante para la pérdida podocitaria en glomerulopatías como la ND, ya que aunque la apoptosis inducida por TGF- $\beta$  se ha visto in vitro e in vivo, en esta última se observa a una rata muy baja; Wharram y col han demostrado que altas tasas de pérdida de podocitos son necesarias para producir una alteración en la función renal con cambios menores en esta con depleción de hasta 40% de podocitos, lo que sugiere que la separación de los podocitos de la membrana basal es probablemente el principal mecanismo de daño podocitario asociado al TGF- $\beta$ <sup>137</sup>.

El TGF- $\beta$  estimula la secreción endógena de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) por los podocitos el cual aumenta la producción de colágeno  $\alpha 3$  (IV)<sup>138</sup>.

Las células mesangiales proveen soporte estructural a los capilares glomerulares y modulan el flujo capilar glomerular y la superficie de ultrafiltración, regulando por tanto el filtrado glomerular. El mesangio también actúa como fuente y objetivo de hormonas vasoactivas, factores de crecimiento, citoquinas y proteínas de matriz extracelular por lo que contribuye en una amplia variedad de enfermedades glomerulares<sup>139</sup>.

Un evento crucial en la glomeruloesclerosis de cualquier origen es el aumento en el tamaño del compartimento mesangial atribuible tanto a depósito de matriz mesangial como a proliferación e hipertrofia celular.

Estudios han mostrado que el TGF- $\beta$  es importante en muchos casos de glomeruloesclerosis y que la sobreexpresión de este produce fibrosis renal en ratones<sup>140</sup> y ratas<sup>141</sup>, y a la inversa la infusión intrarrenal de oligonucleótidos que disminuyen la expresión de TGF- $\beta$  minimiza la esclerosis en nefropatías experimentales<sup>142</sup>.

En células mesangiales cultivadas, humanas y murinas el TGF- $\beta$  estimula la producción de Colágeno tipo I y IV, laminina, fibronectina y proteoglicanos heparan-sulfato<sup>143</sup>.

El TGF- $\beta$  1 puede estimular una variedad de quinasas en células mesangiales de humanos y ratas, como son ERK  $\frac{1}{2}$ , PI3K y JNK-MAP al igual que la p38 que ha sido implicada en la expresión de mRNA del colágeno  $\alpha 1$  estimulada por TGF- $\beta$ <sup>144</sup>.

El TGF- $\beta$  regula muchas funciones endoteliales que incluyen: proliferación, migración y apoptosis. Arciniegas y col. demostraron que TGF- $\beta$ 1 puede inducir células endoteliales aórticas a diferenciarse en células positivas para actina músculo liso  $\alpha$  ( $\alpha$ -SMA) in vitro, proceso llamado transición endotelio-mesenquimal (EndoMT)<sup>145</sup>. La EndoMT ha sido observada in vivo en el corazón inducida por TGF- $\beta$  y juega un papel en la fibrosis cardíaca, por lo que se ha sugerido que también podría estar involucrada en la fibrosis glomerular al aumentar el número de miofibroblastos glomerulares<sup>146</sup>.

## D. Efectos tubulares del TGF- $\beta$

El papel del TGF- $\beta$  en la apoptosis de células tubulares ha sido expuesto por estudios que muestran que la inhibición de las acciones del TGF- $\beta$  in vivo reduce la extensión de la apoptosis, por ejemplo el tratamiento de ratones con un anticuerpo anti- TGF- $\beta$  reduce la apoptosis tubular en un modelo de daño renal por obstrucción ureteral<sup>147</sup>.

La pérdida de túbulo también puede ocurrir por Transición epitelio-mesénquimal (EMT) en la cual las células tubulares se transforman en células mesénquimales, un proceso que ha sido postulado contribuye a la degeneración tubular y fibrosis renal<sup>148</sup>.

El TGF- $\beta$  es el inductor más potente de EMT en las células tubulares, el TGF- $\beta$  inicia y completa la EMT in vivo e in vitro bajo determinadas condiciones, tres receptores han sido implicados en la EMT inducida por TGF- $\beta$ : ALK 4, 5 y 7, entre los cuales el ALK 5 parece ser el principal.

Las células tubulares y del sistema inmune son activadas por TGF- $\beta$  y otros factores de crecimiento para producir citoquinas y desencadenar la respuesta inflamatoria dependiente del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B). Además el TGF- $\beta$  también estimula directa e indirectamente monocitos e infiltración de macrófagos, a su vez la inflamación activa las células tubulares, fibroblastos y miofibroblastos para producir Matriz extracelular y amplificar la fibrosis y el daño tubular<sup>149</sup>.

Sin embargo el TGF- $\beta$  es esencial para la correcta homeostasis del sistema inmune y su función de vigilancia, ya que ratones knock-out TGF- $\beta$ 1 desarrollan espontáneamente una respuesta inflamatoria multifocal<sup>150</sup>. Entre las propiedades antiinflamatorias del TGF- $\beta$ , este antagoniza las citoquinas IL-1 y NTF- $\alpha$  en las enfermedades glomerulares y es un desactivador de macrófagos durante el daño renal por lo que se cree que se libera fisiológicamente como modulador de la reacción inflamatoria y para reparar daño tisular.

La reparación del tejido renal es un proceso estrechamente controlado en donde la intensidad y duración de cada evento debe ser precisa y coordinada, por lo que la proliferación, producción de MEC, producción, inyección y resolución de la inflamación

toman su sitio en un momento preciso<sup>151</sup>. El malfuncionamiento de cualquiera de estos eventos puede enviar información errónea y alterar la homeostasis tisular. En este aspecto TGF- $\beta$  parece tener un papel patológico como consecuencia de una ausente o inapropiada modulación y contrapeso oportuno de sus antagonistas cómo HGF y BMP7<sup>152</sup>.

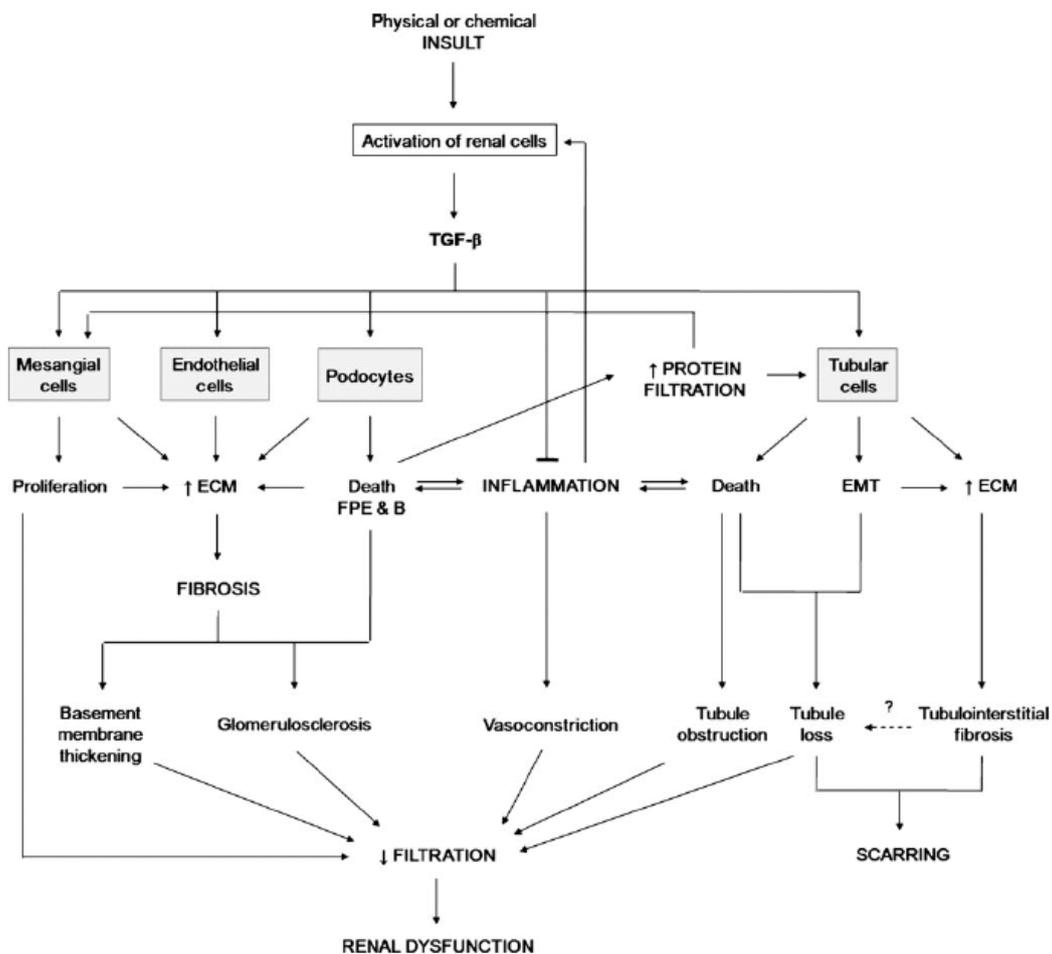


Figura 12: Visión integrativa de las consecuencias fisiopatológicas de los efectos glomerular, tubular y vascular del TGF- $\beta$  durante la Enfermedad Renal Crónica.

## **V. FACTOR CRECIMIENTO DE ENDOTELIO VASCULAR**

### **(VEGF)**

El riñón es un órgano altamente vascularizado con dos importantes microvasculaturas: glomerular y peritubular, alteraciones del capilar glomerular dan como resultado proteinuria mientras que la pérdida de capilares peritubulares da lugar a daño tubulointersticial secundario a hipoxia<sup>153</sup>.

#### **A. Mecanismo de acción**

El VEGF actúa como agente permeabilizante a través de varios mecanismos:

1. Aumenta la velocidad de difusión de sustancias a través de un capilar.
2. Amplia la unión entre células endoteliales y aumenta sus fenestraciones.
3. Induce la formación de organelas vesículo-vacuolares que surgen de la fusión de vesículas intracelulares para formar un canal a través del cuerpo de las células endoteliales.
4. Induce caveolas, que son pequeñas invaginaciones importantes para la endocitosis y el paso transcelular.

El VEGF pertenece a una familia que incluye: Factor crecimiento placentario (PLGF), VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D Y VEGF-E, cada VEGF tiene su propio receptor tirosin quinasa. VEGF-A se une a VEGFR-1 (Flt-1) y VEGFR-2 (KDR/Flk-1), la afinidad del VEGFR-1 al VEGF-A es 10 veces mayor que la del VEGFR-2.

#### **B. VEGF y Riñón**

En el riñón humano, la expresión de VEGF ha sido demostrada en podocitos y células tubulares<sup>154</sup>.

Los receptores del VEGF se encuentran en endotelio de capilares glomerulares y peritubulares<sup>155</sup>. En el glomérulo normal el VEGF se expresa en los podocitos y los

receptores en las células endoteliales lo cual indica que el VEGF necesita ir en contra de la dirección del filtrado glomerular para unirse a su receptor.

La hipoxia es el principal estímulo para la expresión del VEGF, aunque también es regulado por una variedad de hormonas, factores de crecimiento, citoquinas como TGF- $\beta$ , PIGF, IL-1 e IL-6. VEGF estimula la proliferación de células endoteliales, aumenta la permeabilidad vascular y media vasodilatación dependiente de endotelio vía aumento en la producción de óxido nítrico (ON) por acción de la sintetasa de ON endotelial<sup>156</sup> también promueve la quimiotaxis de monocitos y expresión de moléculas de adhesión<sup>157</sup>.

El modelo de riñón remanente mostró que disfunción renal crónica y disminución en el número de capilares glomerulares y tubulointersticiales acompañaban a una expresión renal disminuida de VEGF<sup>158</sup>, la administración de VEGF121 en este modelo disminuyó la disfunción renal y las alteraciones histológicas independientemente de la presión sanguínea proteinuria e infiltración de macrófagos<sup>159</sup>.

En el modelo Thy-1 de glomerulonefritis la administración de un supresor de VEGF suprimía la reparación capilar después de una fase destructiva<sup>160</sup>.

En modelos animales diabéticos la secreción de VEGF y expresión de sus receptores esta sobre regulada por altas concentraciones de glucosa en el riñón<sup>161</sup>.

El análisis de pacientes con DM-1 muestra que los niveles de VEGF son mayores en pacientes con ND que en el grupo de normoalbuminuria<sup>162</sup>.

Los niveles plasmáticos de VEGF son significativamente mayores en pacientes con DM-2 y marcada proteinuria que en los que tenían normoalbuminuria o MAU<sup>163</sup>.

La administración de anticuerpos anti-VEGF disminuye la hipertrofia glomerular y albuminuria en ratas diabéticas inducidas-STZ y ratones diabéticos db/db<sup>164, 165</sup>.

En ratones knockout sintetasa de ON endotelial (eNOS), inducción de diabetes por STZ causa hipertensión, proteinuria y disfunción renal. Los niveles renales de VEGF

estaban aumentados en ratones diabéticos eNOS knockout y el tratamiento con insulina no sólo redujo los niveles de glucosa sino también de tensión arterial, VEGF y daño renal<sup>166</sup>, por lo que este grupo hipotetizó que el VEGF tiene efectos duales por vía dependiente de ON e independiente de ON.

El VEGF mantiene la integridad vascular por vía dependiente-ON mientras lleva a daño vascular y sobreactivación del endotelio, células musculo liso vascular y macrófagos por vía ON-independiente, el VEGF tendría un papel deletéreo en la ND porque la disponibilidad de ON endotelial esta disminuida en la DM y el VEGF ejercería sus acciones por la vía independiente de ON.

## **VI. TELMISARTAN**

El Telmisartan es un antagonista del receptor AT1 de la Angiotensina II, disponible en la presentación de tabletas que contienen 20, 40 y 80 mg de principio activo.

Las indicaciones de la EMEA para el uso de este medicamento son: tratamiento de HTA esencial en adultos y prevención cardiovascular en pacientes con enfermedad cardiovascular aterotrombótica presente (Enfermedad Coronaria, ACV, Enfermedad Arterial periférica) o DM-2 con daño de órgano blanco documentado<sup>167</sup>.

Las indicaciones de la FDA son similares enfatizando en la reducción del riesgo de Infarto Agudo del Miocardio, ACV y muerte cardiovascular u hospitalizaciones por insuficiencia cardiaca en pacientes de 55 años o mayores que presentan alto riesgo de desarrollar eventos cardiovasculares mayores<sup>168</sup>.

En el Sistema Renina Angiotensina, la pro-renina inactiva es proteolíticamente convertida a renina activa en respuesta a: señales de baroreceptores renales, cambios en la concentración de sodio, estimulación nerviosa simpática y retroalimentación negativa por Ang II en células yuxtaglomerulares<sup>169</sup>. El angiotensinógeno, producido principalmente en el Hígado es sometido a la acción de la renina para generar

Angiotensina I y esta es metabolizada por la Enzima Convertidora de Angiotensina presente en endotelio vascular, neuroepitelial y células del túbulo proximal para producir la Angiotensina II. Aunque la vía ECA es la más importante para la generación de Angiotensina II, esta también puede ser formada en otros tejidos vía quimasas, catepsina G y calicreinas.

La Angiotensina II produce sus efectos biológicos negativos al unirse al receptor AT1 en corazón, lecho vascular, riñón, glándulas adrenales, cerebro y adipocitos. La formación del complejo Ang II-AT1R resulta en la inhibición del feedback negativo de liberación de la renina y la producción y liberación de aldosterona por parte de las glándulas adrenales<sup>170</sup>.

Por otra parte, la interacción de la Ang II con el AT2R, el cual está presente en los adultos en bajas concentraciones, produce la mayoría de los efectos positivos en el control de la presión sanguínea y en la reducción y prevención de daño de órgano, a través de vasodilatación mediada por el receptor, liberación de ON, efectos antiproliferativos y proapoptóticos en corazón y lecho vascular, y efectos benéficos en la reabsorción de sodio en los túbulos proximales en el riñón<sup>171</sup>.

Los Receptores AT1 son encontrados principalmente en vasos sanguíneos, hígado, riñón, corazón y cerebro. La afinidad de Telmisartan por el AT1R es mayor que otros ARA II (telmisartan > olmesartan medoxomil > candesartan cilexetil ≥ valsartan ≥ losartan)<sup>172</sup>.

El efecto de Telmisartan es dosis-dependiente con inhibición máxima de la presión arterial diastólica a dosis de 40 y 80 mg<sup>173</sup>.

La protección cardiovascular que ofrece Telmisartan en pacientes de alto riesgo ha sido demostrada por varios estudios entre los que tenemos ONTARGET, el cual comparó telmisartan 80 mg y ramipril 10 mg en pacientes con enfermedad vascular o diabetes con compromiso de órgano blanco, aproximadamente 1/3 de pacientes tenían diabetes y 13% tenían MAU. En este estudio el RR de eventos cardiovasculares en pacientes tratados con Telmisartan, comparado con los tratados con Ramipril fue de 1.01 (95% IC, 0.94-1.09)<sup>174</sup>.

El Telmisartan versus Ramipril on Renal Endothelium function in Type 2 Diabetes (TRENDY) fue el primero en investigar los efectos de la inhibición del SRA en la función endotelial en el riñón diabético y el primero en comparar diferentes clases de antihipertensivos. Se observó que Telmisartan producía un aumento en la actividad de óxido nítrico que aumentaba el flujo plasmático renal en reposo, mientras que el efecto del Ramipril en la función endotelial no fue lo suficiente para provocar dicho efecto<sup>175</sup>.

Actualmente está bien establecido que Telmisartan actúa como agonista parcial selectivo de PPAR $\gamma$  y estos juegan un papel muy importante en la regulación del metabolismo de lípidos, carbohidratos y ligandos de PPAR  $\gamma$  mejoran la sensibilidad a la insulina, disminuyen los niveles de triglicéridos y el riesgo de aterosclerosis<sup>176</sup>.

Benson y col. Reportaron que la concentración sanguínea mínima de Telmisartan requerida para activar PPAR $\gamma$  era de 280 ng/mL (0.54  $\mu$ M), por otra parte la concentración de Telmisartan a dosis de 40 mg es de 0.31  $\mu$ M y a 80 mg de 1.35  $\mu$ M, lo que indica que dosis de 40 mg son insuficientes para la activación de PPAR  $\gamma$ <sup>177</sup>.

Entre los efectos farmacodinámicos de Telmisartan encontramos:

Target	Effect
Cardiovascular system	Lowering BP [32] Reduction of LVH [130] Prevention of recurrence of atrial fibrillation in hypertensive patients [99]
Central nervous system	A potential cerebrovascular benefit was evaluated and discussed in ONTARGET [6,42], TRANSCEND [7,43] and PROFESS [44] trials
Insulin sensitivity and lipid profile	Improvement of insulin sensitivity and lipid profile in hypertensive patients with or without type 2 diabetes and metabolic syndrome [106,131,132] (effect greater than that of losartan [133] and eprosartan, but not significantly different from valsartan [134], irbesartan [133] and nifedipine [63])
Type 2 diabetes	Slowing of the progression from incipient to overt nephropathy [76] and the decline of GFR
Anti-inflammatory effects	Reduction of albuminuria and reduced proteinuria [82,83] Decrease in plasma levels of C-reactive protein in patients [135] with type 2 diabetes (with or without hypertension) and in patients with hypertension and metabolic syndrome [136]
Endothelial function	Improvement of the markers of endothelial function in hypertensive patients and in type 2 diabetic patients [137]
Blood vessel	Reduction of arterial stiffness in hypertensive patients [138]
PPAR- $\gamma$ activation	Anti-inflammatory, antioxidative and antiproliferative effects on vascular walls (decreasing the risks for atherosclerosis [139,140]) Improvement of insulin sensitivity
PPAR- $\alpha$ activation	Reduction of triglyceride levels Modulation of lipid metabolism, particularly in organs exhibiting a high turnover of fatty acids (liver, skeletal muscle) [29]

BP: Blood pressure; GFR: Glomerular filtration rate; LVH: Left-ventricular hypertrophy; PPAR: Peroxisome proliferator-activated receptor.

Tabla 13: Acciones del Telmisartan

Tras esta introducción sobre los aspectos más relevantes que tienen relación con este estudio, entre los que destacan la etiopatogenia de la nefropatía diabética, obesidad, marcadores relacionados e información sobre el fármaco que se ha utilizado, el Telmisartan, vamos a pasar a formular nuestra hipótesis de trabajo.

## **2. HIPÓTESIS DE TRABAJO**



Nuestra hipótesis es que el uso de fármacos renoprotectores (antiproteinúricos y antihipertensivos); como el Telmisartan (que además tiene un efecto antidiabético añadido) retrasa o frena el desarrollo de lesión renal del modo más parecido posible o semejante al de las medidas dietéticas, en sujetos que comienzan con el desarrollo de Microalbuminuria (MAU), es decir, en estadios precoces/iniciales de la lesión vascular renal.

Para desarrollar esta hipótesis hemos llevado a cabo un modelo animal experimental de Diabetes Mellitus y Obesidad. Basándonos en que la precocidad en la intervención retrasa o enlentece la aparición de MAU, analizaremos los mecanismos que a nivel de función renal y del propio tejido renal se producen durante el desarrollo del modelo.



### **3. OBJETIVOS**



## **PRINCIPAL**

- Identificar o datar la aparición de datos de lesión renal (EUA) en un modelo precoz de alto riesgo cardiovascular (Diabetes y Obesidad)
- Observar los efectos de Dieta ó uso de ARA-II en la progresión del daño renal

## **SECUNDARIOS**

- Valorar la evolución del peso y la diabetes en cada uno de los grupos de estudio
- Observar la influencia de las modificaciones farmacológicas (interviniendo sobre los receptores PPAR $\gamma$ ) y no farmacológicas (dieta) en la evolución de la función renal, Microalbuminuria, su momento de aparición, y evolución en cada uno de los grupos.
- Valorar la evolución de diferentes marcadores de lesión tisular renal tales como TGF-  $\beta$ , VEGF en cada uno de los supuestos.
- Determinar la relación entre la evolución de estos marcadores y el deterioro de la Función Renal.



## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**



## I) Infraestructura y animales de experimentación

### a. Infraestructura de la actividad experimental

La parte del proyecto que comprendió la actividad experimental con animales, fue desarrollada desde Mayo del 2007 hasta agosto del 2008 en el estabulario ubicado en el Servicio de Biomedicina y Biomateriales, de la Universidad de Zaragoza. El Servicio de Biomedicina y Biomateriales, como Unidad Mixta de Investigación, ofrece a la Comunidad Universitaria, así como a otros centros de investigación, una serie de prestaciones que permiten realizar pruebas biológicas con animales vivos en condiciones superponibles a la clínica humana.

