






Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



MECANISMOS DE ACCIÓN DEL BLOQUEO SGLT2 EN LA PROTECCIÓN CARDIORRENAL EN LA DIABETES TIPO 2

Tesis Doctoral realizada por

Ander Vergara Arana

para el título de Doctor

Directoras

Dra. María José Soler Romeo

Dra. Conxita Jacobs Cachá

Tutor

Daniel Serón Micas

Programa de Doctorado en Medicina

Departamento de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona

Barcelona, 2021

A mi familia y amigos por descubrirme la vida.

A mis maestros por mostrarme la ciencia.

A todos ellos por enseñarme a disfrutar.

AGRADECIMIENTOS

En la vida, los proyectos salen adelante gracias al esfuerzo de muchas personas. En la ciencia, entendida como sistema que trata de ordenar el conocimiento y explicar la propia vida a través de la observación, este principio aplica igualmente. Así, el presente trabajo de tesis es fruto de un esfuerzo colectivo. De horas de dedicación, no solo mías como doctorando, sino de todo un equipo. Por ello, quisiera dedicar estas primeras páginas a todos aquellos compañeros y amigos que han colaborado para poder llevar a cabo este proyecto.

En primer lugar, quisiera dedicar el presente trabajo a mis directoras de tesis. A la Dra. María José Soler y a su decidido carácter le dedico mi más sincera gratitud y amistad. Su determinación fue la que hizo posible que yo presente el actual trabajo de tesis. De ella he adquirido la pasión por la investigación y he aprendido a disfrutar de la medicina investigadora y traslacional.

A la Dra. Conxita Jacobs quiero agradecerle sus pacientes lecciones. Ella me ha demostrado, que después de la carrera de medicina y la formación especializada como nefrólogo, aún puedo seguir aprendiendo sin cesar. Su dedicación y la permanente riña contra mi cabezonería han logrado que adquiera la mayoría de los conocimientos de laboratorio e investigación básica que poseo actualmente.

A mi tutor de tesis, el Dr. Daniel Serón, quiero mostrarle mi afectuoso respeto. Gracias a la confianza que depositó en mí, actualmente formo parte del extraordinario equipo de Nefrología de Vall d'Hebron y he podido iniciar mis primeros pasos como investigador. Su perfil renacentista y sus conocimientos holísticos de artes y ciencias son una fuente de inspiración para mí.

A Pamela Domínguez y a su capacidad organizativa germánica quiero dedicarle un fuerte abrazo. Su orden y anticipación han sido indispensables en muchas de mis tareas. Sin ella como refuerzo, hubiese sido materialmente imposible realizar todos los procedimientos de estabulación y de laboratorio.

A todas aquellas personas que trabajaron conmigo en el laboratorio: Mireia Molina, Carmen Llorens, Joan López, Begoña Benito, Laia Yáñez, Mónica Vall, Mónica Duran, Jazmine Arévalo, Eduard Sarró, Anna Giralt y Emma Pardo, les dedico mi más sincero agradecimiento por su cariño y su buena disposición. La ayuda de todos ellos

AGRADECIMIENTOS

ha sido indispensable en algún momento y de todos ellos me llevo alguna lección o recuerdo.

A todo el servicio de Nefrología de Vall d'Hebron: Irene Agraz, Sheila Bermejo, Mónica Bolufer, Clara García, Natalia Ramos, Toña Azancot, Néstor Toapanta, Manel Perelló, Joana Sellares, Irina Torres, Ignacio Cidraque, Betty Chamoun, María Meneghini, Roxana Bury, Cinthia Baldallo, José Miguel Zúñiga, Zaira Ivette, Juan Carlos León, César Sánchez, Lemis Arocha, Jhusela Rosas, Francesc Moreso y Oriol Bestard, quiero mostrarles mi más cálido afecto. Todos ellos me han acogido con gran cariño en el equipo y su ayuda ha sido indispensable para poder combinar mi actividad asistencial e investigadora. Sin ellos hubiese sido imposible rascarle horas al tiempo para avanzar en las tareas de laboratorio.

Al servicio de Nefrología de Cruces: Joheny Mabel Fanini, Iñigo Yáñez, Patricia Jiménez, Ane Mujika, Amaia Osorio, Nerea Martínez, María Luisa Muñiz, Nerea Odriozola, Sonia Delgado, Begoña Bralo, José Antonio Quintanar, Ainhoa Inza, Laura Bueno, Luis Miguel Ruiz, Juan José Amenabar, Sofia Zárrega, Gorka García, José Manuel Urbizu, Eva Álvarez y Javier Gainza quiero enviarles mis más amables recuerdos. A su dedicación y paciencia les debo mis primeros pasos como nefrólogo.

A mis amigos, los de siempre, aquellos con los que he compartido el barrio de Repélega o la universidad, les dedico un sincero abrazo por acompañarme en las diferentes etapas y por recibirme con una sonrisa siempre que los bucles de la vida nos vuelven a juntar.

A mi familia: a mi aita, a mi ama, a mi hermana, a mis amamas y a mis aítites, quiero agradecerles su apoyo en la distancia. Sé que, aunque no nos vemos con la frecuencia deseada, siempre nos pensamos mutuamente y siempre somos familia.

A Anna Buxeda quiero dedicarle mi más afectuoso cariño. Ella ha sido el motor de mi vida los últimos cuatro años. La razón por la que mis primeros pasos como investigador se han fraguado en una ciudad como Barcelona. Quien ha compartido los momentos más felices de mi vida reciente, pero también quien más ha lidiado con mi taciturno y sombrío carácter.

AGRADECIMIENTOS

A quienes ya conocía y a quienes he conocido a lo largo de esta aventura muchas gracias. Gracias por enseñarme a disfrutar de la vida y de la medicina. Por mostrarme los sabores agridulces derivados de producir ciencia y por acompañarme siempre a lo largo del camino. Resulta difícil reflejar en unas líneas todo lo vivido en los últimos años y las cosas no siempre siguen un camino recto y nítido. Pero como bien recita aquella canción de Manel: *i, a vegades, ens en sortim*.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ADNc	ADN complementario	AGEs	Productos finales de la glucosilación avanzada (<i>Advanced Glycation End products</i>)
AGT	Angiotensinógeno	AKAP2	Proteína 2 de anclaje de la proteína quinasa A (<i>A-Kinase Anchor Protein 2</i>)
Ang I	Angiotensina I	Ang II	Angiotensina II
Ang-(1-7)	Angiotensina (1-7)	Ang-(1-9)	Angiotensina (1-9)
ARA2	Antagonista del Receptor de Angiotensina II	ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AT₁R	Receptor tipo 1 de la angiotensina II (<i>Angiotensin II Type 1 Receptor</i>)	AT₂R	Receptor tipo 2 de la angiotensina II (<i>Angiotensin II Type 2 Receptor</i>)
BFG	Barrera de filtración glomerular	CAC	Cociente albúmina/creatinina
COLIV	Colágeno IV	CV	CardioVascular
DE	Desviación estándar	DPP4i	Inhibidores de la dipeptidil peptidasa 4 (<i>DiPeptidyl Peptidase-4 inhibitors</i>)
ECA	Enzima convertor de angiotensina	ECA2	Enzima convertor de angiotensina II
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial (<i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i>)	ERC	Enfermedad Renal Crónica
ERD	Enfermedad renal diabética	ET-1	Endotelina-1
ET_A	Receptor de endotelina tipo A	ET_B	Receptor de endotelina tipo B
FDR	Tasa de falsos descubrimientos (<i>False Discovery Rate</i>)	FG	Filtrado glomerular
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase</i>)	HPR	Peroxidasa de rábano. (<i>HorseRadish Peroxidase</i>)
IC 95%	Intervalo de confianza del 95%.	IECAs	Inhibidores del Enzima Convertor de Angiotensina
IHQ	Inmunohistoquímica	iSGLT2	Inhibidor del cotransportador de sodio-glucosa tipo 2 (<i>Sodium-GLucose coTransporter 2 Inhibitor</i>)
IV	Intravenoso	LogFC	Variación de la señal ajustada en escala logarítmica de base 2 (<i>Log₂ Fold-Change</i>).
MAP17	Proteína asociada a membrana de 17kDa (<i>17 kDa Membrane-Associated Protein</i>)	MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos (<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>)
MBG	Membrana basal glomerular	MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1 (<i>Monocyte Chemoattractant Protein 1</i>)
NaCl	Cloruro sódico	NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>)
NF-κβ	Factor nuclear κβ (<i>Nuclear factor κβ</i>)	NHE3	Intercambiador de sodio-hidrógeno tipo 3 (<i>Na⁺/H⁺ Exchanger 3</i>)
NHERF1	Factor regulador 1 del intercambio de sodio-hidrógeno. (<i>Na⁺/H⁺ Exchange Regulatory coFactor 1</i>)	PA	Presión arterial
PAS	Tinción basada en la reacción de Schiff-ácido periódico. (<i>Periodic Acid-Schiff</i>)	PDZK1	Proteína 1 con dominios PDZ (<i>PDZ domain-containing protein 1</i>)
PKA	Proteína quinasa A (<i>Protein Kinase A</i>)	PKC	Proteína quinasa C (<i>Protein Kinase C</i>)
RFU	Unidades de fluorescencia relativa (<i>Relative Fluorescence Units</i>)	ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>Reactive Oxygen Species</i>)

ABREVIATURAS

RQ	Cuantificación relativa (<i>Relative Quantification</i>)	RT	Retrotranscripción (<i>Reverse Transcription</i>)
SGLT2	Cotransportador de sodio-glucosa tipo 2 (<i>Sodium-Glucose Cotransporter 2</i>)	SNGFR	Filtrado glomerular de una única nefrona (<i>Single-Nephron Glomerular Filtration Rate</i>)
SRA	Sistema Renina Angiotensina	STZ	Estreptozotocina. (<i>STreptoZotocin</i>)
TC	Tomografía computarizada	TGF-β1	Factor de crecimiento transformante β1) (Transforming growth factor β1)
TRS	Terapia Renal Sustitutiva	WT-1	Wilms tumor 1

ÍNDICE

ÍNDICE

SUMMARY	14
RESUMEN	16
1. INTRODUCCIÓN	18
1.1. LA HOMEOSTASIS CORPORAL Y EL RIÑÓN	19
1.1.a. La nefrona como unidad funcional renal	19
1.1.b. El glomérulo y la barrera de filtración glomerular	20
1.1.c. El sistema tubular y su participación en la reabsorción y secreción	22
1.1.d. Regulación del filtrado glomerular.....	25
1.1.e. La interacción túbulo-glomerular	28
1.1.f. El SRA y su participación en la regulación renal	30
1.2. LA NEFROPATÍA DIABÉTICA.....	33
1.2.a. Definición de enfermedad renal diabética y nefropatía diabética	35
1.2.b. Diabetes, enfermedad renal crónica y riesgo vascular	39
1.2.c. Mecanismos patológicos implicados en la nefropatía diabética	41
1.3. TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD RENAL DIABÉTICA	44
1.3.a. Impacto de los IECAs y los ARA2 en la enfermedad renal diabética	45
1.3.b. Los inhibidores del cotransportador sodio-glucosa tipo 2: un cambio de paradigma en el tratamiento.....	47
1.3.c. Atrasentán y el papel de los antagonistas selectivos de los receptores de endotelina	50
1.4. MODELOS MURINOS DE DIABETES	53
1.4.a. Ventajas y desventajas de los modelos murinos diabéticos	54
1.4.b. Modelos murinos de diabetes tipo 1	55
1.4.c. Modelos murinos de diabetes tipo 2.....	55
2. HIPÓTESIS	59
3. OBJETIVOS	61
4. MATERIAL Y MÉTODOS	63

4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL	64
4.2. PROCEDIMIENTOS EN ANIMALES	66
4.2.a. Condiciones de estabulación	66
4.2.b. Medición del peso corporal	66
4.2.c. Medición de la glucemia en ayunas	66
4.2.d. Medición de la presión arterial	67
4.2.e. Medición del filtrado glomerular transcutáneo	68
4.2.f. Medición de la excreción urinaria de albúmina	70
4.2.g. Medición de la grasa corporal y el volumen renal mediante tomografía computarizada	72
4.2.h. Eutanasia	75
4.3. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS	75
4.3.a. Inclusión de las muestras en parafina	75
4.3.b. Sección de los bloques y desparafinado	76
4.3.c. Evaluación de la morfología renal en secciones teñidas con PAS	76
4.3.d. Estudios inmunohistoquímicos	78
4.4. ESTUDIOS MOLECULARES	81
4.4.a. Estudios de actividad enzimática de ECA y ECA2	81
4.4.b. Estudios de expresión génica	86
4.5. ESTUDIO DE PROTEÓMICA	90
4.5.a. Extracción proteica	92
4.5.b. Preparación y marcaje de las muestras	92
4.5.c. Cromatografía líquida y espectrometría de masas (LC-MS/MS)	93
4.5.d. Análisis de los datos de la espectrometría de masas	94
4.5.e. Análisis de enriquecimiento funcional	96
4.5.f. Validación de los resultados de proteómica	96
4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	98

ÍNDICE

5. RESULTADOS.....	101
5.1. EFECTOS EN LOS PARÁMETROS FISIOLÓGICOS.....	102
5.1.a. Efectos en el peso, la glucemia y la presión arterial.....	102
5.1.b. Efectos sobre el volumen y la grasa corporal	109
5.1.c. Efectos en los parámetros renales.....	111
5.2. EFECTOS SOBRE LA LESIÓN RENAL DIABÉTICA	119
5.2.a. Evaluación histológica de la lesión renal	119
5.2.b. Evaluación de marcadores de estrés oxidativo, inflamación y fibrosis..	125
5.3. MODULACIÓN DEL EJE RENINA-ANGIOTENSINA.....	128
5.3.a. Efectos sobre las primeras etapas del SRA	128
5.3.b. Efectos sobre la expresión renal de ECA y ECA2	132
5.3.c. Efectos sobre la actividad sérica de ECA y ECA2	145
5.4. MODULACIÓN DEL SISTEMA DE LA ENDOTELINA	148
5.5. EFECTOS EN LOS TRANSPORTADORES DE MEMBRANA	150
5.6. RESULTADOS DEL ANÁLISIS PROTEÓMICO.....	154
5.6.a. Diferencias en el proteoma entre el modelo db/m y db/db	155
5.6.b. Proteínas diferenciales entre el control db/m y los grupos db/db tratados con empagliflozina, ramipril y sus combinaciones	159
5.6.c. Proteínas diferenciales entre el modelo db/db y los tratamientos	163
6. DISCUSIÓN.....	171
6.1. EFECTOS EN LOS PARÁMETROS FISIOLÓGICOS.....	173
6.2. EFECTOS EN LA LESIÓN RENAL DIABÉTICA	176
6.3. MODULACIÓN DEL EJE SRA.....	179
6.4. MODULACIÓN DEL SISTEMA ENDOTELINA.....	184
6.5. EFECTOS EN EL TRANSPORTE DE MEMBRANA.....	185
6.6. VÍAS MODULADAS EN EL ESTUDIO DE PROTEÓMICA	187
6.7. ROL DE LAS PROTEÍNAS ADAPTADORAS (<i>SCAFOLDER</i>)	188

7. CONCLUSIONES	193
8. LIMITACIONES Y LÍNEAS FUTURAS.....	195
8.1. LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	196
8.2. LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURAS.....	197
9. BIBLIOGRAFÍA	198
10. ANEXOS	219
10.1. PARÁMETROS FISOLÓGICOS Y RENALES.....	220
10.1.a. Frecuencia cardíaca.....	220
10.1.b. Área del penacho glomerular	221
10.2. ESTUDIO DE PROTEÓMICA.....	221
10.2.a. Proteínas diferenciales entre los ratones db/m y db/db tratados con vehículo	222
10.2.b. Correlación de la expresión de la proteína MAP17 y otras proteínas asociadas a la membrana	227
10.3. PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES.....	228
10.3.a. Publicaciones relacionadas.....	229
10.3.b. Comunicaciones relacionadas	231
10.4. FINANCIACIÓN	237

SUMMARY

SUMMARY

Diabetic kidney disease (DKD) is the leading cause of dialysis initiation in the world and it is associated to a greater morbidity and mortality. Before 2016, only two drug classes that blocked the renin-angiotensin system (RAS): the angiotensin converting enzyme inhibitors (ACEi) and the angiotensin II receptor blockers (ARB), had shown to delay DKD progression. Recently, two new drug classes: the sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors (SGLT2i) and the endothelin receptor antagonists (ERA) have shown protective effects in DKD. The following study aimed to investigate the effects of the add-on therapy of SGLT2i and ERA on top of RAS blockade in the type 2 diabetic mice (db/db). For this purpose, diabetic db/db mice were treated with a SGLT2i (empagliflozin), an ERA (atrasentan), an ACEi (ramipril) or their combinations for 8 weeks. The effects of these treatments in physiological and kidney variables were evaluated. In addition, their effect on the RAS enzymes and the expression of genes related to oxidative stress, inflammation and fibrosis was also evaluated. A kidney cortex proteomic study was conducted to identify pathways modulated by empagliflozin, ramipril or their combination. Our study showed that the triple therapy with empagliflozin, ramipril and atrasentan compared to ramipril alone, exerts a greater protection against DKD progression through a better glycaemic control, increased blood pressure reduction and amelioration of glomerular hyperfiltration. Moreover, the combined therapy exhibits an increased protection against diabetic kidney injury, reducing mesangial matrix expansion and oxidative stress. In relation to RAS expression, the combination of SGLT2i, ERA and ACEi compared to ramipril alone, stimulates to a greater extent the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2)/angiotensin converting enzyme (ACE) ratio both in the kidney and serum. This finding indicates a greater activation of the protective non-classic RAS with the combined therapy treatment. Lastly, the kidney proteomic study identified, among other proteins, a membrane associated protein of 17 kDa (MAP17) that interacts with sodium-glucose cotransporter 2. This protein is increased in treatments with empagliflozin and may be involved in the mechanisms through which SGLT2i modulate other membrane transporters. In conclusion, the combination of empagliflozin, ramipril and atrasentan exerts greater beneficial effects in DKD than ramipril alone. Furthermore, MAP17 could be a protein involved in the protective mechanisms of SGLT2i.

RESUMEN

RESUMEN

La enfermedad renal diabética (ERD) es la principal causa de inicio de diálisis en el mundo y se acompaña de una elevada morbilidad. Hasta el 2016 solo dos grupos farmacológicos que bloquean el sistema renina-angiotensina (SRA): los inhibidores del enzima conversor de angiotensina (IECAs) y los antagonistas del receptor de angiotensina II (ARA2), habían demostrado frenar la progresión de la ERD. Recientemente, dos grupos farmacológicos: los inhibidores del cotransportador de sodio-glucosa tipo 2 (iSGLT2) y los antagonistas selectivos del receptor de endotelina (ARE) han demostrado efectos protectores frente a la progresión de la ERD. El presente trabajo tiene como objetivo estudiar el efecto de la combinación de ambos fármacos asociados al bloqueo del SRA en la nefropatía diabética experimental en el ratón diabético db/db. Para ello se trataron ratones diabéticos db/db con un iSGLT2 (empagliflozina), un ARE (atrasentán), un IECA (ramipril) o sus combinaciones durante 8 semanas. Se analizaron los efectos de estos fármacos sobre parámetros fisiológicos y renales, enzimas del SRA y la expresión de genes del estrés oxidativo, inflamación y fibrosis. Además, se realizó un estudio de proteómica en extractos corticales renales en los grupos tratados con empagliflozina, ramipril o sus combinaciones para identificar vías fisiopatológicas moduladas de forma diferencial. Los resultados demostraron que la triple terapia con empagliflozina, ramipril y atrasentán comparada con ramipril en monoterapia ofrece una mayor protección frente a la ERD mediante el control glucémico, mayor descenso de presión arterial y prevención de la hiperfiltración glomerular. Esta terapia exhibe además una mayor protección frente a las lesiones renales diabéticas, disminuyendo la expansión de la matriz mesangial glomerular y el estrés oxidativo. Comparada con ramipril en monoterapia, la triple terapia con empagliflozina, ramipril y atrasentán estimula aún más la expresión del enzima conversor de angiotensina 2 (ECA2) sobre el enzima conversor de angiotensina (ECA) a nivel tanto renal como sérico, indicando una mayor activación del eje no-clásico del SRA, con efectos protectores a nivel sistémico. Finalmente, el estudio de proteómica identificó entre otras, una proteína asociada a la membrana plasmática de 17 kDa (MAP17) que interacciona con SGLT2 y incrementa con empagliflozina. Esta proteína podría ser un mecanismo a través del cual los iSGLT2 son capaces de modular otros transportadores. En conclusión, la triple terapia con empagliflozina, ramipril y atrasentán es superior al bloqueo simple del SRA con ramipril en la ERD. Además, MAP17 podría estar relacionada con los efectos renoprotectores de los iSGLT2.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA HOMEOSTASIS CORPORAL Y EL RIÑÓN

Los riñones son los principales responsables de la homeostasis corporal y se encargan de mantener el balance hídrico e iónico del cuerpo humano (1). Esta acción la llevan a cabo a través de la filtración del plasma y la posterior recuperación o excreción selectiva de las sustancias o el agua filtradas. Por este motivo, reciben entre el 20-22% del gasto cardíaco, siendo uno de los órganos que mayor flujo de sangre recibe por minuto en situación de reposo (1).

1.1.a. La nefrona como unidad funcional renal

La nefrona es la unidad funcional del riñón y cada riñón humano cuenta con entre 800.000 y 1.000.000 de nefronas. Cada una de ellas es capaz de producir orina de forma independiente. Las nefronas se componen a su vez de una serie de estructuras (**Figura 1-1**). La primera es un penacho capilar fenestrado recubierto por células epiteliales especializadas denominadas podocitos. Esta estructura es el glomérulo y es responsable de la filtración selectiva del plasma. La sangre accede al penacho capilar glomerular a través de la arteriola aferente y tras circular por dicho sistema capilar se drena mediante la arteriola eferente. Dentro del penacho capilar, en la barrera de filtración glomerular (BFG) formada por la célula endotelial, la membrana basal intercelular y el podocito, se produce la filtración del plasma que drena a la cápsula de Bowman. Posteriormente este filtrado glomerular circula por un sistema tubular que se encarga de la reabsorción y secreción selectiva de las diferentes moléculas e iones hasta producir la orina. En orden, las estructuras de este sistema tubular son el túbulo contorneado proximal, el asa descendente de Henle, el asa ascendente de Henle, el túbulo contorneado distal y el túbulo colector cortical (**Figura 1-1**). Finalmente 8-10 túbulos colectores confluyen en el conducto colector que atraviesan la médula y drenan en la papila renal (1).

1. INTRODUCCIÓN

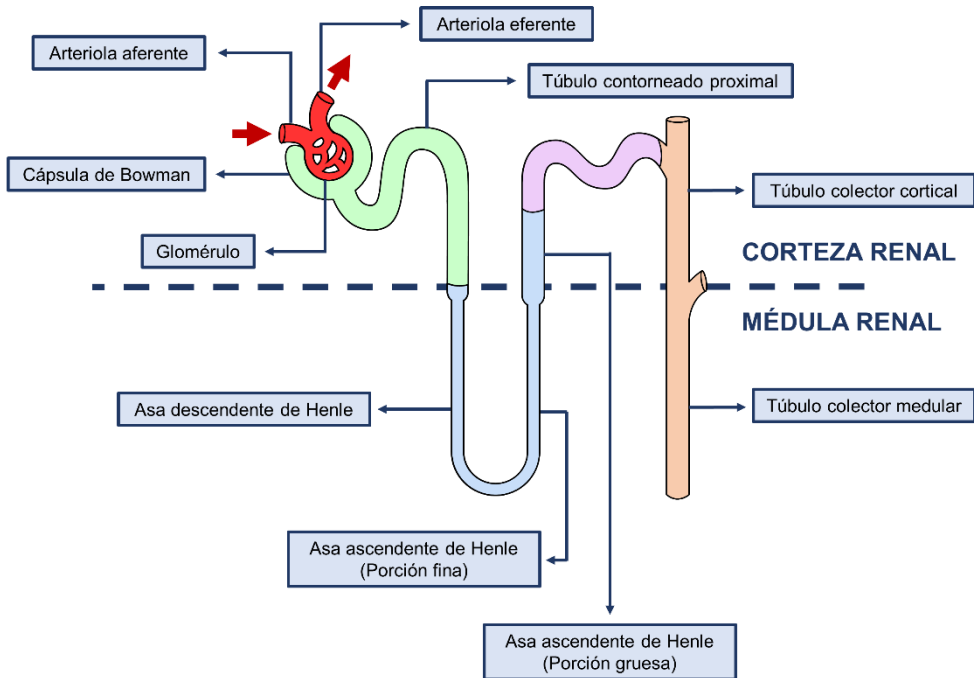


Figura 1-1 - Segmentos de una nefrona. Se muestran los segmentos de una nefrona individual. El penacho glomerular se encuentra resaltado en rojo con sus arterias aferente y eferente señalizadas. La cápsula de Bowman que recoge el filtrado glomerular y el túbulo contorneado proximal se encuentran resaltados en verde. El asa de Henle se encuentra delimitada en azul. Por último, el túbulo contorneado distal se encuentra delimitado en color morado y el túbulo colector en naranja.

Imagen creada con recursos visuales de Servier Medical Art (2).

1.1.b. El glomérulo y la barrera de filtración glomerular

El filtrado glomerular se produce en el glomérulo. Como se ha mencionado previamente, esta estructura de la nefrona es básicamente un ovillo capilar que se sustenta por un tejido conectivo que recibe el nombre de mesangio. El mesangio cuenta con sus propias células denominadas células mesangiales, que se encargan de producir la matriz que soporta el ovillo. El ovillo capilar está formado por células endoteliales y recubierto en su cara externa por células especializadas denominadas podocitos. La sangre accede al ovillo a través de la arteriola aferente, circula por el penacho y drena por la arteriola eferente. Esta circulación de la sangre a través del ovillo produce el filtrado glomerular.

1. INTRODUCCIÓN

El filtrado glomerular se compone fundamentalmente de agua, iones y pequeños solutos. No contiene células y la presencia de proteínas es mínima ya que no se filtran las proteínas de mayor tamaño. Esta filtración selectiva de agua y pequeñas moléculas es posible gracias a la BFG. La BFG está formada por las células endoteliales del penacho capilar, la membrana basal que separa el endotelio de las células epiteliales, y las propias células epiteliales del glomérulo llamadas podocitos (**Figura 1-2**). Esta barrera tiene una mayor permeabilidad que otras redes capilares del organismo humano debido a las propiedades de las células que la componen. El endotelio que sustenta la cara interna de la barrera, es un endotelio fenestrado con poros de gran tamaño a través de los que circula el agua y los solutos. Posteriormente se dispone la membrana basal glomerular (MBG) que exhibe grandes espacios entre las fibras de colágeno y proteoglicanos, facilitando también el paso de agua y solutos. Finalmente, la cara externa de la BFG se compone de unas células de gran tamaño denominadas podocitos. Estas células emiten unas prolongaciones denominadas pies podocitarios de los que a su vez emergen unas prolongaciones secundarias conocidas como pedicelos. Estos pedicelos se interdigitan con los pedicelos de los podocitos vecinos, dejando un espacio o hendidura entre ellos conocida como hendidura de filtración. Tras atravesar los poros endoteliales y la MBG, estas hendiduras son el último segmento que deben atravesar el agua y los solutos filtrados.

1. INTRODUCCIÓN

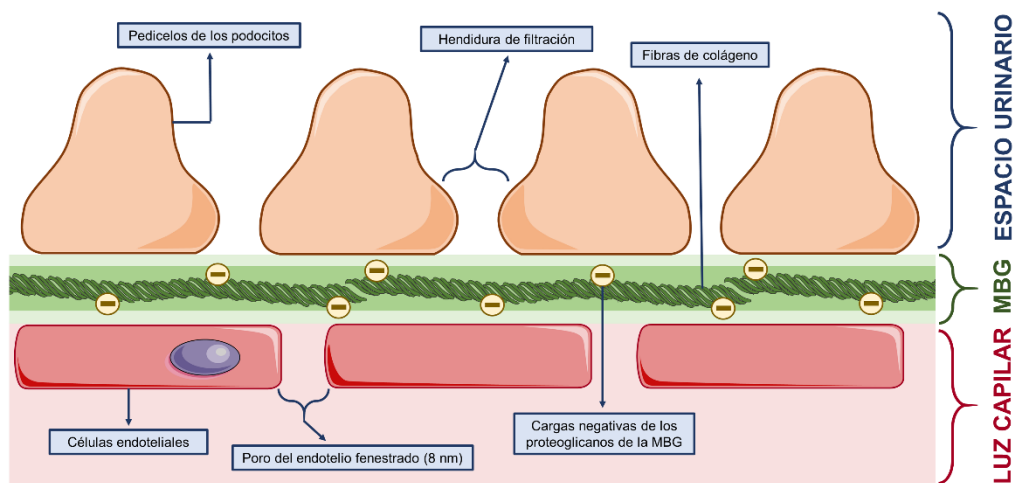


Figura 1-2 - Representación esquemática de la barrera de filtración glomerular.

Se muestran los tres elementos de la barrera: las células endoteliales, la membrana basal glomerular (MBG) y los pedicelos de los podocitos. Además del tamaño de los poros, endoteliales las cargas negativas (especialmente las de los proteoglicanos de la MBG) impiden el paso de moléculas como las proteínas.

Imagen creada con recursos visuales de Servier Medical Art (2).

Las propiedades físico-químicas de la BFG determinan la capacidad del glomérulo para seleccionar, según su peso molecular y carga eléctrica, aquellas moléculas que pueden ser filtradas. Por un lado, el tamaño de los poros de las células endoteliales (8 nm de diámetro) impide que moléculas de gran tamaño como proteínas o células se filtren a la cápsula de Bowman (1). Por otro lado, tanto los poros endoteliales, los proteoglicanos de la MBG y las hendiduras de filtración formadas por los pedicelos podocitarios, están recubiertos de un alto número de cargas negativas que también previenen que se filtren las proteínas del plasma (1,3). Así, proteínas como la albúmina, que tienen un diámetro menor que los poros endoteliales (6 nm de diámetro), no se filtran porque se repelen por las cargas negativas de la BFG.

1.1.c. El sistema tubular y su participación en la reabsorción y secreción

Si se considera que el filtrado glomerular en una persona sana es de 100-120 mL/min/1,73 m², en un solo día esa misma persona filtrará entre 144 y 172 litros de plasma. No obstante, una persona sana orina aproximadamente entre 1 y 2 litros, por lo que el 99% del volumen filtrado en los glomérulos se reabsorbe y no se excreta en

1. INTRODUCCIÓN

orina. Esta acción la lleva a cabo el sistema tubular, que se encarga de reabsorber y secretar iones, moléculas o agua para lograr mantener la homeostasis corporal (1).

El glomérulo tiene la capacidad de retener moléculas grandes con carga negativa, pero permite el paso de grandes cantidades de volumen y pequeños solutos a la cápsula de Bowman. Así, moléculas de más de 70 kDa o con carga negativa como las proteínas, quedan confinadas dentro del penacho capilar (3). Lo mismo ocurre con las células circulantes de la sangre como los hematíes o las plaquetas. Sin embargo, otras moléculas de menor tamaño como la glucosa, los aminoácidos, los iones o el agua se filtran libremente al espacio urinario. Incluso moléculas de mediano tamaño como las proteínas β 2-microglobulina (14 kDa) o mioglobina (17 kDa) pueden atravesar la BFG en menor proporción. Por lo tanto, y para prevenir la pérdida desmesurada de líquido y solutos, el filtrado glomerular circula después por un sistema tubular que se encarga de la reabsorción selectiva de estas pequeñas moléculas (1). Este es el principal sistema responsable del mantenimiento del equilibrio de iones y agua en el plasma.

Como se ha indicado, el filtrado glomerular circula en el siguiente orden por el sistema tubular: el túbulo contorneado proximal, el asa descendente de Henle, el asa ascendente de Henle, el túbulo contorneado distal y el túbulo colector cortical. El túbulo contorneado proximal se encarga de la reabsorción del 65% del agua y el sodio filtrados. Esta población de células es de las más metabólicamente activas a nivel renal y exhibe un alto número de mitocondrias, que le permiten generar una mayor cantidad de ATP para hacer funcionar los transportadores activos de solutos (1). Entre ellos, destaca la bomba sodio-potasio ATPasa de la membrana basolateral que extrae 3 moléculas de sodio e introduce 2 de potasio y le permite a la célula proximal mantener el gradiente de sodio que hará funcionar los cotransportadores apicales. Asimismo, las células tubulares proximales cuentan con microvellosidades en el borde apical que se proyectan hacia la luz tubular y numerosos pliegues en la membrana basolateral que les permiten incrementar la superficie de intercambio tanto apical como basal (4). Además del 65% del agua y sodio, el túbulo contorneado proximal se encarga de reabsorber todos los aminoácidos y la glucosa filtrada en la luz tubular a través del cotransporte pasivo con sodio. Del mismo modo, también juega un papel crucial en la regulación del equilibrio ácido-base del cuerpo a través

1. INTRODUCCIÓN

de la secreción de hidrogeniones a la luz tubular mediante el intercambiador de sodio-hidrógeno tipo 3 (NHE3) y la regeneración del bicarbonato.

Tras atravesar el túbulo proximal, el flujo tubular alcanza el asa de Henle. Esta estructura se compone por un segmento fino que desciende hacia la médula renal, un segmento ascendente fino y un segmento ascendente grueso. El asa de Henle se encarga de reabsorber un 20% del agua y un 25% del sodio filtrado. Para ello, el segmento descendente es moderadamente impermeable a solutos y muy permeable al agua, mientras que el segmento ascendente es impermeable al agua. Además, se debe recordar que la médula renal tiene una elevada osmolaridad intersticial. A medida que el flujo tubular desciende el asa, el agua de la luz tubular sale al intersticio medular para tratar de igualar la osmolaridad entre ambos espacios. Los iones, por el contrario, no se desplazan de un espacio a otro porque apenas pueden atravesar el epitelio tubular en esta sección. De este modo, al alcanzar el bucle del asa, y antes de entrar en el segmento impermeable al agua, la luz tubular contiene una orina hipertónica muy rica en solutos, pero pobre en agua. A medida que el flujo tubular comienza ascender, como en este segmento el agua del intersticio no puede atravesar el epitelio tubular de vuelta a la luz, son los solutos los que lo atraviesan en un intento constante de igualar la osmolaridad a ambos lados. En esta función de reabsorción de iones, es especialmente importante el cotransportador apical $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ del asa ascendente gruesa que se ocupa de gran parte de la reabsorción de sodio de esta sección tubular. Así, al final del asa de Henle llega una orina ligeramente hipoosmolar.

El túbulo contorneado distal, mantiene las mismas propiedades que el asa ascendente de Henle: es impermeable al agua. En la primera porción del túbulo distal se encuentran un grupo de células tubulares especializadas en una estructura denominada mácula densa, que a través del sensado de la concentración de sodio y cloro en la luz tubular son capaces de determinar el flujo tubular y el filtrado glomerular en cada momento. Asimismo, estas células tienen el poder de regular el FG a través de las células yuxtaglomerulares con las que están en contacto (**Ver sección Introducción - La interacción túbulo-glomerular**). Tras atravesar este segmento regulador, en el resto del túbulo distal se reabsorbe un 5% del sodio filtrado con lo que la orina al final de este segmento es aún más hipotónica.

En la última porción del túbulo distal y en el túbulo colector cortical se regula la reabsorción del sodio y el agua restante en base al influjo hormonal que recibe este segmento. En esta sección del túbulo actúan tanto la aldosterona como la hormona antidiurética (ADH). La aldosterona incrementa la reabsorción de sodio de la luz tubular y aumenta la secreción de potasio en esta sección. Además, parte de este potasio secretado se reabsorbe de nuevo en un intercambio de potasio por hidrogeniones. Por lo tanto, la aldosterona incrementa la reabsorción de sodio y produce alcalosis e hipopotasemia para facilitar la secreción de potasio e hidrogeniones. Mediante la acción de la aldosterona puede reabsorberse hasta un 3% del sodio filtrado. Por otro lado, la ADH permite que este segmento tubular se vuelva permeable al agua, al inducir la translocación a la membrana de unos canales denominados acuaporinas. Una vez presentes en la membrana, el agua se difunde con facilidad y a favor del gradiente de concentración, dado que la orina en este segmento es hipoosmolar respecto al intersticio.

1.1.d. Regulación del filtrado glomerular

La tasa de filtración glomerular equivale al coeficiente de filtración de la propia BFG multiplicado por la presión transmembrana. Esta presión transmembrana es el resultado final de las diferentes fuerzas que actúan sobre la BFG y que incrementan o reducen la filtración glomerular. Así la presión hidrostática de los capilares glomerulares y la presión oncótica generada por las escasas proteínas presentes en la cápsula de Bowman favorecen el flujo de agua y solutos a través de la BFG. Por el contrario, la presión oncótica del plasma y la presión hidrostática de la cápsula de Bowman se oponen a la filtración glomerular (**Figura 1-3**).

1. INTRODUCCIÓN

$$\text{Filtrado glomerular} = K_f \times (P_G - P_B - \pi_G + \pi_B)$$

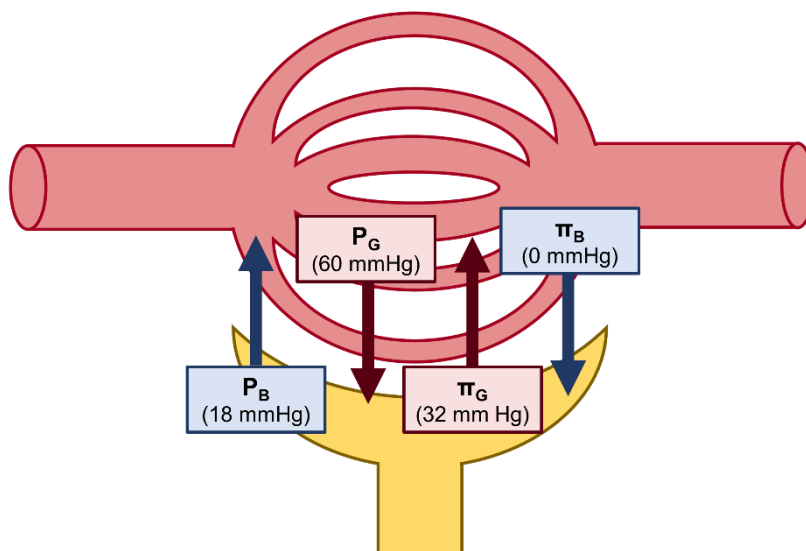


Figura 1-3 - Representación esquemática de las presiones que actúan sobre el glomérulo y que determinan el filtrado glomerular. En rojo oscuro se representan las fuerzas que dependen del flujo sanguíneo glomerular que son la presión hidrostática de la sangre (P_G) y la presión oncótica del plasma (π_G). En azul se representan las fuerzas que dependen del flujo urinario en la cápsula de Bowman que son la presión hidrostática de la orina (P_B) y la presión oncótica de la orina (π_B). En un glomérulo sano, como prácticamente no se filtran proteínas, y aquellas que se filtran no son de alto peso molecular, la presión oncótica de la cápsula de Bowman es cercana a 0 mmHg. El filtrado glomerular es el resultado de la multiplicación del coeficiente de filtración de la barrera (K_f) por el resultado neto de las presiones que actúan sobre ella.

Entre todas las fuerzas que actúan sobre el glomérulo, el filtrado glomerular se regula fundamentalmente a través de la variación de la presión hidrostática del penacho capilar (1). La sangre accede a los capilares glomerulares a través de la arteriola aferente y se drena por la arteriola eferente. Esto permite que la presión hidrostática glomerular pueda regularse bien modificando la entrada de sangre en la arteriola aferente o la salida de sangre en la arteriola eferente. La vasodilatación de la arteriola aferente incrementa el flujo sanguíneo que accede al glomérulo, lo que a su vez incrementa la presión hidrostática capilar y el filtrado. Por el contrario, la vasoconstricción de la arteriola aferente reduce de forma proporcional el filtrado glomerular. Asimismo, la vasodilatación de la arteriola eferente facilita el drenaje de sangre del penacho capilar reduciendo la presión hidrostática glomerular. Sin embargo, la vasoconstricción de la arteriola eferente tiene un efecto bifásico. En una primera fase, una vasoconstricción leve dificulta ligeramente la salida de la sangre de

1. INTRODUCCIÓN

los capilares glomerulares, incrementando la presión hidrostática y el filtrado. En cambio, en una segunda fase, una vasoconstricción severa que supere 3 veces el tono normal de la arteriola eferente, incrementa demasiado la presión hidrostática que de forma retrógrada dificulta la entrada de sangre al glomérulo y reduce el flujo sanguíneo renal. Este fenómeno, unido al mantenimiento continuo del proceso de filtración, incrementa la fracción de filtración renal y provoca que la presión oncótica dentro de los capilares glomerulares aumente mucho. Este importante aumento de la presión oncótica es el principal responsable de que se reduzca la filtración glomerular en esta segunda fase de vasoconstricción intensa (1).

En la regulación del tono de las arteriolas y la filtración glomerular participan el sistema nervioso simpático, mediadores paracrinos como la endotelina, las prostaglandinas, el óxido nítrico y otras moléculas con efecto local, así como una hormona denominada angiotensina II (Ang II). La Ang II es probablemente la hormona más importante en el mantenimiento de la presión hidrostática glomerular, es un potente vasoconstrictor renal e incrementa habitualmente en situaciones que cursan con hipotensión arterial o depleción de la volemia efectiva. La Ang II renal proviene de dos fuentes: la Ang II circulante, que también presenta efectos a nivel sistémico, y la Ang II producida a nivel local (5,6). El riñón cuenta con receptores para la Ang II en prácticamente todos sus vasos sanguíneos, y se ha descrito la presencia de estos receptores tanto en la arteriola aferente como en la eferente (1). No obstante, en la mayoría de situaciones en las que existe una disminución de la presión de perfusión renal, el efecto vasoconstrictor de la Ang II está limitado a la arteriola eferente. Esto se debe a que a pesar de que la Ang II también tiene efectos vasoconstrictores sobre la arteriola aferente, esta última está protegida por la secreción local de mediadores con efectos paracrinos como el óxido nítrico y las prostaglandinas. Así, en situaciones patológicas en las que disminuye la presión de perfusión renal, como en la deshidratación secundaria a una diarrea, la presión hidrostática glomerular se mantiene por una vasoconstricción renal de la arteriola eferente mediada por la Ang II y una vasodilatación de la arteriola aferente permitida por mediadores paracrinos.

Asimismo, la Ang II también participa activamente en la reabsorción de sodio y agua con el objetivo de mantener la volemia circulante y el FG. El incremento de la reabsorción de sodio mediado por la Ang II ocurre a través de varios mecanismos.

1. INTRODUCCIÓN

En primer lugar, la Ang II estimula la secreción de aldosterona que aumenta a su vez la reabsorción de sodio y la secreción de potasio en el túbulo colector cortical. En segundo lugar, la vasoconstricción de la arteriola aferente reduce la presión hidrostática de los capilares peritubulares e incrementa la fracción de filtración a nivel glomerular. Estos cambios producen que la sangre que accede a los capilares peritubulares circule más lentamente y con una presión oncótica elevada lo que facilita la reabsorción de sodio en el asa de Henle. Por último, la Ang II también incrementa directamente la reabsorción de sodio, actuando de forma preferencial sobre el túbulo proximal. Así, en las células tubulares proximales estimula la actividad de la bomba sodio-potasio ATPasa y del cotransportador sodio-bicarbonato ubicados en la membrana basolateral, que incrementarán el gradiente transcelular de sodio. Además, también promueve la expresión de intercambiador de sodio-hidrógeno tipo 3 (NHE3) en la membrana apical estimulando la reabsorción de sodio y la excreción de protones (7).

1.1.e. La interacción túbulo-glomerular

La nefrona, al actuar como unidad funcional renal independiente, cuenta con varios mecanismos que mantienen interconectadas sus diferentes estructuras. Uno de los mecanismos más estudiados es el denominado *feedback* túbulo-glomerular a través del cual el túbulo y el glomérulo interaccionan para regular tanto la filtración glomerular como el flujo de ultrafiltrado a través de la luz tubular. En esta interacción participan la mácula densa y las arteriolas aferente y eferente. La mácula densa se compone por un conjunto de células epiteliales tubulares especializadas ubicadas al inicio del túbulo distal y en contacto con ambas arteriolas glomerulares. Asimismo, en esta sección de la nefrona, las arteriolas están rodeadas por un grupo de células llamadas células yuxtglomerulares (**Figura 1-4**).

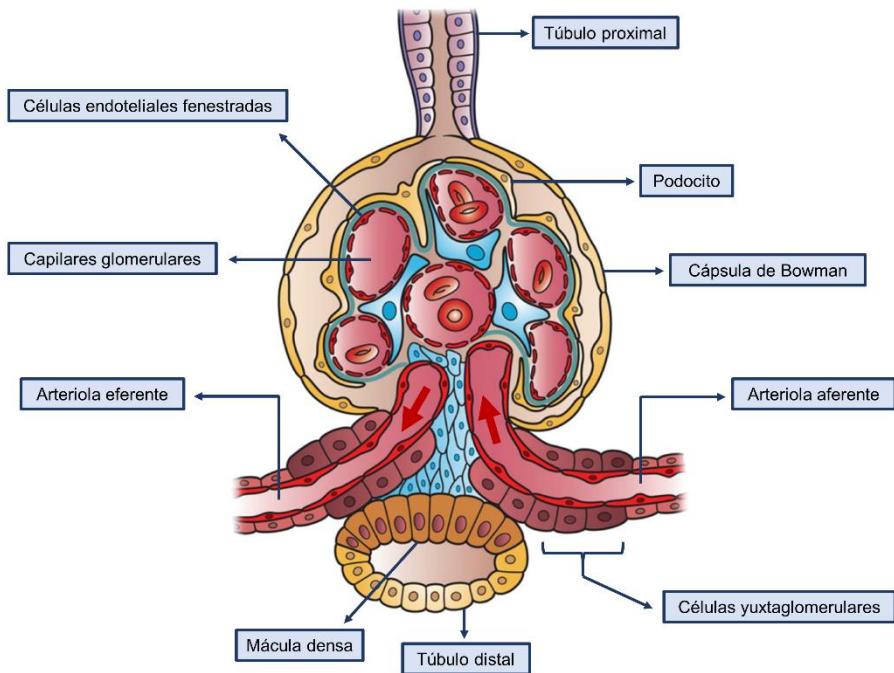


Figura 1-4 - Representación esquemática de la mácula densa y su relación con el glomérulo y las arteriolas aferente y eferente. El conjunto formado por la mácula densa y las células yuxtaloglomerulares componen una estructura denominada aparato yuxtaloglomerular.

Imagen creada con recursos visuales obtenidos de Wikimedia Commons (8). Adaptada de Fischer H.

La mácula densa es capaz de detectar el flujo urinario en la luz tubular distal. A pesar de que los mecanismos a través de los cuales lleva a cabo esta acción no están completamente establecidos, la principal teoría es que sus células especializadas son capaces de determinar la concentración de cloruro sódico (NaCl) que alcanza el túbulo distal (1). Así, en una situación en la que disminuye el filtrado glomerular, el flujo urinario a través de los primeros segmentos de la nefrona (túbulo proximal y asa de Henle) se ralentiza. Ello permite que los diferentes transportadores presentes en la membrana apical tengan un mayor tiempo para llevar a cabo la reabsorción de cloruro sódico del ultrafiltrado plasmático, disminuyendo el débito de cloro y sodio a la mácula densa. Esta disminución de la concentración de NaCl es detectada por la mácula densa que activa varios mecanismos. Por un lado, provoca una vasodilatación de la arteriola aferente que incrementa la presión hidrostática glomerular y el filtrado. Por otro lado, la mácula densa activa las células

1. INTRODUCCIÓN

yuxtaglomerulares que liberan renina (**Figura 1-5**). La renina liberada al torrente sanguíneo convierte el angiotensinógeno circulante en angiotensina I (Ang I) que a su vez se convertirá en Ang II que, entre otros efectos, producirá una vasoconstricción de la arteriola eferente como se describía previamente.

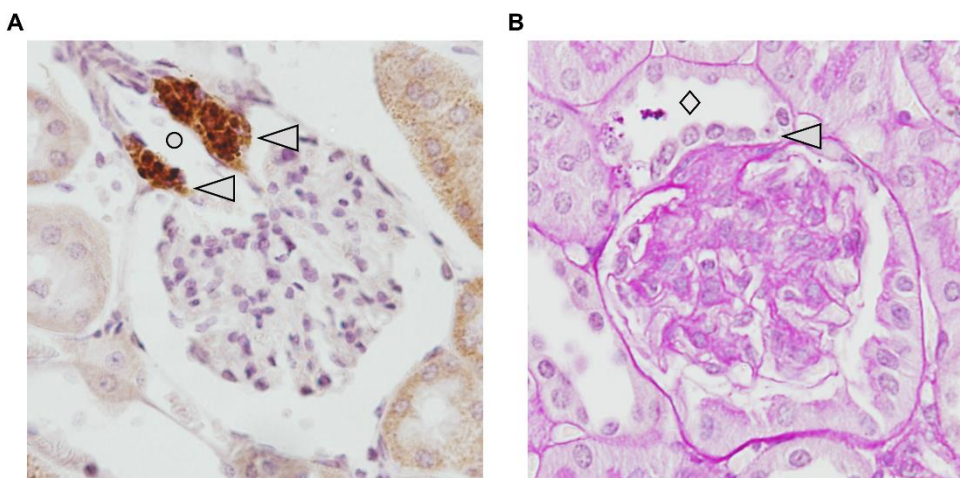


Figura 1-5 - Microfotografías de glomerulos murinos que muestran el aparato yuxtaglomerular. Imágenes obtenidas del presente estudio. Se muestra una imagen de una tinción inmunohistoquímica de renina y una tinción de PAS. **A:** Microfotografía obtenida a 40 aumentos de un glomérulo teñido con IHQ de renina, que muestra las células yuxtaglomerulares con los gránulos de secreción de renina rodeando una arteriola renal (flechas: células yuxtaglomerulares; ○: arteriola renal); **B:** Microfotografía obtenida a 40 aumentos de un glomérulo teñido con PAS que muestra como el glomérulo contacta con el túbulo contorneado distal y la disposición de las células de la mácula densa (flechas: células de la mácula densa; ◇: túbulo contorneado distal).

De forma inversa, si el débito de NaCl a la mácula densa incrementa, esta incrementará el tono vascular de la arteriola aferente y frenará la secreción de renina. Así, variaciones en la presión arterial sistémica, que podrían incrementar o disminuir de forma considerable el FG, apenas modifican el mismo a través del *feedback* túbulo-glomerular.