En paralelo, se realizó durante el mismo periodo la actividad experimental de laboratorio, en los laboratorios ubicados en la Unidad Mixta de Investigación. Laboratorios dotados de aparataje básico para la obtención de muestras biológicas y la realización de determinaciones bioquímicas y cultivos celulares. Con las muestras semiprocessadas, se continuó la actividad experimental hasta mayo del 2009 en los laboratorios de investigación del Servicio de Inmunología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa.

### b. Animales de experimentación

En este estudio de investigación, utilizamos tres cepas de rata diferentes:

- Machos Sprague-Dawley (SD) de ocho semanas de edad. Las ratas Sprague-Dawley (cepa Outbred), albinas y muy dóciles en su manejo, son comúnmente utilizadas en investigación.
- Machos Zucker Fatty (ZF) fa/fa (cepa Outbred) homocigotos para la mutación, de ocho semanas de edad (como en el caso anterior).
- Machos Zucker Fatty and Diabetic (ZDF) fa/fa (cepa Inbred) homocigotos para la mutación, de ocho semanas de edad. (Fig. 13).

Las ratas ZDF constituyen un modelo animal de DM 2, basado en obesidad inherente causada por la mutación génica fa. Dicha mutación afecta al dominio extracelular del receptor de la leptina, resultando un receptor de leptina no funcional y produciéndose así, un aumento en los niveles de leptina en sangre.

Los machos homocigotos para la mutación (fa/fa), muestran hiperlipidemia, hiperinsulinemia e hiperglicemia a partir de la semana siete de vida, siendo precedida ésta, por obesidad y resistencia a la insulina. En torno a la semana doce, los niveles de glucosa en suero pueden llegar a exceder los 500 mg/dl, a diferencia de los machos homocigotos (+/+) y heterocigotos (fa/+), que permanecen normoglucémicos.



Figura 13: Rata ZDF utilizada en el experimento.

Los animales fueron suministrados por los laboratorios Charles River (CRL) (Francia), y mantenidos en condiciones convencionales en el estabulario de la Unidad Mixta de Investigación de la Universidad de Zaragoza. Individualizados en jaulas standard (Fig. 14) en habitaciones con temperatura, humedad e iluminación controlada. La temperatura, conseguida mediante un sistema de aire acondicionado, ronda los 20-22° C, la humedad se mantiene constante dentro de un margen 40-70%, y la iluminación es regulada artificialmente mediante ciclos luz-oscuridad 12h.:12h.

Todos los animales fueron alimentados ad libitum, a excepción del grupo dieta, siendo la comida en forma de pellets, que ingieren de forma semicontinúa, principalmente, durante el periodo de oscuridad.



Figura 14: Jaulas standard para pequeños roedores.

El procedimiento cumple los principios éticos y de protección de animales de experimentación propios de la normativa vigente (R.D. 1201/2005).

PI01-06 aprobado por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal (23/03/06)



UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA  
COMISIÓN ÉTICA ASESORA PARA LA EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Reunida la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal, el día 23 de marzo de 2006 y una vez revisada la documentación disponible en relación al procedimiento de experimentación "*Expresión de nefrina como marcador de daño renal en un modelo experimental de Diabetes Mellitus tipo 2 y obesidad. Efecto renoprotector de fármacos antiproteinúricos*", presentado por el investigador Dr. D. Pablo Javier Iñigo Gil, , como parte del Proyecto de Investigación "*Expresión de nefrina como marcador de daño renal en un modelo experimental de Diabetes Mellitus tipo 2 y obesidad. Efecto renoprotector de fármacos antiproteinúricos*." considera:

*QUE EL PROCEDIMIENTO CUMPLE LOS PRINCIPIOS ÉTICOS Y DE PROTECCIÓN DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN QUE SE HA IMPUESTO LA UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA PARA LA MANIPULACIÓN DE ANIMALES DE INVESTIGACIÓN, Y SE ADAPTA A LA NORMATIVA VIGENTE (R.D. 1201/2005).*

*POR TODO ELLO, SE EMITE INFORME FAVORABLE.*

Esta evaluación será válida únicamente para ESTE EXPERIMENTO, y durante el periodo de tiempo especificado en la documentación aportada.

En Zaragoza, a 23 de marzo de 2006

EL SECRETARIO DE LA COMISIÓN  
EN FUNCIONES

Fdo.: Rosa María Morales Larruela

EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN

Fdo.: José Ángel Villar Rivacoba

## II) Materiales

### a) Productos para la determinación de parámetros bioquímicos en suero

La determinación de parámetros bioquímicos en suero procedente de muestras sanguíneas, se realizó en un analizador automático de bioquímica Vetscan, obtenido en Practice C.V.M. (Navarra). Para ello fueron necesarios rotores perfil comprensivo Vetscan, procedentes del mismo lugar.

## b) Productos para la determinación de Albúmina y Creatinina en orina

Para determinar la albúmina y creatinina en orina de rata, se utilizaron dos kits QuantiChrom™, kits de ensayos colorimétricos para análisis en muestras biológicas como orina. Son ensayos sencillos y directos que no necesitan tratamiento previo de la muestra. En concreto: QuantiChrom™BCG Albumin Assay Kit (DIAG-250) y QuantiChrom™ Creatinine Assay Kit (DICT-500), suministrados por Genycell Biotech (Santa Fé, Granada). Las placas de 96 pocillos estériles Nunclon™ con tapa 1/50 utilizadas en este experimento, fueron suministradas por Sumalsa (Zaragoza).

## c) Productos para la determinación de TGF-β1 y VEGF en orina

Para realizar la concentración de orina, se utilizaron columnas Amicon® Ultra-4 (4 ml.) 10K de Millipore (Barcelona), pre-tratadas con 0,1% Tween® 20 procedente de Merck (Barcelona).

Para la determinación de TGF-β1 y VEGF en orina de rata, se utilizaron kits Quantikine de inmunoensayo ELISA tipo sándwich: Mouse/Rat/Porcine/CanineTGF-β1 MB100B y Rat VEGF RRV00, ambos de R&D Systems (USA).

## d) Soluciones y reactivos empleados en la determinación cuantitativa del factor transformador del crecimiento (TGF-β1).

- TGF-β1 Control: TGF-β1 Kit Control (R&D Systems)  
Agua destilada
- Calibrador RD5-26 diluido (1X):  
Calibrador RD5-26 concentrado (4X) (R&D Systems) 20 ml  
Agua destilada 60 ml
- TGF-β1 Estándar: TGF-β1 estándar (R&D Systems)  
Calibrador RD5-26 diluido (1X)
- Tampón de lavado (625 ml) (solución A):  
Concentrado de tampón de lavado (R&D Systems) 25 ml  
Agua destilada 600 ml
- Solución substrato (solución B):  
Reactivo A (R&D Systems)  
Reactivo B (R&D Systems)

- Diluyente RD1-21 (R&D Systems)
- TGF- $\beta$ 1 conjugado (R&D Systems)
- Solución Stop (solución C)

Además, se utilizó ácido clorhídrico (HCl) 37% de Panreac (Barcelona), e hidróxido sódico (NaOH) y HEPES de Sigma (Madrid).

e) Soluciones y reactivos empleados en la determinación cuantitativa del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).

- VEGF Control: VEGF Kit Control (R&D Systems)  
Agua destilada
- VEGF Estándar: VEGF estándar (R&D Systems)  
Calibrador RD5-18 diluido (R&D Systems)
- Tampón de lavado (625 ml) (solución A)
- Solución substrato (solución B)
- Diluyente RD1-41 (R&D Systems)
- VEGF conjugado de rata (R&D Systems)
- Solución Stop (solución Stop)

f) Productos para aislamiento de RNA total, RT-PCR y PCR control

Para el aislamiento del RNA total se utilizó el kit comercial RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit (50) de Qiagen, suministrado por Izasa (Barcelona). En dicho procedimiento se utilizó además RNA later, RNase Zap® y 2- $\beta$ -Mercaptoethanol, todos de Sigma.

Las reacciones de RT-PCR se realizaron mediante el kit SuperScript™ III First-Strand de Invitrogen (Barcelona). Este mismo kit contenía los reactivos necesarios para la realización de las reacciones PCR control, a excepción de: 10X PCR buffer minus Mg<sup>++</sup>, 50 mM MgCl<sub>2</sub> y Taq DNA polimerasa, suministrados todos ellos por Invitrogen.

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador ThermoHybaid PxE (Alemania). Los microtubos (0.2 ml.) utilizados para este termociclador fueron obtenidos de Thermo Scientific (UK).

### g) Productos para electroforesis en gel de agarosa

Para el análisis de los productos PCR mediante electroforesis, se utilizó agarosa de Ecogen (España), bromuro de etidio de Bio-Rad (España), y Tris-Glicina buffer 10X de AppliChem (España). El marcador de PM 100 bp DNA ladder, fue de Thermo Scientific.

### h) Productos para Real-Time PCR

El material necesario para la cuantificación de mRNA por real-time PCR consistió en: Taq Man PCR Master Mix, No AmpErase® UNG, y sondas Taq Man MGB marcadas con FAM™ para los genes TGFb1, VEGFa, Nephrin, y Gapdh. Además se utilizaron placas para Real-Time PCR MicroAmp® de 96 pocillos (0.1 ml.).

Todo el material procedente de Applied Biosystems (España), y suministrado por Rafer (Zaragoza).

## III) Métodos

### A- Cronograma de la recogida de muestras

Las muestras de sangre, orina y tejido renal, se obtienen en los siguientes momentos del desarrollo experimental definidos en la figura 15(pag. 76)

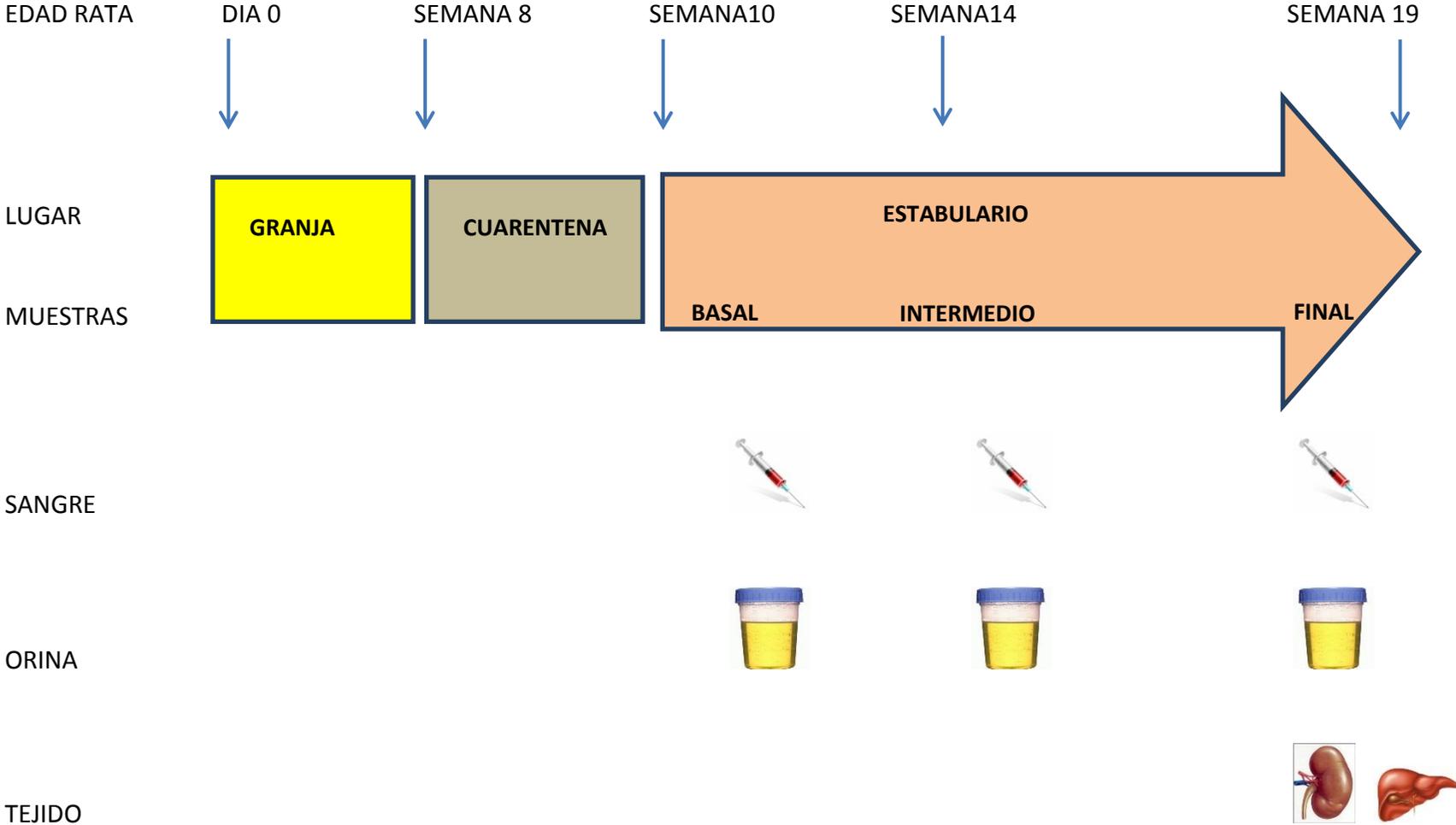
A la llegada de los animales al estabulario, le sigue un periodo de adaptación de 10-14 días, en el cual no se somete a los animales a ningún estrés extra que no haya supuesto ya el transporte de los mismos hasta el estabulario. Pasado este tiempo, se realiza un control de peso semanal y una extracción de sangre y recogida de orina mensual, resultando tres las tomas de muestras sanguíneas y de orina totales por animal y fase.

Durante el desarrollo experimental con animales pertenecientes al grupo tratado, debido al procedimiento de dosificación del fármaco, se realizaron medidas de consumo de bebida diarias. Así mismo, durante la fase experimental en la que se trabajó con animales pertenecientes al grupo dieta, se realizaron diariamente medidas de ingesta.

Para la recogida de orina, utilizamos unas jaulas metabólicas, en las cuales se mantienen a los animales individualizados durante 24 h.

A los 90 días de estudio aproximadamente se realizó el sacrificio, y con el animal totalmente anestesiado se procede a la extirpación de los riñones.

# CRONOGRAMA



## B- Proceso de extracción de sangre

A fin de reducir al mínimo el estrés del animal, la extracción se realizó en todos los casos por punción venosa en vena coccígea o de cola, con el animal previamente anestesiado. La anestesia utilizada fue isofluorano 4% inducción, 2% mantenimiento. Anestésico del cual los animales se recuperan con rapidez, y sin efecto sobre los parámetros hematológicos y bioquímicos. Además para facilitar la vasodilatación, se colocaron a los animales en una cama termostática previamente calentada a 30°C, y bajo constante observación para prevenir la hipertermia.

Con el animal sedado, y habiendo localizado y averiguado el recorrido de la vena, y habiéndola dilatado e inmovilizado, se procedió a perforar la piel con una aguja del orden de 23-26G x 10-20 mm junto con una jeringuilla. En este proceso es importante apuntar para perforar la piel y la vena de un solo movimiento, dirigiendo la punta de la aguja (con el bisel hacia arriba) un poco más arriba de la vena, de manera que el ángulo de penetración sea casi paralelo a la vena.

Considerando el volumen de sangre total del animal, generalmente estimado en 55-70 ml/kg de peso corporal, con un porcentaje algo más bajo (-15%) en obesos, y teniendo en cuenta que hasta un 10% del volumen de sangre circulante puede ser extraída en una ocasión con efectos adversos mínimos, (este sangrado puede repetirse a las 3-4 semanas), se extrajo 0.5-0.6 ml de sangre/muestreo.

Una vez retirada la aguja, se aplicó una presión continua en el lugar de la punción durante 30-60 segundos. Se observó la zona unos 30 segundos más, para asegurarse que no se vuelve a producir sangrado, y se devolvió el animal a su jaula bajo supervisión durante 10-15 minutos.

## C- Sacrificio y recogida de muestras titulares

Las muestras de tejido renal se obtuvieron a partir de la extirpación de los riñones del animal, el día del sacrificio.

A la hora de la elección del método de eutanasia para ratas, y tras tener en cuenta que para garantizar el bienestar del animal, toda técnica de eutanasia debe asegurar la ausencia de dolor o angustia, se optó por el isofluorano, agente suministrado vía inhalatoria que induce inicialmente anestesia y a continuación la muerte, deprimiendo los sistemas cardiovascular y respiratorio. Este agente fue utilizado gracias a la disposición de un aparato de recogida de gases apropiado. Además durante todo el proceso, quedó prohibido el sacrificio de un animal en presencia de otros animales, ya que les podía inducir miedo y angustia.

Una vez que el animal estuvo completamente anestesiado, se dispuso en la mesa quirúrgica previamente equipada con el material quirúrgico estéril necesario, inmovilizándolo de forma que quede con el vientre hacia arriba. Y a fin de mantener una asepsia completa a lo largo del muestreo, se rasuró la zona a intervenir, y se realizó un lavado posterior con etanol.

Con ayuda de pinzas dentadas para facilitar la sujeción de la piel, y utilizando un bisturí, se realizó una incisión cutánea, terminando con un corte a lo largo de toda la línea media ventral. Mediante un separador, se lateralizaron las paredes a uno u otro lado, e inmediatamente se tuvo fácil acceso a la cavidad abdominal, pudiendo distinguir las diferentes estructuras características de la anatomía de la rata.

Ambos riñones se exponen desplazando la masa intestinal al lado contralateral del riñón a extirpar. Para movilizar los riñones con el fin de extirparlos, se tomó con una pinza el peritoneo separando con suavidad éste del riñón, y tras retirar la grasa perirrenal, se seccionaron la arteria y la vena renal, pudiendo movilizar ya los riñones de su lecho.

Una vez confirmada la muerte del animal por exanguinación, y como consecuencia de la pérdida masiva e irreversible de la volemia, se retiró el cadáver pasando a procesar la muestra tisular.

#### D- Estudio piloto de dosificación del fármaco

Se trata de un estudio previo realizado para poner a punto la administración del fármaco a los animales (grupo tratado). Con él, tratamos de poner solución a planteamientos cuestionados como la solubilidad, dosis a administrar, preparación del Telmisartan en agua de bebida, otras alternativas para administrar la dosis diaria de fármaco a los animales, y posible neofobia gustativa, (rechazo tanto al agua de bebida como a los alimentos, una vez que se ha incorporado una nueva sustancia).

Tras realizar la consulta con la Unidad de Valoración Funcional del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS), obtuvimos que la solubilidad del Telmisartan es de 5 mg/ml a 60°C en DMSO (dimetil sulfóxido). La dosis elegida fue de 3 mg/kg/día (Ohmura et al., 2007) durante cuatro semanas, y tras confirmar el grado de toxicidad del DMSO vía oral, LD50 po rata = 14.5 g/kg (Pestel et al., 2006; Buggins et al., 2007), se resolvió realizar una disolución madre 50X en 100% DMSO calentando, para posteriormente diluirla 1:50 en agua (antes de diluir se comprobó que el fármaco estuviera totalmente disuelto en el DMSO). De esta manera intentamos reducir el sabor amargo al que hace referencia el handbook de excipientes a cerca del DMSO.

Como alternativa a la administración del fármaco en agua de bebida, preparamos una gelatina (sabor fresa) con la dosis del fármaco (+ DMSO) deseada.

A 8 machos Sprague-Dawley de 8 semanas de edad los dividimos en 4 grupos:

- Grupo Bebida: Agua. N=2
- Grupo Gelatina: N=2
- Grupo Tratado: Agua + Fármaco (Telmisartan) disuelto en DMSO (3 mg/kg). N=2
- Grupo Tratado: Gelatina + Fármaco (Telmisartan) (3 mg/kg). N=2

Tras realizar regularmente controles de peso y medidas de consumo de agua (ml/día/animal) de los 8 animales implicados en el estudio, se realizaron los cálculos pertinentes para la preparación de la disolución del fármaco en agua, en aquellos animales pertenecientes al grupo tratado.

## E- Tipos de dietas y regímenes

A la hora de alimentar a los animales de laboratorio y en función de los requerimientos experimentales, se eligieron distintos tipos de regímenes relacionados con la cantidad total ingerida, así como distintos tipos de dietas, cuya formulación varía a fin de ajustar la concentración de nutrientes específicos a objetivos experimentales.

Las ratas pertenecientes a la cepa Sprague-Dawley y Zucker Fatty, fueron alimentadas con dieta estándar, formulada con un promedio de datos de proteína, fibra, grasa y otros. Se trata de pienso en forma de pellets en régimen alimenticio ad libitum (AL), lo que supone el libre acceso al alimento las 24 horas del día.

Por otro lado, las ratas ZDF (Zucker Diabetic Fatty) constituyen un modelo animal que desarrolla espontáneamente NIDDM (DM 2). El laboratorio Charles River con el fin de inducir el fenotipo diabético deseado, recomiendan suministrar una dieta de Purina 5008 (Tabla 8) a machos ZDF.

Peso	Calorías
Proteínas 23%	Proteínas 26,8%
Carbohidratos 58,5%	Carbohidratos 56,4%
Grasas 6,5%	Grasas 16,7%
Fibra 4,0%	
Otros 8%	

Tabla 8. Composición dieta Purina 5008. Especialmente indicada para machos ZDF.

Siguiendo las recomendaciones indicadas, las ratas ZDF se alimentaron ad libitum con dieta Purina 5008.

El grupo ZDF dieta planteaba algunas dudas, a las cuales había que encontrar respuesta. A través del departamento de nutrición Harlan Teklad, se nos informó del hecho de que una reducción del 30% (reducción moderada) en kcal/g (energía total), se traduce en un incremento de celulosa de hasta el 40% de la dieta. Este alto nivel en fibra podría causar problemas en la función digestiva normal, por lo que se optó por una dieta Purina 5008 restringida. La alimentación restringida (AR) moderada implica

una restricción en torno al 30% respecto a la ingesta diaria del grupo ZDF control. Este tipo de régimen supuso una mayor dedicación, ya que en el caso de AR, se les suministró la alimentación a diario.

## F- Métodos analíticos y procesamiento de las muestras

### *\*Procesamiento de muestras de sangre. Parámetros bioquímicos*

Un volumen de sangre de aproximadamente 0,5 ml/muestra, se recogió en tubos Eppendorf estériles de capacidad 1,5 ml. A continuación se realizó una centrifugación a 3500 rpm, 4°C, durante 5'. El suero resultante se transfirió a otro tubo Eppendorf estéril. Cien microlitros de suero por muestra, se analizaron en un analizador automático de bioquímica Vetscan. Este analizador nos permite determinar parámetros bioquímicos estándar como la albúmina (ALB), (la hipoalbuminemia es indicativa de nefrosis, nefritis y/o enfermedad glomerular renal), urea nitrogenada (BUN) y creatinina (CRE), (altos niveles de BUN y CRE en suero identifican el diagnóstico de alteración de la función renal), glucosa (GLU), (su detección nos permite saber grado de diabetes), y proteína total, entre otros. (Fig. 16). El resto de muestra sérica, se guardó congelada a -20°C.

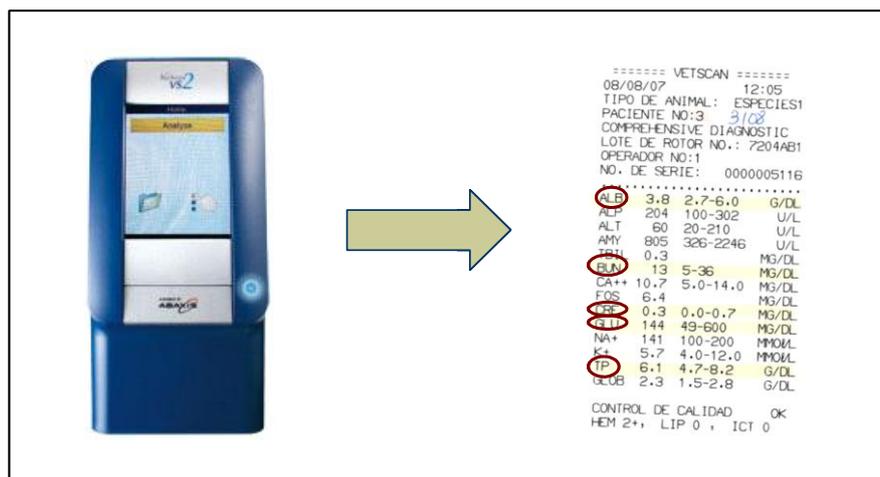


Figura 16: Analizador Vetscan para análisis bioquímico de muestras séricas.

*\*Procesamiento y determinaciones en muestras de orina*

Las muestras de orina se recogieron en tubos Falcon de 15 ml., y se sometieron a centrifugación 3500 rpm, 15 minutos, a 22°C.

Se realizaron dos tipos de estudio en orina: Determinación de albúmina para medir microalbuminuria, y de creatinina urinaria

La creatinina es un producto de desecho del metabolismo normal de los músculos, producida habitualmente en una tasa constante, filtrada por los riñones y excretada en la orina. Ante un filtrado de riñón deficiente, los niveles de creatinina en sangre se elevan y este efecto es el usado como marcador de la función renal.

En la determinación de albúmina mediante el QuantiChrom™ Albumin Assay Kit, se transfirieron 5 µl de los estándares diluidos (necesarios para la realización de la curva estándar), así como de las muestras a determinar, más blancos, a una placa de 96 pocillos. Posteriormente se añadió 200 µl de reactivo por muestra, y tras incubar la placa 5 minutos a temperatura ambiente, se midió densidad óptica a 620 nm, en un lector de placas. La concentración de albúmina fue obtenida mediante la fórmula:

$$\frac{\Delta OD \text{ muestra} \times b}{a - \Delta OD \text{ muestra}} \times n \text{ (g / dL)}$$

dónde  $\Delta OD \text{ muestra} = OD \text{ muestra} - OD \text{ blanco}$ ,  $n = \text{Factor de dilución}$ , y  $a$  y  $b$  son obtenidos de la ecuación  $y = a \times / (b+x)$  correspondiente a la curva estándar.

En la utilización del kit QuantiChrom para creatinina, se dispusieron 5 µl de muestra por pocillo en una placa de 96, incluyendo un blanco y un estándar de creatinina a una concentración de 50 mg/dL. A continuación se añadieron 200 µl más por pocillo de reactivo, y se midió densidad óptica a 490-530 nm al cabo de 1 y de 5 minutos. La concentración de creatinina de cada muestra se calculó a través de la siguiente fórmula:

$$\frac{OD \text{ muestra } 5' - OD \text{ muestra } 1'}{OD \text{ std } 5' - OD \text{ std } 1'} \times [STD] \text{ (mg / dL)}$$

*\*Determinación de TGF- $\beta$ 1 y VEGF en orina. Técnicas inmunoenzimáticas (ELISA)*

Debido a que las concentraciones de estas dos citoquinas en orina, están por debajo del límite de detección de los kits comerciales, se procedió a realizar un paso previo de concentración de orina en el cual, según protocolo descrito por Ellis et al., (1998), y tras someter las columnas a un pre-tratamiento overnight con Tween-20 al 0.1% a temperatura ambiente y protegido de la luz, y dejarlas secar al aire, se añadió 2 ml de muestra de orina por columna y se centrifugó a 4200 rpm, durante 90 min, a 20°C.

Una vez realizada la concentración, y con ayuda de una microjeringa Hamilton de 100  $\mu$ l, se procedió a medir el volumen de orina concentrada por muestra.

- Preparación de las muestras

Las muestras de orina concentradas que van a ser posteriormente sometidas a una cuantificación de TGF- $\beta$ 1, se llevaron a un volumen de 100  $\mu$ l utilizando calibrador RD5-26 (1X) diluido. Para su activación, se añadieron 20  $\mu$ l de HCl 1N por muestra, y se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente. Al cabo de 10 minutos, se añadieron 13  $\mu$ l de 1,2N NaOH/0,5M HEPES. Tras mezclar bien, se procedió a la determinación.

Las muestras de orina concentradas que por el contrario, van a ser sometidas a una cuantificación de VEGF, se llevaron a un volumen de 100  $\mu$ l, utilizando el calibrador RD5-18 diluido. (En este caso no es necesario activar previamente las muestras).

En este punto, es importante tener en cuenta el factor de concentración/dilución resultante en cada muestra, ya que éste influye directamente en el cálculo final.

- Procedimiento inmunoenzimático para la cuantificación del TGF- $\beta$ 1 y VEGF

- Se reconstituye tanto el TGF- $\beta$ 1 Kit Control, como el VEGF Kit Control (R&D Systems), ambos con 1 ml de agua destilada.

- Se reconstituyen el TGF- $\beta$ 1 estándar y VEGF estándar (R&D Systems) con 2 ml de calibrador RD5-26 (1X) diluido y RD5-18 diluido (R&D Systems), respectivamente. Para obtener en ambos casos una solución con una concentración final de 2000 pg/ml. La solución obtenida se mantiene 5 minutos con agitación lenta hasta la preparación de las diluciones.
- En ambos casos, se preparó 625 ml de tampón de lavado diluido, mezclando 25 ml de tampón de lavado (25X) (R&D Systems) con 600 ml de agua destilada hasta completa disolución.
- También en ambas determinaciones, se realizaron diluciones seriadas con la solución estándar reconstituida correspondiente, y 500  $\mu$ l del calibrador diluido adecuado en cada tubo (figura 11).

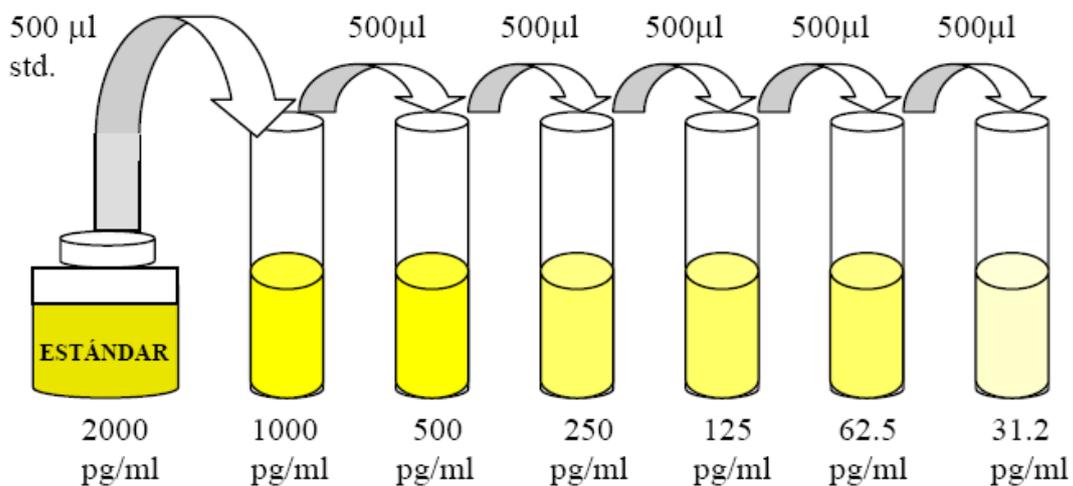


Figura 17: Preparación de las diluciones a partir del estándar (R&D Systems).

Tanto la cuantificación del TGF- $\beta$ 1, como la del VEGF se realizaron por duplicado para cada una de las muestras. Se utilizaron placas de poliestireno de 96 pocillos con un anticuerpo monoclonal de rata frente a TGF-  $\beta$ 1/VEGF-A fijado en el fondo de cada pocillo.

Se añadieron 50  $\mu$ l de diluyente RD1-21 (TGF- $\beta$ 1)/ RD1-41 (VEGF) a cada pocillo y 50  $\mu$ l del estándar, las diluciones realizadas previamente, y las muestras de orina. Se incubó a temperatura ambiente y con agitación constante ( $500 \pm 50$  rpm) durante 2 horas.

Tras la incubación, se lavó cada pocillo un total de 5 lavados, con 400  $\mu$ l de tampón de lavado previamente preparado. Una vez realizados los lavados se añadieron 100  $\mu$ l de TGF-  $\beta$ 1/VEGF conjugado de rata y se incubó 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Tras esta incubación se volvió a proceder al lavado de los pocillos un total de 5 lavados, con 400  $\mu$ l de tampón de lavado. Se añadieron 100  $\mu$ l de solución substrato por pocillo (los reactivos A y B mencionados en el apartado 3.3.3.2. deben mezclarse en volúmenes iguales y en ausencia de luz), y se incubó durante 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Una vez finalizada la incubación, se añadieron 100  $\mu$ l de solución stop, utilizada para parar la reacción.

Una vez añadida la solución stop y antes de que transcurran 30 minutos, se determinó la densidad óptica de cada pocillo a longitudes de onda 450 y 540 nm.

El cálculo de los resultados se realizó mediante la obtención de la media de las lecturas de la densidad óptica de los duplicados a 450nm, para cada estándar y muestra problema, restando la corrección mediante la lectura de la densidad óptica a 540nm y el estándar de concentración cero. La resta con la lectura de la densidad óptica a 540nm se realizó para corregir las imperfecciones ópticas de la microplaca.

La recta patrón se calculó mediante la media obtenida para cada estándar, y la realización de la regresión lineal de los datos. Tras la obtención de la recta patrón se obtuvo la concentración de TGF-  $\beta$ 1/VEGF para cada muestra problema.

#### *\*Procesamiento y determinaciones en muestras tisulares*

Las muestras de tejido renal se obtuvieron a partir de la extirpación de los riñones del animal, el día del sacrificio. El riñón se dividió en dos partes mediante un corte longitudinal. Los cortes seleccionados se conservaron en criotubos estériles con RNA later (producto utilizado para preservar el RNA).

Para almacenar tejido de una manera eficaz, se recomienda usar RNA later y congelar las muestras tras su recogida a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Esto, nos permite almacenar muestras de tejido hasta el momento de su procesamiento (figura 18).

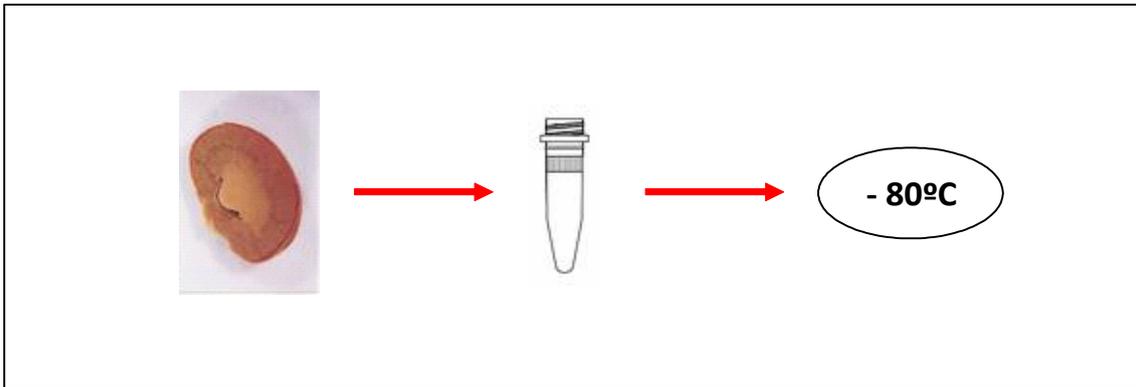


Figura 18: Esquema procesamiento de muestras de tejido renal

En muestras de tejido, medimos expresión de nefrina, una proteína de interés, y de TGF- $\beta$ 1 y VEGF, como marcadores de daño y proliferación tisular/vascular.

#### *\*Extracción de RNA*

A la hora de trabajar con RNA, deben tomarse las máximas precauciones para evitar posibles contaminaciones. Es importante trabajar en un ambiente exento de RNAsas que puedan degradar nuestro RNA. Deben usarse guantes durante todo el proceso, así mismo, utilizar material estéril: puntas, tubos, pipetas, etc...

Se utilizó un kit de extracción de RNA de Qiagen, diseñado para aislar RNA total en pequeñas cantidades, que además nos permite su purificación.

En este procedimiento, un buffer especial con alto contenido salino permite unirse a más de 100  $\mu\text{g}$  de RNA mayor de 200 bases, a una membrana basada en un gel de sílice.

- Preparación de reactivos

Se añadieron 10  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol (14,3M) por 1 ml de buffer RLT (contiene tiocianato de guanidina, buffer desnaturizante utilizado para lisar y homogeneizar las muestras biológicas).

El buffer RPE (buffer de lavado) se diluyó añadiendo 4 volúmenes de etanol (96-100%). También se preparó previamente la solución DNasa I, disolviendo el stock DNasa I (sólido), en 550  $\mu$ l de RNasa-free water (contiene desoxirribonucleótidos).

- Procedimiento

En primer lugar y tras añadir 300  $\mu$ l de buffer RLT, se procedió a homogeneizar cada muestra utilizando un rotor convencional.

Se añadió 590  $\mu$ l de RNasa-free water seguidos de 10  $\mu$ l de proteinasa K a cada homogeneizado, con el fin de digerir posibles DNAs y proteínas presentes en la muestra. Tras mezclar suavemente por pipeteo, se incubó la mezcla a 55°C durante 10 minutos, y se centrifugó 3 minutos a 10000 rpm, a 20-25°C.

El sobrenadante resultante se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 ml, y se añadieron 0,5 volúmenes de etanol. Tras volver a mezclar por pipeteo, la mezcla se añadió a la columna en alícuotas sucesivas de 700  $\mu$ l, incluyendo cualquier precipitado que se hubiese formado. La columna, colocada en un tubo colector de 2 ml, se centrifugó 15 segundos a 10000 rpm. El eluyente se descartó. (El RNA total queda adherido a la matriz de sílice de la columna).

Se pipeteó 350  $\mu$ l de buffer RW1 (contiene etanol) a cada columna, y tras centrifugar 15 segundos a 10000 rpm, volvió a descartarse el eluyente.

En este punto, se procedió a mezclar 10  $\mu$ l de solución DNasa I, con 70  $\mu$ l de buffer RDD. Los 80  $\mu$ l resultantes por muestra, se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos, y se añadieron a cada columna.

La columna fue transferida a un nuevo tubo colector de 2 ml.

Se pipeteó 500 µl de buffer RPE (buffer de lavado) por columna, se centrifugó 15 segundos a 10000 rpm, y se descartó el eluyente.

Se pipeteó 500 µl de buffer RPE por columna, y se centrifugó esta vez durante 2 minutos a máxima velocidad (12000 rpm). Es importante secar bien la membrana de la columna de restos de etanol, para que éste no interfiera en pasos posteriores.

La columna se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 ml, y se pipeteó 30-50 µl de RNasa-free water. Se centrifugó durante 1 minuto a 12000 rpm para eluir. En el caso de llevarse a cabo una segunda elución (más de 30 µg de RNA), vuelven a pipetarse 30-50 µl de RNasa-free water.

Se llevó a cabo una Evaluación de la calidad del RNA obtenido

En el estudio se cuantificó la expresión de RNAm de TGFβ y VEGF. Para la transcripción inversa se utilizaron 6 µg de RNA total (usando SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR, Invitrogen) en 20 µl de volumen. La transcripción inversa fue realizada usando Oligo(dT)(0,5 µg/µl). El DNAc que se consiguió fue almacenado a -80 °C hasta su uso. La cuantificación del RNAm fue realizado mediante una reacción en cadena de polimerasa a tiempo real (**Real Time Polymerase Chain Reaction**), usando el ABI Prism 7700 (sistema de detección de secuencia) (Applied Biosystem).

Rápidamente, 1 µl del DNAc se mezcló con 10 µl de Taqman® mezcla maestra de PCR universal, No AmpErase® UNG y con 1 µl of Taqman® ensayos de expresión génica, en 20 µl de volumen del reactivo. Todos los reactivos fueron proporcionados por Applied Biosystem.

El 18s RNA ribosomal se usó como gen de control interno (housekeeping). Se usaron las siguientes secuencias de pruebas de Taqman® MGB: Tgfb1 Rn 00572010\_m1, Vegfa Rn 00582935\_m1, and 18S rRNA VIC 4319413E (Applied Biosystem). Todos los ensayos de expresión génica tuvieron un FAM™ indicador colorimétrico a los 5 minutos del final de la prueba de Taqman® y un extintor no fluorescente a los 3 minutos del final de la prueba.

#### **IV) Análisis estadístico**

El escaso número de sujetos en cada uno de los grupos impide que los resultados estadísticos, tanto significativos como No significativos tengan un peso determinante, debiendo analizar clínicamente el sentido de las tendencias y resultados.

Los Grupos Vehículos y Control se diseñaron así desde un punto de vista Metodológico de la experimentación pero constituyen un único Grupo Clínico de forma que aun habiendo sido también analizados de forma separada lo normal y correcto desde el punto de vista de resultados clínicos es proceder a su análisis en un único Grupo.

Todos los valores fueron expresados como medias y desviación estándar.

Para el análisis estadístico fueron retirados algunos de los resultados (solo unos pocos dentro de todo el estudio) que se alejaron excesivamente tanto de los resultados normales como de los de seguimiento dentro del mismo animal por considerar que la muestra no estaba en correcto estado.

Se realizaron **3 estudios, Basal, Intermedio y Final.**

La estadística que se expone tanto en este Documento como en la Presentación hará referencia únicamente a los datos Basal y Final y no figuran los Intermedios para no sobrecargar con resultados que no conducen a conclusiones finales.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS 15.0.

Para la Estadística Descriptiva univariada, las variables cualitativas se presentarán mediante la distribución de frecuencias de los porcentajes de cada categoría. Para las variables cuantitativas se explorará si siguen o no una distribución normal mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov, y se darán indicadores de tendencia central (media o mediana) y de dispersión (desviación estándar o percentiles).

En la Fase analítica. Para comparar el resultado de las variables y correlacionar con los diferentes factores se realizarán pruebas de contraste de hipótesis, con comparación de proporciones cuando ambas variables sean cualitativas (chi cuadrado, prueba exacta de Fisher); y comparaciones de medias cuando una de ellas sea cuantitativa (t de Student, ANOVA, y si no siguen distribución normal mediante test no paramétricos para muestras pareadas). Se aplicarán técnicas de análisis para estudios de pruebas diagnósticas. Análisis de sensibilidad, especificidad y valores predictivos. Se completará el análisis con modelos de regresión multivariante.

Se establecerá como valor positivo para la Significatividad =  $p < 0,05$ .

## **5. RESULTADOS**

Durante el modelo experimental se realizaron tres estudios en el tiempo, Basal, Intermedio y Final. En cada una de las variables mostraremos inicialmente los datos recogidos de los 3 estudios pero para simplificar el entendimiento de los resultados más importantes, dado que el estudio intermedio se ha realizado por Metodología para comprobar el buen estado de los animales y la presencia y evolución de la patología en estudio, en las tablas y gráficos se muestran solo los resultados iniciales y finales con los que se ha realizado la estadística del mismo.

Los Grupos Vehículos y Control se diseñaron así desde un punto de vista Metodológico de la experimentación pero constituyen un único Grupo Clínico, de forma que aun habiendo sido también analizados de forma separada lo normal y correcto desde el punto de vista de resultados clínicos es proceder a su análisis en un único Grupo.

# PROTEINURIA

Las determinaciones para cuantificar la Excreción Urinaria de Albúmina se realizaron de varias formas; determinando el ALCR (cociente Albúmina/Creatinina en Orina); también realizamos la determinación de Microalbuminuria aislada y midiendo Proteínas en Orina de 24 horas (mg/día).

De las 3 formas dudamos metodológicamente del cálculo del ALCR porque debería de hacerse con una muestra aislada a primera hora de la mañana, esto en la rata, sería a primera hora de la noche, imposibilitando bastante el estudio y además el volumen recogido en una micción aislada es muy pequeño y en algunas ocasiones casi no da volumen o bien hace que no nos fiemos del resultado obtenido. Con todo esto y lo que hay en la literatura, nos decantamos por mostrar los resultados de orina de 24 horas en la determinación de proteínas en orina

## Proteínas en Orina (mg/día)

En el **Estudio Basal** (semana 10) las Ratas SD presentaron una media de valores de  $5,19 \pm 0,66$ . Las Zucker valores de  $4,42 \pm 0,86$ . Las ZDFC de  $37,26 \pm 15$ , las ZDFD de  $19,45 \pm 7,2$  y las del ZDFT de  $24,73 \pm 9,6$ .