1.1.f. El SRA y su participación en la regulación renal

En los mecanismos de regulación renal, se ha comentado que la Ang II es un importante regulador del filtrado glomerular y de la reabsorción de sodio. Esta hormona es uno de los diferentes mediadores que conforman el sistema renina-

1. INTRODUCCIÓN

angiotensina (SRA). El SRA es un conjunto de hormonas que actúan coordinadas y cuya función principal es la regulación de la presión arterial y del balance hidrosalino corporal. Este sistema es, por tanto, clave en la modulación de las resistencias vasculares y de la función renal (9).

Desde el descubrimiento del primer elemento del eje en 1898: la renina (10), hasta la actualidad, el conocimiento del SRA ha ampliado considerablemente. De hecho, hasta 1988 se pensaba que la Ang II era la única hormona en este eje. Sin embargo, en ese mismo año Santos y cols. descubrieron un segundo péptido, la angiotensina (1-7) (Ang-(1-7)) que se formaba a partir de la Ang I y que también interviene en la señalización intercelular (11). A partir de este punto, varios autores denominaron a aquellos primeros mediadores el SRA clásico, mientras que los nuevos elementos del eje descubiertos pasaron a formar parte del SRA no clásico (12). Actualmente, y para prevenir errores, es mejor denominar a cada segmento de este sistema por su mediador hormonal y receptor concretos.

El SRA clásico se compone por el enzima conversor de angiotensina (ECA), la angiotensina II (Ang II) y los receptores de Ang II de tipo 1 (AT₁R). El eje se inicia con la producción de angiotensinógeno (AGT) a nivel hepático, aunque también se ha descrito su producción en otros órganos incluido el riñón (13–15). Este AGT circula por el plasma en su forma inactiva hasta que la renina lo convierte en una forma activa. La renina es una aspartil-proteasa cuya función principal es activar en AGT mediante la eliminación de los 10 aminoácidos del extremo N-terminal. Como resultado se forma un intermediario del eje conocido como angiotensina I (Ang I). Este enzima es el primer paso limitante del SRA y de su función depende la activación o no de todo el eje renina-angiotensina-aldosterona (**Figura 1-6**). En situaciones fisiológicas la renina se secreta por las células yuxtglomerulares que se encuentran en la capa media de la arteriola aferente. No obstante, en situaciones patológicas en las que la secreción de renina está aumentada se observan gránulos de secreción de renina en otras localizaciones como la arteriola eferente o el mesangio extraglomerular (14,16). La renina se libera fundamentalmente ante dos estímulos, que traducen una caída de la presión de perfusión renal: 1.-la estimulación de los propios baroreceptores de la arteriola aferente al caer la presión sanguínea en dicha

1. INTRODUCCIÓN

arteriola (17), o 2.-un menor débito de NaCl a la mácula densa (**Ver sección Introducción - La interacción túbulo-glomerular**) (18).

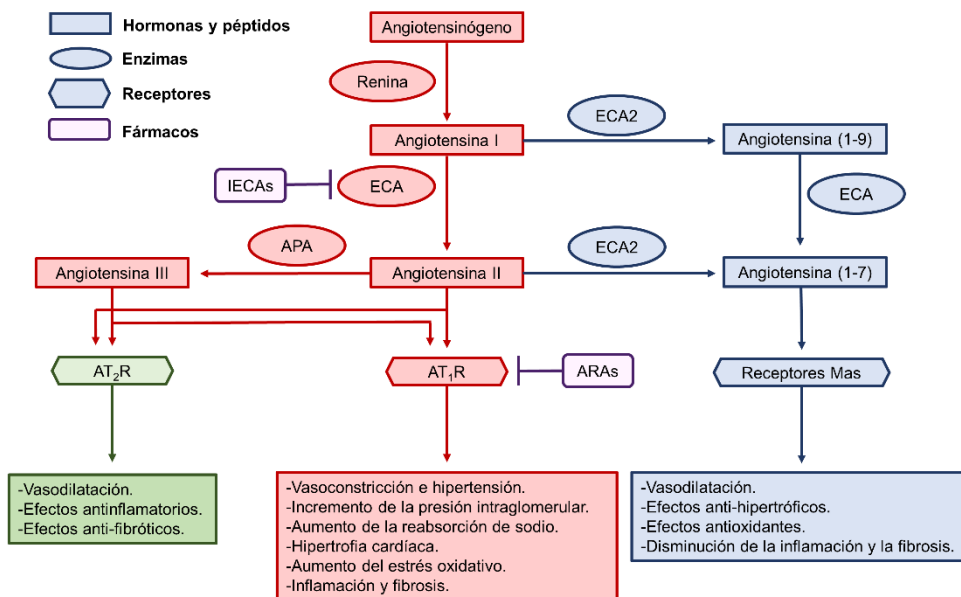


Figura 1-6 - Sistema renina-angiotensina y sus elementos. La presente figura muestra los diferentes péptidos, enzimas y receptores que conforman el sistema renina-angiotensina clásico y no clásico.

La Ang I circulante al atravesar la red capilar pulmonar se transforma en angiotensina II (Ang II) por acción del enzima conversor de angiotensina (ECA) (**Figura 1-6**). Esta última es el verdadero metabolito activo del eje y tiene importantes efectos vasopresores al unirse a los receptores AT₁R (14). Cabe mencionar que, aunque clásicamente se consideraba que la Ang I sólo se transformaba en Ang II a nivel pulmonar, el avance en el conocimiento del SRA ha demostrado que existe expresión de componentes de este eje en otros órganos (15). Así, al igual que ocurría con el AGT, el riñón expresa otros elementos del SRA como la ECA, que es capaz de convertir a la Ang I en Ang II para que actúe a nivel local. La Ang II realiza sus acciones principales sobre los receptores AT₁R que tiene una elevada expresión en vasos sanguíneos, riñón o corazón. A corto plazo, la Ang II produce vasoconstricción, hipertensión, incremento de la presión glomerular e hiperfiltración, así como aumento de la reabsorción de sodio. Estos efectos permiten mantener la volemia circulante y la presión arterial (**Figura 1-6**). No obstante, si se mantienen en el tiempo son deletéreos y se asocian a una hipertrofia miocárdica, mayor inflamación e incremento

de fibrosis de diferentes órganos (15). En cualquier caso, y como se ha comentado previamente, la Ang II es una hormona esencial en el mantenimiento del filtrado glomerular actuando a través del eje ECA/Ang II/ AT₁R.

Otros receptores sobre los que puede actuar Ang II son los AT₂R, aunque estos son mucho menos ubicuos que los primeros. Curiosamente, los AT₂R tienen acciones opuestas a los receptores AT₁R y en diferentes estudios han demostrado efectos vasodilatadores, antiinflamatorios y antifibróticos (19,20).

A partir de 1990, se empezó a categorizar con precisión un segundo eje del SRA: el eje ECA₂/Ang-(1-7)/Mas. En el año 2000 se descubre una enzima que comparte una homología del 42% con el ECA y que se denomina ECA₂ por este motivo (21,22). Al igual que ECA, esta es una metaloproteasa transmembrana dependiente de zinc, aunque también se han identificado formas solubles (23). Su principal función descrita es la generación de péptidos alternativos de angiotensina, fundamentalmente mediante la conversión de Ang II en Ang-(1-7) y de Ang I en Ang-(1-9) (**Figura 1-6**). Así, mientras ECA genera Ang II eliminando el dipéptido His-Leu del extremo C-terminal, ECA₂ cataliza la conversión de esta Ang II en Ang-(1-7) eliminando el residuo de fenilalanina de ese mismo extremo C-terminal. Además, ECA₂ también es capaz de transformar la Ang I en Ang-(1-9), que a su vez se puede transformar en Ang-(1-7) por acción del ECA (24). La Ang-(1-7) actúa a través de receptores los receptores Mas acoplados a proteínas G y presenta efectos opuestos a los del eje ECA/Ang II/ AT₁R (25). La activación de los receptores Mas, incrementa la generación de óxido nítrico y prostaglandinas, produce vasodilatación y tiene efectos antiinflamatorios y antifibróticos. Así, el eje no-clásico ECA₂/Ang-(1-7)/Mas permite eliminar la Ang II y contrarrestar los efectos de la activación del SRA clásico. Se cree que este eje juega un papel crucial a nivel local protegiendo a los tejidos del exceso de Ang II (19).

1.2. LA NEFROPATÍA DIABÉTICA

Según la Federación Internacional para la Diabetes, en el año 2019 se estimaba que en el mundo 463 millones de adultos entre 20 y 79 años eran diabéticos, lo que

1. INTRODUCCIÓN

supone una prevalencia del 9,3% en este rango de edad (26). Además, se prevé que para el año 2030 este número haya incrementado 100 millones, con aproximadamente 578 millones de casos diagnosticados entre los 20 y 79 años. La prevalencia de la diabetes incrementa año tras año, principalmente debido a un incremento de los casos de diabetes tipo 2, estrechamente relacionados con el incremento simultáneo de la obesidad y el síndrome metabólico (27).

Igualmente, la mayor prevalencia de diabetes va asociada a un incremento de la comorbilidad relacionada con esta patología. Las complicaciones crónicas de la diabetes fundamentalmente derivan de la lesión que sufren las células endoteliales y los vasos sanguíneos por la exposición a las concentraciones elevadas de glucosa (28). Se distinguen dos grandes grupos de complicaciones diabéticas basadas en el tamaño de los vasos sanguíneos afectados: las macrovasculares y las microvasculares. Las complicaciones macrovasculares, como indica el nombre, afectan a vasos de mayor tamaño que se pueden identificar macroscópicamente. En este grupo se incluyen 3 grandes comorbilidades: 1.-la cardiopatía isquémica, secundaria a la afectación de las arterias coronarias, 2.-la isquemia cerebral, secundaria a la lesión de las arterias cerebrales, y 3.-la arteriopatía periférica, debida habitualmente a un compromiso del flujo a las extremidades inferiores (28). En cuanto a las complicaciones microvasculares, estas son secundarias a la lesión de las pequeñas arterias, arteriolas y redes capilares del organismo. Este grupo engloba otras 3 comorbilidades frecuentes en la diabetes: 1.-la retinopatía diabética, debida a la afectación de las arterias retinianas, 2.-la neuropatía diabética, secundaria a la lesión de la *vasa nervorum* y la consecuente isquemia de los nervios, y 3.-la enfermedad renal diabética (ERD). A pesar de que las complicaciones microvasculares son más frecuentes que las macrovasculares, estas últimas son la principal causa de muerte en pacientes con diabetes tanto tipo 1 como tipo 2 (28,29). La retinopatía diabética es la complicación más frecuente de la diabetes con una prevalencia estimada en torno al 35% (30), aunque es seguida de cerca por la nefropatía diabética con una prevalencia entre el 30 y el 50% como se indica más adelante (31).

Por otra parte, si las complicaciones CV suponen la primera causa de muerte en el paciente diabético, las complicaciones microvasculares son responsables de la

importante morbilidad y gasto sanitario asociado a la diabetes. Entre estas, la enfermedad renal diabética (ERD) es la más debilitante para el sistema sanitario, ya que se trata de la comorbilidad que mayor gasto asistencial genera (32). En un análisis de la población suscrita al seguro de salud *Medicare Advantage* realizado en EEUU, presentar una ERD diabética avanzada en estadios 4 o 5 suponía un incremento del gasto en 12 meses de seguimiento de 33.131 y 106.975 dólares respectivamente respecto a pacientes diabéticos sin ERD (33). Este incremento tan importante del gasto en la ERD avanzada venía derivado básicamente de la necesidad de terapia renal sustitutiva (TRS) y del incremento del número de consultas médicas. Por este motivo, el desarrollo de herramientas terapéuticas que permitan prevenir o enlentecer las complicaciones derivadas de la diabetes se está transformando en un objetivo crucial para el sistema sanitario de muchos países.

1.2.a. Definición de enfermedad renal diabética y nefropatía diabética

El diagnóstico de la ERD es clínico. Aquellos pacientes con diabetes conocida y que presenten en dos determinaciones con 3 meses o más de diferencia: 1.-una elevación de la excreción urinaria de albúmina con un CAC ≥ 30 mg/g, o 2.-una disminución del filtrado glomerular estimado por debajo de 60 mL/min/1,73 m² de superficie corporal, serán diagnosticados de ERD (34). Este es un término poco específico que puede albergar un amplio número de patologías renales bajo una misma definición. Por ejemplo, un paciente obeso mórbido e hipertenso con una ERC estadio 3 sin seguimiento médico especializado, que posteriormente desarrolla diabetes, podría ser diagnosticado de ERD. Sin embargo, en el caso de su enfermedad renal probablemente hayan participado más la propia la obesidad y la lesión microvascular producida por la hipertensión, que la diabetes en sí misma. Así, se deben tener en cuenta las limitaciones del concepto ERD y no asumir que toda lesión renal en el paciente diabético es consecuencia de la diabetes (27).

La única forma de tener un diagnóstico de certeza que confirme que la diabetes es la causa de la lesión renal es mediante una biopsia de riñón. La afectación renal diabética presenta unas características distintivas de otras patologías renales que habitualmente son diagnósticas del proceso (35). En los casos en los que se confirma el diagnóstico a nivel histológico, nos referimos a la enfermedad renal diabética como

1. INTRODUCCIÓN

nefropatía diabética. Es decir, el término nefropatía diabética se reserva para aquellas enfermedades renales secundarias a la diabetes que tengan una confirmación histológica.

El glomérulo es la estructura renal clásicamente descrita como afectada en la diabetes. En estadios iniciales se observa un engrosamiento de la MBG en muchos casos sólo reconocible mediante el uso de microscopía electrónica. A medida que progresa la enfermedad, se empieza a apreciar un ensanchamiento progresivo del mesangio a expensas de matriz mesangial. Este depósito de matriz mesangial puede ser severo y en ocasiones puede llegar a producir los denominados nódulos de Kimmelstiel-Wilson (**Figura 1-7**). Estas lesiones son nódulos PAS-positivos compuestos por matriz extracelular y que también tiñen a nivel histológico con la plata-metenamina de Jones. A pesar de que son muy característicos de la nefropatía diabética, también se pueden identificar en nefropatías hipertensivas o en la afectación por la hipercolesterolemia (35,36). Por otro lado, aunque la afectación glomerular predomina en la nefropatía diabética clásica, también existen formas de nefropatía diabética en las que predomina la lesión túbulo-intersticial. Estas formas son más frecuentes en pacientes con diabetes tipo 2, donde los cambios patológicos renales pueden ser heterogéneos como consecuencia de la interacción de varias comorbilidades como la diabetes, la hipertensión o la obesidad (35).

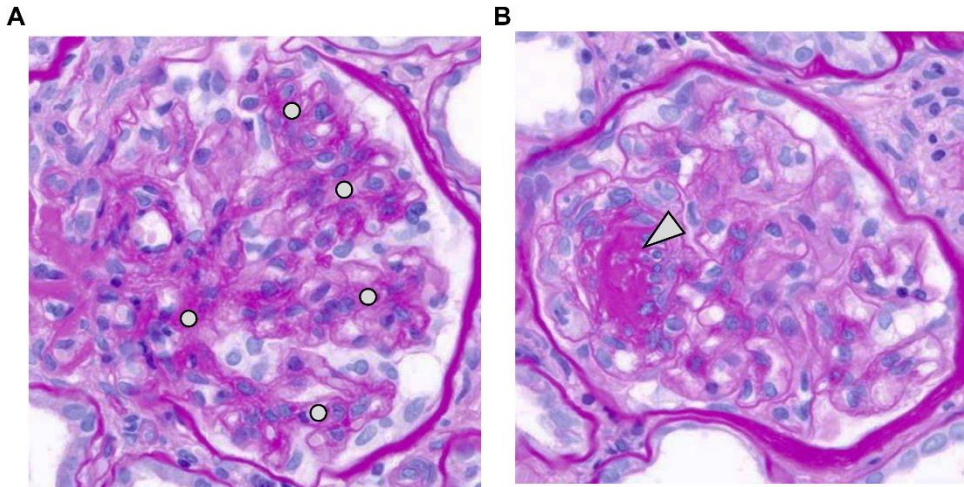


Figura 1-7 - Microfotografías de glomérulos humanos que muestran lesiones típicas de la nefropatía diabética. Se muestran dos imágenes de glomérulos teñidos con tinción de PAS que resaltan la matriz mesangial en color morado. **A:** microfotografía renal que muestra la expansión de la matriz mesangial (○: áreas de expansión de matriz mesangial que asocian incremento del mesangio); **B:** microfotografía de un glomérulo que con glomerulosclerosis nodular (flecha: nódulo de Kimmelstiel-Wilson).

Imagen creada con recursos visuales obtenidos de Wikimedia Commons (8).

Con el objetivo de no sólo diagnosticar sino de clasificar la severidad histológica de la nefropatía diabética de una forma uniforme, en el año 2010 Tervaert y cols. crearon una clasificación de la nefropatía diabética ampliamente utilizada actualmente (36). Esta clasifica las lesiones glomerulares en 4 clases, siendo la clase I la más leve y la clase IV la más severa. Además, incluye una evaluación vascular y del intersticio con dos escalas complementarias. Así, la biopsia renal de un paciente diabético no sólo nos permite alcanzar el diagnóstico, sino que nos aporta información sobre la severidad de las lesiones diabéticas.

Al igual que se clasifica la severidad histológica de la nefropatía diabética, se puede estratificar el riesgo CV y de progresión de la ERD. Para ello, en la práctica clínica se emplean las guías KDIGO de diabetes en ERC recientemente publicadas (37). Estas guías basan la clasificación clínica en las guías previas del año 2013 que proponían un sistema de clasificación de la ERC (38). Así, por un lado en base al FG se distinguen 5 estadios o categorías: el estadio 1 con $FG \geq 90$ mL/min/1,73 m², el estadio 2 con FG entre 60 y 89 mL/min/1,73 m², el estadio 3, que se subdivide en estadio 3a con un FG entre 45 y 59 mL/min/1,73 m² y estadio 3b con un FG entre 30

1. INTRODUCCIÓN

y 44 mL/min/1,73 m², el estadio 4 con un FG entre 15 y 29 mL/min/1,73 m² y el estadio 5 con un FG menor de 15 mL/min/1,73 m² (**Tabla 1-1**).

Tabla 1-1 - Categorías de filtrado glomerular. Se muestran las categorías de filtrado glomerular propuestas por las guías KDIGO que también se aplican a otras causas de ERC (37,38).

Categoría	Filtrado glomerular (mL/min/1,73 m ²)
Estadio 1	≥90
Estadio 2	60-89
Estadio 3a	45-59
Estadio 3b	30-44
Estadio 4	15-29
Estadio 5	<15

Del mismo modo, la albuminuria persistente se clasifica en tres categorías: la albuminuria A1 con una excreción urinaria de albúmina menor de 30 mg/24 horas, la albuminuria A2 con una excreción entre 30 y 300 mg/24 horas y la albuminuria A3 con una excreción mayor de 300mg/24 horas (**Tabla 1-2**). Dado que en la práctica clínica habitual la recogida de orina de 24 horas es compleja y no siempre se realiza de forma adecuada, la excreción urinaria en 24 horas puede sustituirse por el cociente albúmina/creatinina (CAC) de una orina espontánea de primera hora de la mañana. En pacientes con excreción urinaria de proteínas menor a 3 gramos en 24 horas, este cociente se aproxima mucho al verdadero valor de excreción urinaria de albúmina en 24 horas (**Tabla 1-2**) (39).

Tabla 1-2 - Categorías de albuminuria. Se muestran las categorías de albuminuria propuestas por las guías KDIGO, que son aplicables para la clasificación tanto de enfermedad renal diabética como enfermedad renal por otras causas (37,38).

Categoría	Excreción urinaria de albúmina (mg/24h)	Cociente albúmina/creatinina (mg/g) -Equivalente a la excreción en 24h-
A1	<30	<30
A2	30-300	30-300
A3	>300	>300

Tradicionalmente, a la pérdida entre 30 y 300 mg de albúmina en orina de 24 horas se le denominó microalbuminuria, mientras que la pérdida de albúmina >300mg/24h se definió como macroalbuminuria. Ambos términos pueden dar lugar a confusión, ya que el término microalbuminuria, por ejemplo, induce a pensar que la albúmina que

se pierde en orina es de menor tamaño, cuando no es así (3). De esta forma, los nuevos términos propuestos por las guías KDIGO han desplazado los antiguos y actualmente la albuminuria debería clasificarse en las categorías A1 (normoalbuminuria), A2 (microalbuminuria) y A3 (macroalbuminuria).

La conjunción de la categoría en filtrado glomerular unida a la categoría de albuminuria permite entonces estratificar el pronóstico de la ERD. A menor filtrado glomerular o mayor albuminuria peor pronóstico, tanto por un incremento de la mortalidad como por un mayor riesgo de progresión de la propia ERD (38). Así, el mayor riesgo, no tanto por progresión de la enfermedad renal, sino por una mortalidad de cualquier causa incrementada de forma exponencial es para el grupo con ERD estadio 5 y albuminuria A3 (**Figura 1-7**) (38).

		Categorías de albuminuria		
		A1	A2	A3
Categorías del filtrado glomerular	Estadio 1	Bajo o nulo*	Moderado	Alto
	Estadio 2	Bajo o nulo*	Moderado	Alto
	Estadio 3a	Moderado	Alto	Muy alto
	Estadio 3b	Alto	Muy alto	Muy alto
	Estadio 4	Muy alto	Muy alto	Muy alto
	Estadio 5	Muy alto	Muy alto	Muy alto

Figura 1-8 - Clasificación del pronóstico de la enfermedad renal diabética propuesto por las guías KDIGO. El pronóstico se establece a través de la evaluación clínica del filtrado glomerular y la albuminuria que para considerarse diagnósticas deben ser persistentes durante 3 meses o más.

*Si no se evidencia ninguna otra alteración renal (histología compatible con nefropatía diabética, alteraciones estructurales renales en pruebas renales, alteraciones del sedimento) el paciente no tiene una enfermedad renal diabética.

1.2.b. Diabetes, enfermedad renal crónica y riesgo vascular

La diabetes es actualmente la primera causa de ERC en el mundo seguida de la hipertensión, aunque la glomerulonefritis crónica (probablemente por infecciones y tóxicos) sigue siendo una causa importante en países en vías de desarrollo (40). Además, la diabetes también es la primera causa de ERC avanzada e inicio de TRS (32). De hecho, la diabetes tipo 2 está presente en más del 50% de los pacientes que inician TRS (32). Según el Registro Español de Enfermos Renales, en España casi

1. INTRODUCCIÓN

un 26% de los pacientes que iniciaron TRS en el año 2019 lo hicieron como consecuencia de una ERD avanzada y la incidencia de esta última está incrementando en los últimos años (41).

En cuanto a la prevalencia de ERD en pacientes con diabetes, esta varía entre los pacientes con DM tipo 1 y tipo 2 (31). Aproximadamente la mitad de los pacientes con diabetes tipo 2 tiene ERD bien por la presencia persistente de albuminuria o por la disminución del FG (32). En un análisis del estudio DEMAND que incluía pacientes con DM tipo 2 de 33 países un 49% presentaba albuminuria y un 22% un FG menor de 60 mL/min/1,73 m² (42). Del mismo modo, otro análisis del estudio UKPDS en población británica con diabetes tipo 2 mostró tras 15 años de seguimiento que un 38% desarrollaba albuminuria y un 29% disminución del FG (43). En la diabetes tipo 1, por el contrario, la prevalencia de ERD no es tan elevada y se estima en torno al 30% (44,45). Además, la incidencia de la misma está disminuyendo en algunas series, probablemente por las mejoras en el diagnóstico y tratamiento de los pacientes con DM tipo 1.

La diabetes comporta un elevado riesgo cardiovascular (CV) y es considerada un factor de riesgo independiente de mortalidad por este motivo (46). Así, los pacientes diabéticos tienen entre 2 y 6 veces más riesgo de morir por causas CV (46–48). En un estudio en EEUU que incluía a 4.875 pacientes a los que se les realizó seguimiento durante 7-5 años, la diabetes incrementó la mortalidad CV 3,2 veces en hombres y 8,5 veces en mujeres (49). La asociación de la diabetes a la ERD incrementa este riesgo de forma sinérgica. En otro trabajo realizado por Afkarian y cols. en 15.046 pacientes estadounidenses a partir de la encuesta de salud NHANES III, la mortalidad por cualquier causa en pacientes sin diabetes era del 7,7%. En pacientes con diabetes esta mortalidad se incrementó 11,5%, mientras que la mortalidad en pacientes diabéticos y enfermedad renal era 3 veces mayor y alcanzaba un 31,1% (50). En otro estudio realizado a partir del UKPDS en pacientes con DM tipo 2, la severidad de la ERD era un importante condicionante de la tasa de mortalidad anual. Así, pacientes diabéticos sin nefropatía tenían una tasa de mortalidad anual de 1,4%. En los pacientes con microalbuminuria (equivalente a la actual categoría A2) la mortalidad anual ascendía a 3,0%, mientras que en los que presentaban macroalbuminuria la tasa era de 4,6%. Además, en los pacientes que

presentaban elevación de la creatinina plasmática esta tasa incrementaba de forma muy significativa hasta el 18,9% (51). Estos hallazgos demuestran que el incremento de la mortalidad y del riesgo CV se concentra especialmente en la población diabética con ERD, que tiene incluso más riesgo de mortalidad que de progresión a la enfermedad renal avanzada (51).