En el **Estudio Final** (semana 19) las Ratas SD presentaron una media de valores de  $7,5 \pm 3,58$ . Las Zucker valores de  $37,20 \pm 17,20$ . Las ZDFC de  $298,46 \pm 107,72$ . Las ZDFD de  $130 \pm 66,56$  y las del ZDFT de  $97,8 \pm 57,43$ .

PROTEINURIA						
		<i>BASAL</i>		<i>FINAL</i>		<i>INCREMENTO PROTEINURIA</i>
		Media	D. Est	Media	D. Est	
Z	(5)	4.42	0.86	37.2	17.52	32.78±17.52
ZDFT	(8)	24.73	9.6	97.8	57.4	73.07±52.9
ZDFC	(12)	57.31	48.8	323.63	134.3	266.3±124.8
ZDFD	(8)	19.51	7.81	130.32	66.5	110.8±64.5

Tabla 9: Comparativa proteinuria basal (semana 10) y final (semana 19), utilizando media y desviación estándar. Incremento proteinuria

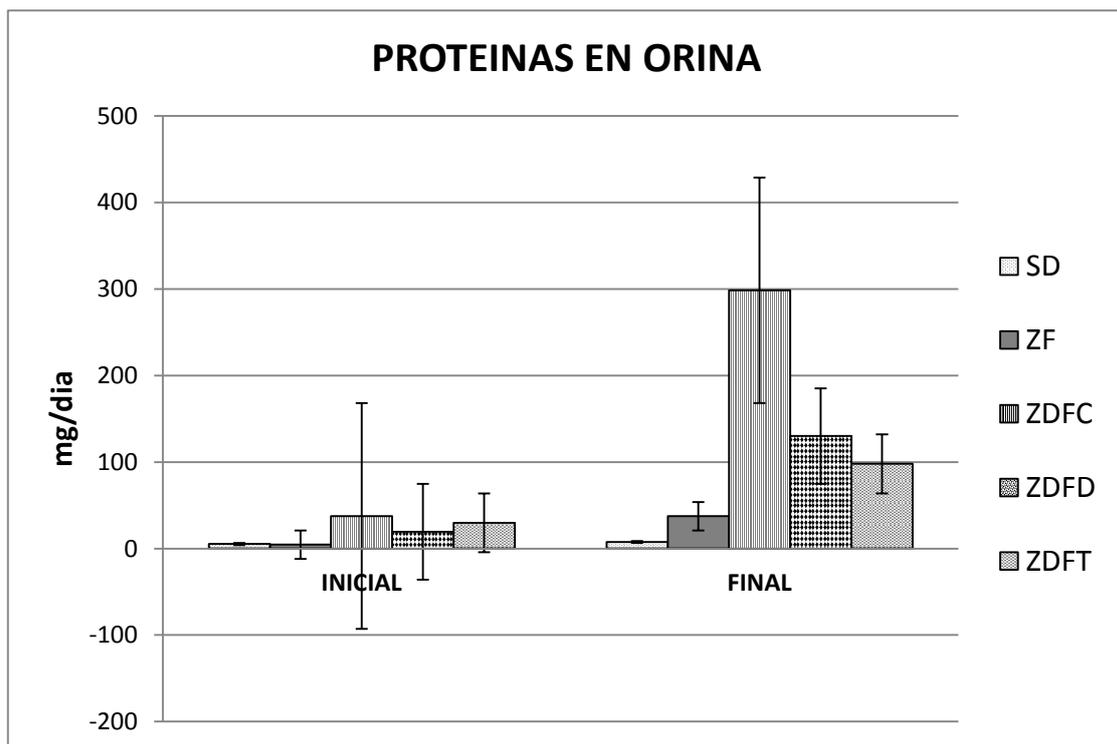


Figura 19: Gráfico comparativo proteinuria inicial y final según poblaciones. SD(Sprague Dawley), ZF(Zucker fatty), ZDFC(Zucker diabetic and fatty control/sin intervención), ZDFD(Zucker diabetic and fatty tratadas con dieta), ZDFT(Zucker diabetic and fatty tratadas con telmisartan)

## Resultados significativos. Estadística

No hubo diferencias significativas entre momento inicial y final en el grupo SD ( $p=0,17$ ). Hubo diferencias significativas en las ratas Zucker entre el inicio y el final del estudio; de 4,4mg/día a 37,2 mg/día ( $p= 0,013$ ). Entre el momento inicial y final, las diferencias fueron muy significativas en el grupo control (de 37 mg/día a 298 mg/día) ( $p= 2,768E-06$ ). También las hubo en el grupo de tratamiento con Telmisartan (ZDFT) durante el estudio; 24,7 mg/día al inicio y 97,8 mg/día al final ( $p= 0,0066$ ). El grupo de dieta también mostró diferencias significativas de 19,45 a 130,3 mg/día ( $p= 0,001$ ). Otros resultados interesantes clínicamente y con significación estadística en el momento final del estudio fueron:

- Las ZDF T y las ZDF D no presentaron diferencias significativas entre ellas al final del estudio. ( $p=0,89$ )
- Las ZDFT incrementaron su ALB (o) pero de forma significativamente inferior a las control ( $p= 0,02$ )
- Las ZDFD incrementaron su ALB(o) pero de forma casi significativamente inferior a las control ( $p= 0,05$ )
- Las ZF aumentaron su ALB (o) con  $p=0.025$  respecto a las ZDFC

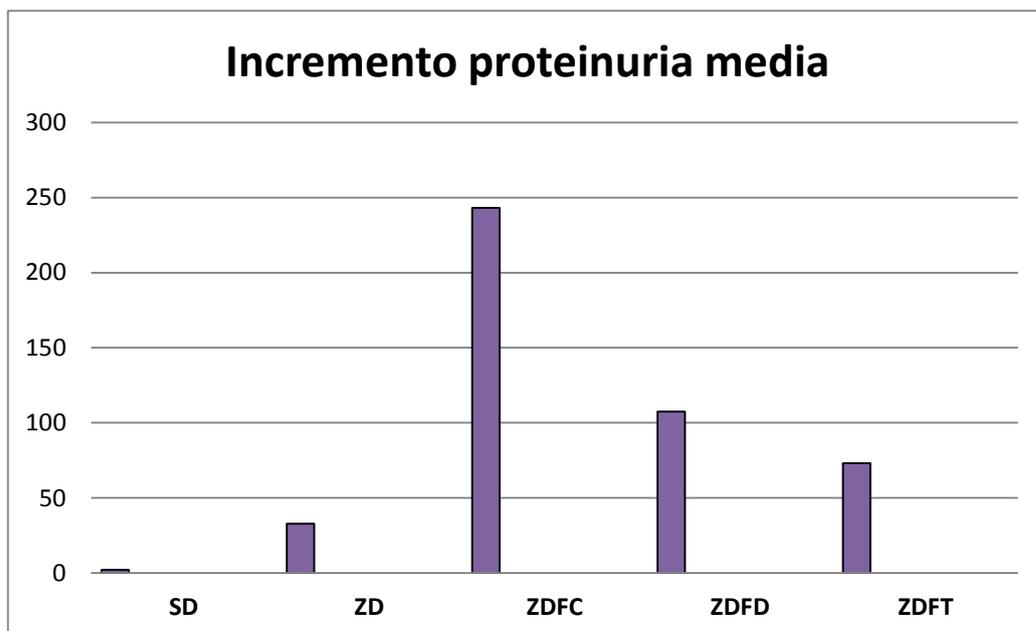


Figura 20: Grafico comparativo incremento proteinuria media

## GLUCEMIA

Las Ratas SD presentaron una media de valores de glucemia en sangre en el **Estudio Basal** de 175 mg/dL. Las Zucker valores de 150mg/dL. Las ZDFC de 265,4 mg/dL, las ZDFD de 146.25 mg/dL y las del ZDFT de 223 mg/dL. En el **Final** las SD mostraron una media de glucemia en sangre de 184 mg/dL. Las Zucker valores de 188mg/dL. Las ZDFC de 615 mg/dL, las ZDFD de 360.1 mg/dL y las del ZDFT de 478,43 mg/dL.

		BASAL			FINAL		
		Media	E. Típico	D. Est	Media	E. Típico	D. Est
SD	(5)	175	11.62	25.99	184.6	13.84	30.95
Z	(5)	150	6.98	15.61	188.6	35.09	78.28
ZDFT	(8)	223.5	52.98	129.78	478.43	43.47	115.01
ZDFC	(12)	265.41	41.45	91.746	615.06	27.01	63.23
ZDFD	(8)	146.25	8.14	23.026	360.1	42.03	118.8

Tabla 10: Comparativa glucemia basal y final (semana 10 y 19), con medias, error típico y desviación estándar

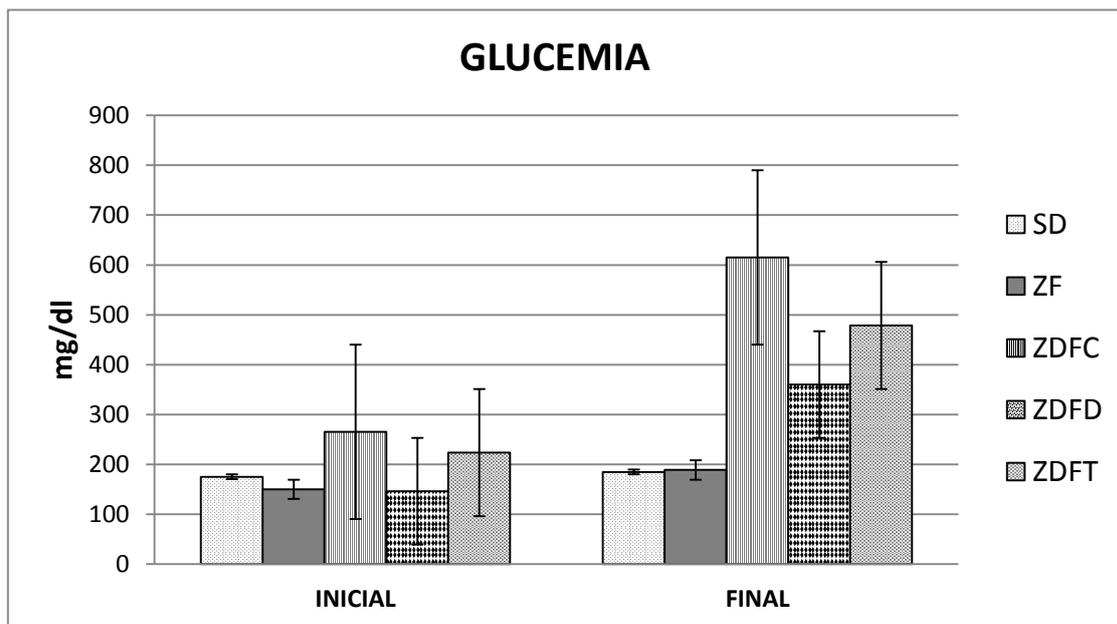


Figura 21: Gráfico comparativo glucemia inicial y final según poblaciones

## Resultados significativos

Las ratas del grupo ZDFC presentaron un aumento significativo de los niveles de glucemia entre el período inicial y final del estudio, de 265, 41 a 615,06; también es llamativo que el incremento de los valores en el grupo de Dieta fue menor que en el grupo control y que las ratas del grupo Telmisartan si bien incrementaban los valores medios al final del estudio lo hacían en menor proporción que el grupo control. Entre los grupos ZDFC y ZDFD se encontraron diferencias estadísticamente significativas con un menor incremento de Glucemia en el grupo ZDFD ( $p=0,000$ ). Llegando a glucemia de 615 mg/dl de media en el grupo control frente a 360 mg/dl en el grupo tratado con dieta. Entre el grupo de ZDFT frente a ZDFC también se documentó un menor incremento de glucemia, con  $p=0,137$ (615 frente a 478)

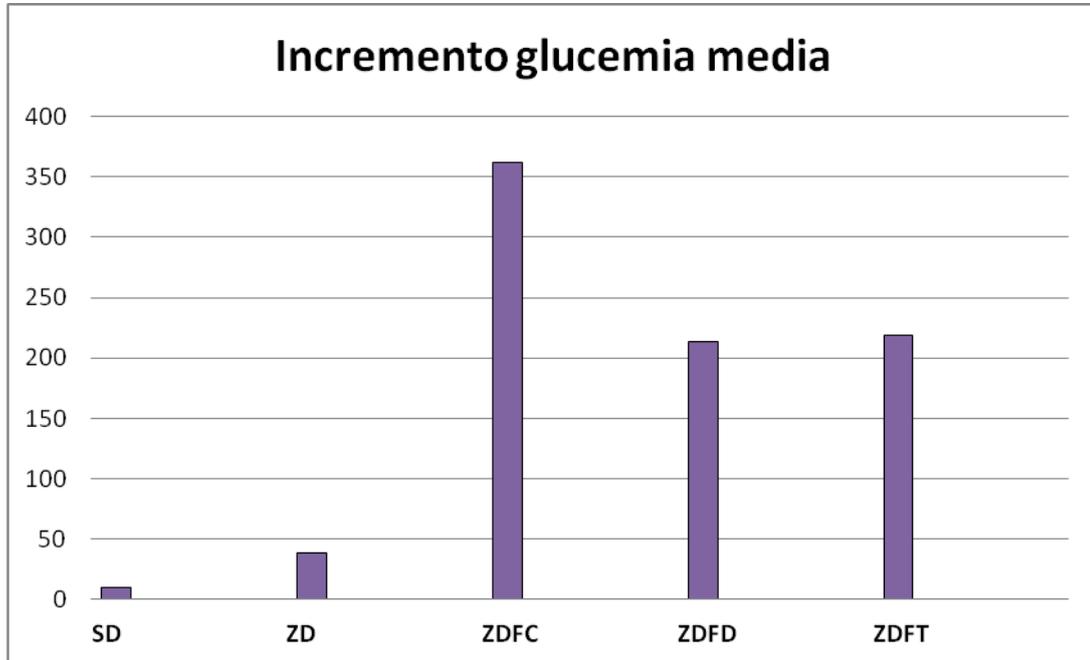


Figura 22: Gráfico comparativo incremento glucemia media

## PESO

Las Ratas SD presentaron una media de Peso en el **Estudio Basal** de 386.39 gr. Las Zucker de 330.1 gr. Las ZDFC de 351.53 gr, las ZDFD de 337,09 gr y las del ZDFT de 360.81 gr. En el **Final** las SD presentaron una media de peso de 519.19. Las Zucker valores de 517.6. Las ZDFC de 422.4 gr, las ZDFD de 495.60 y las del ZDFT 480.79 gr.

		PESO					
		BASAL			FINAL		
		Media	E. Típico	D. Est	Media	E. Típico	D. Est
SD	(5)	386.39	15.53	34.733	519.19	28.501	63.729
Z	(5)	330.10	10.46	23.394	517.60	15.036	33.621
ZDF T	(8)	360,81	5.12	14.493	480.79	24.126	68.237
ZDF C	(12)	351.53	5.37	13.940	422.4	9,166	23.43
ZDF D	(8)	337.09	4.76	13.487	495.60	5.30	15.01

Tabla 11: Comparativa peso basal y final (semana 10 y 19), utilizando medias, error típico y desviación estándar

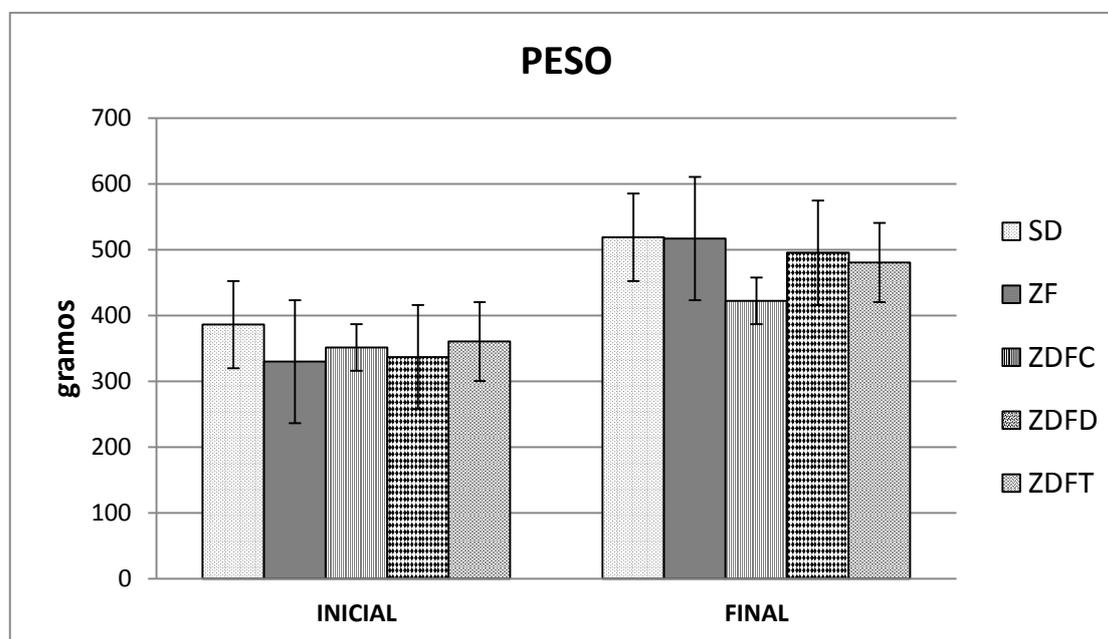


Figura 23: Gráfico comparativo peso inicial y final según poblaciones

### Resultados significativos

No hubo diferencias significativas entre el momento inicial y final en ningún grupo

## CREATININA

Las Ratas SD presentaron una media de Creatinina en sangre en el **Estudio Basal** de 0.44 mg/dL. Las Zucker valores de 0.25. Las ZDFC de 0.67 mg/dL, las ZDFD de 0.20 mg/dL y las del ZDFT de 0.40 mg/dL. En el **Final** las Ratas SD presentaron una media de valores de 0.42. Las Zucker valores de 0.34. Las ZDFC de 0.39 mg/dL, las ZDFD de 0.24 y las del ZDFT de 0.30 mg/dL.

CREATININA						
BASAL				FINAL		
	Media	E. Típico	D. Est	Media	E. Típico	D. Est
SD (5)	0,44	0,05	0,11	0,42	0,04	0,11
Z (5)	0,25	0,02	0,05	0,34	0,05	0,11
ZDF T (8)	0,40	0,12	0,31	0,30	0,04	0,12
ZDF C (12)	0,67	0,1	0,24	0,39	0,05	0,11
ZDF D (8)	0,20	0	0	0,24	0,01	0,05

Tabla 12: Comparativa creatinina basal (semana 10) y final (semana 19), utilizando medias, error típico y desviación estándar

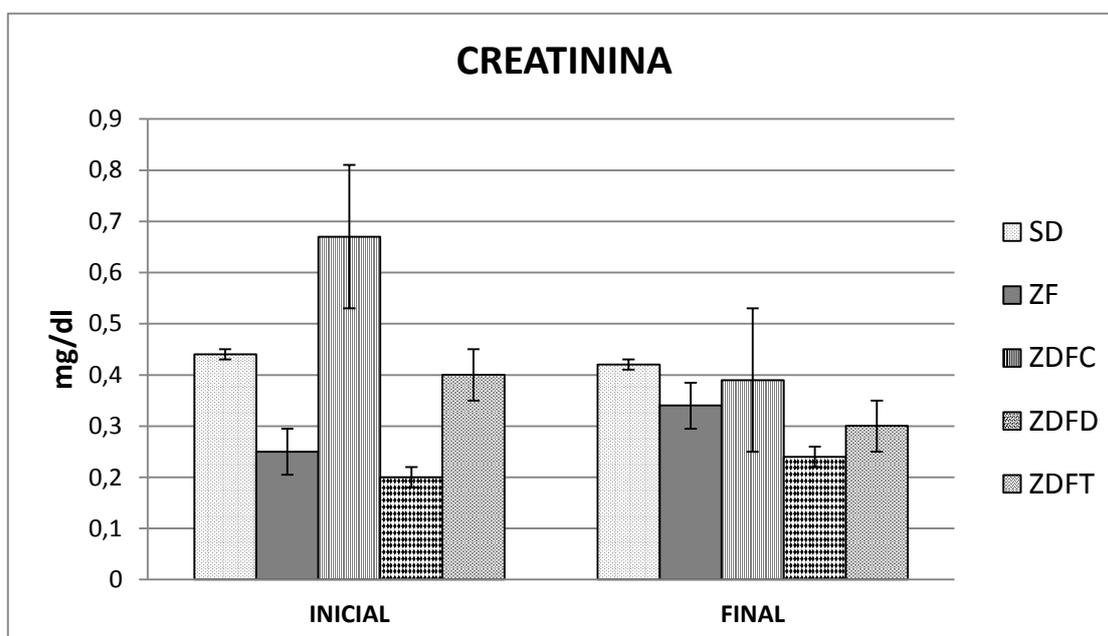


Figura 24: Gráfico comparativo creatinina inicial y final según poblaciones

### Resultados significativos

No hubo diferencias significativas entre el momento inicial y final en ningún grupo

## BUN

Las Ratas SD presentaron una media de BUN en sangre en el **Estudio Basal** de 14.8. Las Zucker valores de 24. Las ZDFC de 19.91, las ZDFD de 17.38 y las del ZDFT de 17.83 mg/dL. En el **Final** las Ratas SD presentaron una media de valores de 16.8. Las Zucker valores de 22. Las ZDFC de 22.44, las ZDFD de 19.63 y las del ZDFT de 19.14 mg/dL.