1.2.c. Mecanismos patológicos implicados en la nefropatía diabética

Son muchos y complejos los mecanismos implicados en el desarrollo de la nefropatía diabética. La hiperglucemia crónica podría considerarse el eje etiopatogénico del proceso que conduce al daño renal, la aparición de albuminuria y la pérdida progresiva del filtrado glomerular. A efectos prácticos, y también para facilitar su abordaje, podríamos clasificar las vías que contribuyen al daño diabético renal en dos grandes grupos: la vía hemodinámica y la vía metabólica (**Figura 1-9**) (52). Ambas actúan de manera simultánea.

1. INTRODUCCIÓN

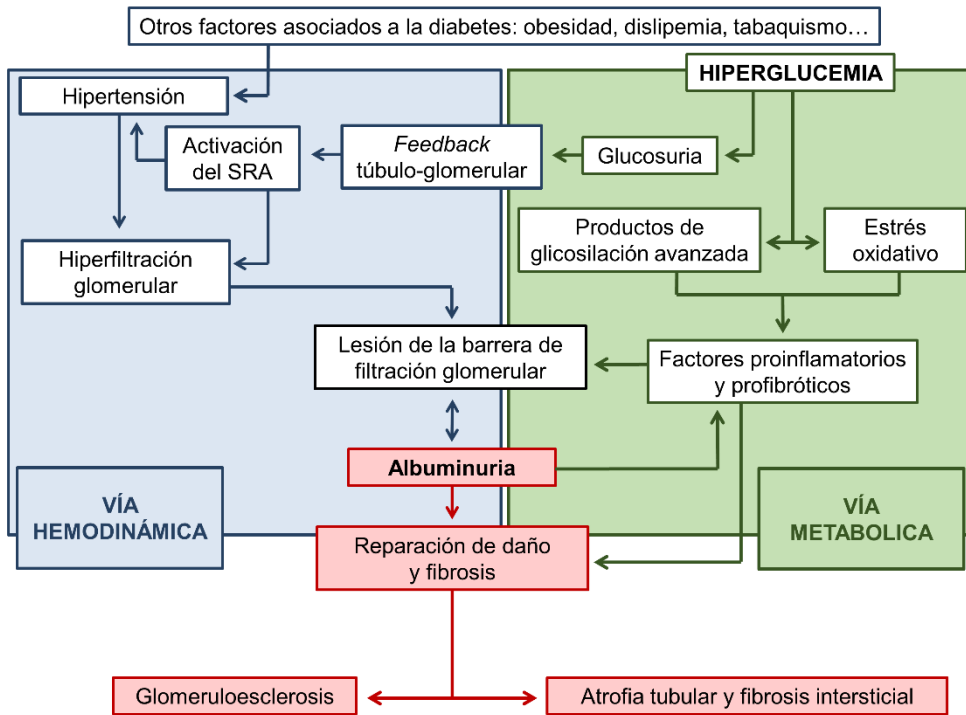


Figura 1-9 - Mecanismos fisiopatológicos implicados en la nefropatía diabética.

Partiendo de la hiperglucemia como eje etiopatogénico del proceso (esquina superior derecha), se distribuyen los mecanismos patogénicos en dos grandes grupos: la vía metabólica (verde) y la vía hemodinámica (azul). La primera depende de la toxicidad celular mediada por la propia hiperglucemia, mientras que la segunda depende de los cambios hemodinámicos renales que induce la hiperglucemia a nivel renal.

La vía metabólica se debe a la exposición de las células a las elevadas concentraciones de glucosa (31). El incremento del flujo de glucosa al interior de las células incrementa el estrés oxidativo y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (**Figura 1-9**). La mayor disponibilidad de glucosa estimula la glucólisis y la cadena de respiración mitocondrial. Esta última es una fuente de ROS y especialmente de superóxidos (31,53). Además, la hiperglucemia es capaz de activar unas enzimas denominadas NADPH oxidasas y que también son responsables de la producción de especies reactivas de oxígeno (54). El incremento de ROS inhibe a su vez la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), bloqueando la glucólisis en células previamente expuestas a una hiperglucemia crónica (55). Este bloqueo de la GAPDH dirige el metabolismo de la glucosa hacia otras vías como la de los polioles o la de las hexosaminas (53). Además, el bloqueo de la GAPDH también estimula la proteína quinasa C (PKC) (53). La activación de estas vías

1. INTRODUCCIÓN

contribuye a la secreción de factores proinflamatorios y profibróticos como el factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) o el factor nuclear κB (NF- κB) que, unidos al daño oxidativo, conducirán a la apoptosis celular, inflamación y posterior fibrosis. Por otro lado, el incremento de ROS en contexto de hiperglucemia facilita la glicosilación no enzimática de otras moléculas intracelulares como proteínas, lípidos o ácidos nucleicos dando lugar a la aparición de los denominados productos finales de la glucosilación avanzada (AGEs) (**Figura 1-9**). Estos también son capaces de estimular la secreción de factores proinflamatorios como el NF- κB (53).

La lesión celular derivada de la hiperglucemia va alterando progresivamente la arquitectura renal. El daño endotelial conduce, por ejemplo, a una lesión microvascular que reduce el flujo sanguíneo a diferentes estructuras como el túbulo renal, desencadenando una situación de hipoxia. Dado que las células tubulares proximales en la diabetes presentan un incremento de la actividad metabólica, entre otros motivos por la necesidad de reabsorber la glucosa filtrada, tienen un mayor consumo de oxígeno y son especialmente susceptibles tanto a la hipoxia como a la lesión celular derivada de esta última (31). Por otro lado, la exposición de los podocitos a la hiperglucemia o a otros factores liberados en el contexto diabético como TGF- $\beta 1$ o factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), provoca cambios patológicos en estas células como la reorganización del citoesqueleto, la retracción celular o la pérdida de los pedicelos y las hendiduras de filtración (31,56). Si la lesión progresa, el daño puede conducir a la apoptosis de los podocitos y a que estos se desprendan del glomérulo. Asimismo, la hiperglucemia también conduce a la pérdida de los glucosaminoglicanos de la membrana basal glomerular, lo que reduce la carga negativa de esta última, que es necesaria para mantener las moléculas electronegativas como las proteínas en el interior del compartimento plasmático (3). Estas últimas alteraciones, afectan a la integridad de la BFG, que pierde su permeabilidad selectiva, permitiendo el paso moléculas más grandes e incrementando la albuminuria.

En cuanto a la vía hemodinámica, la glucosuria secundaria a la hiperglucemia aumenta la reabsorción de glucosa junto con sodio a nivel tubular proximal, lo que disminuye el débito de este último al túbulo contorneado distal. La mácula densa, interpreta esta disminución del NaCl a nivel tubular como un descenso del filtrado y

1. INTRODUCCIÓN

produce una vasodilatación de la arteriola aferente y un incremento de la secreción de renina. El incremento de la secreción de renina estimula el SRA y la producción de Ang II. Esta última es responsable de la vasoconstricción de la arteriola eferente, que, unida a la vasodilatación de la aferente, incrementa la presión intraglomerular produciendo hiperfiltración (**Figura 1-9**) (3,57). La activación del SRA, unida a otros factores más frecuentemente relacionados con la diabetes tipo 2 como la obesidad o la resistencia insulínica, facilitan la aparición de hipertensión sistémica, que incrementa el riesgo de progresión de la enfermedad renal diabética.

1.3. TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD RENAL DIABÉTICA

El abordaje del paciente diabético debería ser multidisciplinar siempre que sea posible y especialmente si el paciente presenta complicaciones derivadas de la diabetes. Asimismo, un adecuado tratamiento de la diabetes exige también una correcta prevención primaria mediante la promoción de un estilo de vida saludable y un diagnóstico precoz en el caso de que se desarrolle la diabetes.

En cuanto al tratamiento específico del paciente con ERD, hasta la fecha esta puede dividirse en 4 grandes áreas: control de los factores de riesgo CV modificables (tabaquismo, dislipemia, obesidad...), control glucémico, control de la presión arterial y bloqueo del SRA (58). Además, en la última década nuevos grupos farmacológicos como los inhibidores del cotransportador de sodio-glucosa tipo 2 (iSGLT2) o los agonistas del receptor GLP-1 (GLP-1 RA) suponen prometedoras herramientas dentro del espectro de tratamientos frente a la ERD (59).

Por su relevancia para el actual trabajo, se describirán con mayor detenimiento la importancia del bloqueo del SRA en la ERD, los prometedores resultados obtenidos con los iSGLT2 y la experiencia existente hasta la fecha con los antagonistas selectivos del receptor de endotelina (ARE).

1.3.a. Impacto de los IECAs y los ARA2 en la enfermedad renal diabética

A pesar de que el control estricto de la presión arterial y la glucemia por sí mismas ha demostrado proteger frente a la hiperfiltración diabética y la pérdida progresiva del FG (60), dentro de los grupos farmacológicos disponibles para tratar la presión arterial los inhibidores del enzima conversor de angiotensina (IECAs) y los antagonistas del receptor tipo 1 de la angiotensina II (ARA2) mostraron mayores beneficios frente a otros grupos (58). Estos beneficios son más evidentes en pacientes con ERD establecida, especialmente si es proteinúrica, que en pacientes diabéticos que no presentaban nefropatía previa. Así, en la prevención de la aparición de microalbuminuria los IECAs y los ARA2 han mostrado resultados dispares. En el estudio HOPE (*Heart Outcomes Prevention Evaluation*), por ejemplo, en pacientes diabéticos sin enfermedad renal el tratamiento con 10 mg/día de ramipril no mostró eficacia en la prevención de la microalbuminuria, pero sí redujo el riesgo de desarrollar ERD franca (establecida como albuminuria A3 o proteinuria mayor de 500mg en 24 horas) (61). En el estudio BENEDICT (*BErgamo NEphrologic Diabetes Complications Trial*), por el contrario, el control estricto de la presión arterial y el tratamiento con IECAs se asociaron ambos de forma independiente a la reducción de la aparición de microalbuminuria en pacientes diabéticos tipo 2 sin albuminuria previa (62).

Independientemente de si son capaces de prevenir en mayor o menor medida la aparición de microalbuminuria, lo que sí ha quedado patente del tratamiento con IECAs y ARA2 es que previenen el desarrollo de ERD. En el año 1994 un estudio publicado por Hebert y cols. ya demostraba en diabéticos tipo 1 la regresión de la proteinuria en rango nefrótico con el tratamiento con captopril y estudios posteriores como el HOPE terminaron por consolidar estos hallazgos en relación al tratamiento con IECAs (61,63). En cuanto a los ARA2 el estudio IDNT (*Irbesartan Diabetic Nephropathy Trial*) con irbesartán y el estudio RENAAL (*Reduction of Endpoints in NIDDM with the Angiotensin II Antagonist Losartan*) con losartán demostraron que ambos fármacos reducen el evento compuesto renal: doblar la creatinina sérica, alcanzar la ERD avanzada con necesidad de TRS o muerte (64,65). Este efecto era además independiente del control de la presión arterial.

1. INTRODUCCIÓN

Posteriores estudios trataron de evaluar si la combinación de IECAs y ARA2 aportaba mayores beneficios en la protección frente a la progresión de la ERD. En el estudio ONTARGET (*Ongoing telmisartan alone and in combination with ramipril global endpoint trial*), 25.620 pacientes diabéticos o con enfermedad vascular aterosclerótica fueron asignados a recibir ramipril, telmisartán o ambos fármacos. La terapia combinada no mostró una reducción del evento compuesto CV y además presentó un mayor riesgo de desarrollar el evento compuesto renal (doblar la creatinina sérica, alcanzar la ERD avanzada con necesidad de TRS o muerte) (66,67). Este aumento del riesgo renal derivaba de una mayor necesidad de diálisis urgente como complicación del doble bloqueo del SRA. Además también hubo más abandonos en la doble terapia por hipotensión, aunque la combinación de telmisartán y ramipril sí fue más eficaz en reducir la proteinuria (67). Otros ensayos clínicos como el VA NEPHRON-D (*Veterans Affairs Nephropathy in Diabetes*) (68), que compara losartán contra losartán más lisinopril o el ALTITUDE (*Aliskiren Trial in Type 2 Diabetes Using Cardiorenal Endpoints*) que comparaba aliskirén (un inhibidor directo de la renina) contra placebo en pacientes que ya recibían bloqueo del SRA (69), tuvieron que ser suspendidos de forma temprana. El primero se suspendió por un incremento de los casos de hiperkalemia y fallo renal agudo, mientras que el segundo se suspendió por un incremento de la morbi-mortalidad CV sin que se viese afectado el evento compuesto renal. Los resultados de estos últimos estudios fueron una evidencia sólida y descartaron el uso del doble bloqueo con IECAs y ARA2 por su mayor número de eventos adversos sin un claro beneficio CV ni renal, salvo un mayor efecto sobre la proteinuria (58).

Actualmente, los IECAs o los ARA2 en monoterapia son una de las bases del tratamiento de la ERD siempre que no existan contraindicaciones como la existencia previa de hiperkalemia o el riesgo de deterioro agudo de la función renal (58). No obstante, el bloqueo único del SRA no logra prevenir completamente la progresión de la ERD, lo que ha obligado a buscar nuevas terapias.

1.3.b. Los inhibidores del cotransportador sodio-glucosa tipo 2: un cambio de paradigma en el tratamiento

Desde los contundentes ensayos que confirmaron los efectos beneficiosos del bloqueo del SRA en la protección renal frente a la diabetes, en los últimos 15 años no se logró identificar ningún otro fármaco claramente eficaz en el tratamiento de la ERD (58,70). Este panorama cambió en el año 2016 cuando el análisis de un objetivo secundario de un ensayo clínico que evaluaba la protección CV que ejercía un iSGLT2 (la empaglifozina) en pacientes con diabetes tipo 2, mostró que este fármaco también prevenía la progresión de la ERD (71). A partir de ese punto se abrió un campo de estudio sobre la protección que ofrece este grupo farmacológico en la lesión renal diabética.

Los inhibidores del cotransportador de sodio-glucosa tipo 2 (iSGLT2) inhiben específicamente el cotransportador SGLT2 que se ubica en el primer segmento del túbulo contorneado proximal y cuyo objetivo es reabsorber la glucosa filtrada en el glomérulo (**Ver sección introducción - El sistema tubular y su participación en la reabsorción y secreción**). Estos cotransportadores son responsables de la reabsorción del 80-90% de la glucosa filtrada (72). Al bloquear SGLT2, la capacidad de reabsorción de glucosa a nivel renal disminuye y queda limitada a aquella que es capaz de realizar el cotransportador de sodio glucosa tipo 1 (SGLT1) (57). Este último se ubica en segmentos más distales del túbulo proximal (segmentos S2 y S3) y tiene una mayor afinidad pero menor capacidad para reabsorber glucosa (72). En condiciones basales, SGLT1 sólo reabsorbe el 10-20% de la glucosa filtrada. Así, al bloquear SGLT2, la capacidad de reabsorción de glucosa renal queda limitada a unos 50-60 mg/min (57) cuando el riñón en condiciones fisiológicas es capaz de reabsorber hasta un máximo aproximado de 375 mg/min (72). Este efecto condiciona una pérdida neta de glucosa y mejora el control glucémico en pacientes diabéticos (73,74). No obstante, se observó que su efecto hipoglucemiante se veía reducido en pacientes con ERD, probablemente por una disminución del FG y, por ende, una menor filtración de glucosa (73). Sin embargo, y a pesar de un efecto hipoglucemiante amortiguado en los pacientes con ERD, recientes ensayos clínicos han demostrado

1. INTRODUCCIÓN

una excelente protección contra la progresión de la ERD incluso en estadios avanzados.

Entre los ensayos clínicos recientes que presentaban como objetivo primario la evaluación de eventos renales, se deben destacar el estudio CREDENCE (*Canagliflozin and Renal Events in Diabetes With Established Nephropathy Clinical Evaluation*) y el DAPA-CKD (*Dapagliflozin and Prevention of Adverse Outcomes in Chronic Kidney Disease*). El primero incluyó a 4.401 pacientes con diabetes tipo 2 con ERD establecida al menos por la evidencia de albuminuria A3. El FG de los pacientes incluidos osciló entre 30 y 90 mL/min/1,73 m² y el objetivo primario fue el análisis del evento compuesto renal de: doblar la creatinina sérica, alcanzar la ERD avanzada con un FG <15 mL/min/1,73 m², la necesidad de TRS o la muerte. Un grupo fue asignado a placebo más terapia habitual, mientras que el segundo fue asignado a recibir canagliflozina 100mg/día. El estudio se detuvo de forma precoz por los beneficios observados en el grupo tratado con canagliflozina con una reducción del 30% del riesgo de presentar un evento renal (75). El DAPA-CKD, con un diseño similar al CREDENCE, incluyó 4.304 pacientes con diabetes tipo 2 y ERD establecida, asignándoles al tratamiento con placebo o dapagliflozina. El FG medio de los pacientes incluidos era en torno a 40-45 mL/min/1,73 m², que correspondería a un estadio 3b según la clasificación KDIGO. Dapagliflozina redujo hasta casi un 40% la probabilidad de sufrir un evento renal en estos pacientes (76). Por tanto, ambos estudios demostraron que el efecto protector de los iSGLT2 es evidente en pacientes con ERD establecida. Además, y teniendo en cuenta el menor efecto hipoglucemiante de estos fármacos pacientes con FG disminuido, es probable que los efectos protectores renales tengan implicaciones más allá del simple control glucémico.

Son varios los mecanismos protectores propuestos para los iSGLT2 en la protección renal (**Figura 1-10**). Además de facilitar el control glucémico, la pérdida de glucosa a través de la orina provoca un balance calórico negativo que reduce el peso corporal a lo largo del tratamiento (74). Este efecto es especialmente importante en los pacientes con diabetes, ERD y obesidad, en los que a la hiperfiltración diabética se le suma la hiperfiltración por obesidad (77). Así, una reducción progresiva del peso mejora esta situación de hiperfiltración. Otro efecto importante que logran los iSGLT2,

y también relacionado con un mejor control del peso y la glucemia, es la disminución de la resistencia a la insulina y una mejoría de la función de las células β del páncreas (78–80). Esto supone, en síntesis, una reducción de la exposición renal a la insulina, cuyo exceso de secreción se ha relacionado con varios mecanismos fisiopatológicos de daño renal, especialmente a nivel podocitario (81–84). Además, la diuresis osmótica y la natriuresis ejercida por este grupo farmacológico reduce tanto la presión arterial como la sobrecarga hidrosalina propias de la diabetes (72). Sin embargo, uno de los efectos protectores más aceptado de este grupo farmacológico es la mejoría de la hiperfiltración renal (57). Los iSGLT2, al inhibir la reabsorción de glucosa, inhiben también la reabsorción de sodio asociada a estos cotransportadores en túbulo proximal e incrementan el débito de sodio a la mácula densa. Este aumento del sodio es detectado por la mácula densa que a través del *feedback* túbulo-glomerular produce una vasoconstricción de la arteriola aferente y reduce la filtración glomerular (**Ver sección Introducción - La interacción túbulo-glomerular**) (57). Asimismo, una disminución del filtrado unida al bloqueo de la reabsorción de glucosa en el túbulo proximal, reduce el transporte apical en las células proximales y el consumo de ATP por parte de la bomba sodio-potasio ATPasa de la membrana basolateral, que es necesaria para mantener un gradiente de sodio constante. Esto supone un alivio de la actividad metabólica en las células tubulares proximales que se ha relacionado con un menor estrés oxidativo e inflamación (**Figura 1-10**) (85).

1. INTRODUCCIÓN

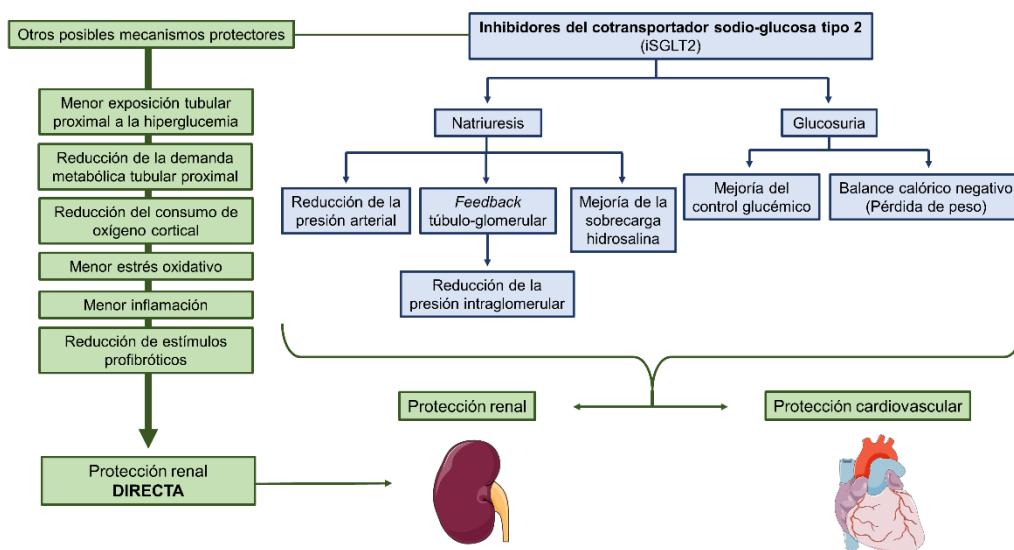


Figura 1-10 - Mecanismos protectores cardiorenales de los inhibidores del cotransportador de sodio-glucosa tipo 2 (iSGLT2). Se muestran los mecanismos cardioprotectores propuestos para el grupo farmacológico iSGLT2. Además de los efectos derivados de la glucosuria y la natriuresis, se han descrito efectos protectores renales directos de este grupo farmacológico. Entre otros, la inhibición del SGLT2 reduce la actividad metabólica de las células tubulares y su consumo de oxígeno.

Imagen creada con recursos visuales de Servier Medical Art (2).

Por último, cabe destacar que estos fármacos no han demostrado efectos protectores sólo a nivel renal. La pérdida de glucosa y la mejoría de la glucemia secundaria al tratamiento con iSGLT2 modifican el metabolismo corporal, que en vez de utilizar carbohidratos como fuente de energía comienza a utilizar lípidos, reduciendo la grasa visceral y la esteatosis (78,85). Además, la mejoría de la retención hidrosalina por su efecto diurético y su efecto sobre la presión arterial, se han considerado protectores también a nivel cardíaco (86).

1.3.c. Atrasentán y el papel de los antagonistas selectivos de los receptores de endotelina

El sistema de la endotelina se ha relacionado con diferentes patologías renales, incluyendo la enfermedad renal diabética (87). La endotelina es el principal protagonista de este sistema. Se han descrito 3 tipos: la endotelina-1 (ET-1), la endotelina-2 (ET-2) y la endotelina-3 (ET-3). Todos ellos son péptidos de pequeño

tamaño (21 aminoácidos) que actúan como hormonas y participan en la señalización intercelular (87). Sus efectos son predominantemente locales con acciones autocrinas o paracrinas. El mejor caracterizado de los 3 péptidos es la endotelina-1. Esta fue descrita por primera vez en las células endoteliales, de donde deriva su actual nombre (88). El primer efecto reconocido de la ET-1 fue la potente vasoconstricción vascular que desencadena con su liberación (88). Actualmente se conoce que estos efectos vasoconstrictores están fundamentalmente mediados por los receptores de endotelina tipo A (ET_A) (89). Asimismo, se han identificado dos subtipos de receptores de ET-1, los ET_A descritos y los receptores de endotelina tipo B (ET_B).

La implicación de este sistema en las diferentes patologías renales aún no está completamente dilucidada, pero parece que los principales efectos deletéreos de la ET-1 en la enfermedad renal diabética están mediados por los receptores ET_A (**Figura 1-11**). Además de la vasoconstricción y la lesión endotelial que pueden desencadenar la ET-1, se han descrito efectos proinflamatorios a nivel renal (90,91). Por otro lado, la exposición de los podocitos a la ET-1 interfiere con la estabilidad del citoesqueleto de actina (92) y contribuye a la pérdida de los pies podocitarios (93), alterando la barrera de filtración glomerular. En modelos animales diabéticos, se ha descrito un incremento de la expresión de ET-1 y también ET_A con una unión predominante de endotelina en la región glomerular (94,95), lo que sugiere una implicación de esta hormona en la nefropatía diabética. Además, modelos animales diabéticos tratados con bloqueo de los receptores ET_A han mostrado una reducción de la albuminuria, mejoría de la hiperfiltración y efectos protectores a nivel histológico como la preservación podocitaria (96–98).

1. INTRODUCCIÓN

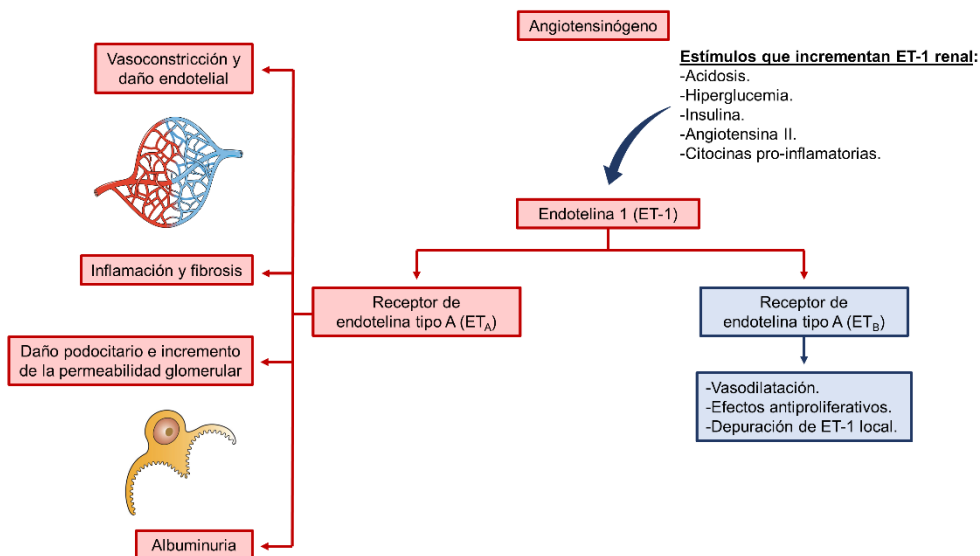


Figura 1-11 - Representación esquemática del sistema de la endotelina. Se muestran los estímulos que intervienen en la secreción de endotelina-1 y los efectos mediados por la activación de los receptores de endotelina A y endotelina B.