		BUN					
		BASAL			FINAL		
		Media	E. Típico	D. Est	Media	E. Típico	D. Est
SD	(5)	14,8	1,15	2,58	16,8	1,15	2,58
Z	(5)	24	0,54	1,22	22	1	2,23
ZDF T	(8)	17,83	0,83	2,04	19,14	0,7	1,86
ZDF C	(12)	19,91	0,76	1,69	22,44	0,48	1,26
ZDF D	(8)	17,38	0,70	1,99	19,63	0,90	2,56

Tabla 13: Comparativa BUN basal y final (semana 10 y 19), utilizando medias, error típico y desviación estándar

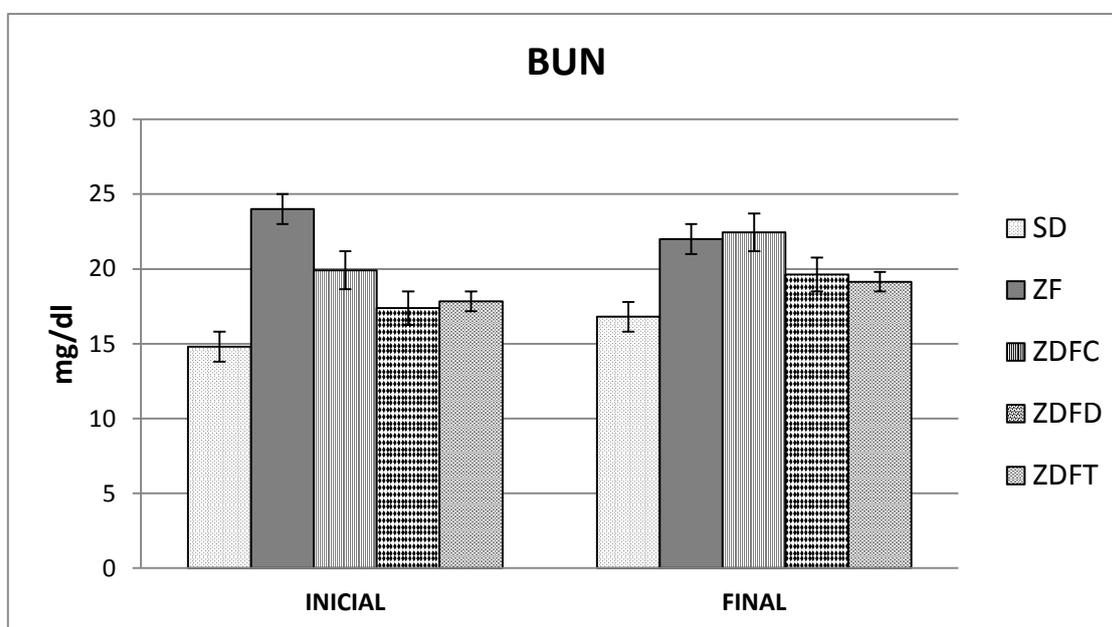


Figura 25: Gráfico comparativo BUN inicial y final según poblaciones

### Resultados significativos

No hubo diferencias significativas entre el momento inicial y final en ningún grupo.

# TGF-β Y VEGF

## RESULTADOS EN MUESTRAS DE ORINA

Ambos, niveles urinarios de TGF-β y VEGF están expresados en pg/24h.

Respecto al TGF-β; En el **estudio basal** se encontraron valores medios en las ratas Zucker de 2878, en las ZDFC de 3750, en las ZDFT de 5845 y en las ZDFD de 878. En el **estudio final** las ratas Zucker presentaron un valor medio de 2900, en las ZDFC de 7544, en las ZDFT de 8385 y en las ZDFD de 2161.

TGF-β1						
BASAL				FINAL		INCREMENTO TGF-β1
	Media	D. Est		Media	D. Est	
ZF	(5)	2848	436	2900	620	26 pg/24h
ZDFT	(8)	5845	674	8385	1280	2540 pg/24h
ZDFC	(12)	3750	520	7544	1065	3794 pg/24h
ZDFD	(8)	878	661	2161	390	1283pg/24h

Tabla 14: Comparativa TGF-B en orina basal (semana 10) y final (semana 19), utilizando medias, y desviación estándar. Incremento medio

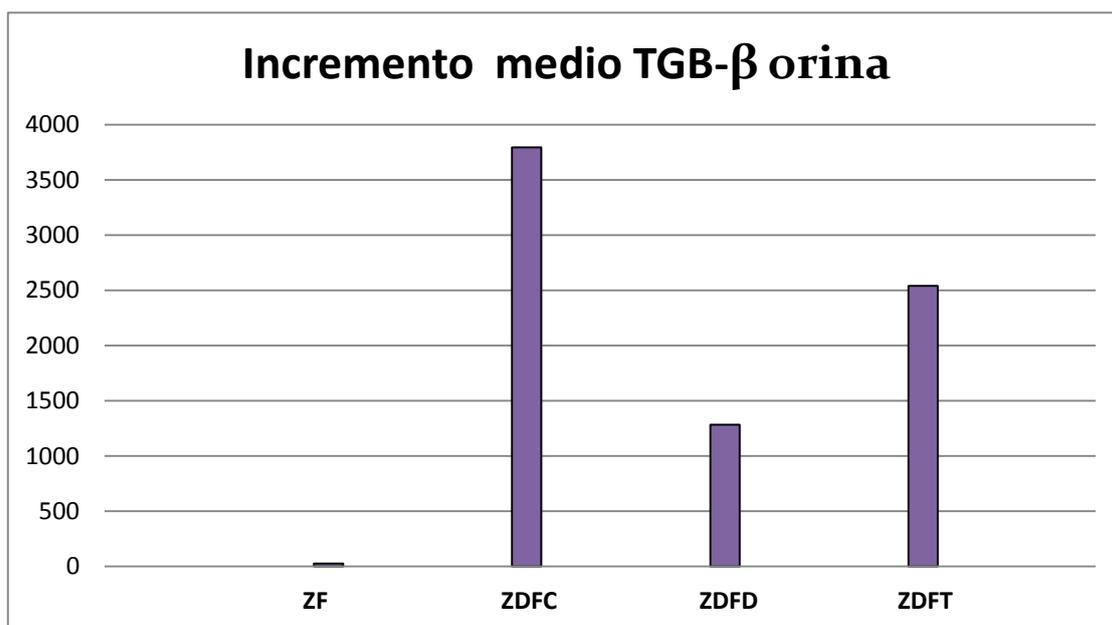


Figura 26: Grafico comparativo incremento medio TGF-B en orina

Respecto al VEGF; En el **estudio basal** se encontraron valores medios en las ratas Zucker de 548, en las ZDFC de 1787, en las ZDFT de 1913y en las ZDFD de 622. En el **estudio final** las ratas Zucker presentaron un valor medio de 560, en las ZDFC de 3691, en las ZDFT de 3133 y en las ZDFD de 2306.

VEGF						
BASAL				FINAL		INCREMENTO VEGF
		Media	D. Est	Media	D. Est	
ZF	(5)	548	196	560	218	12 pg/24h
ZDFT	(8)	1913	328	3133	450	1220 pg/24h
ZDFC	(12)	1787	260	3691	502	1904 pg/24h
ZDFD	(8)	622	180	2306	216	1684 pg/24h

Tabla 15: Comparativa VEGF en orina basal (semana 10) y final (semana 19), utilizando medias, y desviación estándar. Incremento medio

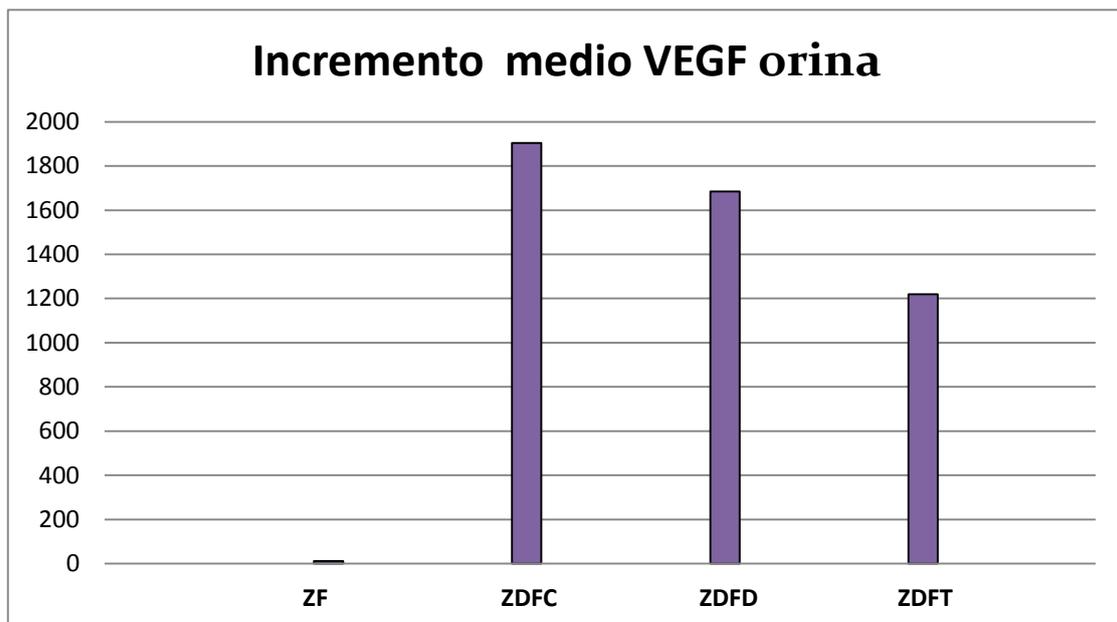


Figura 27: Grafico comparativo incremento medio VEGF en orina

## Resultados significativos

Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles urinarios de TGF- $\beta$  en las ratas Zucker comparándolo al resto de grupos con una  $p < 0,001$ . Si comparamos los niveles de TGF- $\beta$  entre el grupo tratado con Dieta y el de Telmisartan también hay diferencia con una  $p = 0,01$ . Entre el grupo control (ad libitum) y el grupo de ZDFT también encontramos diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,04$ )

Respecto al VEGF, igualmente se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las ratas Zucker y el resto de grupos ( $p < 0,001$ ). Los niveles urinarios de VEGF fueron mayores en el grupo control (ZDFC) respecto al grupo tratado con dieta y Telmisartan ( $p = 0,035$  y  $p < 0,01$  respectivamente). Cuando comparamos los niveles entre los grupos de ZDFT y ZDFD encontramos un resultado significativo con  $p = 0,01$ , en este caso a favor del grupo de Telmisartan.

## RESULTADOS EN MUESTRAS DE TEJIDO RENAL

### EXPRESIÓN DE RNAm TGF- $\beta$ y VEGF

El RNAm TGF- $\beta$  and VEGF se cuantificó por real-time PCR y los resultados se expresaron como threshold cycle (ct) o ciclo umbral.

	TGF- $\beta$ 1	VEGF
	FINAL	FINAL
ZF (5)	0,62 $\pm$ 0,4	0,62 $\pm$ 0,4
ZDFC(12)	1,50 $\pm$ 0,3	1,3 $\pm$ 0,6
ZDFT(8)	0,69 $\pm$ 0,9	1,22 $\pm$ 0,3
ZDFD(8)	0,57 $\pm$ 0,5	1,26 $\pm$ 0,2

Tabla 16: Tabla comparativa resultados finales de TGF-B Y VEGF al final del estudio(semana 19)

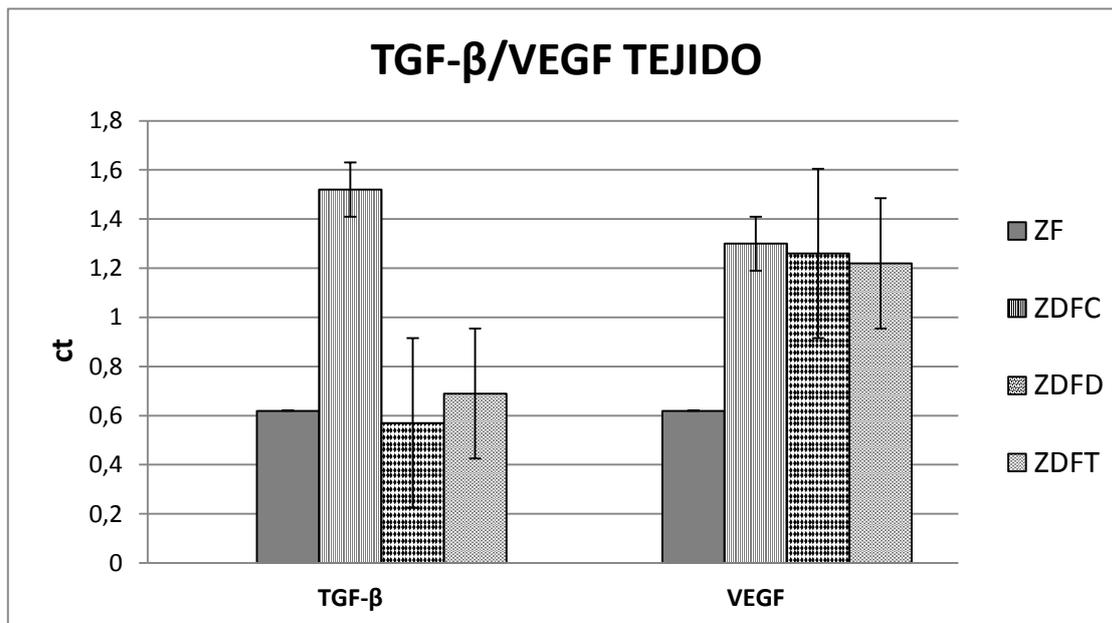


Figura 28: Gráfico comparativo TGB y VEGF en las poblaciones al final del estudio ZF(Zucker fatty), ZDFC(Zucker diabetic and fatty control/sin intervención), ZDFD(Zucker diabetic and fatty tratadas con dieta), ZDFT(Zucker diabetic and fatty tratadas con telmisartan)

### Resultados significativos

Los resultados fueron cercanos a la significación ( $p=0,09$ ) cuando comparamos la expresión de TGF- $\beta$ 1 RNAm entre el grupo control (ZDFC) y el grupo tratado con dieta (ZDFD); TGF- $\beta$ 1 RNAm en las ratas tratadas con Telmisartan respecto al grupo control no obtuvo resultados significativos ( $p=0,20$ ), pero los resultados fueron similares al del grupo de las ZD.

Los resultados no fueron significativos respecto al VEGF.

## **6. DISCUSIÓN**



La diabetes y la obesidad son patologías de enorme impacto en nuestra sociedad; alcanzando proporciones epidémicas tanto en los países desarrollados como en vías de este. Según los registros de USA, la DM afecta a más de 18 millones de pacientes y en España a más de 2 millones<sup>2</sup>.

Estos pacientes debido a sus elevadas complicaciones cardiovasculares suponen un elevado coste para nuestra sociedad tanto en términos económicos como su elevado coste social y de deterioro de su calidad de vida<sup>178</sup>. En términos económicos la DM cuesta a la sociedad en España alrededor de 2400 millones de euros, lo que representa alrededor del 7% del gasto anual de la seguridad social<sup>3</sup>.

La DM tipo 2, forma más común de DM, es uno de los principales factores de riesgo cardiovascular en la población, además de ser un predictor de mala evolución y mortalidad en pacientes con enfermedad cardiovascular ya establecida.

Por ello es de vital importancia detectar precozmente a esta población susceptible de desarrollar la enfermedad, entrando aquí el concepto de prediabetes. Según la OMS podemos clasificar la prediabetes en: 1. Glucemia basal alterada; 2. Alteración de la tolerancia a la glucosa. Diversos estudios han descrito que padecerla duplica el riesgo de muerte por ECV, como lo demostró el estudio de Whitehall en el cual, 18 403 hombres con edades comprendidas entre los 40 y 64 años fueron examinados para valorar la mortalidad por Enfermedad Coronaria en relación a la glucemia 2 horas después de una carga de 50 gr de glucosa oral, la mortalidad fue aproximadamente del doble en el grupo de los que padecían intolerancia definida como una glucemia por encima del percentil 95 ( $\geq 96$  mg/dl). Una relación dosis respuesta entre Intolerancia a la glucosa y la incidencia de Mortalidad por Enfermedad de arteria coronaria y mortalidad cardiovascular fue también encontrada durante los 23 años de seguimiento en el Honolulu Heart Program<sup>179</sup>.

Estos importantes hallazgos fueron confirmados por Coutinho y Col. en un meta-análisis de 95,783 sujetos seguidos durante 12 años. Comparada con una glucosa en ayunas de 75 mg/dl, un valor de 110 mg/dl estuvo asociado con un riesgo relativo

de eventos cardiovasculares de 1.33 (95% IC 1.06-1.67); y una glucosa a las 2H de carga oral de 140 mg/dl, estuvo asociado con un riesgo relativo de eventos cardiovasculares de 1.58 (95% IC: 1.19-2.10)<sup>180</sup>.

Las intervenciones poblacionales con estilo de vida favorables (dieta y actividad física, principalmente) muestran que se puede alterar la progresión de prediabetes a DM2, como quedó claramente demostrado en el The Finnish Diabetes Prevention Study (DPS), en donde ninguno de los individuos de alto riesgo con tolerancia alterada a la glucosa desarrollaron DM durante el período de prueba inicial si alcanzaban 4 o 5 de 5 objetivos de estilo de vida predefinidos. Estos objetivos eran: pérdida peso > 5%, ingesta de energía grasa < 30%, ingesta de grasas saturadas < 10%, aumento de fibra dietaria a  $\geq 15$  g/1000 kcal y aumento de actividad física al menos 4 h/semanales<sup>181</sup>.

La nefropatía diabética (ND) es la principal causa de enfermedad renal crónica terminal (ERCT) en nuestro medio, exacerbada en muchas ocasiones por la obesidad<sup>182</sup>. La MAU es un signo precoz de que la barrera de filtrado funciona mal y será a su vez un elemento lesivo para el intersticio y túbulo renal. La MAU será un signo de lesión incipiente, existiendo una perfecta correlación entre esta lesión y los eventos CV, mortalidad CV y mortalidad general<sup>183, 184</sup>.

A nivel celular los tres principales procesos responsables de la ND incluyen:

1. Cambios hemodinámicos intraglomerulares: hiperfiltración, hiperperfusión
2. Alteraciones metabólicas incluyendo hiperglucemia y,
3. Activación de factores de crecimiento: TGF- $\beta$ , VEGF; Estos son procesos interdependientes que crean cambios patológicos.

La obesidad, como ocurre con la DM, se está convirtiendo igualmente en una verdadera epidemia. Estudios experimentales han demostrado cambios renales en los pacientes obesos consistentes en hiperfiltración e hiperperfusión, mismos cambios encontrados tempranamente en el desarrollo de nefropatía diabética<sup>185</sup>.

Maddox y Col. demostraron que perros alimentados con una dieta rica en grasa durante 5-6 semanas desarrollaban hiperfiltración glomerular; Así mismo Henegar y Col. demostraban también un aumento del Filtrado glomerular en ratas Zucker obesas, estos cambios eran reversibles, al menos en las ratas Zucker obesas en las cuales la restricción de alimento estaba asociada con disminución de la hiperfiltración glomerular debido posiblemente a disminución en la ingesta de proteínas y pérdida de peso<sup>186</sup>.

Estas observaciones de modelos experimentales han sido confirmadas también en humanos, Chagnac y Col. han mostrado que los individuos obesos (IMC  $\geq 35$  Kg/m<sup>2</sup>) muestran un Filtrado Glomerular alrededor de un 50% mayor cuando se compara con individuos de peso normal (IMC 22 Kg/m<sup>2</sup>)<sup>187</sup>.

Una revisión sistemática por Afshinnia et al de 522 sujetos demostraron la asociación de la pérdida de peso con descenso de proteinuria y MAU. Restricción dieta, ejercicio, fármacos y cirugía bariátrica se incluyeron como medidas para llevar a cabo esta pérdida de peso. Cada kilo perdido estaba asociado a un descenso de 110 mg en la proteinuria, independientemente de la reducción en la tensión arterial<sup>188</sup>.

La MAU (producida por la ND, la Obesidad o ambas) se reconoce actualmente cómo la expresión renal de una disfunción endotelial sistémica que afecta todos los lechos vasculares incluyendo, cerebro, ojos, corazón y riñón.

Perkovic V y Col. realizaron un metaanálisis que incluía un total de 26 estudios de cohortes con 169.949 individuos y 7117 eventos coronarios (27% fatal), tras tener en cuenta los factores de riesgo cardiovascular tradicionales, había una relación dosis-respuesta entre la albuminuria y el riesgo de enfermedad coronaria<sup>117</sup>. Comparados con los individuos sin albuminuria, aquellos con Macroalbuminuria tenían doble riesgo de Enfermedad coronaria, y la presencia de MAU se asociaba con un riesgo casi el 50% más alto. El aumento del RCV aparecía en todos los subgrupos, incluyendo personas con y sin HTA, DM y disminución de la tasa de filtración glomerular.

Análisis Post hoc en diferentes grupos poblacionales han sugerido que además de la relación con Enfermedad Renal, la MAU es un importante factor de riesgo y mortalidad cardiovascular en pacientes con y sin DM y/o HTA; Entre casi 9000 participantes de alto riesgo para eventos cardiovasculares en el estudio HOPE, la presencia de MAU estuvo asociada con un aumento del riesgo relativo del punto final primario (Infarto de Miocardio, ACV o muerte cardiovascular) en aquellos con y sin DM (1.97 y 1.61 respectivamente)<sup>189</sup>. El riesgo de un evento adverso cardiovascular aumentaba progresivamente con aumento en los niveles absolutos de MAU.

Pero no solo la MAU se relaciona con un aumento en el Riesgo y Mortalidad cardiovascular, valores en el rango alto de la normalidad también se han relacionado con este aumento. En el Third Copenhagen Heart Study, 2726 pacientes se les realizó medición de albúmina en orina y se les realizó seguimiento durante un promedio de 2.6 años para el desarrollo de Enfermedad Coronaria o Muerte. Pacientes en el cuartil superior de EUA (>4.8 mcg/min [6.9 mg/day]) tenían un riesgo relativo ajustado de muerte de 1.9 y Enfermedad Coronaria de 22.0. Entre los participantes hipertensos, la incidencia acumulada de Enfermedad cardiaca (11 Vs 5%) y Mortalidad (28 Vs 13%) eran significativamente mayores con una EUA  $\geq$ 5 mcg/min (>7.2 mg/day) comparado con valores por debajo de este<sup>190</sup>.

Los fármacos que han demostrado tener efectos antiproteinúricos importantes han sido fármacos antihipertensivos, sobre todo los del grupo de los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAs) y también los antagonistas de los receptores AT-1 de la angiotensina-II (ARAs)<sup>133,135</sup>. Se ha observado en pacientes con diabetes mellitus tipo I y tipo 2 un efecto positivo de los IECAs y ARAs en la disminución de la proteinuria y retraso en el deterioro de la función renal. De todos los ARAs, el Telmisartan ha demostrado además que a su efecto antihipertensivo y antiproteinúrico, en definitiva renoprotector hay que añadirle un efecto PPAR- $\gamma$ <sup>177</sup>, (peroxisome proliferator-activated gamma) es decir, semejante al grupo terapéutico de los antidiabéticos orales de este grupo, y esto es debido a su parecido estructural con las glitazonas, siendo este efecto “no de clase” sino exclusivo de esta molécula. Estudios recientes demuestran que la activación de este receptor tiene un papel

importante en la expresión completa del síndrome metabólico. Por ello en nuestro estudio hemos utilizado el Telmisartan como fármaco para comprobar los cambios que se podrían producir a nivel renal de forma precoz como nefroprotector.