Imagen creada con recursos visuales de Servier Medical Art (2).

En ensayos clínicos en humanos, los primeros estudios con antagonistas selectivos de los receptores de ET_A en pacientes con ERC proteinúrica mostraron una reducción de la albuminuria de un 20-30%, independiente del control de la presión arterial (99). Curiosamente en este estudio Dhaun y cols. observaron que los efectos antiproteinúricos del antagonista ET_A eran mayores en pacientes con doble bloqueo del SRA mediante IECAs y ARA2 (100). Ello sugirió que la terapia con antagonistas de la endotelina podría ser más eficaz en el paciente recibiendo tratamiento previo de bloqueo del SRA. Además, el bloqueo del SRA es actualmente uno de los pilares del tratamiento de la ERD (58). Así, los primeros ensayos de pacientes con ERD que emplearon avosentán (inhibidor selectivo ET_A con una selectividad A:B de 50-300:1) seleccionaron aquellos enfermos que recibían tratamiento previo con IECAs o ARA2 (101). Estos primeros estudios confirmaron una reducción de la albuminuria en torno al 30% en el grupo tratado, pero reportaron un efecto adverso ya conocido y que en posteriores estudios limitaría el uso de los antagonistas de la endotelina: el edema periférico y la retención hidrosalina (101). Recientemente, el estudio SONAR (Study

of Diabetic Nephropathy with Atrasentan) realizó una selección estricta de pacientes con diabetes tipo 2 y ERD establecida con un FG medio en torno a 40-45 mL/min/1,73 m² y un CAC mediano de 800 mg/g que recibían tratamiento con bloqueo del SRA. Estos pacientes fueron sometidos a un periodo de evaluación inicial en el que se les trató con atrasentán (inhibidor selectivo ET_A con una selectividad A:B de 1200:1) y sólo aquellos que mostraron una reducción de >30% de la albuminuria sin presentar signos de retención hidrosalina fueron incluidos en el ensayo y aleatorizados a recibir placebo o atrasentán. El objetivo del estudio fue evaluar un evento compuesto renal de: doblar la creatinina sérica, alcanzar la ERD avanzada con un FG <15 mL/min/1,73 m², la necesidad de TRS o la muerte por causas renales. Tras una mediana de seguimiento de 2,2 años el tratamiento con atrasentán demostró una reducción de un 35% del riesgo de sufrir un evento renal, fundamentalmente mediante una disminución del riesgo de doblar la creatinina sérica (102). Sin embargo, hubo una mayor incidencia de retención hidrosalina y anemia como efectos adversos del tratamiento, a pesar de que aproximadamente un 50% de los pacientes recibían tratamiento con diurético. La muerte por causa CV no incrementó y se redujo la incidencia de ACV isquémico no fatal.

En base a la evidencia reciente, los antagonistas selectivos de la endotelina permanecen como un fármaco con potencial efecto beneficioso en la ERD, pero con potenciales efectos adversos como la retención hidrosalina, que limitan su uso en determinadas poblaciones de pacientes. En un futuro, combinaciones de este fármaco con otros fármacos con propiedades diuréticas como los iSGLT2 podrían ser una alternativa de tratamiento para el paciente con ERD.

1.4. MODELOS MURINOS DE DIABETES

A pesar de que la mejor evidencia científica se obtiene de los ensayos clínicos, los estudios en modelos animales contribuyen al conocimiento de las diferentes patologías que afectan al ser humano. En el caso de la nefropatía diabética, estos ofrecen una información valiosa sobre los mecanismos fisiopatológicos implicados en la enfermedad y el efecto que ejercen los diferentes tratamientos sobre dichos mecanismos.

1. INTRODUCCIÓN

1.4.a. Ventajas y desventajas de los modelos murinos diabéticos

Los modelos murinos diabéticos, y especialmente los ratones, son ampliamente utilizados en la investigación de la nefropatía diabética (103). En el caso de los ratones son varias las ventajas. Por un lado, su estabulación es más sencilla, ocupan menos espacio y es menos costosa. Por otro lado, los cortos periodos de gestación de los ratones hacen que su manipulación genética sea más sencilla y que resulte más cómodo tanto crear como mantener líneas consanguíneas. Además, el ratón comparte una gran homología genética con el humano (104,105).

Otra de las ventajas de los modelos murinos es que la manipulación genética permite estudiar con precisión la implicación fisiopatológica de una determinada proteína mediante la delección o mutación de los genes que codifican dicha proteína. Así, por ejemplo, al eliminar un gen se crean nuevos modelos *knockout* que carecen de una proteína, receptor o transportador de interés. Al comparar estos ratones *knockout* con sus homólogos genéticos no mutados, se obtiene una información valiosa de la implicación de una proteína en los procesos fisiológicos y patológicos del organismo (106,107).

Sin embargo, una de las desventajas de los modelos murinos diabéticos es que la mayoría de ellos sólo exhiben signos de nefropatía diabética incipiente. Así, en los parámetros fisiológicos normalmente presentan hiperfiltración y albuminuria, mientras que a nivel histológico exhiben una expansión mesangial leve-moderada y una hipertrofia glomerular (103,105). Del mismo modo, también es posible identificar engrosamiento de la MBG mediante microscopía electrónica. Otros hallazgos como la glomeruloesclerosis nodular o la atrofia tubular llamativa son poco frecuentes en los modelos murinos diabéticos y sólo se observan en cepas especialmente manipuladas para desarrollar nefropatía diabética severa (105). Estas cepas con nefropatía diabética acelerada normalmente se obtienen mediante la adición de varias alteraciones genéticas a un mismo modelo. Por ejemplo, existen cepas modelo db/db a las que se les asocia una deficiencia de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). Así, además de la mutación del receptor de la leptina que lo convierte en

obeso y diabético, este ratón acumula una segunda mutación en la eNOS, que acelera la lesión endotelial y agrava la hipertensión en este modelo (108).

1.4.b. Modelos murinos de diabetes tipo 1

Al igual que en la diabetes humana, existen modelos de diabetes murinos que remedan a una diabetes tipo 1 y otros que se asemejan a una diabetes tipo 2 (103). En este caso describiremos con más detalle los modelos murinos de diabetes tipo 2, pero conviene conocer los modelos de diabetes tipo 1, ya que se mencionan en alguna ocasión a lo largo de este trabajo. Entre los modelos murinos de diabetes tipo 1 destacan aquellos inducidos estreptozotocina (STZ), así como las cepas *non-obese diabetic* (NOD) y Akita, que tienen un origen hereditario. La inducción de diabetes con STZ es una forma rápida y eficaz de generar modelos de diabetes tipo 1 sobre cualquier cepa murina, aunque existen cepas más resistentes a sus efectos en las que resulta más complejo realizar la inducción (103). Este producto es tóxico para las células β del páncreas y por tanto produce una depleción de las mismas que es responsable de la diabetes. Por otro lado, el modelo Akita presenta una mutación de la insulina (Ins2^{Akita}), que provoca una alteración del plegamiento de esta proteína. La insulina mal plegada se acumula en las células β , lesionando las mismas y desencadenando el defecto de secreción de insulina. Finalmente, el modelo NOD es un modelo murino de diabetes hereditaria poligénica. Este último es el que más remeda a la diabetes humana, ya que desarrolla una lesión autoinmune del páncreas con infiltración leucocitaria de los islotes. Esta lesión de origen inmunológico es la que conduce al déficit de secreción de insulina.

1.4.c. Modelos murinos de diabetes tipo 2

En cuanto a los modelos murinos de diabetes tipo 2, además del modelo db/db empleado en este trabajo, y que mencionaremos específicamente al final, existen modelos de diabetes tipo 2 inducidos con dietas ricas en grasa, modelos hereditarios y modelos de nefropatía diabética acelerada que acumulan más de una mutación lesiva. Brevemente describiremos algunos de ellos.

1. INTRODUCCIÓN

1.4.c.I Modelos inducidos con dietas ricas en grasa

Este es un método clásico para la inducción de diabetes. Básicamente se basa en alimentar al animal con una dieta rica en grasa hasta que desarrolle obesidad, resistencia insulínica y diabetes. Las desventajas de este método es que no resulta homogéneo en la inducción de diabetes dentro de un mismo grupo experimental (103). Además, las lesiones de nefropatía diabética que desarrollan los modelos inducidos únicamente con dieta rica en grasas son leves y deben seleccionarse cepas especialmente sensibles genéticamente al desarrollo de hiperglucemia y obesidad como la C57BLKS (105). Actualmente este método se utiliza para lograr una mayor lesión renal diabética en cepas previamente susceptibles como puede ser el ob/ob o el db/db.

1.4.c.II. Modelo ob/ob

El modelo ob/ob es similar al db/db sólo que desarrolla la hiperfagia por una mutación de la propia leptina en vez de su receptor (103). Esta es una cepa consanguínea y uno de los modelos clásicos en los estudios de diabetes y obesidad. Debido a la hiperfagia el ratón desarrolla obesidad, resistencia insulínica y diabetes. En cepas consanguíneas desarrolladas sobre genotipos permisivos a la hiperglucemia como la C57BLKS, estos ratones exhiben signos de nefropatía diabética incipiente (103).

1.4.c.III. Modelo db/db con deficiencia de la óxido nítrico sintasa endotelial (db/db eNOS -/-)

La deficiencia de la óxido nítrico sintasa (eNOS) se puede asociar como evento estresor que agrava la lesión diabética. Esta mutación bloquea la síntesis de óxido nítrico y agrava la lesión endotelial. Los ratones db/db eNOS-/- desarrollan hipertensión y presentan una excreción urinaria de albúmina 30 veces mayor que sus controles db/db no mutados. Este modelo desarrolla expansión severa de la matriz mesangial, pudiendo incluso llegar a presentar glomerulosclerosis nodular y fibrosis intersticial significativa (108,109). Asimismo, estudios realizados con este modelo han

llegado a objetivar disminución del filtrado glomerular a las 26 semanas de edad (105).

1.4.c.IV. Modelo BTBR ob/ob mouse

El cruzamiento de las cepas *Black and tan, brachyuric* (BTBR) con el ob/ob permitió el desarrollo de otra cepa de nefropatía diabética acelerada denominada BTBR ob/ob. Los ratones BTBR presentan de forma natural resistencia insulínica (110), por lo que la asociación con la mutación ob/ob conduce al desarrollo de una cepa que presenta obesidad, hiperglucemia precoz y lesiones de nefropatía diabética establecida. Al igual que los ratones db/db eNOS^{-/-} estos animales exhiben lesiones diabéticas severas como glomeruloesclerosis nodular y hialinosis arteriolar (111).

1.4.c.V. El modelo murino db/db

El modelo db/db es que se emplea en el presente trabajo. Este es un modelo murino de diabetes tipo 2 de origen hereditario. El db/db presenta una mutación del receptor de la leptina que se desarrolla mediante consanguinidad. Los ratones homocigotos para esta mutación desarrollan hiperfagia, obesidad y resistencia insulínica (103). A las 4 semanas de edad estos ratones ya son obesos en comparación con los controles heterocigotos y a las 8 semanas de edad presentan hiperglucemia. Actualmente estas cepas se desarrollan habitualmente sobre un genotipo permisivo a la hiperglucemia como es el C57BLKS.

A nivel renal el ratón db/db presenta una excreción urinaria de albúmina incrementada, mientras que a nivel histológico destacan signos de nefropatía diabética incipiente como expansión mesangial leve y pérdida podocitaria (112).

1. INTRODUCCIÓN

En el presente estudio, se evaluarán los efectos de dos grupos farmacológicos comentados previamente: los inhibidores del cotransportador de sodio-glucosa tipo 2 (SGLT2i) y los antagonistas selectivos de la endotelina (ARE), sobre el bloqueo del sistema renina-angiotensina y en un modelo murino de diabetes tipo 2 que exhibe signos de nefropatía diabética incipiente (el modelo db/db). El objetivo es demostrar que la combinación de los iSGLT2 y los ARE con el bloqueo del SRA tiene mayores efectos protectores en la progresión de la nefropatía diabética que el bloqueo del SRA solo.

2. HIPÓTESIS

2. HIPÓTESIS

En la enfermedad renal diabética tanto los inhibidores del cotransportador sodio-glucosa tipo 2 como los antagonistas selectivos del receptor de endotelina tipo A han demostrado ser protectores en monoterapia en la enfermedad renal diabética tanto en modelos animales como en ensayos clínicos. Ambos fármacos han demostrado individualmente efectos beneficiosos sobre el daño renal diabético como la reducción de la albuminuria, la disminución de la expansión mesangial glomerular o la reducción de la expresión de marcadores de fibrosis, inflamación y estrés oxidativo.

Nuestra hipótesis es que la combinación de tratamiento con inhibidores del cotransportador sodio-glucosa tipo 2 (empagliflozina) y antagonistas selectivos del receptor de endotelina tipo A (atrasentán) sobre el bloqueo del sistema renina-angiotensina, ejerce un efecto protector sumatorio a nivel cardiorrenal, que supera al bloqueo simple del sistema renina-angiotensina. Además, postulamos que los mecanismos protectores de la inhibición del cotransportador sodio-glucosa tipo 2 están mediados por vías moleculares específicas, que pueden ser identificadas mediante estudios de proteómica.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Considerando las hipótesis propuestas, los objetivos de este estudio son:

OBJETIVO PRINCIPAL

1.-Estudiar los efectos cardioprotectores de la combinación de tratamiento con inhibidores del cotransportador sodio-glucosa tipo 2 (empagliflozina) y antagonistas selectivos del receptor de endotelina A (atrasentán) sobre el bloqueo del sistema renina-angiotensina en el ratón diabético db/db.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

Para evaluar este objetivo principal se proponen a su vez los siguientes objetivos secundarios:

1.-Identificar en el ratón db/db los efectos del tratamiento con empagliflozina y atrasentán sobre parámetros implicados en la lesión cardiorrenal como la hiperglucemia o la hipertensión.

2.-Evaluar en el ratón diabético db/db los efectos del tratamiento con empagliflozina y atrasentán sobre marcadores de lesión renal diabética como la albuminuria, el filtrado glomerular, la inflamación, el estrés oxidativo y la fibrosis.

3.-Analizar la modulación que ejercen la empagliflozina y el atrasentán sobre determinadas vías implicadas en la patogenia de la nefropatía diabética como el sistema renina angiotensina o el sistema de la endotelina.

4.-Identificar mediante estudios de proteómica diferencial en el riñón del ratón diabético db/db tratado con empagliflozina proteínas de interés que nos permitan reconocer nuevas rutas implicadas en la protección frente a la enfermedad renal diabética.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

El proyecto se realizó empleando un modelo murino de diabetes tipo 2. La especie elegida fue BKS.Cg-Dock7m +/- Leprdb y los laboratorios Charles River se encargaron de proveer los animales a lo largo de todo el proyecto. En total se emplearon 12 ratones db/m y 89 ratones db/db todos ellos machos. Los animales se recibieron con 8 semanas de edad y tras 1 semana de aclimatación se realizaron las mediciones de las variables pretratamiento. A las 12 semanas de edad los ratones fueron asignados de forma aleatoria a cada una de las 10 ramas experimentales y se iniciaron los tratamientos. En total se asignó el siguiente número de ratones a cada rama: 1.-controles db/m: 12 ratones, 2.-controles db/db tratados con vehículo: 15 ratones, 3.-db/db tratados con empagliflozina: 14 ratones, 4.-db/db tratados con empagliflozina y ramipril: 15 ratones, 4.-db/db tratados con empagliflozina, ramipril y atrasentán: 15 ratones, 6.-db/db tratados con atrasentán: 8 ratones, 7.-db/db tratados con atrasentán y ramipril: 13 ratones, y 8.-db/db tratados con ramipril: 9 ratones (**Figura 4-1**). La empagliflozina a dosis de 10 mg/Kg/día se administró a través de sondaje oral diario. El resto de ratones no tratados con empagliflozina también fueron sometidos a sondaje oral pero sólo recibieron vehículo (hidroxietilcelulosa 0,5%). Ramipril y atrasentán se administraron en agua de bebida a diluciones de 20 mg/L y 17,5 mg/L. Ello suponía, basado en la caracterización previa de la ingesta de agua del modelo db/db (113), una dosis estimada de 8 mg/Kg/día de ramipril y de 7 mg/Kg/día de atrasentán. Los ratones fueron tratados durante 8 semanas.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

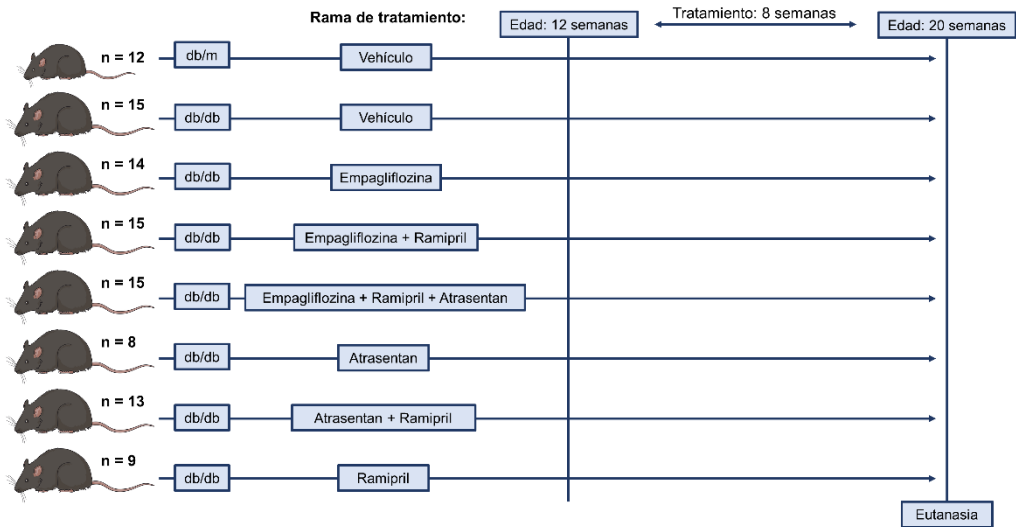


Figura 4-1 - Diseño experimental y ramas de tratamiento. El actual experimento contó con un grupo de control no diabético (db/m), un grupo control diabético tratado con vehículo y 6 ramas de tratamientos con empagliflozina, ramipril o sus combinaciones. En el siguiente esquema, además de las ramas de tratamiento, se indica el número de ratones asignados a cada rama.

Durante el procedimiento experimental se recogieron muestras de orina y se registraron varios parámetros fisiológicos. El peso se midió pretratamiento y de forma semanal durante el tratamiento. La glucemia se midió pretratamiento y de forma bisemanal tras el inicio del mismo. La presión arterial se midió pretratamiento y al finalizar el mismo. El filtrado glomerular se midió pretratamiento, a las 4 semanas de haber iniciado el mismo y al final del tratamiento. Para futuros análisis, se recogieron muestras de orina pretratamiento y al final del tratamiento. Las tomografías computarizadas para medir la grasa corporal se realizaron antes de iniciar el tratamiento y una vez finalizado el mismo. Finalmente, tras 8 semanas de tratamiento se realizó la eutanasia para la obtención del suero y los órganos de interés. Todos estos procedimientos se detallan en los siguientes apartados. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Ética de Experimentación Animal del Instituto de Investigación Vall d'Hebron (CEEA 47.18).

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.2. PROCEDIMIENTOS EN ANIMALES

4.2.a. Condiciones de estabulación

Los ratones se estabularon en grupos de 2-3 animales por jaula en una habitación con temperatura controlada a 22°C y con un ciclo de 12 horas de luz / 12 horas de oscuridad. Durante el procedimiento experimental, los animales tuvieron acceso libre al agua y a la comida.

4.2.b. Medición del peso corporal

Los ratones se pesaron de forma semanal mediante una báscula (Navigator, OHAUS) y siempre en el mismo rango horario entre las 8:00 y las 10:00 horas. Antes de pesar los animales se calibraba el cero de la báscula y se taraba el recipiente en el que posteriormente se ubicaría a los ratones para pesarlos.

4.2.c. Medición de la glucemia en ayunas

La glucemia basal se midió de forma bisemanal. Al igual que con el peso, la glucemia siempre se realizó en el mismo rango horario entre las 12:00 las 14:00 horas. A las 8:00 de la mañana se sometía a los animales a un periodo de 4 horas de ayuno sin restringir el acceso al agua. Tras el correspondiente periodo de ayuno, se obtenía una pequeña muestra de 7-10 uL de sangre mediante punción de la vena safena. Esta muestra fue inmediatamente analizada mediante el uso de un glucómetro (Accu-Chek Performa, Roche). Tras anotar el resultado, el ratón era devuelto a su jaula y se reiniciaba la dieta.

Los ratones db/db que no exhibían una glucemia basal mayor de 200 mg/dL a las 12 semanas de edad fueron descartados del estudio. Asimismo, el límite superior de detección del glucómetro era de 600 mg/dL y cuando las cifras medidas eran superiores a dicho límite el aparato lo informaba con las siglas *HI*. En estos casos, el valor anotado en el resultado fue el límite superior de detección (600 mg/dL).

4.2.d. Medición de la presión arterial

Las presiones arteriales sistólica y diastólica, así como la frecuencia cardíaca, se midieron antes del inicio del tratamiento y la última semana de tratamiento. La medición previa al inicio del tratamiento se realizó entre las 11 y las 12 semanas de edad, mientras que la medición final se realizó entre las 19 y las 20 semanas de edad. Para las mediciones se utilizó el sistema no invasivo de manguito de cola (LE 5001, Harvard Apparatus). En primer lugar, se calentaban los animales sobre una manta térmica a 37°C cinco minutos antes de iniciar la medición para mejorar el flujo sanguíneo de la cola y facilitar la correcta detección de la onda de pulso por el transductor. Además, el calor facilitaba la relajación del animal antes del procedimiento. Posteriormente eran transferidos a una segunda manta térmica sobre la que se colocaba un cilindro de acrílico cubierto por una talla opaca. Gracias al entrenamiento de jornadas previas, los ratones se introducían de forma libre en el cilindro, dejando expuesta la cola. Entonces se colocaba tanto el manguito como el transductor de la onda de pulso y se iniciaba la medición (**Figura 4-2**). El aparato de medición registraba la presión sistólica en el momento en el que reaparecía la señal de la onda de pulso, y la presión diastólica en el momento en el que la onda de pulso recuperaba su amplitud inicial. La frecuencia cardíaca se estimaba a través de la frecuencia de la propia onda de pulso (**Figura 4-2**). Mediante este método, se registraron 4 valores homogéneos en 2 días distintos para cada ratón y el valor definitivo se calculó a partir de la media de estos 4 valores.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

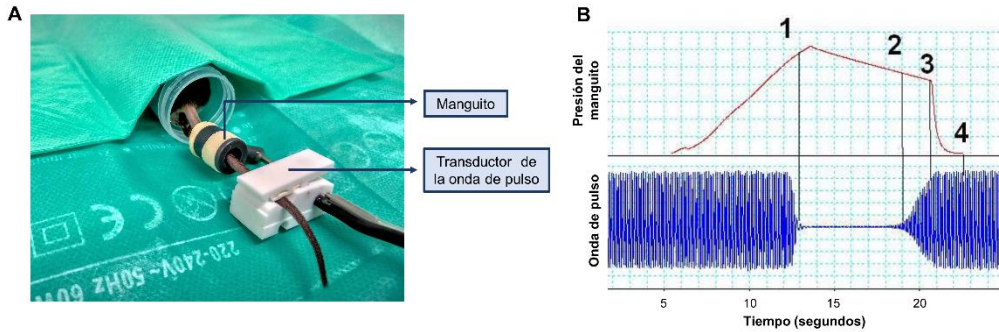


Figura 4-2 - Procedimiento de medición de la presión arterial no invasiva. La presión arterial (PA) no invasiva se midió mediante un manguito de cola y un transductor de la onda de pulso. **A:** Equipo de medición colocado sobre la cola del ratón. Los animales previamente entrenados se introducían libremente en un tubo cubierto por una talla poca. El colocar el tubo sobre una manta térmica a 37°C, facilitaba la relajación del animal; **B:** Secuencia de medición de la PA. Inicialmente se registraba una onda de pulso estable. Una vez comenzaba a inflarse el manguito, la onda de pulso desaparecía (1). Tras desaparecer la onda de pulso el manguito comenzaba a deshincharse. En el momento en que reaparecía la onda de pulso se registraba la presión del manguito como presión arterial sistólica (2). Cuando la onda de pulso recuperaba la amplitud inicial se registraba la presión arterial diastólica. Tras realizar estas 2 medidas el manguito se desinflaba completamente (4).