Por otra parte, el bloqueo de la angiotensina II inhibe la síntesis de factores de crecimiento que promueven la fibrosis y mecanismos fisiopatológicos envueltos en la progresión de la disfunción renal. TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor beta-1) juega un papel importante en la patogénesis de la ND por la inducción y mantenimiento de la fibrosis intersticial<sup>132</sup>. Es la sustancia con mayor capacidad fibrogénica del organismo y está implicada en los procesos reparativos pero una estimulación constante como sucede en la hipertensión arterial, la diabetes o las dislipemias produce una acumulación de fibras de colágeno que conducen a la fibrosis de los tejidos. TGF- $\beta$ 1 estimula otros factores de crecimiento como el VEGF (vascular endotelial growth factor) un potente factor angiogénico que actúa sobre la integridad, permeabilidad y viabilidad de las membranas endoteliales, contribuyendo a la angiogénesis e hiperfiltración inicial y microalbuminuria<sup>191, 195</sup>

***Nuestro estudio muestra un modelo muy precoz de lesión del endotelio vascular/renal por lo que no podemos ver la evolución más allá de las 20 semanas de vida de las ratas que era cuando se sacrificaban, pero si que podemos ver tanto la tendencia en ciertos parámetros (peso, glucemia, función renal, MAU, TGB Y VEGF), como asistir al inicio del proceso, el inicio del mecanismo fisiopatogénico a nivel del tejido renal.***

Para el desarrollo de nuestro modelo hemos utilizado ratas Zucker, el modelo animal mejor conocido de obesidad genética. Las ratas afectadas presentan una mutación en el receptor de la leptina y acusan hiperfagia y otras alteraciones semejantes a las que aparecen en el síndrome metabólico humano. Además de resistencia a las acciones metabólicas de la insulina, los animales presentan dislipemia, ligera intolerancia a la glucosa e hiperinsulinemia. Los machos ZDF fa/fa se han usado tradicionalmente como modelo de DM tipo2.

Pasaremos a discutir los diferentes resultados obtenidos desde el modelo experimental para valorar si dichos valores eran los esperados por lo descrito en la literatura o no e intentar explicar el porqué de los mismos

## 1. PESO

Los resultados en este apartado no fueron los esperados a priori, teniendo en cuenta las características de las ratas y las intervenciones realizadas en cada grupo, si tomamos el peso como indicador de obesidad.

La obesidad se está convirtiendo de forma rápida en un problema de salud a nivel mundial. Es un factor extensamente reconocido para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y de varios trastornos metabólicos incluida la diabetes.

La OMS define Sobrepeso y Obesidad en base a la IMC, una medida objetiva basada en el Peso y Talla del paciente que aunque ha resultado útil para la clasificación, también ha creado una serie de inconvenientes respecto a la interpretación en grupos específicos de población (Ancianos, Atletas, Caquexia, etc.).

El IMC tiende a sobrestimar la Obesidad en adultos con un alto grado de masa muscular y no tiene en cuenta la adiposidad regional, esto ha quedado ilustrado por el hecho que la asociación entre IMC y mortalidad es débil en adultos mayores de 65 años comparada con individuos más jóvenes. De hecho un mayor IMC frecuentemente se asocia con disminución en la mortalidad de adultos con enfermedades crónicas como ICC y ERC cuando se comparan con aquellos que presentan un IMC en el rango ideal (18.5-25 kg/m<sup>2</sup>), sin embargo, mayores niveles de grasa abdominal están asociados con mayor mortalidad incluso después de realizar ajustes para la grasa corporal total. La asociación de Obesidad abdominal definida como una circunferencia de 102 cm o mayor en hombres y 88 cm o mayor en mujeres con HTA, DM, e Hiperlipidemia permanece fuerte después de realizar los ajustes para IMC.

En nuestro modelo observamos un aumento progresivo de peso en todos los grupos durante el estudio. Prevalece una mayor ganancia en las ratas no diabéticas, a la inversa, las ratas obesas y diabéticas sobre las que no se había administrado

tratamiento fue el grupo con el menor incremento de peso, sin embargo tuvieron un importante aumento de volumen corporal y masa grasa.

El incremento medio de peso en el grupo de ratas Zucker fue de 187 gr, y este incremento en el grupo control (grupo con modificaciones genéticas para que desarrollaran obesidad y diabetes), sobre los que recordemos no se realizó ningún tipo de intervención (Dieta/Telmisartan) fue de 71 gr.

Este resultado, que las obesas diabéticas con dieta ad limitum ganasen mucho menos peso que las Zucker o incluso que las SD, nos sorprendió, pero por el contrario la diferencia entre sus volúmenes corporales no requiere de estadísticos que las valoren, el volumen de las ZDF era casi del doble y la masa grasa mucho mayor. Ante estos resultados revisamos la literatura y observamos que resultados similares fueron observados por Ohneda y Colaboradores, en un estudio realizado con ratas ZDF, que el grupo con acceso libre a una dieta sin restricciones presentaba una menor ganancia de peso frente al grupo de ratas standard, lo que apunta a una menor ganancia de peso en el grupo diabético sin control. La tendencia parecía mostrar que a las 18 semanas la ganancia de peso medio se igualaba al de las ratas sin restricción de dieta.



Figura 29: Diferencia de volumen corporal entre SD y Zucker

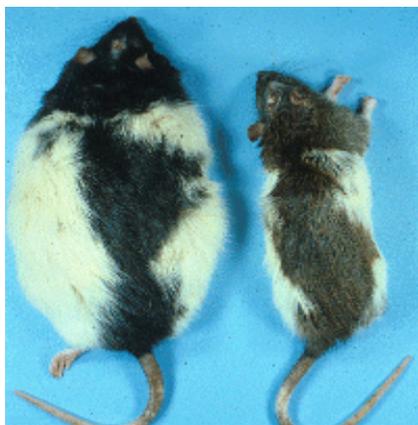


Figura 30: Diferencia de volumen corporal entre Z y ZDF

Corsetti y colaboradores, también observaron datos similares a los hallados en nuestro estudio, en donde el peso en el grupo de ratas con un aumento en el contenido graso de la dieta tenía una tendencia a ser menor<sup>196</sup>. Esta tendencia a un menor incremento de peso con dietas más calóricas, la explicaron por la presencia de un estado catabólico severo.

En nuestro estudio, al ser un modelo muy precoz es posible que lo que observamos al realizar las mediciones en los diferentes momentos que fueron hechas, sea el aumento del componente graso que no se traduce necesariamente en un incremento del peso corporal total, al pesar la grasa mucho menos que el músculo, ser ratas más inactivas y con tendencia al sedentarismo.

## 2. GLUCEMIA

Clark y colaboradores fueron los primeros en obtener una línea de ratas diabéticas no insulino dependientes a partir de una colonia de ratas Zucker obesas en 1980 en la Universidad de Indiana. La rata Zucker obesa (fa/fa) se debe a un gen autosómico recesivo, y se caracteriza por tener hiperinsulinismo con euglucemia.

La hiperglucemia de las ZDF fa/fa (no las cepas salvajes) se inicia sobre las 7 semanas de vida, y son completamente diabéticas entre la 10 y la 12 semana a medida que los niveles de insulina descienden.

Ohneda y colaboradores estudiaron el impacto que tenía la dieta no controlada en el desarrollo de diabetes en animales predispuestos, ZDF fa/fa, frente a delgados. Observaron que, las ZDF controles desarrollaban hiperglucemia, poliuria y glucosuria a las 8 semanas de edad, mientras que el grupo de ratas en tratamiento dietético se mantenían euglucémicas durante los 3 meses de seguimiento<sup>197</sup>. Así, en las ratas control la estimulación de secreción de insulina era nula a las 12 semanas de edad y la cantidad de células beta pancreáticas GLUT-2 positivas había descendido un 30%. Por el contrario la restricción dietética durante 3 meses previno la pérdida de secreción de insulina estimulada por glucosa y la reducción de células beta pancreáticas GLUT-positivas. Concluyen los autores, que en las ratas ZDF, la incompetencia de las células beta y su reducción en número coinciden con la aparición de la hiperglucemia, y que las alteraciones metabólicas descritas, en su caso, ocurrían solo cuando la ingesta

calórica es excesiva (a pesar de ser un modelo de obesidad genética con tendencia a la diabetes).

Brown y colaboradores estudiaron el efecto del tratamiento con diferentes agonistas PPAR $\gamma$  (el compuesto GW1929 –agonista selectivo PPAR $\gamma$  - y una tiazolidinediona) sobre varios parámetros metabólicos (glucemia y hemoglobina glicosilada, ácidos grasos, triglicéridos, etc.), la sensibilidad a la acción de la insulina y sobre la estructura pancreática en ratas ZDF<sup>198</sup>. EL agonista selectivo se mostró más potente que la tiazolidinediona. La administración de GW1929 durante 14 días consiguió un descenso significativo de la glucosa plasmática en ayunas en todos aquellos animales que recibían la dosis de 5 mg/Kg, en el 75% de los que recibían 1 mg/Kg, y en el 37.5% de los que recibían dosis de 0.5 mg/Kg. También la hemoglobina glicosilada HbA1 descendía significativamente comparándola con el grupo vehiculo control.

Nosotros utilizamos el Telmisartan, un ARA2, pero que como hemos explicado tiene acción PPAR $\gamma$ . En el estudio de Castoldi usaron otro agonista como el Losartan +/- *compound 21* para la prevención de nefropatía diabética en ratas ZDF, pero no vieron resultados ni descenso en los niveles de glucosa en sangre de estas ratas respecto a las no tratadas<sup>199</sup>. Muchas líneas de estudios con los antidiabéticos de reciente aparición, como lo inhibidores de la DPP-4, han realizado trabajos sobre sus efectos en este grupo de ratas sobre niveles de glucosa, proteinuria.

En nuestro estudio observamos lo siguiente, el aumento de glucemia en el grupo SD fue significativamente inferior al grupo Zucker( un incremento de 8 mg/dl frente a 38), entre los grupos ZDFC y ZDFD se encontraron diferencias estadísticamente significativas con un menor incremento de Glucemia en el grupo ZDFD (p=0,000). Llegando a glucemia de 615 mg/dl de media en el grupo control frente a 360 mg/dl en el grupo tratado con dieta. Entre el grupo de ZDFD frente a ZDF también se documentó un menor incremento de glucemia, con p=0,137(615 frente a 478)

Es decir, nuestras ratas ZDF desarrollaron hiperglucemias y diabetes según lo previsto. Los resultados de nuestro estudio están en consonancia con lo descrito en estudios previos, con un menor aumento de glucemia en los grupos no diabéticos quienes no presentaron resistencia a la insulina y una tendencia más que un resultado

estadísticamente significativo explicado posiblemente por la precocidad del modelo en los grupos diabéticos sobre los que se realizó intervención farmacológica y dietética.

Los resultados verdaderamente interesantes sobre la glucemia los aportaron los dos grupos de tratamiento, la dieta aunque no pudo controlar los valores de glucemia los disminuyó drásticamente si tenemos en cuenta los valores absolutos en animales de metabolismo tan acelerado. Esto nos ayuda a reforzar la idea del beneficio y pilar fundamental que sigue siendo la dieta para el control de los pacientes diabéticos. El tratamiento con Telmisartan acercó los resultados de la glucemia al grupo de restricción dietética demostrando que el efecto agonista selectivo PPAR y del Telmisartan sobre la sensibilidad a la acción de la insulina en los tejidos, no es suficiente para controlar la glucemia, pero puede ser casi tan efectivo como una dieta de alta restricción en calorías. Por lo que la combinación de ambas medidas sería una buena alternativa para el control glucémico.

### **3. BUN Y CREATININA**

En estos parámetros no se demostraron diferencias estadísticamente significativas, pero hemos de recordar que se trata de un modelo precoz de lesión vascular/renal, estos resultados eran de esperar teniendo en cuenta que se necesita cierto tiempo de afectación renal e incluso la pérdida de un volumen importante de nefronas funcionantes para producir alteraciones en los niveles sanguíneos de Creatinina y BUN.

La creatinina se deriva del metabolismo de la creatina en el músculo esquelético y en menor porcentaje de la ingesta alimentaria de carne y se usa para estimar el filtrado glomerular; No hay una correlación exacta entre la pérdida de masa renal y la caída en el filtrado glomerular ya que los riñones adaptan la pérdida de algunas nefronas con hiperfiltración y/o aumento en la reabsorción de agua y solutos por parte de las nefronas funcionantes remanentes, por lo que la relación entre creatinina plasmática y el Filtrado glomerular no es lineal. Si a esto añadimos que en los pacientes ancianos la masa muscular y los niveles nutricionales disminuyen, nos

encontramos ante situaciones en las que cifras de creatinina que parecen normales no reflejan el estado real de la función glomerular.



*Cr: 1.3 mg/dL FGC: 90 ml/min*

*Cr: 1.3 mg/dL FGC: 30 ml/min*

Figura 31: Comparación estimación FG según edad y masa muscular

Es importante tener en cuenta que la creatinina solo puede ser usada para estimar el filtrado glomerular en pacientes con función renal estable.

Si nuestro modelo se hubiera retrasado en el tiempo, previsiblemente hubiéramos visto cambios a nivel del BUN y creatinina con un descenso del FG ya que la enfermedad renal crónica es una consecuencia importante en los pacientes obesos, por la estrecha relación entre el depósito de grasa visceral y dos de las principales causas de ERC: hipertensión y diabetes. En otros modelos con rápido aumento de peso se ha observado un incremento en la reabsorción tubular de sodio lo que ha producido una vasodilatación renal compensatoria y aumento del filtrado glomerular<sup>200</sup>. Posteriormente ocurre un descenso progresivo de FG como consecuencia del daño renal y pérdida de nefronas funcionantes. Están envueltos la combinación de cambios a nivel hemodinámico, metabólico e inflamatorio. Las lesiones más típicas observadas en biopsias renales de pacientes obesos son glomeruloesclerosis focal y segmentaria y glomerulomegalia.

## 4. EXCRECION URINARIA DE ALBUMINA

En nuestro estudio se encontró un incremento de la excreción urinaria de albumina en todos los grupos. En el grupo control el aumento fue significativamente mayor que en el grupo tratado con dieta o el de Telmisartan al final del estudio. Resultados similares se obtuvieron en el estudio previamente comentado de Castoldi et al con Losartan +/- compound 21. Todos los grupos de ZDF presentaron un aumento de la EUA. Al final del estudio y comparando el grupo control encontraban diferencias significativas respecto al grupo tratado (disminución de la EUA en modelos precoces)

O'Donnell et al ya habían demostrado previamente en un estudio con Ratas Zucker obesas que la expansión de matriz mesangial y albuminuria precedía al desarrollo de una marcada Glomeruloesclerosis focal. En su estudio la expansión de matriz mesangial era evidente a las 14 semanas de edad en Ratas Zucker Obesas macho, seguida de un rápido aumento en la albuminuria a pesar de tener aclaramiento de inulina y fracción de filtración normal<sup>201</sup>.

En nuestro estudio también se encontró un aumento en la excreción urinaria de albúmina significativo entre el inicio y el final en el grupo Zucker, con diferencias muy significativas en subgrupos como el caso control (de 37 a 298) y en el grupo Dieta (de 19,4 a 130).

Las ZDFT aumentan también la EUA pero significativamente menor al grupo control, lo que nos lleva a plantear el efecto PPAR- $\gamma$  de Telmisartan, como la causa de este menor incremento. Buckingham y Col, observaron que la administración de Rosiglitazona, un fármaco antidiabético con actividad PPAR- $\gamma$  a Ratas Zucker retrasaba la aparición de proteinuria de 3 a 6 meses en el grupo prevención y reducía la tasa de progresión de la misma en ambos grupos prevención y tratamiento, una vez esta se instauraba<sup>202</sup>.

En el estudio de Hempe et al también se utilizaron ratas ZDF para acercarse a un modelo de diabetes y sus complicaciones, utilizando grupos similares a los nuestros; no tratadas, uso de pioglitazona (antidiabético oral) y dieta hipocalórica. Se estudiaron a lo largo de 35 semanas parámetros como la glucosa, FG, EUA... Respecto al grupo tratado con restricción dietética encontraron una EUA menor en este grupo, siendo incluso menor en el grupo tratado con pioglitazona<sup>203</sup>.

También es llamativo que los subgrupos de ZDFT y ZDFD no presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellas al final del estudio lo que podría ser explicado por un efecto comparable entre la dieta y la administración de Telmisartan en lo concerniente a disminución de la excreción urinaria de albúmina, hecho de gran significancia en la práctica clínica si consideramos que estas son medidas que podrían aplicarse al mismo tiempo y conseguir un mejor control sobre la evolución de la Nefropatía en el paciente. No olvidemos que la albuminuria es predictor no sólo de nefropatía sino también de riesgo cardiovascular en pacientes diabéticos y no diabéticos, su reducción está asociada a disminución del riesgo de eventos renales y CV<sup>113</sup>

Respecto a medidas para reducir MAU y progresión de nefropatía, en pacientes con obesidad y microalbuminuria, es interesante hablar de la adiponectina que no hemos podido medir en nuestro estudio, pero que en otros modelos se ha relacionado con la nefropatía inducida por obesidad, se correlaciona inversamente con albuminuria en obesos. En el estudio de Sharma reducir niveles de adiponectina en ratas producía un aumento de la albuminuria<sup>73</sup>. Por lo tanto podíamos hablar de una proteína renoprotectora y habría que investigar hacia fármacos que pudieran aumentar sus niveles.

## **5. FACTORES DE CRECIMIENTO (TGF-beta y VEGF)**

Respecto a los resultados en las muestras urinarias; en nuestro estudio encontramos que los grupos tratados con Telmisartan y dieta tenían niveles urinarios de TGF- $\beta$  Y VEGF significativamente menores. Bondar et al ya mostraron datos similares en estados precoces de nefropatía diabética, pacientes con microalbuminuria tuvieron niveles urinarios significativamente mayores de TGF- $\beta$  que aquellos normoalbuminúricos, incluso el incremento fue mayor en aquellos con macroalbuminuria<sup>204</sup>. También detectaron que existía una correlación positiva entre la excreción de TGF- $\beta$  y la hemoglobina glicada.

Podemos decir que en nuestro estudio encontramos datos similares a los encontrados en la literatura, mejorando el control glucémico de los pacientes, ya sea con dieta o Telmisartan, descienden significativamente los niveles urinarios de TGF- $\beta$  y VEGF, en un estado muy precoz de enfermedad renal, comparando a estos con la población sin intervención.

Se encontraron diferencias significativas, con un incremento medio del TGF- $\beta$  de 3792 en las ratas control frente a 37 en las Zucker. Lo mismo ocurrió con el VEGF que incremento 1900 frente a 12.

Respecto a los datos en muestras tisulares, la expresión de TGF- $\beta$ 1 RNAm en las ratas tratadas con dieta fue menor que en el resto de grupos, encontrando también un descenso de los niveles en el grupo tratado con Telmisartan, que aunque no fueron significativos, estaban entre los obtenidos por el grupo de la dieta y los controles.

Los niveles de TGF- $\beta$ 1 RNAm fueron mucho menores en los grupos ZD, ZDFD, ZDFT respecto al grupo de ratas diabéticas alimentadas ad libitum (ZDFC), y aunque no hubo diferencias significativas entre ninguno de ellos, llama la atención los niveles incluso más bajos en el grupo tratado con dieta que en las ratas no diabéticas.

Respecto al VEGF RNAm, los niveles fueron mayores en todos los grupos respecto a las Zucker, siendo la tendencia un poco menor en el grupo de Telmisartan, seguido del de dieta. Esto nos muestra como los niveles de VEGF son mayores en las diabéticas que en las no diabéticas, siendo este un factor independiente y estimulador precoz en los modelos diabéticos per se. Múltiples estudios sobre el VEGF en la retinopatía diabética se han realizado, las células retinianas sintetizan este factor, mediado por la hipoxia, estimulando la formación de neovasos y contribuyendo a un aumento de la permeabilidad y formación de edema.<sup>205, 206</sup>

Como sabemos, el TGF- $\beta$  va aumentando de forma precoz y en el VEGF también empezamos a ver ese aumento, si el estudio se hubiera ampliado más de las 19 semanas que se establecieron, quizás podríamos ver como VEGF seguía aumentando influenciado además de por la diabetes per se, por el efecto del TGF- $\beta$ , mientras TGF- $\beta$  disminuía, siguiendo su evolución esperada.

El estudio realizado en este modelo experimental refleja que el VEGF y TGF- $\beta$  pueden ser importantes factores en el desarrollo de los cambios glomerulares en un modelo muy precoz de daño renal cuando aparece MAU, antes incluso de cambios en la creatinina. Se muestran importantes efectos beneficiosos de ambas intervenciones, tanto dieta como Telmisartan.

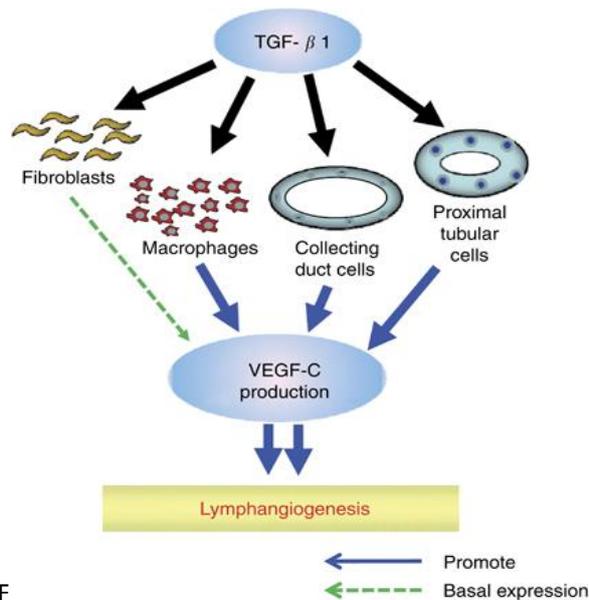


Figura 32: El TGF- $\beta$  estimula el VEGF

Estudios han intentado analizar si con bloqueo del VEGF se puede actuar sobre estados precoces, pero los resultados, pese que a priori parecían alentadores, no han sido lo esperado. Bieke et al usaron ZDF hembras que trataron con anti VEGF, obtuvieron resultados en la prevención de la hipertrofia glomerular pero no se afectó EUA o aclaramiento de creatinina. Como explica el artículo, quizás aparecen estos datos porque en el mecanismo de la albuminuria están implicados múltiples factores y mediadores y no sólo el VEGF<sup>207</sup>.

Podíamos pensar que sea porque actuar sobre el VEGF, es llegar demasiado tarde y podemos adelantarnos aun más a la fisiopatología de la microalbuminuria y nefropatía, como vemos en nuestro modelo, trabajando sobre el bloqueo del TGF- $\beta$  que en estados muy precoces aparece también como un factor aumentado y que se ve influenciado por la acción de la dieta y Telmisartan a dosis bajas.

Hay artículos que hablarían a favor de estas medidas; El bloqueo de la actividad del TGF- $\beta$  con anticuerpos neutralizantes y/o decorina, un secuestrador de su forma activa, ha demostrado una reducción de la fibrosis en modelos experimentales de daño renal. Sin embargo, el ratón deficiente en TGF- $\beta$  es letal, desarrollando un defecto en la reparación de herida, con problemas en los depósitos de colágeno, y presenta un fenotipo hiperinflamatorio<sup>208</sup>. Aunque también se han visto efectos beneficiosos en la ND experimental con el uso de anticuerpos neutralizantes anti-TGF1<sup>209</sup>

## **7. CONCLUSIONES**



1. La obesidad y la diabetes son causa de enfermedad vascular y renal, potenciándose ambas en el desarrollo de la misma, teniendo la diabetes mayor peso en la progresión del daño.
2. Las ratas ZDF fa/fa desarrollaron valores superiores de glucemia tal y como se esperaba. El grupo tratado con dieta disminuyó de forma significativa los niveles de glucemia, aunque el grupo de Telmisartan también lo hizo (por su efecto antidiabético/PPAR $\gamma$  añadido).
3. El primer signo de daño renal, y por ende, de alteración cardiovascular es la microalbuminuria, que aparece de forma precoz, a partir de la semana 10 en el grupo de ratas obesas y diabéticas.  
No hay cambios significativos respecto a parámetros de función renal como el BUN y la creatinina, ya que se trata de un modelo precoz.
4. No se encontraron cambios significativos en el peso en ninguno de los grupos, dada la precocidad del modelo, pero si se advirtió la diferencia de volumen corporal (masa grasa) entre los grupos.
5. El TGF- $\beta$  aumenta sus niveles urinarios y de expresión tisular en el grupo de ratas diabéticas (ZDF) fa/fa respecto a las obesas (Zucker) de forma precoz, influyendo tanto la dieta como el fármaco en estos parámetros.
6. El VEGF también aumenta sus niveles urinarios en el grupo de ratas diabéticas de forma precoz. Respecto a su expresión tisular, encontramos diferencias entre las ratas diabéticas y no diabéticas, no viéndose influenciado a priori, en este modelo precoz, por la producción de TGF-  $\beta$  ni las medidas realizadas.

7. La dieta hipocalórica aporta mejores resultados en el control glucémico, y la disminución de niveles urinarios y tisulares de TGF- $\beta$ . Mientras que el Telmisartan disminuyó en mayor medida la microalbuminuria y los niveles urinarios de VEGF.

Desconocemos si el tratamiento combinado con ambas medidas (dieta y Telmisartan) llevaría a conseguir cifras normales de MAU y glucemia en un modelo precoz.

8. TGF- $\beta$  y VEGF se establecen como importantes factores en el desarrollo de cambios glomerulares en un modelo precoz de daño renal, cuando microalbuminuria aparece y la creatinina todavía permanece normal.

## CONCLUSION FINAL

Tanto la dieta hipocalórica como el Telmisartan han demostrado, que en un modelo precoz de obesidad y diabetes, disminuyen los valores de MAU, glucemia y parámetros de lesión tisular, pudiendo tener ambas medidas, un papel fundamental para la prevención de daño renal y progresión de la enfermedad. Dada la falta de cumplimentación y de seguimiento de las medidas higiénico-dietéticas, parece recomendable el inicio precoz del tratamiento con este tipo de fármacos de forma preventiva.



## **8. BIBLIOGRAFIA**



1. American Diabetes Association. Standard of medical care in diabetes-2011. *Diabetes care* 2011; 34 (suppl 1): s17-s61
2. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global Prevalence of Diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004;27:1047-1053
3. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas 4th ed.* 2009. Brussels, International Diabetes federation 2009.
4. Virally M, Blicklé J-F, Girard J, Halimi S, Simon D, Guillausseau P-J. Type 2 diabetes mellitus: epidemiology, pathophysiology, unmet needs and therapeutical perspectives. *Diabetes and Metabolism* 2007; 33:231-244.
5. Tuomilehto J, Lindstrom J, Ericsson JG, Valle TT, Hamalainen H, Ilianne-Parikka P. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Eng J Med.* 2001; 344:1343-1350.
6. The Diabetes Prevention Program Research Group: Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 346: 393-403, 2002
7. Alberti KGMM. The diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Voice, Bulletin of the International Diabetes Federation* 1999; 44:35-41.
8. Harris M, Zimmet P. Classification of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. In Alberti K, Zimmet P, Defronzo R, editors. *International Textbook of Diabetes Mellitus. Second Edition.* Chichester: John Wiley and Sons Ltd; 1997. p9-23.
9. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997; 20:1183-97.
10. Genuth S, Alberti KG, Bennett P, Buse J, Defronzo R, Kahn R, Kitzmiller J, Knowler WC, Lebovitz H, Lernmark A, Nathan D, Palmer J, Rizza R, Saudek C, Shaw J, Steffes M, Stern M, Tuomilehto J, Zimmet P, Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus 2, the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003; 26:3160-67.
11. Scaglione R, Ganguzza A, Corrao S, Parrinello G, Merlino G, Dichiara MA, et al: Central obesity and hypertension: pathophysiologic role of renal haemodynamics and function. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995; 19:403-409.
12. Eriksson KF, Lindgärde F: Prevention of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus by diet and physical exercise: the 6-year Malmo feasibility study. *Diabetologia* 34: 891-898, 1991.
13. Eriksson J, Tuominen J, Valle T, Sundberg S, Sovijärvi A, Lindholm H, Tuomilehto J, Koivisto V: Aerobic endurance exercise or circuit-type resistance training for individuals with impaired glucose tolerance? *Horm Metab Res* 30: 37-41, 1998.

14. Sarkkinen E, Schwab U, Niskanen L, Hannuksela M, Savolainen M, Kervinen K, Kesäniemi A, Uusitupa MI: The effects of monounsaturated-fat enriched diet and polyunsaturated-fat enriched diet on lipid and glucose metabolism in subjects with impaired glucose tolerance. *Eur J Clin Nutr* 50:592-598, 1996.
15. International Expert Committee. International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 2009; 32:1327-34.
16. Edelman D, Olsen MK, Dudley TK, Harris AC, Oddone EZ. Utility of hemoglobin A1c in predicting diabetes risk. *J Gen Intern Med* 2004; 19:1175-80.
17. Maursetter L, Djamali A. Progression of diabetic nephropathy: mechanisms and new directions in prevention. *Avances en Nefropatía Diabética 2012: Publicaciones Permanyer*.
18. Hallan S, Astor B, Romundstad S, et al. Association of kidney function and albuminuria with cardiovascular mortality in older vs younger individuals: The HUNT II Study. *Arch Intern Med*. 2007;167:2490-6
19. Van der Velde M, Matsushita K, Coresh J, et al. Lower estimated glomerular filtration rate and higher albuminuria are associated with all-cause and cardiovascular mortality. A collaborative meta-analysis of high-risk population cohorts. *Kidney Int* 2011;79:1341-52
20. Remuzzi G, Schieppati A, Ruggenenti P. Clinical practice. Nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 1993; 329:977-86
21. Grundy SM, Benjamin MD, Burke G, Chait A, Eckel R, et al. Diabetes and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation* 1999; 100:1134-46
22. Carrol MF, Temte jl, Proteinuria in adults: a diagnostic approach. *Am Fam Physician* 2000; 62: 1333-1340.
23. Bergon E, Granados R, Fernandez-Segoviano P et al. Classification of renal proteinuria: a simple algoritm. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40: 1143-1150.
24. Asanuma K, Mundel P. The role of podocytes in glomerular pathobiology. *Clin Exp Nephrol* 2003; 7 (4): 225-9.
25. Farquhar MG. The glomerular basement membrane: not gone, just forgotten. *J Clin Invest* 2006; 116: 2090-2093.
26. Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev*. 2003; 83(1): 253-307.
27. Faul C, Asanuma K, Yanagida-Asanuma E et al. Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol* 2007; 17: 428-437.

28. Mundel P, Kriz W. Structure and function of podocytes: an update. *Anat Embryol (Berl)* 1995; 192: 385-397.
29. Asanuma K, Mundel P. The role of podocytes in glomerular pathobiology. *Clin Exp Nephrol*. 2003; 7(4): 255-9.
30. Dronavalli S, Duka I, Bakris GL. The pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2008; 4: 444-52.
31. Ziyadeh FN, Wolf G. Pathogenesis of the podocytopathy and proteinuria in diabetic glomerulopathy. *Curr Diabetes Rev* 2008; 4(1): 39-45
32. Floege J, Johnson RJ, Feehally J. *Comprehensive clinical nephrology*, 4<sup>th</sup> edn. Saunders/Elsevier: Philadelphia, PA, 2010.
33. Stitt-Cavanagh E, MacLeod L, Kennedy C. The podocyte in diabetic kidney disease. *Scientific World J*. 2009; 9: 1127-39.
34. Stieger N, Worthmann K, Schiffer M. The role of metabolic and haemodynamic factors in podocyte injury in diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2011; 27 (3): 207-15.
35. Kanwar YS, Wada J; Sun L, et al. Diabetic nephropathy: mechanism of renal disease progression. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2008; 233 (1): 4-11.
36. Pavenstadt H. Roles of the podocyte in glomerular function. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000; 278 (2): F173-9.
37. Wolf G, Chen S, Ziyadeh FN. From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease: podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2005; 54(6):1626-34.
38. Li Y, Kang YS, Dai C, Kiss LP, Wen X, Liu Y. Epithelial-to-mesenchymal transition is a potential pathway leading to podocyte dysfunction and proteinuria. *Am J Pathol*. 2008; 172(2):299-308.
39. Nishikawa T, Edelstein D, Brownlee M. The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney Int Suppl*. 2000; 77: S26-30.
40. Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*. 1998; 47: 859-66.
41. Schlöndorff D, Banas B. The mesangial cell revisited: no cell is an island. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 1179-1187.
42. Schiffer M, Bitzer M, Roberts IS, et al. Apoptosis in podocytes induced by TGF-beta and Smad7. *J Clin Invest*. 2001; 108(6):807-16.
43. Moorthy AV. *Pathophysiology of kidney disease and hypertension*. Saunders/Elsevier: Philadelphia, PA, 2009.

44. Ravera M, Re M, Deferrari L, et al. Importance of blood pressure control in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17: S98-103.
45. Jennette JC, Heptinstall RH, Ovid Technologies Inc.: Heptinstall's pathology of the kidney. In, 6<sup>th</sup> ed, Philadelphia, PA, Lippincot Williams & Wilkins, 2007.
46. Schrijvers BF, Flyvbjerg A, De Vriese AS. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal pathophysiology. *Kidney Int*. 2004; 65 (6): 2003-17.
47. Chen S, Kasama Y, Lee JS, Jim B, Marin M, Ziyadeh FN. Podocyte-derived vascular endothelial growth factor mediates the stimulation of alpha3 (IV) collagen production by transforming growth factor-beta 1 in mouse podocytes. *Diabetes*. 2004;53 (11):2939-49.
48. Liebau MC, Lang D, Bohm J, et al. Functional expression of the renin-angiotensin system in human podocytes. *Am J physiol Renal Physiol*. 2006; 290(3):F710-9.
49. Velez JC, Bland AM, Arthur JM, Raymond JR, Janech MG. Characterization of renin-angiotensin system enzyme activities in cultured mouse podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007; 293(1):F398-407.
50. Macconi D, Abbate M, Morigi M, et al. Permselective dysfunction of podocyte-podocyte contact upon angiotensin II unravels the molecular target for renoprotective intervention. *Am J Pathol*. 2006; 168(4):1073-85.
51. Ding G, Reddy K, Kapasi AA, et al. Angiotensin II induces apoptosis in rat glomerular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002; 283(1):F173-80.
52. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser* 2000; 894: I-xii:1-253.
53. Praga M, Morales E. Obesity, proteinuria and progression of renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 15:481-486.
54. Pi-Sunyer X. The medical risks of obesity. *Postgrad Med* 2009; 121:21-33.
55. Rutkowski P, Klasen A, Sebekova K, et al.: Renal disease in obesity. The need for greater attention. *J Ren Nutr* 2006, 16:216-233.
56. Haslam D, James P. Obesity. *Lancet* 2005; 366:1197-1209.
57. Obesity and the Metabolic Syndrome in Developing Countries. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93:s9-s30.
58. Bibbins-Domingo K, Coxson P, Pletcher MJ, Lightwood J, Goldman L. Adolescent overweight and future adult coronary heart disease. *N Eng J Med* 2007; 357:2371-2379.
59. Estimates for overweight and obesity in Europe. International Association for the Study of Obesity, IASO infobase. July 2008.

60. Ogden C, Carroll M, Curtin L. Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. *JAMA* 2006; 295(13):1549-1555.
61. Chen J, Munther P, Hamm LL, Jones DW, Batuman V, Fonseca V et al. The metabolic syndrome and chronic kidney disease in U.S. adults. *Ann Intern Med* 2004; 140: 167-74.
62. Kurella M, Lo JC, Chertow GM. Metabolic syndrome and the risk for chronic kidney disease among nondiabetic adults. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 2134-40.
63. Ejerblad E, Fored CM, Lindblad P, Fryzek J, McLaughlin JK, Nyren O. Obesity and risk for chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 1695-1702.
64. Iseki K, Ikemiya Y, Kinjok K, Inoue T, Iseki C, Takishita S. Body mass index and the risk of development of end-stage renal disease in a screened cohort. *Kidney Int* 2004; 65: 1870-6.
65. de Zeeuw D, Parving H-H, Henning RH. Microalbuminuria as an early marker for cardiovascular disease. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 2100–2105.
66. Fox CS, Larson MG, Leip EP, Culleton B, Wilson PWF, Levy D. Prediction of new-onset kidney disease in a community-based hospital. *J Am Med Assoc* 2004; 291:844-50.
67. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2548–2556.
68. Fischer-Posovszky P, Wabitsch M, Hochberg Z. Endocrinology of adipose tissue – an update. *Horm Metab Res* 2007; 39: 314–321.
69. Lee MH, Klein RL, El-Shewy HM et al. The adiponectin receptors AdipoR1 and AdipoR2 activate ERK1/2 through a Src/Ras-dependent pathway and stimulate cell growth. *Biochemistry* 2008; 47: 11682–11692.
70. Mao X, Kikani CK, Riojas RA et al. APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function. *Nat Cell Biol* 2006; 8: 516–523.
71. Tsioufis C, Dimitriadis K, Chatzis D et al. Relation of microalbuminuria to adiponectin and augmented C-reactive protein levels in men with essential hypertension. *Am J Cardiol* 2005; 96:946.
72. Yano Y, Hoshida S, Ishikawa J et al. Differential impacts of adiponectin on low-grade albuminuria between obese and non obese persons without diabetes. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2007; 9: 775–782.
73. Sharma K, Ramachandrarao S, Qiu G et al. Adiponectin regulates albuminuria and podocyte function in mice. *J Clin Invest* 2008; 118: 1645–1656.
74. Sharma K. The link between obesity and albuminuria: adiponectin and podocyte dysfunction. *Kidney Int* 2009; 76: 145–148.

75. Henegar JR, Bigler SA, Henegar LK. Functional and structural changes in the kidney in the early stages of Obesity. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 1211-1217.
76. Chagnac A, Weinstein T, Korzets a et al. Glomerular hemodynamics in severe Obesity. *Am J Physiol* 2000; 278: F817-F822.
77. Hall JE. The kidney, hypertension and obesity. *Hypertension* 2003; 41: 625-633.
78. Jiang T, Wang Z, Proctor G et al. Diet-induced obesity in C57BL/6J mice causes increased renal lipid accumulation and glomerulosclerosis via a sterol regulatory element-binding protein 1c-dependent pathway. *J Biol Chem* 2005; 280: 32317–32325.
79. Serradeil-Le Gal C, Raufaste D, Brossard G, Pouzet B, Marty E, Maffrand JP, Le Fur G: Characterization and localization of leptin receptors in the rat kidney. *FEBS Lett* 1997;404: 185–191.
80. Wolf G, Hamann A, Han DC, Helmchen U, Thaiss F, Ziyadeh FN, Stahl RAK: Leptin stimulates proliferation and TGF- $\beta$  expression in renal glomerular endothelial cells: potential role in glomerulosclerosis. *Kidney Int* 1999; 56:860–872.
81. Han DC, Isono M, Chen S, Hong SW, Casaretto A, Wolf G, Ziyadeh FN: Leptin stimulates type I collagen production in db/db mesangial cells: role of increased glucose uptake and TGF- $\beta$  type II receptor expression. *Kidney Int* 2001; 59:1315–1323.
82. Haynes WG, Morgan DA, Walsh SA, Mark SA, Sivitz WI: Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin. *J Clin Invest* 1997; 100:270–278.
83. Praga M. Sinergy of low nephron number and obesity: a new focus on hyperfiltration nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20: 2594-2597.
84. Praga M, Hernandez E, Herrero JC et al. Influence of Obesity on the appearance of proteinuria and renal insufficiency after unilateral nephrectomy. *Kidney Int* 2000; 58: 2111-2118.
85. Gonzalez G, Gutierrez E, Morales E, et al. Factors influencing the progression of renal damage in patients with unilateral renal agenesis and remant kidney. *Kidney Int* 2005; 68: 263-270.
86. Ducloux D, Kazory A, Simula-Faiure D, Chalopin JM. One year posttransplant weight gain is a risk factor for graft loss. *Am J Transplant* 2005; 12: 2922-2928.
87. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis.* 2002; 39(Suppl): 1-266.
88. Ruggenenti P, Perna A, Mosconi L, Pisoni R, Remuzzi G. Urinary protein excretion is the best independent predictor of ESRF in non-diabetic proteinuric chronic nephropathies. Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in Nefrologia (GISEN). *Kidney Int.* 1998; 53:1209-16.

89. Svendsen PA, Oxenball B, Christiansen JS. Microalbuminuria in diabetic patients: a longitudinal study. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)* 1981; 242: 53-54.
90. Viberti GC, Hill RD, Jarret RJ, Argyropoulos A, Mahmud U, Keen H. Microalbuminuria as a predictor of clinical nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1982; I: 1430-1432.
91. Carrol MF, Temte JL. Proteinuria in adults: a diagnostic approach. *Am Fam Physician* 2000; 62: 1333-1340.
92. Orth SR, Ritz E. The nephrotic syndrome. *N Engl J Med* 1998; 338: 1202-1211.
93. Redon J, Williams B. Microalbuminuria in essential hypertension: redefining the threshold. *J Hypertens* 2002; 20:353-5.
94. Hillege HL, Janssen WMT, Bak AAA, Diercks GFH, Grobbee DE, Crijns HJGM, van Gilst WH, de Zeeuw D, de Jong PE for the PREVEND Study group. Microalbuminuria is common, also in a nondiabetic, nonhypertensive population, and an independent indicator of cardiovascular risk factors and cardiovascular morbidity. *J Intern Med* 2001; 249: 519–526.
95. Coresh J, Selvin E, Stevens LA, et al. Prevalence of Chronic Kidney Disease in the United States. *JAMA*. 2007;298(17):2038-2047.
96. Cerasola G, Mulè G, Cottone S, Nardi E, Cusimano P. Hypertension, microalbuminuria and renal dysfunction: the Renal Dysfunction in Hypertension (REDHY) study. *J Nephrol* 2008; 21(3): 368 – 373.
97. Leoncini G, Viazzi F, Rosei EA, Ambrosioni E, Costa FV, Leonetti G, Pessina AL, Trimarco B, Volpe M, deferrari G, PortermoliR. Chronic kidney disease in hypertension under specialist care: the I-DEMAND study. *J Hypertens*. 2010 Jan;28(1):156-62.
98. Guidelines for the management of arterial hypertension. The task force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension and the European Society of Cardiology. *J Hypertens* 2007; 25: 1105-87.
99. Montañes Bermudez R, Gracia García S, Pérez Surribas D, Marrtinez Castelao A, Bover Sanjuan J. Documento de consenso. Recomendaciones sobre la valoración de la proteinuria en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad renal crónica. *Nefrologia* 2011; 31: 1-16.
100. Standards of Medical Care in Diabetes. Clinical Practice Recommendations. American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2010; 1 (Suppl) 11-61
101. Lamb E, Newman D, Price C. Kidney function test. In: Burtis C, Ashwood E, Bruns D. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. Saint Louis: Saunders Elsevier; 2006.