4.2.e. Medición del filtrado glomerular transcutáneo

El filtrado glomerular se midió en ratones conscientes antes de iniciar el tratamiento, tras 4 semanas de tratamiento y al final del mismo. Se empleó una técnica de medición transdérmica que utiliza un dispositivo miniaturizado (**Figura 4-3**) con dos emisores de luz y un fotodiodo central que actúa como detector de la luz fluorescente (MediBeacon). Asimismo, el reactivo fluorescente utilizado para realizar la medición es la sinistrina unida a isotiocianato de fluoresceína (FITC-sinistrina). La sinistrina, al igual que la inulina, es una molécula que se filtra a nivel glomerular y que no sufre ningún tipo de secreción o reabsorción tubular, por lo que su excreción depende exclusivamente del FG. Así, la semivida de eliminación de FITC-sinistrina permite estimar el filtrado glomerular.

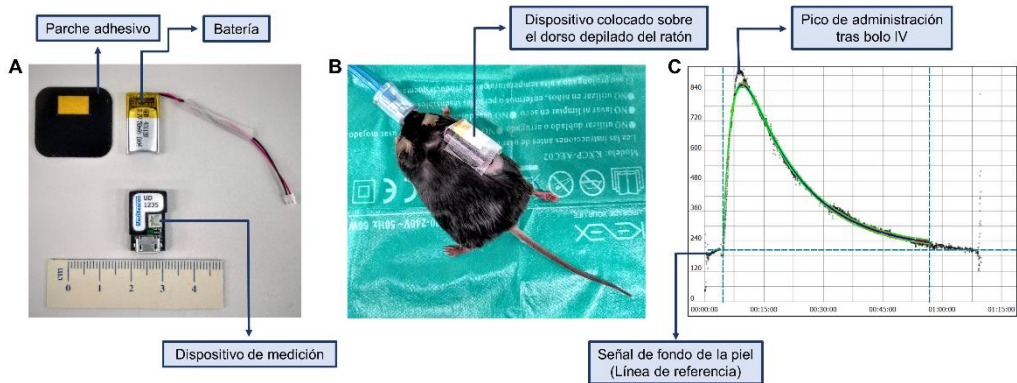


Figura 4-3 - Técnica de medición del filtrado glomerular transcutáneo. Se muestra el dispositivo utilizado para la medición del filtrado glomerular, como se ubicaba este en el dorso del animal y la curva de medición. **A:** Dispositivo de medición y sus accesorios; **B:** Dispositivo de medición ubicado sobre el dorso depilado de un ratón db/db anestesiado; **C:** Curva de medición del filtrado glomerular, que se compone del registro inicial de la señal de fondo de la piel, un pico de señal tras la inyección intravenosa directa del agente trazador fluorescente (FITC-sinistrina) y una posterior curva de eliminación.

IV: intravenoso.

4.2.e.I. Técnica de medición del filtrado glomerular

Brevemente, se pesa al animal y posteriormente se realiza la inducción anestésica con isoflurano al 4% y el mantenimiento con isoflurano al 2%. Una vez anestesiado se afeita y se depila un lateral del lomo del ratón, creando un pequeño segmento de piel expuesta entre la cintura escapular y pélvica. El dispositivo de medición se coloca sobre un parche adhesivo de doble cara que dispone de una ventana para permitir la emisión de luz y la captación por el fotodiodo de la fluorescencia de retorno (**Figura 4-3**). Este parche se pega por la otra cara adhesiva directamente sobre la piel expuesta del animal y se fija con cinta hipoalérgica (**Figura 4-3**). Durante 5 minutos se permite al dispositivo registrar la señal de fondo de la piel, que servirá de punto de referencia para el proceso de medición. Transcurridos los 5 minutos, se inyecta al animal aún anestesiado 0,15 mg/g de FITC-sinistrina en el seno venoso retroorbitario (Concentración del stock de FITC-sinistrina: 40 mg/mL disuelto en PBS 1x). Tras la administración se suspende la anestesia, manteniendo en todo momento el dispositivo activo. Una vez recuperado de la anestesia, el ratón se mantiene en una jaula individual durante 1 hora. En esta hora se completa la medición y se registra la curva de eliminación de la FITC-sinistrina mientras el animal está consciente.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Transcurrido el tiempo de medición se despegó el dispositivo de la piel del animal, se devuelve a su jaula original y se procede a la lectura de los resultados (**Ver sección Material y Métodos - Análisis de los datos de filtrado**).

4.2.e.II. Análisis de los datos de filtrado

Los datos obtenidos se leyeron con el software de análisis MPD Lab (MediBeacon) y posteriormente se analizaron con el software MPD Studio (MediBeacon) (102). En síntesis, una curva de medición se compone por una señal inicial de referencia (la medición de la señal de fondo de la piel) (**Figura 4-3**), seguida de un pico que coincide con el bolo de administración intravenosa y la posterior curva de eliminación de la FITC-sinistrina. El análisis de estas curvas utilizando un modelo tricompartmental, permitió una estimación de la vida media de la FITC-sinistrina. A partir de la vida media de la FITC-sinistrina, y utilizando un factor de conversión previamente validado (114), se estimó el FG de cada ratón en $\mu\text{L}/100\text{g}/\text{min}$.

4.2.f. Medición de la excreción urinaria de albúmina

La excreción urinaria de albúmina se determinó al final del tratamiento mediante el cociente albúmina/creatinina (CAC) medido en una orina espontánea recogida siempre entre las 8:00 y las 13:00 horas. Para medir la albúmina se empleó un kit comercial ELISA para medir la albúmina, mientras que la creatinina se determinó mediante un ensayo colorimétrico como se detalla más adelante. El cociente albúmina/creatinina se midió en mg/g.

4.2.f.I. Colección de orina

La orina se recogió colocando a los animales durante un periodo máximo de 30 minutos sobre unas jaulas individuales adaptadas que actualmente se encuentran en vías de patente. Las muestras urinarias recogidas se centrifugaron a 3000 RCF durante 10 minutos, se aspiró el sobrenadante y se conservaron a -80°C para futuros análisis.

4.2.f.II. Medición de albúmina

La concentración urinaria de albúmina se midió en las muestras urinarias previamente recogidas empleando los kits ELISA Albuwell M (Ethos Biosciences). Este es un método competitivo indirecto. El procedimiento se realiza en placas de 96 pocillos con albúmina fijada en el fondo del pocillo (fase inmóvil). A estos pocillos se les añaden las muestras de orina que tendrán una concentración de albúmina determinada (fase líquida). La albúmina de las muestras de orina actúa como antígeno, siendo reconocida por el anticuerpo primario anti-albúmina murina conjugado con peroxidasa de rábano (HRP). Este anticuerpo primario se une a la albúmina de la muestra (fase líquida) o a aquella del fondo del pocillo (fase inmóvil). Tras la incubación y los lavados, sólo el anticuerpo unido a la albúmina de la fase inmóvil permanece en el pocillo. Así, se trata de un método competitivo indirecto porque la albúmina de muestra de orina compite con la de la fase inmóvil para unirse al anticuerpo primario. Por ello, la intensidad del color al revelar los pocillos es inversamente proporcional a la concentración de albúmina de la muestra. A mayor intensidad del color, menor albúmina contenía la muestra (103).

Brevemente, 50 μ L de la recta patrón o de la muestra diluida previamente en una ratio de 1/13 con un diluyente ya incluido en el kit, se pipeteaban por duplicado en la placa de 96 pocillos con albúmina fija en el fondo. Posteriormente, se añadían a cada pocillo 50 μ L del anticuerpo primario anti-albúmina conjugado con HRP tras lo cual se dejaba incubar la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente y protegida de la luz. La placa contaba además con un control negativo donde no se pipeteaba el anticuerpo y un control positivo donde se pipeteaba sólo el diluyente en vez de la muestra. Después de la incubación se retiraba el contenido de los pocillos y estos se lavaban 10 veces con agua Milli-Q. Una vez finalizados los lavados, se añadían 100 μ L del líquido de revelado (*color developer*) y se dejaba actuar durante 5 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. Transcurridos los 5 minutos, la reacción se detenía con un reactivo ácido facilitado en el kit. La absorbancia resultante se midió entonces a 450 nm con un lector Varioskan Lux (ThermoFisher). Utilizando la recta patrón, se estimaron las concentraciones de albúmina de cada pocillo en μ g de albúmina por mL.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.f.III. Medición de creatinina

La determinación se realizó empleando unos kits comerciales basados en el método colorimétrico de Jaffé (*Creatinine Companion*, Ethos Biosciences). La medición de la creatinina se realizó en las mismas muestras de orina en las que se determinó la albúmina. El ácido pícrico en un medio alcalino se ioniza y reacciona con la creatinina de la muestra urinaria para formar complejos de tonalidad roja. El cambio de coloración generado por estos complejos es proporcional a la cantidad de creatinina presente en la muestra y su intensidad puede determinarse mediante absorbancia (103).

En resumen, 20 μ L de la recta patrón o 20 μ L de las muestras urinarias diluidas previamente en una ratio variable de 1/2 a 1/20 (según muestra), se pipetearon por duplicado a una placa de 96 pocillos convencional. Posteriormente se añadieron 100 μ L de una solución de picrato alcalino (Ácido pícrico y NaOH 1 N suministrados por el kit en una relación de 1/5) y se dejó incubar la placa durante 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurridos los 10 minutos se midió la absorbancia de la placa a 500 nm con un lector Varioskan Lux (ThermoFisher). Tras esta primera lectura se añadieron 100 μ L del reactivo ácido suministrado por el kit y se volvió a dejar incubar la placa durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después de esos 5 minutos se volvió a leer la absorbancia de la placa a 500 nm. Restando el valor de la segunda a la primera lectura se calculó la diferencia o delta del picrato tanto para la curva patrón como para las muestras. Utilizando entonces los valores de la recta patrón, se estimaron las concentraciones de creatinina en mg/dL.

4.2.g. Medición de la grasa corporal y el volumen renal mediante tomografía computarizada

4.2.g.I. Toma de las imágenes

Las imágenes de tomografía computarizada (microTC) se adquirieron con un sistema de imágenes Quantum FX (PerkinElmer). Este equipo está especialmente diseñado para estudios pre-clínicos y la toma de imágenes en animales de pequeño tamaño. Los parámetros de adquisición de las imágenes fueron: campo de visión de 73 mm,

4. MATERIAL Y MÉTODOS

tiempo de adquisición 2 minutos, voltaje de la corriente 70 mV y amperaje de la corriente 200 μ A. La reconstrucción de las imágenes se basó en el método Feldkamp. El tamaño de los vóxeles (unidad gráfica tridimensional) fue de 0,148mm x 0,148mm x 0.148mm, lo que equivale a un volumen de 3,2418 μm^3 para cada vóxel. Cada estudio se realizó mediante 2 escaneos diferentes debido a la proporcionalidad entre la mesa del escáner y el tamaño del animal. Para el procedimiento los animales se anestesiaron realizando la inducción con isoflurano al 5% y el mantenimiento con isoflurano al 2%. Una vez anestesiados los animales se colocaron sobre la mesa del escáner en posición supina. El flujo de aire se mantuvo a 0,8 litros por minuto. Una vez finalizada la realización del escáner los animales se retornaron a su jaula original para la recuperación posanestésica.

4.2.g.II. Análisis de las imágenes

Las imágenes fueron analizadas por el equipo de imagen preclínica del Instituto de Investigación Vall d'Hebron. El volumen corporal total se determinó realizando una segmentación de los vóxeles de aire y el cuerpo del animal (umbral mínimo -400 unidades Hounsfield). Posteriormente, mediante la aplicación de un rango de unidades Hounsfield (HU) entre -200 y 100 para realizar una segmentación que selecciona una intensidad radiológica correspondiente a la grasa, se calculó el tejido graso total. La confirmación de que cada segmentación realizada en base a la intensidad radiológica se correlacionó verdaderamente con el tejido graso, se realizó mediante la revisión visual de las imágenes. Finalmente, una segmentación entre la grasa intraabdominal y subcutánea se realizó aplicando el método *seeds and frontiers* (**Figura 4-4**). El umbral aplicado era el mismo que aquel utilizado para medir la grasa corporal total (entre -200 y 100 HU). La información del volumen para cada territorio de tejido graso y del volumen corporal total permitió calcular los porcentajes correspondientes de grasa corporal.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

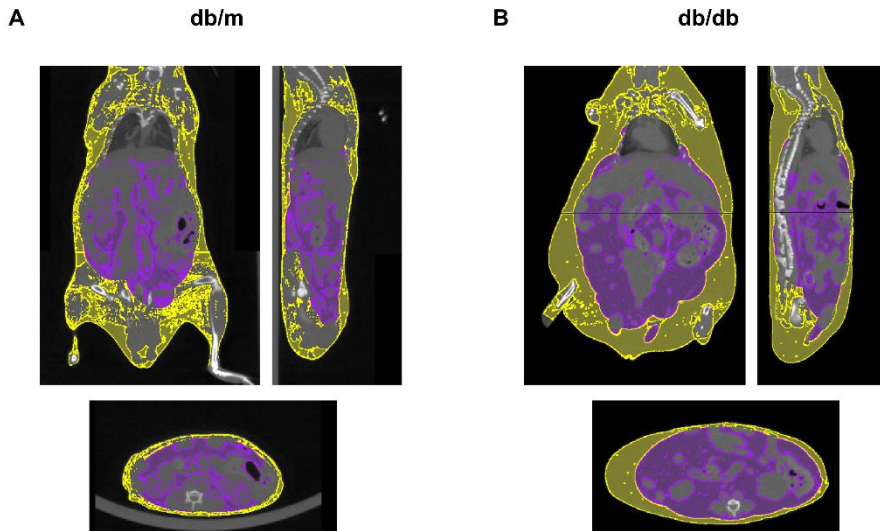


Figura 4-4 - Imágenes representativas de la medición de la grasa subcutánea e intraabdominal en un ratón db/m y en un ratón db/db tratado con vehículo. Se muestra la segmentación realizada para la grasa subcutánea (color amarillo) y la grasa intraabdominal (color morado) en los 3 planos (coronal, sagital y axial).

Para medir el volumen renal, se identificaron primero los riñones en las imágenes del microCT. Posteriormente, se midieron los ejes vertical, transversal y anteroposterior de cada riñón. Utilizando la longitud de estos 3 ejes y aplicando la fórmula matemática del elipsoide se determinó el volumen de cada riñón (**Figura 4-5**).

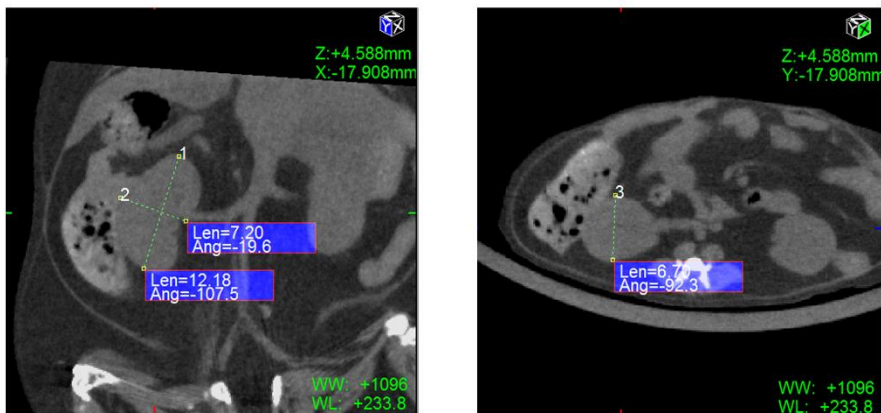


Figura 4-5 - Medición de los ejes vertical, transversal y anteroposterior del riñón izquierdo de uno de los ratones db/m. Para poder medir estos ejes son necesarias las imágenes de al menos dos de los planos. En este caso se muestra el plano coronal a la izquierda y un plano axial a la derecha.

4.2.h. Eutanasia

Tras 8 semanas de tratamiento y alcanzadas las 20 semanas de edad, los ratones fueron anestesiados con una dosis letal de pentobarbital sódico de 100 mg/Kg. La correcta anestesia antes del procedimiento se confirmó mediante la ausencia de los reflejos de estación y podal. Una vez el ratón alcanzó un plano anestésico profundo se disecó el tórax y se expuso el ápex pulmonar con el corazón aún latiendo. Mediante punción del ápex cardíaco, se extrajo en primer lugar una cantidad de sangre suficiente (100-150 μ L) para la obtención de suero. Posteriormente y también a través del ápex, los ratones fueron perfundidos con una solución fría de fosfato y sodio (PBS 1x). Mediante la perfusión se llevó a cabo la exanguinación completa del animal. Se extrajeron entonces los riñones, el corazón, el pulmón, el páncreas y el hígado. Se registró, además, el peso de los riñones y el corazón. Medio riñón cortado de forma longitudinal se fijó en formalina al 10% durante 48 horas y posteriormente se conservó en etanol 70% hasta realizar la inclusión en parafina según el protocolo estándar. El riñón y medio restante fue congelado de forma inmediata en nitrógeno líquido y conservado posteriormente a -80°C hasta su uso. El corazón se diseco en aurículas, ventrículo derecho, ápex del ventrículo izquierdo y base del ventrículo izquierdo. Las aurículas, el ventrículo derecho y el ápex del ventrículo izquierdo fueron congelados de forma inmediata en nitrógeno líquido y conservados posteriormente a -80°C hasta su uso. La base del ventrículo izquierdo se fijó en formalina al 10% durante 48 horas y posteriormente se conservó en etanol 70% hasta su proceso de inclusión en parafina. El resto de órganos se congelaron en nitrógeno líquido y fueron conservados a -80°C. La sangre se centrifugo durante 5 minutos a 10.000 RCF a 20°C. Posteriormente se recogió el suero y se transfirió a nuevos tubos de 1,5 mL para conservarlo a -80°C hasta su próximo uso.

4.3. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS

4.3.a. Inclusión de las muestras en parafina

Como se indica previamente, inmediatamente después de extraer los tejidos de interés, estos se fijaron en formalina al 10% durante 48 horas. Posteriormente se

4. MATERIAL Y MÉTODOS

aclararon y fueron sometidos a deshidratación mediante la inmersión en cubetas de etanol con una graduación creciente: 70% (30 min), 96% (45 min) y 100% (2 inmersiones de 45 min). Tras la deshidratación se transfirieron a una cubeta de xileno que actúa como sustancia intermediaria al ser miscible tanto en etanol como en parafina. Se realizaron 2 inmersiones en xileno de 30 minutos cada una. Una vez cumplidos los tiempos de inmersión en xileno se introdujeron en parafina líquida dentro de una estufa a 60°C (2 inmersiones de 1 hora la primera y de 3 horas la segunda). Tras extraerlas de este segundo baño de parafina, las muestras de tejido se colocaron en moldes de un tamaño adecuado para la muestra y se cubrieron de parafina. Los moldes con las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente y una vez la parafina se enfrió se desmoldaron los bloques.

4.3.b. Sección de los bloques y desparafinado

Las muestras renales previamente incluidas en parafina se cortaron en secciones de 4 µm mediante un microtomo de rotación semiautomático (HistoCore MULTICUT, Leica Biosystems). Estas se dejaron expandir en un baño a 37°C durante unos minutos y fueron recogidas después sobre portas (Deltalab). Tras dejarlas secar a temperatura ambiente, se introdujeron en una estufa a 60°C durante 30 minutos para derretir la parafina. Una vez extraídas de la estufa el exceso de parafina se retiró mediante 2 inmersiones de 5 min de las muestras en xileno. Después del xileno, las muestras fueron rehidratadas mediante el baño de las secciones en cubetas de etanol de graduación decreciente: 100% (10 min), 96% (10 min) y 70% (10 min). Tras este último baño de etanol estas muestras se terminaron de rehidratar (2 baños de 5 min) en una solución salina tamponada con Tris (TBS 1x). A partir de este punto las muestras se procesaron de forma diferente según la técnica.

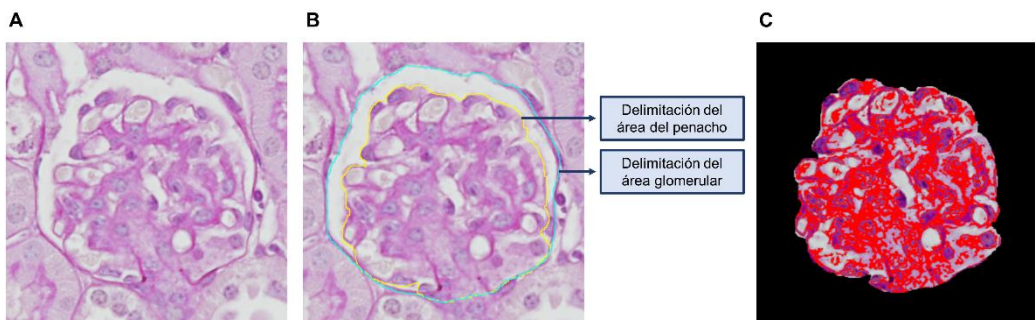
4.3.c. Evaluación de la morfología renal en secciones teñidas con PAS

Brevemente, para llevar a cabo la tinción de PAS (tinción de Schiff-Ácido periódico), las secciones previamente desparafinadas y rehidratadas se introdujeron un baño de ácido periódico al 0,5% durante 5 minutos. Tras este baño, las muestras se aclararon en agua desionizada realizando 3 baños de 3 minutos cada uno. Posteriormente, las secciones renales se sumergieron en el reactivo de Schiff (Sigma) durante 30

4. MATERIAL Y MÉTODOS

minutos. Transcurridos los 30 minutos, las secciones se lavaron de nuevo en agua desionizada realizando entre 5 y 10 baños de 2 minutos hasta retirar el exceso de tinción rosada. Una vez lavadas, las muestras se introdujeron en una cubeta con solución de Hematoxilina Gill N°3 (Sigma) durante 30 minutos. Después las muestras se aclararon realizando entre 3 y 5 baños de 2 minutos hasta retirar el exceso de tinción. Tras el lavado, las muestras fueron deshidratadas mediante inmersión en etanol de graduación creciente: 70% (1 min), 96% (1 min) y 100% (1 min). Una vez finalizada la deshidratación, estas se sometieron a dos baños de xileno de 1 minuto. Finalmente, tras evaporarse el xileno, las muestras se montaron con solución de montaje DPX (Sigma) y fueron cubiertas con un cubreobjetos.

La evaluación de la estructura y lesión glomerular se realizó mediante la obtención con un microscopio óptico (BX61, Olympus) de 10 microfotografías a 40 aumentos de los glomérulos corticales de cada animal teñidos mediante la técnica de PAS (**Figura 4-6**). Para evitar la variabilidad en el tamaño de los glomérulos a la hora de analizar las imágenes, se seleccionaron aquellos glomérulos que mostraban algún segmento del polo vascular y que indican que se trataba de la zona central del glomérulo. Este método permitió la selección de cortes glomerulares homogéneos y descartó aquellos cortes periféricos.



Porcentaje matriz mesangial en el penacho glomerular = $(\text{Área matriz mesangial} / \text{Área del penacho}) \times 100$

Figura 4-6 - Medición de la expansión de la matriz mesangial con PAS. Para el proceso de medición se fotografiaron 10 glomérulos con polo vascular en cada sección. En cada uno de estos glomérulos se midió el área glomerular, el área del penacho y el área de la matriz mesangial. El porcentaje de matriz mesangial del penacho se calculó mediante el cociente área de la matriz mesangial / área del penacho. **A:** Microfotografía representativa de un glomérulo tomada a 40 aumentos; **B:** Misma imagen con las áreas del glomérulo y del penacho delimitadas; **C:** Medición del área de la matriz mesangial seleccionando el área por umbral de color (en las tinciones de PAS el área morada corresponde al área de matriz mesangial).

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Utilizando el software de análisis de imágenes ImageJ en cada glomérulo se realizó una medición ciega del área de la cápsula glomerular y el área del penacho. Asimismo, utilizando la capacidad del programa para seleccionar regiones de interés según el umbral de color, se midió el área de la matriz mesangial, que tiñe de morado por los glucosaminoglicanos de dicha estructura (115). Utilizando la medida de las áreas, en cada glomérulo se determinó también la ratio área del penacho/área del glomérulo y la ratio área matriz mesangial/área del penacho. Finalmente, para cada animal se calculó la media del área glomerular, el área del penacho, la ratio área del penacho/área glomerular y la ratio área del mesangio/área del penacho (**Figura 4-6**).

4.3.d. Estudios inmunohistoquímicos

Para la realización de los estudios de inmunohistoquímica, las secciones de 4 μm previamente desparafinadas y rehidratadas fueron sumergidas durante 10 minutos en una cubeta con solución de bloqueo de peroxidasas endógenas (Peróxido de hidrógeno 3% y Metanol 10% en agua desionizada). Tras el bloqueo las muestras fueron aclaradas mediante tres baños de 5 minutos en TBS 1x. Posteriormente se sumergieron en una solución de citrato sódico (Ácido cítrico 10 Mm; NaOH pH 6) y se calentaron a 95-100°C durante 10 minutos mediante un microondas para el desenmascaramiento de epítomos. Después se dejaron enfriar dentro de la misma solución durante 20 minutos. Una vez finalizado el proceso de desenmascaramiento, las muestras se lavaron 3 veces durante 5 minutos en TBS 1x y se retiró el exceso de líquido. La unión inespecífica de los anticuerpos se previno mediante el bloqueo previo de las secciones con albúmina sérica bovina (BSA (ITW Reagents) al 5% en TBS 1x) durante 1 hora y a temperatura ambiente. Tras retirar la solución de bloqueo, las muestras fueron incubadas con el anticuerpo primario disuelto en BSA al 2,5% y empleando una dilución diferente según el tipo de anticuerpo (**Tabla 4-1**). Una vez realizada la incubación primaria, se utilizaron anticuerpos secundarios biotinilados disueltos en BSA al 2,5% y adecuados al origen del primario (**Tabla 4-2**). Después de la incubación con ambos anticuerpos, las secciones se lavaron mediante 3 baños de 5 minutos y se incubaron con un complejo avidina-biotina (*ABC Peroxidase Staining Kit*, ThermoFisher) durante 1 hora. Finalmente, se aclararon mediante 3

4. MATERIAL Y MÉTODOS

baños de 5 minutos y se tiñeron utilizando un kit de diaminobenzidina (DAB Enhanced Liquid Substrate System, Sigma).

Tabla 4-1 - Listado de anticuerpos primarios utilizados en las técnicas de inmunohistoquímica. Se indican los anticuerpos primarios utilizados en las técnicas de IHQ, la dilución empleada y el tiempo de incubación.

Proteína	Desenmascaramiento de epítomos	Solución de bloqueo	Anticuerpo primario			
			Origen	Referencia	Dilución	Incubación
ECA	10 mM citrato sódico pH6 MW; 95°C; 10min	BSA 5% 10 min	Conejo Policlonal	Bioworld (BS3485)	1/250	16h; 4°C
ECA2	10 mM citrato sódico pH6 MW; 95°C; 10min	BSA 5% 10 min	Cabra Policlonal	R&D (AF3437)	1/250	16h; 4°C
Renina	10 mM citrato sódico pH6 MW; 95°C; 10min	BSA 5% 10 min	Conejo Monoclonal	Abcam (ab212197)	1/2000	16h; 4°C
SGLT2	10 mM citrato sódico pH6 MW; 95°C; 10min	BSA 5% 10 min	Conejo Policlonal	Abcam (ab85626)	1/500	16h; 4°C
WT-1	10 mM citrato sódico pH6 MW; 95°C; 10min	BSA 5% 10 min	Conejo Monoclonal	Abcam (ab89901)	1/100	16h; 4°C

ECA: Enzima conversor de angiotensina; ECA2: enzima conversor de angiotensina 2; SGLT2: cotransportador de sodio-glucosa tipo 2; WT-1: Wilms tumor 1; MW: microondas.

Tabla 4-2 - Listado de anticuerpos secundarios utilizados en las técnicas de inmunohistoquímica. Se indican los anticuerpos secundarios utilizados en las técnicas de IHQ, la dilución empleada y el tiempo de incubación.

Anticuerpo secundario	Origen	Referencia	Dilución	Incubación
Anti-Conejo IgG Biotinilado	Caballo	Vector (BA-1100)	1/250	1h; RT
Anti-Cabra IgG Biotinilado	Caballo	Vector (BA-9500)	1/250	1h; RT

RT: temperatura ambiente.

4.3.d.1. Evaluación del número de podocitos mediante IHQ

Los podocitos se pueden identificar en IHQ con una tinción específica para Wilms tumor 1 (WT) (**Figura 4-7**). Tras realizar tinciones de cada animal, se obtuvieron 10 microfotografías a 40 aumentos de glomérulos corticales. En estas imágenes, se realizó una medición ciega del número de núcleos teñidos (podocitos), el número de núcleos no teñidos (otras células) y el área del penacho glomerular (**Figura 4-7**). Mediante estos datos, el número de podocitos se ajustó al área del penacho glomerular en cada imagen para obtener la densidad podocitaria por cada 100 μm^2 .

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Finalmente, para cada animal se calculó la media del número de podocitos y de la densidad podocitaria.

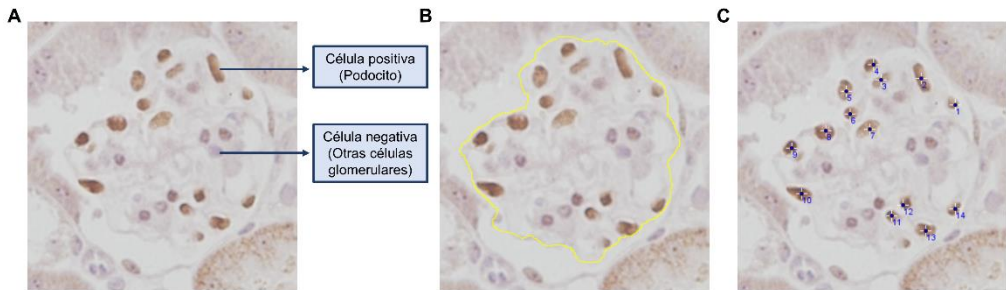


Figura 4-7 - Procedimiento de medición del número de podocitos glomerulares y la densidad podocitaria. Se muestran microfotografías a 40 aumentos de un glomérulo murino teñido mediante inmunohistoquímica para Wilms Tumor 1 (WT-1). Los núcleos de los podocitos son positivos y adquieren una tinción marronácea. El resto de núcleos glomerulares son negativos y sólo tiñen con hematoxilina. Para el proceso de medición se fotografiaron 10 glomérulos corticales. En cada uno de estos glomérulos se midió el área del penacho. Posteriormente, se contabilizó el número de podocitos para calcular la densidad podocitaria en cada imagen. **A:** Microfotografía a 40 aumentos en la que se observa la diferencia de tinción entre núcleos; **B:** Medición del área del penacho glomerular; **C:** Contaje de podocitos para estimar la densidad podocitaria utilizando el área previamente medida.

4.3.d.II. Evaluación del área de tinción de renina mediante IHQ

En los cortes teñidos específicamente para renina, se identificaron las células yuxtglomerulares teñidas junto a los glomérulos. Se obtuvieron 10 imágenes de regiones diferentes a 40 aumentos. Mediante el software de análisis de imagen ImageJ se realizó una medición ciega del área de tinción de renina en cada imagen. Finalmente se calculó la media del área de tinción para cada animal.

4.3.d.III. Evaluación de la tinción de ECA, ECA2 y SGLT2

La evaluación de las tinciones de inmunohistoquímica de ECA, ECA2 y SGLT2 se realizaron de forma ciega por un investigador. Este evaluó en una primera ronda todas las secciones y puntuó las mismas en una segunda visualización. La puntuación se realizó en base a una escala semicuantitativa que evaluaba la intensidad de la tinción: 1 punto, no teñido o mínima intensidad, 2 puntos, intensidad moderada, y 3 puntos, intensidad fuerte. En las tinciones de ECA y ECA2 se realizó además una

evaluación específica tanto de la tinción en el epitelio apical de las células tubulares como de la tinción glomerular.

4.4. ESTUDIOS MOLECULARES

4.4.a. Estudios de actividad enzimática de ECA y ECA2

4.4.a.I. Extracción proteica

De los riñones previamente conservados a -80°C , se realizaron secciones de corteza renal (25 mg) y se mezclaron con 200 μL de buffer de lisis con Zinc (HEPES pH 7,4 y 50 mM; NaCl 150 mM; Triton X-100 0,5%; ZnCl_2 0,025 mM; Pefablock SC PLUS 0,1 mM (Roche); Mini-EDTA-Free Protease Inhibitor Cocktail 1 tableta por cada 7 mL (Roche)). La homogeneización se realizó en frío, primero con un homogeneizador manual de PTFE y después mediante una jeringuilla con aguja de 30G. Una vez homogeneizados, los extractos proteicos se clarificaron centrifugando las muestras a 16.000 RCF durante 60 minutos y a 4°C de temperatura. Se recogió el sobrenadante y fue transferido a tubos de 1,5 mL para su cuantificación.

4.4.a.II Obtención de extracto enriquecido en proteínas de membrana

Con el objetivo de tener extractos enriquecidos en membrana celular, se utilizó una solución tamponada rica en sacarosa, que permite separar estructuras más densas de la célula como el núcleo o los orgánulos de otras menos densas como las membranas. De los riñones previamente conservados a -80°C , se realizaron secciones de corteza renal (25 mg) y se mezclaron con 1 mL de una solución tamponada de sacarosa (Sacarosa 250 mM; Tris-Hidrocloruro 10 mM pH 7,5; Pefablock SC PLUS 0,1 mM (Roche); Mini-EDTA-Free Protease Inhibitor Cocktail 1 tableta por cada 7 mL (Roche)) en tubos de 2 mL. Posteriormente se homogeneizaron con un homogeneizador rotativo (LabGEN 125, Cole-Parmer) y se centrifugaron por un corto periodo de tiempo (6200 RCF a 4°C durante 1 min). Esta primera centrifugación permitió separar las estructuras celulares más densas (pellet) de otras menos densas como las membranas (sobrenadante). Se recogió entonces el

4. MATERIAL Y MÉTODOS

sobrenadante y se transfirió a tubos Beckman de 10 mL para ultracentrifugar este sobrenadante a 132.000 RCF durante 1 hora y a 4°C. La ultracentrifugación permitió depositar en el fondo un pellet compuesto fundamentalmente de membranas celulares. El sobrenadante del tubo se recogió en tubos de 1,5 mL y se conservó a -20°C para futuros estudios sobre el citosol de las células. El pellet del fondo se disolvió entonces en 200µL de buffer de lisis con Zinc, igual al utilizado para la extracción de proteínas corticales totales (HEPES pH 7,4 y 50 mM; NaCl 150 mM; Triton X-100 0,5%; ZnCl₂ 0,025 mM; Pefablock SC PLUS 0,1 mM (Roche); Mini-EDTA-Free Protease Inhibitor Cocktail 1 tableta por cada 7 mL (Roche)). Una vez disuelto se procedió a la cuantificación proteica.

4.4.a.III Cuantificación proteica

La concentración proteica de los extractos corticales se determinó mediante ácido bicinconínico (BCA) utilizando un kit comercial (Pierce BCA Protein Assay Kit, ThermoFisher). Esta técnica se basa en la reacción de Biuret, que consiste en la reducción de iones de cobre ($\text{Cu}^{+2} \rightarrow \text{Cu}^{+1}$) que ocurre en un medio alcalino por la unión del catión a las proteínas presentes en la muestra (116). La reacción colorimétrica que tiene lugar tras la adición de BCA se debe a la presencia del catión Cu^{+1} reducido y que es proporcional a la cantidad de proteína.

Brevemente, 10 µL de los extractos proteicos previamente diluidos (dilución habitual 1/4 en el mismo buffer de lisis en que fueron extraídas) y una recta patrón realizada con BSA se pipetearon por duplicado a una placa de 96 pocillos. Posteriormente 200 µL de una solución compuesta por cobre y BCA se añadieron a cada pocillo y las placas se incubaron durante 30 min a 37°C. La absorbancia de cada pocillo se midió empleando el lector de placas Varioskan Lux (ThermoFisher) a una longitud de onda de excitación de 562 nm. Utilizando la recta patrón, se estimaron las concentraciones de albúmina de cada pocillo en µg de proteína por µL.

4.4.a.IV Determinación de la actividad renal de ECA

La determinación mediante ensayo de la actividad de ECA se realizó utilizando un sustrato de ácido hipúrico unido a un residuo de histidina y otro de leucina (N-

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucine). Estos dos últimos aminoácidos son exactamente los que escinde la ECA para convertir la Ang I e Ang II. Al poner en contacto el sustrato con el enzima se generan dipéptidos de His-Leu y ácido hipúrico de forma proporcional a la cantidad de enzima. Estos dipéptidos de His-Leu pueden ser posteriormente detectados mediante un método fluorométrico que emplea o-Phthalaldeido (117,118).

Los extractos corticales renales, previamente cuantificados, se ajustaron a una concentración de 0,5 µg/µL con el mismo buffer de lisis previamente empleado (HEPES pH 7,4 y 50 mM; NaCl 150 mM; Triton X-100 0,5%; ZnCl₂ 0,025 mM; Pefablock SC PLUS 0,1 mM (Roche); Mini-EDTA-Free Protease Inhibitor Cocktail 1 tableta por cada 7 mL (Roche)). Una vez ajustados, 2 µL (1 µg de proteína) de cada una de las muestras se incubaron durante 25 minutos y a 37°C con 73 µL de la solución de ensayo (Tampón de borato sódico pH 8,3 (Ácido Bórico 0,4 M; NaCl 0,9 M) con 5 mM de N-Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucine (Sigma)). Posteriormente, la reacción se detuvo añadiendo 180 µL de Hidróxido Sódico 0,28 M. Tras detener la reacción, a cada muestra se le añadieron 15 µL de o-Phthalaldeido (20 mg/mL en Metanol) y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y protegidas de la luz. Esta segunda reacción se detuvo mediante la adición a las muestras de 30 µL de Ácido Clorhídrico 3 N (ITW Reagents). Después, para clarificar las muestras, estas se centrifugaron durante 5 minutos a 800g. 200 µL de los sobrenadantes de cada muestra se transfirieron a placas opacas de 96 pocillos. Una vez transferidas las muestras, la fluorescencia emitida en cada pocillo se midió empleando el lector de placas Varioskan Lux (ThermoFisher) a una longitud de onda de excitación de 360 nm y de emisión de 485 nm. Se realizó un duplicado técnico para cada muestra y el valor de fluorescencia se obtuvo de la media de ambas mediciones. Los valores fueron ajustados al tiempo de reacción (25 min) y a la cantidad de proteína (1 µg) para obtener la actividad cruda en unidades relativas de fluorescencia (RFU)/mg/h. Además, con el objetivo de eliminar posible variabilidad interplaca, la actividad de cada muestra fue ajustada al control positivo (ECA recombinante murina a 75 ng/µL) de cada placa. Estos valores ajustados de actividad de ECA se presentan en los resultados a modo de porcentaje de la ratio que se obtiene dividiendo la actividad de cada muestra por el promedio de la actividad del grupo db/m.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.4.a.V. *Determinación de la actividad sérica de ECA*

Las muestras de suero, previamente conservadas a -80°C , fueron descongeladas y se diluyeron a una proporción 1/8 en PBS 1x (2 μL en 14 μL de PBS1x). Se tomaron entonces 2 μL de esta dilución que se incubaron durante 15 minutos y a 37°C con 73 μL de la solución de (Tampón de borato sódico pH 8,3 (Ácido Bórico 0,4 M; NaCl 0,9 M) con 5 mM de N-Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucine (Sigma)). Después, la reacción se detuvo añadiendo 180 μL de Hidróxido Sódico 0,28 M. A partir de este punto la técnica siguió exactamente los mismos pasos que aquellos indicados en la medición de la actividad de ECA renal (**Ver sección Material y Métodos - Determinación de la actividad renal de ECA**). Del mismo modo, se realizó un duplicado técnico para cada muestra y el valor de fluorescencia se obtuvo de la media de ambas mediciones. Los valores fueron ajustados al tiempo de reacción (15 min) y a la cantidad de suero utilizada teniendo en cuenta la dilución 1/8 empleada (0,25 μL) para obtener la actividad cruda en RFU/ $\mu\text{L}/\text{h}$. Además, también se estimó la actividad de ECA ajustada al grupo db/m.

4.4.a.VI. *Determinación de la actividad renal de ECA2*

La actividad renal de ECA2 se determinó utilizando un sustrato cuya escisión por ECA2 genera fluorescencia y que se denomina por su composición Mca-Ala-Pro-Lys(Dnp)-OH (Enzo LifeSciences). El grupo Dnp de este sustrato inhibe la fluorescencia de Mca hasta que ECA2 hidroliza el sustrato y escinde los grupos de Pro-Lys(Dnp)-OH. Así, la fluorescencia generada es proporcional a la cantidad de enzima presente en la muestra.

A partir de los extractos renales corticales previamente cuantificados, se obtuvieron 0,25 μg que se diluyeron en 50 μL de la solución de ensayo (Tris-Hidrocloreuro 100 mM pH 7,5; NaCl 600 mM; ZnCl_2 0,01 mM; Captopril 100 μM ; Bestatina 5 μM ; Amastatina 5 μM ; Z-Pro-prolinal 10 μM). 50 μL de estas diluciones se pipetearon por duplicado a 2 placas opacas de 96-pocillos. En una de las placas la reacción se inició mediante la adición 50 μL de solución de ensayo con sustrato fluorescente disuelto a una concentración de 5 μM , mientras que en la otra placa la reacción se inició añadiendo 50 μL de solución de ensayo con sustrato fluorescente a 5 μM y un potente

4. MATERIAL Y MÉTODOS

inhibidor de ECA2 (MLN-4760, Sigma) a una concentración de 10 μM . Las placas se dejaron incubar durante 4 horas a 37°C y tras la incubación la fluorescencia emitida en cada pocillo se midió empleando el lector de placas Varioskan Lux (ThermoFisher) a una longitud de onda de excitación de 320 nm y de emisión de 400 nm. El valor medio de cada muestra se calculó restado a la media de la fluorescencia de los pocillos sin inhibidor la media de los pocillos con inhibidor. Esta corrección eliminaba cualquier actividad de lisis del sustrato no dependiente de ECA2. Los valores finales fueron ajustados al tiempo de reacción (4 horas) y a la cantidad de proteína (0,25 μg) para obtener la actividad cruda en unidades relativas de fluorescencia (RFU)/mg/h. Además, con el objetivo de eliminar la posible variabilidad interplaca, la actividad de cada muestra fue ajustada al control positivo (ECA2 recombinante murina a 0,008 ng/ μL) de cada placa. Estos valores ajustados de actividad de ECA2 se presentan en los resultados a modo de porcentaje de la ratio que se obtiene dividiendo la actividad de cada muestra por el promedio de la actividad del grupo db/m.

4.4.a.VII Determinación de la actividad de ECA2 sérica

Para la medición de la actividad de ECA2 en suero, 2,5 μL de suero se pipetearon por duplicado a 2 placas opacas de 96 pocillos. En este caso se añadieron 97,5 μL de solución de ensayo con sustrato fluorescente a 20 μM en una de las placas, y 97,5 μL de solución de ensayo con sustrato fluorescente a 20 μM y el inhibidor MLN-4760 a 10 μM . El volumen final en cada pocillo era de 100 μL . Las placas se incubaron a 37°C durante 4 horas y se midieron con los mismos parámetros utilizados para la actividad renal e ECA2 (**Ver sección Material y Métodos - Determinación de la actividad renal de ECA2**). El valor medio de cada muestra se calculó restado a la media de la fluorescencia de los pocillos sin inhibidor la media de los pocillos con inhibidor. Los valores finales fueron ajustados al tiempo de reacción (4 horas) y a la cantidad de suero (2,5 μL) para obtener la actividad cruda en unidades relativas de fluorescencia (RFU)/mg/h. Además, con el objetivo de eliminar la posible variabilidad interplaca, la actividad de cada muestra fue ajustada al control positivo (ECA2 recombinante murina a 0,008 ng/ μL) de cada placa. Estos valores ajustados de actividad de ECA2 se presentan en los resultados a modo de porcentaje de la ratio que se obtiene dividiendo la actividad de cada muestra por el promedio de la actividad del grupo db/m.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.4.b. Estudios de expresión génica

4.4.b.I. Extracción de ARN

La extracción de ARN para los estudios de expresión génica se realizó con el método de tiocianato de guanidina utilizando el reactivo comercial TRIzol G (ITW Reagents). De los riñones previamente conservados a -80°C , se realizaron secciones de corteza renal (25 mg) y se mezclaron con 1 mL de TRIzol en tubos de 2 mL libres de RNAsas. Posteriormente se homogeneizaron con un homogeneizador rotativo (LabGEN 125, Cole-Parmer) y se dejaron incubar 5 min a temperatura ambiente para asegurar la disociación de los complejos de nucleoproteínas. Tras la incubación se añadieron 200 μL de cloroformo y se agitaron los tubos de forma vigorosa durante 15 segundos para dejarlos incubar de nuevo 10 minutos a temperatura ambiente. Para obtener las 3 fases: 1.-el RNA (fase acuosa superior), 2.- el DNA (interfase), y 3.-las proteínas (fase orgánica de tonalidad rojiza), las muestras se centrifugaron a 12.000 RCF durante 15 minutos y a 4°C . 500 μL de la fase acuosa superior fueron recogidos y transferidos a un nuevo tubo de 1,5 mL libre de RNAsas. En este tubo se añadieron 500 μL de isopropanol siguiendo una relación 1/1. Las muestras se incubaron entonces durante 15 minutos en hielo. Tras la incubación fueron centrifugadas a 12.000 RCF durante 15 minutos y a 4°C . Después de la centrifugación se descartó el sobrenadante y se añadió 1 mL de etanol 70% disuelto en agua DEPC (agua libre de RNAsas). La mezcla se agitó y se centrifugó de nuevo a 12.000 RCF durante 5 minutos y a 4°C . El sobrenadante se descartó y de nuevo se realizó un segundo lavado del ARN añadiendo 1mL de etanol 100%. La mezcla se agitó y se centrifugó de nuevo a 12.000 RCF durante 15 minutos y a 4°C . Se volvió a descartar el sobrenadante y los pocos restos de etanol se dejaron secar a temperatura ambiente con la tapa de los tubos abierta. El pellet del fondo del tubo de 1,5 mL se resuspendió con 50 μL de agua DEPC.

4.4.b.II. Conversión del ARN a ADNc

La concentración, calidad y pureza del ARN se analizó utilizando el dispositivo NanoDrop 2000 (ThermoFisher). Una pureza aceptable se consideró aquella con una

4. MATERIAL Y MÉTODOS

ratio A260/A280 entre 1,6 y 2,0. La concentración se midió en ng/ μ L y todas las muestras extraídas presentaron una concentración superior a 100 ng/ μ L. La conversión de las cadenas simples de ARN a ADN se realizó utilizando el kit comercial High Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems). Para ello, 1 μ g de RNA de cada una de las muestras se diluyó en agua DEPC para obtener un volumen total de 9 μ L. Estos 9 μ L se mezclaron con 11 μ L del reactivo de retrotranscripción para obtener un volumen final de 20 μ L (**Tabla 4-3**).

Tabla 4-3 - Reactivos utilizados en la retrotranscripción de ARN. Se muestran los reactivos empleados, la cantidad pipeteada por muestra y la concentración final de los reactivos. Se empleó el kit High Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems).

Reactivo	Volumen (μ L/muestra)	Concentración final
Tampón de retrotranscripción 2X (<i>RT Buffer Mix</i>)	10	1X
Enzimas de retrotranscripción 20X (<i>RT Enzyme Mix</i>)	1	1X
Muestra de ARN (1 μ g)	Variable hasta añadir 1 μ g	0,05 μ g/ μ L
Agua libre de ARNasas	Ajustar para alcanzar volumen total	-
Volumen total por muestra	20	-

ARNasa: ribonucleasa.

El proceso de retrotranscripción se realizó en un termociclador (GS1 G-Storm, Gene Technologies) mediante una incubación con los siguientes parámetros: 60 min a 37°C y 5 min a 95°C. El producto final fue 1 μ g de cDNA para cada una de las muestras.

4.4.b.III. PCR cuantitativa en tiempo real

La PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) utiliza la misma metodología que la PCR clásica, pero se incluye un fluoróforo en la mezcla. Además, el termociclador cuenta con un detector de fluorescencia que mide la misma en tiempo real a medida que se suceden los ciclos de amplificación. Así, ofrece una lectura continua a lo largo de todo el proceso de amplificación. En este trabajo, las RT-qPCR se realizaron utilizando el reactivo SYBR Green PCR Master Mix (ThermoFisher). Este contiene una ADN polimerasa y el colorante SYBR Green I, que a medida que se amplifican las dobles cadenas de ADN en cada ciclo, se intercala entre ellas incrementando

4. MATERIAL Y MÉTODOS

progresivamente la fluorescencia de los pocillos. Los ciclos térmicos y la lectura se realizaron con el dispositivo 7900HT Fast Real-Time PCR System (ThermoFisher) empleando el bloque para placas de 384 pocillos.

En síntesis, las muestras de ADNc fueron previamente diluidas en agua DEPC, ajustando la dilución según el gen a estudio (**Tabla 4-4**). Posteriormente 1µL de cada una de estas diluciones fue pipeteado por triplicado a placas de 384 pocillos. En el pocillo que actuaba como control negativo se pipeteo exclusivamente agua tratada con dietilpirocarbonato libre de ribonucleasas (agua DEPC). A cada uno de estos pocillos se les añadió después 9µL del reactivo SYBR Green PCR Master Mix más los cebadores (*primers*) del gen a estudio (**Tabla 4-5**). Por último, se programó la máquina según los parámetros que figuran en la **Tabla 4-6**.

Tabla 4-4 - Cebadores (*primers*) utilizados en las técnicas de RT-qPCR. Se muestra el listado de genes analizados y la secuencia de los primers utilizados para cada gen. Además, se muestra la dilución de ARN utilizada con cada gen (se indica en cuantos µL se diluyo 1 µg).