102. Rumley A. Urine dipstick testing: comparison of results obtained by visual reading and with the Bayer CLINITEK 50. *Ann Clin Biochem.* 2000; 37:220-1.
103. Nishi HH, Elin RJ. Three turbidimetric methods for determining total protein compared. *Clin Chem* 1985; 31: 1377-80.
104. Gansevoort RT, Verhave JC, Hillege, et al, for the PREVEND Study Group. The validity of screening based on spot morning urine samples to detect subjects with microalbuminuria in the general population. *Kidney Int Suppl.* 2005 Apr;(94):S28-35.
105. Mountokalakis TD. The renal consequences of hypertension. *Kidney Int* 1997; 51: 1639-1653.
106. Dworkin LD, Ichikawa I, Brenner BM. Hormonal modulation of glomerular function. *Am J Physiol* 1983; 244: F95-F104.
107. Hostetter TH, Olson JL, Rennke HG, Venkatachalam MA, Brenner BM. Hyperfiltration in remnant nephrons: a potential adverse response to renal ablation. *Am J Physiol* 1981; 241: F85-F93.
108. Whaley-Connell AT, Chowdhury NA, Hayden MR, Stump CS, Habibi J, Wiedmeyer CE, et al. Oxidative stress and glomerular filtration barrier injury: Role of the renin-angiotensin system in the Ren 2 transgenic rat. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 291:F1308–F1314.
109. Cottone S, Mulé G, Nardi E, Lorito MC, Guarneni M, Arseno R, Cerasola G. Microalbuminuria and early endothelial activation in essential hypertension. *J Hum Hypertens* 2007; 21:167–172.
110. Gorritz JL, Martinez-Castelao A. Proteinuria: detection and role in native renal disease progression. *Transplant Rev* 2012 Jan; 26(1): 3-13.
111. Eddy AA. Proteinuria and interstitial injury. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:277-81
112. Klausen K, Borch-Johnsen K, Feldt-Rasmussen B, Jensen G, Clausen P, Scharling H, Appleyard M, Jensen JS. Very Low Levels of Microalbuminuria Are Associated With Increased Risk of Coronary Heart Disease and Death Independently of Renal Function, Hypertension, and Diabetes. *Circulation* 2004; 110:32-35.
113. Hillege HL, Fidler V, Diercks GF, van Gilst WH, de Zeeuw D, van Veldhuisen DJ, Gans RO, Janssen WM, Grobbee DE, de Jong PE; Prevention of Renal and Vascular End Stage Disease (PREVEND) Study Group. Urinary Albumin Excretion Predicts Cardiovascular and Noncardiovascular Mortality in General Population *Circulation.* 2002; 106:1777-1782.

114. Ninomiya T, Perkovic V, de Galan BE, Zoungas S, Pillai A, Jardine M, Patel A, Cass A, Neal B, Poulter N, Mogensen CE, Cooper M, Marre M, Williams B, Hamet P, Mancia G, Woodward M, MacMahon S, Chalmers J; ADVANCE Collaborative Group. Albuminuria and Kidney Function Independently Predict Cardiovascular and Renal Outcomes in Diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20:1813-21.
115. Egan BM, Zhao Y, Axon R. US Trends in Prevalence, Awareness, Treatment, and Control of Hypertension, 1988-2008. *JAMA* 2010; 303(20):2043-2050.
116. Arnlöv J, Evans JC, Meigs JB, Wang TJ, Fox CS, Levy D, Benjamin EJ, D'Agostino RB, Vasan RS. Low-Grade Albuminuria and Incidence of Cardiovascular Disease Events in Nondiabetic and Nondyslipidemic Individuals: The Framingham Heart Study. *Circulation* 2005; 112:969-975.
117. Perkovic V, Verdon C, Ninomiya T, Barzi F, Cass A, Patel A, Jardine M, Gallagher M, Turnbull F, Chalmers J, Craig J, Huxley R. The Relationship between Proteinuria and Coronary Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Med.* 2008 Oct 21;5(10):e207.
118. Ninomiya T, Perkovic V, Verdon C, Barzi F, Cass A, Gallagher M, Jardine M, Anderson C, Chalmers J, Craig JC, Huxley R. Proteinuria and stroke: a meta-analysis of cohort studies. *Am J Kidney Dis.* 2009 Mar; 53(3):417-25.
119. Wang W, Koka V, Lan HY. Transforming growth factor-beta and Smad signalling in kidney diseases. *Nephrology (Carlton)*. 2005 Feb; 10(1):48-56.
120. Massagué J, Chen YG. Controlling TGF- $\beta$  signaling. *Genes Dev* 2000 Mar 15; 14(6): 627-644.
121. Tsuchida KI, Cronin B, Sharma K. Novel aspects of transforming growth factor-beta in diabetic kidney disease. *Nephron* 2002; 92:7-21.
122. Reddy AS. *Diabetic Nephropathy: Theory & practise*. East Hanover, NJ: College Book Publishers. L.L.C. 2004; 563.
123. Schnaper HW, Jandeska S, Runyan Ce, Hubchak SC, Basu RK, Curley JF, Smith RD, Hayashida T. TGF- $\beta$  signal transduction in chronic kidney disease. *Front Biosci* 14: 2448-2465.
124. Wolf G. Link between angiotensin II and TGF-beta in the kidney. *Miner Electrolyte Metab* 1998; 24(2-3):174-180.
125. Strutz F, Neilson Eg. New insights into mechanisms of fibrosis in immune renal injury. *Springer Semin Immunopathol.* 2003 May;24(4):459-76.

126. López-Novoa JM, Rodríguez-Peña AB, Ortiz A, Martínez-Salgado C, Lopez-Hernández FJ. Etiopathology of chronic tubular, glomerular and renovascular nephropathies: clinical implications. *J Transl Med.* 2011 Jan 20; 9:13.
127. Kopp JB, Factor VM, Mozes M, Nagy P, Sanderson N, Bottinger EP, Klotman PE, Thorgeirsson SS. Transgenic mice with increased plasma levels of TGF- $\beta$  1 develop progressive renal disease. *Lab Invest* 1996; 74: 991-1003.
128. Srivastava T, Garola RE, Whiting JM, Alon US. Synaptopodin expression in idiopathic nephrotic syndrome of childhood. *Kidney Int* 2001; 59: 118-125.
129. Steffes MW, Schmidt D, McCrery R, Basgen JM. Glomerular cell number in normal subjects and in type 1 diabetic patients. *Kidney Int* 2001; 59: 2104-2113.
130. Shih NY, Li J, Karpitskii V, Nguyen A, Dustin ML, Kanagawa O, Miner JH, Shaw AS. Congenital nephritic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science* 1999; 286: 312-315.
131. Schiffer M, Bitzer M, Roberts IS, Kopp JB, Dijke P ten, Mundel P, Bottinger EP. Apoptosis in podocytes induced by TGF- $\beta$  and Smad7. *J Clin Invest* 2001; 108:807–816.
132. Lee HS. Pathogenic role of TGF- $\beta$  in the progression of podocyte diseases. *Histol Histopathol* 2011; 26:107–116.
133. Iglesias-de la Cruz MC, Ziyadeh FN, Isono M, Kouahou M, Han DC, Kalluri R, Mundel P, Chen S. Effects of high glucose and TGF- $\beta$  1 on the expression of collagen IV and vascular endothelial growth factor in mouse podocytes. *Kidney Int* 2002; 62: 901-913.
134. Wolf G, Chen S, Ziyadeh FN. From the periphery of glomerular capillary wall toward the center of the disease. Podocyte injury comes on age in diabetic nephropathy. *Diabetes* 2005; 54: 1626-1634.
135. Wang S-N, Lapage J, Hirschberg R. Role of glomerular ultrafiltration of growth factors in progressive interstitial fibrosis in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2000; 57: 1002-1014.
136. Chen HC, Chen CA, Guh JY, Chang JM, Shin SJ, Lai YH. Altering expression of  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 integrin on podocytes of human and rats with diabetes. *Life Sci* 2000; 67: 2345-2353.
137. Wharram BL, Goyal M, Wiggins JE, Sanden SK, Hussain S, Filipiak WE, Saunders TL, Dysko RC, Kohno K, Holzman LB, Wiggins RC. Podocyte depletion causes glomerulosclerosis: diphtheria toxin-induced podocyte depletion in rats expressing human diphtheria toxin receptor transgene. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:2941–2952.

138. Chen S, Kasama Y, Lee JS, Jim B, Marin M, Ziyadeh FN. Podocyte-derived vascular endothelial growth factor mediates the stimulation of  $\alpha 3(\text{IV})$  collagen production by transforming growth factor- $\alpha$  1 in mouse podocytes. *Diabetes* 2004; 53:2939–294
139. Sinuani I, Beberashvili I, Averbukh Z, Cohn M, Gitelman I, Weissgarten J. Mesangial cells initiate compensatory tubular cell hypertrophy. *Am J Nephrol* 2010 31:326–331.
140. Mozes MM, Böttinger EP, Jacot TA, Kopp JB. Renal expression of fibrotic matrix proteins and of transforming growth factor-beta (TGF-beta) isoforms in TGF-beta transgenic mice. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10:271–280.
141. Isaka Y, Fujiwara Y, Ueda N, Kaneda Y, Kamada T, Imai E. Glomerulosclerosis induced by in vivo transfection of transforming growth factor-beta or platelet-derived growth factor gene into the rat kidney. *J Clin Invest* 1993; 92:2597–2601.
142. Akagi Y, Isaka Y, Arai M, Kaneko T, Takenaka M, Moriyama T, Kaneda Y, Ando A, Orita Y, Kamada T, Ueda N, Imai E. Inhibition of TGF- $\beta$ 1 expression by antisense oligonucleotides suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 1996; 50:148–155.
143. McKay NG, Khong TF, Haites NE, Power DA. The effect of transforming growth factor-1 on mesangial cell fibronectin synthesis: increased incorporation into the extracellular matrix and reduced pl but no effect on alternative splicing. *Exp Mol Pathol* 1993; 59:211–224.
144. Chin BY, Mohsenin A, Li SX, Choi AM, Choi ME. Stimulation of pro- $\alpha$ 1(I) collagen by TGF-beta1 in mesangial cells: role of the p38 MAPK pathway. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280:F495–F504.
145. Arciniegas E, Sutton AB, Allen TD, Schor AM. Transforming growth factor beta 1 promotes the differentiation of endothelial cells into smooth muscle-like cells in vitro. *J Cell Sci* 1992; 103:521–529.
146. Zeisberg M, Kalluri R. Reversal of experimental renal fibrosis by BMP7 provides insights into novel therapeutic strategies for chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 2008; 23:1395–1398.
147. Miyajima A, Chen J, Lawrence C, Ledbetter S, Soslow RA, Stern J, Jha S, Pigato J, Lemer ML, Poppas DP, Vaughan ED, Felsen D. Antibody to transforming growth factor-beta ameliorates tubular apoptosis in unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* 2000; 58:2301–2313.
148. López-Novoa JM, Nieto MA. Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression. *EMBO Mol Med* 2009; 1:303–314.

- 149.Border WA, Noble NA. TGF- $\beta$  in kidney fibrosis: a target for gene therapy. *Kidney Int* 1997; 51:1388–1396.
- 150.Schull MMI, Ormsby I, Kier AM, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D, Annunziata M, Doetschman T. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- $\beta$  1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature (Lond)* 1992; 359:693–699.
- 151.Chanson M, Derouette JP, Roth I, Foglia B, Scerri I, Dudez T, Kwak BR. Gap junctional communication in tissue inflammation and repair. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1711:197–207.
- 152.Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, Mammoto T, Charytan D, Strutz F, Kalluri R. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial- to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med* 2003; 9:964–968.
- 153.Nangaku M. Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common pathway to end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 17-25.
- 154.Kretzler M, Schroppel B, Merkle M, Huber S, Mundel P, Horster M, et al. Detection of multiple vascular endothelial growth factor splice isoforms in single glomerular podocytes. *Kidney Int Suppl* 1998; 67: S159-61.
- 155.Simon M, Rockl W, Hornig C, Grone EF, Theis H, Weich HA, et al. Receptors of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) in fetal and adult human kidney: localization and [125I]VEGF binding sites. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 1032-44.
- 156.Hood JD, Meininger CJ, Ziche M, Granger HJ. VEGF upregulates eNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *Am J Physiol* 1998; 274: H1054-8.
- 157.Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999; 13:9-22.
- 158.Kang DH, Joly AH, Oh SW, Hugo C, Kerjaschki D, Gordon KL, et al. Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: I. Potential role of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 1434-47.
- 159.Kang DH, Hughes J, Mazzali M, Schreiner GF, Johnson RJ. Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: II. Vascular endothelial growth factor administration reduces renal fibrosis and stabilizes renal function. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 1448-57.
- 160.Ostendorf T, Kunter U, Eitner F, Loos A, Regele H, Kerjaschki D, et al.VEGF(165) mediates glomerular endothelial repair. *J Clin Invest* 1999; 104: 913-23.

161. Cooper ME, Vranes D, Youssef S, Stacker SA, Cox AJ, Rizkalla B, et al. Increased renal expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 in experimental diabetes. *Diabetes* 1999; 48: 2229-39.
162. Hovind P, Tarnow L, Oestergaard PB, Parving HH. Elevated vascular endothelial growth factor in type 1 diabetic patients with diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl* 2000; 75: S56-61.
163. Cha DR, Kim NH, Yoon JW, Jo SK, Cho WY, Kim HK, et al. Role of vascular endothelial growth factor in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl* 2000; 77: S104-12.
164. de Vriese AS, Tilton RG, Elger M, Stephan CC, Kriz W, Lameire NH. Antibodies against vascular endothelial growth factor improve early renal dysfunction in experimental diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 993-1000.
165. Flyvbjerg A, Dagnaes-Hansen F, De Vriese AS, Schrijvers BF, Tilton RG, Rasch R. Amelioration of long-term renal changes in obese type 2 diabetic mice by a neutralizing vascular endothelial growth factor antibody. *Diabetes* 2002; 51: 3090-4.
166. Nakagawa T, Sato W, Glushakova O, Heinig M, Clarke T, Campbell-Thompson M, et al. Diabetic endothelial nitric oxide synthase knockout mice develop advanced diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 539-50.
167. European Medicines Agency. Summary of product characteristics, Micardis®. Micardis 20 mg, 40 mg and 80 mg tablets: summary of product characteristics. Limited BI; Bracknell, UK: 2009.
168. NDA 20-850 Efficacy Supplement SE1-025 Micardis® (telmisartan) tablets. Available from: [www.FDA.gov](http://www.FDA.gov) [Last accessed June 2011].
169. Atlas S. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Pharm* 2007; 13:S9-20.
170. Destro M, Cagnoni F, Dognini GP, Galimberti V, Taietti C, Cavalleri C, Galli C. Telmisartan: Just an antihypertensive agent? A literature review. *Expert Opin Pharmacother* 2011; 12(17): 2719-2735.
171. Lifton R, Gharavi A, Geller D. Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell* 2001; 104:545-56.
172. Galzerano D, Capogrosso C, Michele SD, Galzerano A. New standards in hypertension and cardiovascular risk management: focus on telmisartan. *Vasc Health Risk Manag* 2010; 6:113-33.

173. Battershill A, Scott L. Telmisartan: a review of its use in the management of hypertension. *Drugs* 2006; 66:51-83.
174. Mann JF, Schmieder RE, McQueen M, et al. Renal outcomes with telmisartan, ramipril, or both, in people at high vascular risk (the ONTARGET study): a multicentre, randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet* 2008;372:547-53.
175. Schmieder R, Delles C, Mimran A, et al. Impact of telmisartan versus ramipril on renal endothelial function in patients with hypertension and type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2007; 30:1351-17.
176. Clasen R, Schupp M, Foryst-Ludwig A, Sprang C. PPARgamma-activating angiotensin type-1 receptor blockers induce adiponectin. *Hypertension* 2005; 46:137-43.
177. Benson S, Pershadsingh H, Ho C, Chittiboyina A. Identification of telmisartan as a unique angiotensin II receptor antagonist with selective PPAR $\gamma$ -modulating activity. *Hypertension* 2004; 43:993-1002.
178. Jonsson B; CODE-2 Advisory Board. Revealing the cost of Type II diabetes in Europe. *Diabetologia*. 2002 Jul;45(7):S5-12
179. Robert D. Abbott, PhD; Richard P. Donahue, PhD; Stephen W. MacMahon, PhD; Dwayne M. Reed, MD, PhD; Katsuhiko Yano, MD. Diabetes and the Risk of Stroke. The Honolulu Heart Program.. *JAMA*. 1987;257(7):949-952.
180. Coutinho M, Gerstein HC, Wang Y, Yusuf S. The relationship between glucose and incident cardiovascular events. A metaregression analysis of published data from 20 studies of 95,783 individuals followed for 12.4 years. *Diabetes Care*. 1999 Feb;22(2):233–240
181. Lindström J, Louheranta A, Mannelin M, et al., The Finnish Diabetes Prevention Study (DPS)(2003) Lifestyle intervention and 3-year results on diet and physical activity. *Diabetes Care* 26(12):3230–3236.
182. Ninomiya T, Perkovic V, Galan BE, Zoungas S, Pillai A, Jardine M, Patel A, Cass A, Neal B, Poulter N, Mogensen CE, Cooper M, Marre M, Williams B, Hamet P, Mancia G, Woodward M, Macmahon S, Chalmers J. Albuminuria and kidney function independently predict cardiovascular and renal outcomes in diabetes. *J Am Soc Nephrol*. 2009; 20: 1813–1821
183. Anavekar NS, McMurray JJ, Velazquez EJ, et al. Relation between renal dysfunction and cardiovascular outcomes after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2004 Sep 23;351(13):1285-95

184. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med*. 2004 Sep 23;351(13):1296-305
185. Engeli S, Sharma AM. The renin–angiotensin system and natriuretic peptides in obesity-associated hypertension. *J Mol Med* 2001; 79:21-29.
186. Henegar JR, Bigler SA, Henegar LK, et al. Functional and structural changes in the kidney in the early stages of obesity. *J Am Soc Nephrol*. 2001 Jun; 12(6):1211–1217.
187. Chagnac A, Weinstein T, Herman M, Hirsh J, Gafer U, Ori Y. The effects of weight loss on renal function in patients with severe obesity. *J Am Soc Nephrol*. 2003; 14 (6):1480–6.
188. Afshimnia F, Wilt TJ, Duval S, Esmaili A. Weight loss and proteinuria: systematic review of clinical trials and comparative cohorts. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25(4).1173-1183
189. Hertz C, Gerstein, MD, MSc; Johannes F. E. Mann, MD; Qilong Yi, PhD; MBBS, DPhil; for the HOPE Study Investigators. Albuminuria and Risk of Cardiovascular Events, Death, and Heart Failure in Diabetic and Nondiabetic Individuals. *JAMA*. 2001; 286(4):421-426.
190. Klausen K, Borch-Johnsen K, Feldt-Rasmussen B, et al. Very low levels of microalbuminuria are associated with increased risk of coronary heart disease and death independently of renal function, hypertension, and diabetes. *Circulation* 2004;110:32–5
191. Pershadsingh HA. Treating the metabolic syndrome using angiotensin receptor antagonists that selectively modulate peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ . *Int J Biochem Cell Biol*. 2006; 38: 766–781.
192. Li B, Yao J, Kawamura K, Oyanagi-Tanaka Y, Hoshiyama M, Morioka T, Gejyo F, Uchiyama M, Oite T. Real-time observation of glomerular hemodynamic changes in diabetic rats: effects of insulin and ARB. *Kidney Int*. 2004; 66: 1939–1948.
193. Kang DH, Joly AH, Oh SW, Hugo C, Kerjaschki D, Gordon KL, et al. Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: I. Potential role of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1. *J Am Soc Nephrol*. 2001; 12:1434-47.
194. Cooper ME, Vranes D, Youssef S, Stacker SA, Cox AJ, Rizkalla B, et al. Increased renal expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 in experimental diabetes. *Diabetes*, 1999, 48: 2229-39.

195. Hovind P, Tarnow L, Oestergaard PB, Parving HH. Elevated vascular endothelial growth factor in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl* 2000; 75: S56-61.
196. Corsetti JP, Sparks JD, Peterson RG, Smith RL, Sparks CE. Effect of dietary fat on the development of non-insulin dependent diabetes mellitus in obese Zucker diabetic fatty male and female rats. *Atherosclerosis*. 2000; 148: 231–241.
197. Ohneda M, Inman LR, Unger RH. Caloric restriction in obese pre-diabetic rats prevents beta-cell depletion, loss of beta-cell GLUT 2 and glucose incompetence. *Diabetologia*. 1995; 38:173–179.
198. Brown et al. A novel N-aryl tyrosine activator of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  reverses the diabetic phenotype of the Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes*, 1999; 48:1415 PMID:10389847.
199. Castoldi G, di Gioia CR, Bombardi C, Maestroni S, Carletti R, Steckelings UM et al. Prevention of diabetic nephropathy by compound 21, selective agonist of angiotensin type 2 receptors, in Zucker diabetic fatty rats. *American Journal of Physiology: Renal Physiology*. 2014 Sep 3;307 (10):F1123-F1131
200. Hall JE, Henegar JR, Dwyer T, et al. Mechanisms of obesity-associated cardiovascular and renal disease. *Am J Med Sci* 2002, 324(3):127-137
201. O'Donnell MP, Kasiske BL, Cleary MP, Keane WF. Effects of genetic obesity on renal structure and function in the Zucker rat. II. Micropuncture studies. *J Lab Clin Med* 1985; 106:605-10
202. Buckingham RE, Al-Barazanji KA, Toseland CD, Slaughter M, Connor SC, West A, Bond B, Turner NC, Clapham JC. 1998. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  agonist, rosiglitazone, protects against nephropathy and pancreatic islet abnormalities in Zucker fatty rats. *Diabetes* 47:1326–1334
203. Hempe J, Elvert R, Schmidts HL, Kramer W, Herling AW (2011). Appropriateness of the Zucker Diabetic Fatty rat as a model for diabetic microvascular late complications. *Lab. Anim.* 46(1):32-9
204. Bondar IA, Klimontov VV, Nadeev AP. Urinary excretion of proinflammatory cytokines and transforming growth factor beta at early stages of diabetic nephropathy. *Ter Arkh.* 2008; 80: 52-6.
205. Miller, Jw. Et al. Vascular endothelial growth factor in ocular neovascularization and proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Metab Rev* 1997; 13: 37-50.
206. Aiello LP, et al. Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in retinal cells. *Arch Ophthalmol* 1995; 113(12): 1538-1544.

207. Bieke F. Schrijvers, Allan Flyvbjerg, Ronald G. Tilton, Norbert H. Lameire, and An S. De Vriese . A neutralizing VEGF antibody prevents glomerular hypertrophy in a model of obese type 2 diabetes, the Zucker diabetic fatty rat. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2006 21: 324-329.
208. Luscher TF, Barton M. Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation* 2000; 102(19):2434-40.
209. Sharma K, Ziyadeh FN: Perspectives in diabetes. Hyperglycemia and diabetic kidney disease. The case for transforming growth factor  $\beta$  as a key mediator. *Diabetes* 44: 1139-1146, 1995.