Nombre del gen	Gen	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Dilución (ARN 1 µg)
Enzima conversor de angiotensina	Ace	CGCCGCTATGGGGACAAATA	ATGTCTCCCAGCAAAATGGGC	1/50
Enzima conversor de angiotensina 2	Ace2	CGCAGAGATCAAGCCATTGT	TCCATCAACTTCTCTCACA	1/50
Angiotensinógeno	Agt	CGTGCCCTAGGTGAGAGAG	TCCAAGTCAGGAGTCTGTC	1/50
Proteína quimiotáctica de monocitos 1	Ccl2	AGGTCCTGTCATGCTTCTG	CGTAACTGCATCTGGCTGA	1/10
Colágeno IV cadena alfa-1	Col4a1	TGTCCATGGCACCCATCTCT	CACAAACCGCACACCTGCTA	1/25
Endotelina-1	Edn1	CCTGGACATCATCTGGGTC	TGTGGCCTTATTGGGAAG	1/25
Receptor tipo A de la endotelina	Ednra	GGTGGCTCTTTGGGTCT	GACGCTGTTTGAGGTGCT	1/25
Receptor tipo B de la endotelina	Ednrb	TGCGAAATGCTCAGGAAG	ACGAGGACCAGGCAGAAG	1/25
Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa	Hprt1	TGTTGTTGGATATGCCCTTG	AATGACACAAACGTGATTCAAA	1/50
NADPH oxidasa 2	Nox2	TCTCAGGTGTCATGTAGCC	TTGCTGCATTCAAGTCAAGG	1/100
NADPH oxidasa 4	Nox4	CTTGGTGAATGCCCTCAACT	TTCTGGGATCCTCATTCTGG	1/100
Cotransportador de sodio-glucosa tipo 2	Slc5a2	ATGGAGCAACACGTAGAGGC	ACATAGACCACAAGCCAACACC	1/25
Intercambiador de sodio-hidrógeno tipo 3	Slc9a3	AGGCCACCAACTATGAAGAG	AGGGGAGAACACGGGATTATC	1/25
Renina	Ren1	ACCTTGCTTGTGGGATTAC	CCTGATCCGTAGTGGATGGT	1/50
Factor de crecimiento transformante β1	Tgfb1	TGAGTGGCTGTCTTTGACG	AGCCCTGTATTCCGTCTCCT	1/25

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 4-5 - Reactivos utilizados en la RT-qPCR. Se muestran los reactivos empleados, la cantidad pipeteada por pocillo y la concentración final de los reactivos. Cada muestra de ADNc se pipeteo por triplicado en las placas de 384 pocillos.

Reactivo	Volumen (µL/pocillo)	Concentración final
SYBRGreen Master Mix 2x (Applied Biosystems)	5,0	1x
Forward primer (10 µM) (Cebador de la hebra positiva de ADN)	0,25	0,25 µM
Reverse primer (10 µM) (Cebador de la hebra negativa de ADN)	0,25	0,25 µM
Agua libre de ARNasas	3,5	-
Muestra de ADNc (Dilución previa variable según el gen a estudio)	1	-

ADNc: ADN complementario; **ARNasa:** ribonucleasa.

Tabla 4-6 - Parámetros de configuración del equipo de RT-qPCR. Se muestran la duración de cada etapa y la temperatura programada para cada una.

Etapa	Temperatura	Rampa de temperatura	Tiempo
1.-Preincubación	95°C	4,8°C/s	5 minutos
2.-Amplificación (45 ciclos)			
Desnaturalización	95°C	4,8°C/s	10 segundos
Unión	58°C	2,5°C/s	20 segundos
Extensión	72°C	4,8°C/s	20 segundos
3.-Cálculo de la temperatura de fusión			
Desnaturalización	95°C	4,8°C/s	5 segundos
Fusión	58°C	2,5°C/s	1 minuto
Desnaturalización	95°C	0,11°C/s	
4.-Enfriado	40°C	2,5°C/s	10 segundos

4.4.b.IV. Lectura de los datos de la RT-qPCR

Se evaluó la expresión de genes relacionados con la fibrosis, la inflamación, el estrés oxidativo, el SRA y los transportadores de membrana. La secuencia de los *primers* empleados para la amplificación de estos genes figura en la **Tabla 4-4**. Para cada gen a estudio, se utilizó una dilución que permitiese obtener CTs en torno a 20-30. Asimismo, se utilizó el gen de la hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Hprt1) para normalizar la señal entre muestras (*housekeeping gene*) (**Tabla 4-4**). Por otra parte, la interpretación de los resultados fue siempre relativa a un grupo control, que en todos los casos fue la rama no diabética db/m. Estos valores relativos se

4. MATERIAL Y MÉTODOS

expresaron como RQ (cuantificación relativa o *relative quantification* por sus siglas en inglés). Esta se obtenía elevando 2 al valor $-\Delta\Delta CT$ como se ha descrito previamente (119). Un RQ de 1 indicaba la ausencia de cambio respecto al control. Así, valores mayores de 1 indicaban incremento y menores de 1 disminución de la expresión de ARNm.

4.5. ESTUDIO DE PROTEÓMICA

Los estudios de proteómica se basan en el análisis de la expresión de un gran conjunto de proteínas. En el presente trabajo se realizó un estudio de proteómica del conjunto de proteínas expresadas en extractos corticales renales mediante cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas (LC-MS/MS). El objetivo era identificar proteínas renales expresadas de forma diferencial entre grupos experimentales. En este estudio se incluyeron sólo 6 muestras de cada una de las siguientes ramas: 1.-db/m, 2.-db/db, 3.-db/db tratado con empagliflozina, 4.-db/db tratado con ramipril, y 5.-db/db tratado con empagliflozina y ramipril. En síntesis, este estudio cuantifica la expresión de las proteínas en base a la intensidad de los péptidos pertenecientes a la misma que se reconocen en el estudio LC-MS/MS. La técnica consistía en obtener los extractos de proteína cortical renal para posteriormente digerirlos con tripsina. La digestión generaba péptidos que eran etiquetados mediante el sistema TMT detallado más adelante (**Figura 4-8**). Estas etiquetas otorgan una masa concreta a todos los péptidos de una muestra sin alterar su carga. Al realizar la lectura mediante LC-MS/MS, como se conoce la masa con la que se etiquetaron los péptidos de cada una de las muestras, el programa de lectura es capaz de identificar a que muestra pertenecen esos péptidos. Los péptidos identificados permiten reconocer las proteínas expresadas en el córtex renal y la intensidad de estos péptidos permiten establecer cuanto se expresa esa proteína en cada una de las muestras. Así, el estudio LC-MS/MS, además de identificar proteínas expresadas en el córtex renal murino, estableció si estas estaban más expresadas en una rama experimental o en otra (**Figura 4-8**).

4. MATERIAL Y MÉTODOS

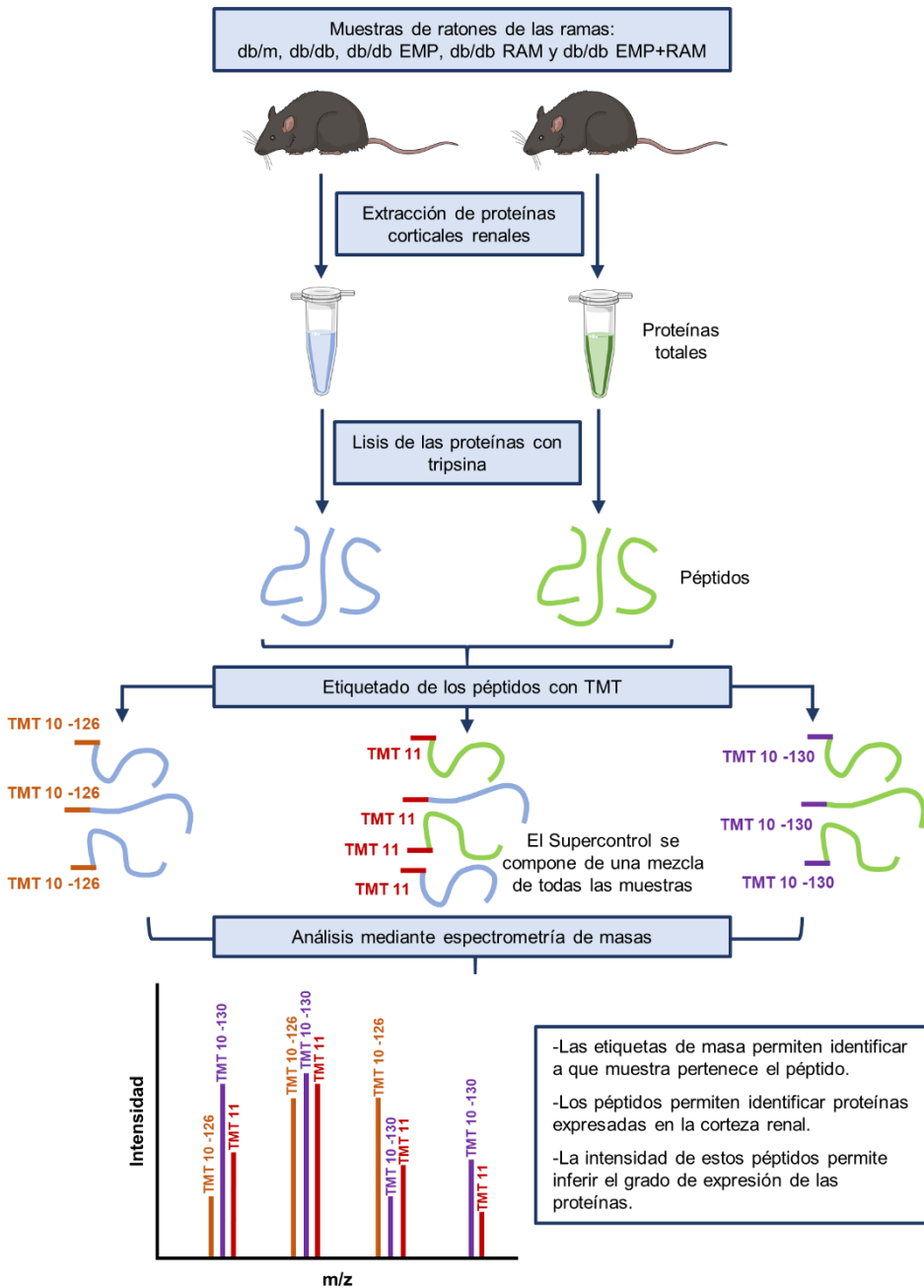


Figura 4-8 - Esquema que representa el procedimiento de proteómica. Se muestra cómo se realizó la extracción de proteínas, la digestión de las mismas y el posterior análisis de los péptidos expresados mediante cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas (LC-MS/MS).

TMT: Tandem Mass Tag; m/z: relación masa/carga.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio de proteómica diferencial se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular Europeo (EMBL por sus siglas en inglés *European Molecular Biology Laboratory*) ubicado en Heilderberg (Alemania). Este cuenta con una Unidad de Proteómica con amplia experiencia en estudios de proteómica diferencial y con el que el Grupo de Nefrología del Instituto de Investigación Vall d'Hebron ya había trabajado previamente. El proceso se realizó según se indica a continuación.

4.5.a. Extracción proteica

De los riñones previamente conservados a -80°C , se realizaron secciones de corteza renal (25 mg) y se mezclaron con 200 μL de tampón de lisis RIPA (Tris-Hidrocloruro 50 mM pH 7,5; EDTA 1 mM pH 8; NaCl 150 mM; SDS al 0,1%; NP-40 al 1% y desoxicolato de sodio al 0,5%; Mini-EDTA-Free Protease Inhibitor Cocktail 1 tableta por cada 7 mL (Roche); Na_3VO_4 1 mM; NaF 1 mM) modificado mediante la adición de Benzonasa a 0,5 unidades/ μL (TB261, Merck) para digerir ARN y ADN de forma simultánea al proceso de lisis tisular y así liberar las proteínas unidas a ácidos nucleicos. Una vez mezclados los ejidos con el tampón de lisis, se realizó la homogeneización en frío primero con un homogeneizador manual de PTFE y después mediante una jeringuilla con aguja de 30G. Una vez homogeneizados, los extractos proteicos se clarificaron centrifugando las muestras a 16.000 RFC durante 60 minutos y a 4°C de temperatura. Se recogió el sobrenadante y fue transferido a tubos de 1,5 mL para su cuantificación por BCA como se explicó previamente (**Ver sección Material y Métodos - Cuantificación proteica**).

4.5.b. Preparación y marcaje de las muestras

Los puentes disulfuro se redujeron con Ditiotetriol (Ditiotetriol 10 mM disuelto en 50 mM HEPES pH 8,5) a 56°C y durante 30 minutos. Una vez reducidos, estos fueron alquilados con 2-Cloroacetamida (Cloroacetamida 20 mM disuelta en 50 mM HEPES pH 8,5) durante 30 minutos, protegidos de la luz y a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se prepararon utilizando el protocolo SP3 que emplea unas cuentas paramagnéticas (*paramagnetic beads*) que se unen a los péptidos y permiten su lavado, siguiendo un procedimiento descrito previamente (120,121). Tras la preparación se añadió Tripsina (Promega) en una ratio enzima:proteína de 1/50.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Una vez añadida, las muestras se incubaron 16 horas a 37°C para permitir la acción de la tripsina. Tras la incubación con Tripsina, los péptidos se recuperaron en solución HEPES, recogiendo primero el sobrenadante sobre un imán y combinándolo con una segunda elución y lavado de los *beads* con HEPES.

Se realizaron 3 tandas de lectura para poder realizar todas las muestras (30 en total). En cada tanda de lectura se incluyeron 10 muestras más el Supercontrol, que se componía de una mezcla de las 30 muestras procesadas para proteómica. Las 10 muestras de cada tanda incluían: 1.-2 muestras del grupo db/m, 2.-2 muestras del grupo db/db tratado con vehículo, 3.-2 muestras del grupo db/db tratado con empagliflozina, 4.-2 muestras del grupo db/db tratado con ramipril, y 5.-2 muestras del grupo db/db tratado con empagliflozina y ramipril. Los péptidos de cada muestra se etiquetaron con una masa específica para esa muestra utilizando el reactivo TMT10plex Isobaric Mass Tag Labeling Reagent (ThermoFisher). Asimismo, el Supercontrol se etiquetó con el reactivo TMT11-131C Label Reagent (ThermoFisher). Así, se realizaron un total de 11 marcajes específicos, los 10 de las muestras y 1 del Supercontrol siguiendo las instrucciones del fabricante (122). Las muestras se combinaron con este reactivo y para un posterior lavado se utilizó el OASIS® HLB μ Elution Plate (Waters). El fraccionamiento *offline* de fase inversa en pH alto se realizó en un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento (Agilent 1200 Infinity) equipado con una columna Gemini C18 (3 μ m, 110 Å, 100 x 1.0 mm, Phenomenex) (123).

4.5.c. Cromatografía líquida y espectrometría de masas (LC-MS/MS)

Se utilizó un equipo UltiMate 3000 RSLC nano LC system (Dionex) con un cartucho de captura (μ -Precolumn C18 PepMap 100, 5 μ m, 300 μ m i.d. x 5 mm, 100 Å) y una columna analítica (nanoEase M/Z HSS T3 column 75 μ m x 250 mm C18, 1.8 μ m, 100 Å, Waters). El atrapamiento se realizó con un flujo constante a 30 μ L/min de solución de atrapamiento (Ácido trifluoroacético al 0,05% en agua) sobre la columna de atrapamiento durante 6 minutos. Posteriormente, los péptidos se eluyeron a través de la columna analítica con disolvente A (Ácido fórmico al 0,1% y DMSO al 3% en agua) con un flujo constante de 0,3 μ L/min y un porcentaje creciente de disolvente B (Ácido fórmico al 0,1% y DMSO al 3% en acetonitrilo): del 2% al 8% en 4 min, del 8%

4. MATERIAL Y MÉTODOS

al 28% durante 104 min, del 28 al 40% durante 4 min, y finalmente de 40% al 80% durante 4 min, seguido de un reequilibrio del disolvente B al 2% en 4 min. La salida de la columna analítica se acopló directamente a un espectrómetro de masas Orbitrap Fusion Lumos Tribrid (ThermoFisher) utilizando una fuente de ionización Nanospray Flex (ThermoFisher) en modo de iones positivos.

Los péptidos se introdujeron en Fusion Lumos mediante un emisor Pico-Tip de 360 μm de diámetro exterior, 20 μm de diámetro interno, punta de 10 μm (New Objective) y un voltaje de pulverización aplicado de 2,4 kV. La temperatura capilar se fijó en 275°C. Se adquirió un barrido de masa completo con un rango de masa de 375-1500 m/z en modo perfil en el Orbitrap con una resolución de 120.000. El tiempo de llenado se estableció en un máximo de 50 ms con una limitación de 4×10^5 iones. La adquisición dependiente de datos se realizó con la resolución del Orbitrap establecida en 30.000, con un tiempo de llenado de 94 ms y una limitación de 1×10^5 iones. Se aplicó una energía de colisión normalizada de 38. Los datos de MS2 se adquirieron en modo perfil.

4.5.d. Análisis de los datos de la espectrometría de masas

Se utilizó el software IsobarQuant (124) y Mascot (v2.2.07) para procesar los datos adquiridos, contrastando los mismos contra una base de datos de Uniprot de *Mus musculus* (UP000000589), que contiene contaminantes comunes y secuencias inversas. Las siguientes modificaciones se incluyeron en los parámetros de búsqueda: Carbamidometil (C) y TMT11 (K) (modificación fija), Acetil (Proteína N-terminal), Oxidación (M) y TMT11 (N-terminal) (modificaciones variables). Para la exploración completa (MS1) se estableció una tolerancia de error de masa de 10 ppm y para espectros MS/MS (MS2) de 0,02 Da. Se establecieron otros parámetros: tripsina como proteasa con una tolerancia de un máximo de dos escisiones omitidas, una longitud mínima de los péptidos de siete aminoácidos y la presencia de al menos dos péptidos únicos para la identificación de una proteína. La tasa de falsos descubrimiento (FDR) a nivel de péptidos y proteínas se estableció en 0,01.

Los archivos de datos crudos sin procesar del software IsobarQuant (protein.txt - archivos) se procesaron utilizando el lenguaje de programación R (125). Únicamente

4. MATERIAL Y MÉTODOS

se consideraron para el análisis las proteínas que se cuantificaron con al menos dos péptidos únicos. Además, sólo se conservaron las proteínas que se identificaron en dos de cada tres tandas de espectrometría de masas realizadas. 4725 proteínas pasaron estos filtros de control de calidad. Por otro lado, en el tratamiento de la señal, se eliminó en primer lugar y utilizando el método limma la variabilidad de la señal entre las 3 tandas de espectrometría realizadas (126). Después esta señal se normalizó aún más utilizando el método de estabilización y normalización de la varianza (127). Los valores perdidos se trataron con el método knn utilizando el paquete Msnbase (128). Las proteínas se analizaron para determinar la expresión diferencial utilizando el paquete limma. En síntesis, la señal de las proteínas en cada grupo se ajustaba contra el grupo frente al que se realizaba la comparación. Esta señal ajustada se transformaba a una escala logarítmica de base 2, que durante el presente trabajo se denomina LogFC (*Log fold-change* o número de veces que varía la señal respecto a un control en una escala logarítmica de base 2). El incremento o descenso de la expresión se calcula entonces elevando el número 2 al valor del LogFC. Así, un LogFC de 1 indica que la expresión de esa proteína incrementa 2 veces, mientras que un LogFC de -1 indica que la expresión de la proteína disminuye 2 veces respecto a un control previamente establecido. Por último, para determinar la significación estadística se utiliza la tasa de falsos descubrimientos (FDR por sus siglas en inglés de False Discovery Rate), que equivale a un valor p penalizado para comparaciones múltiples entre grupos.

En el análisis de la expresión diferencial de proteínas, estas se categorizaron en dos tipos de proteínas diferencialmente expresadas: 1.-un grupo de proteínas con una expresión diferencial muy significativa, que se anotaron como *hit proteins* y presentaban un $\text{LogFC} \geq 1$ ó ≤ -1 (existía una diferencia de expresión de 2 veces entre grupos) con una $\text{FDR} < 0,05$, y 2.-un segundo grupo de proteínas con una expresión diferencial menos significativa pero evidente, que se anotaron como *candidate proteins* y presentaban un $\text{LogFC} \geq 0,585$ o $\leq -0,585$ (existía una diferencia de expresión de 1,5 veces entre grupos) con una $\text{FDR} < 0,10$.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.5.e. Análisis de enriquecimiento funcional

Para identificar si un conjunto de proteínas expresadas de forma diferencial estaba relacionado con una vía metabólica o un proceso biológico concreto, se realizaron análisis de enriquecimiento funcional. Estos se llevaron a cabo empleando la herramienta g:Profiler (Elixir) (129). Esta aplicación enlaza los nombres de genes y proteínas a la información contenida sobre las mismas en diferentes bases de datos como el GO (*Gene Ontology*), el KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) o el REAC (*Reactome Pathway Database*). Entre otra información, en estas bases de datos se registran las funciones biológicas conocidas para cada una de las proteínas. La herramienta g:Profiler analiza el listado de proteínas introducido e identifica que funciones biológicas están más frecuentemente relacionadas con el listado, la significación estadística de dicha relación y que proteínas están relacionadas con cada una de las funciones biológicas identificadas. Para analizar un listado, es suficiente con acceder a la aplicación web (129), seleccionar la especie en la que fueron identificadas las proteínas y pegar el listado. Además, se consultó de forma manual la base de datos de proteínas UniProt (Elixir) (130) para identificar las palabras clave de procesos biológicos relacionadas con cada una de las proteínas.

4.5.f. Validación de los resultados de proteómica

Los resultados de proteómica de la proteína MAP17 (Proteína asociada a membrana de 17 kDa) se validaron en los mismos extractos utilizados para proteómica mediante western blot. El western blot es una técnica que utiliza la electroforesis para separar por su peso molecular proteínas previamente desnaturalizadas. Posteriormente las proteínas son transferidas a una membrana absorbente e incubadas con anticuerpos específicos.

Brevemente, 10 µg de proteína se diluyeron en 30 µL de tampón reductor (Tris-Hidrocloruro 21 mM pH 6,8; SDS al 6%; Glicerol al 34%; β-mercaptoetanol al 19%, azul bromofenol al 0,002%) y desnaturalizaron durante 10 minutos a 100°C. Las muestras se cargaron posteriormente en geles de acrilamida/bisacrilamida con un primer segmento de atrapamiento del 4% (*stacking gel*) y un segundo segmento de separación del 12,5% (*running gel*) (**Tabla 4-7**). En el primer pocillo se cargó un

4. MATERIAL Y MÉTODOS

marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Dual Color Standards, BIO-RAD) para reconocer el estrato en el que se ubica la MAP17. Tras cargar las muestras en los pocillos de los geles, la electroforesis se realizó utilizando un tampón específico (Tris 25 mM; Glicina 129 mM; SDS al 0,1%) a 200 V hasta obtener la separación deseada. Después de la electroforesis, las muestras se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Immobilon-FL, Merck), previamente activadas con metanol durante 10 segundos. La transferencia se realizó utilizando un tampón específico (Tris 25 mM, Glicina 129 mM, Metanol al 20%; SDS al 0,1%) a 70 V durante 1 hora y manteniendo la temperatura de la solución a 4°C. La unión inespecífica de los anticuerpos a la membrana se previno mediante el bloqueo de las zonas de unión inespecíficas con leche en polvo al 5% en PBS-Tween al 0,1% durante 1 hora y a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de bloqueo, la membrana se seccionó en 2 fragmentos inmediatamente por encima del marcador de peso de 25 kDa. La mitad superior fue incubada con el anticuerpo primario anti-MAPK y la mitad inferior con anti-MAP17 (**Tabla 4-8**) durante 16 horas a 4°C. Transcurrido el tiempo de incubación del anticuerpo primario, se lavaron las membranas con PBS-Tween al 0,1% y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado a HRP correspondiente durante 1 hora y a temperatura ambiente. Las bandas proteicas marcadas se detectaron mediante quimioluminiscencia empleando el sustrato Luminata Forte HRP (Merck) y el equipo Odyssey Fc Imaging System (LI-COR). El análisis densitométrico de estas bandas se realizó con el mismo software facilitado por el equipo. La intensidad de las bandas de MAP17 se ajustó a las de MAPKt, que se utilizó como control de carga. Los valores se presentan como el cociente de ambas intensidades.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 4-7 - Composición de los geles utilizados para las técnicas de western blot. Se muestra la composición de los dos segmentos del gel: el stacking y el running.

Stacking gel (4% acrilamida)	Running gel (12,5% acrilamida)
Acrilamida 0,5 mL	Acrilamida 3,4 mL
Tris-Hidrocloruro pH 6,8 1 mL	Tris Hidrocloruro pH 8,8 2 mL
SDS al 10% 40 µL	SDS al 10% 80 µL
Agua Milli-Q 2,4 mL	Agua Milli-Q 2,6 mL
Temed 2,8 µL	Temed 4 µL
APS al 10% 28 µL	APS al 10% 40 µL

Tris: tris(hidroximetil)aminometano; SDS: dodecilsulfato sódico; Temed: tetrametiletilendiamina; APS: persulfato de amonio.

Tabla 4-8 - Anticuerpos primarios utilizados en las técnicas de western blot. Se muestran los anticuerpos utilizados en western blot, las diluciones empleadas y el tiempo de incubación.

Proteína	Anticuerpo primario			
	Origen	Referencia	Dilución	Incubación
MAP17	Conejo Policlonal	Novus (NB400-151)	1/1000	16h; 4°C
MAPK	Conejo Policlonal	Sigma (ABS44)	1/2000	16h; 4°C

4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El procesamiento de los datos y el análisis estadístico se realizó con los programas informáticos: Stata versión 15.1 y GraphPad Prism versión 6.0. Antes de proceder con el análisis se evaluó la distribución de las variables en cada grupo de tratamiento. La distribución normal de las variables se confirmó mediante el test de Shapiro-Wilk y evaluando tanto la simetría como la curtosis. También se evaluó el aspecto de los diagramas de caja (box-plots) para valorar la aplicabilidad de pruebas paramétricas. Sólo en los casos en los que la variable seguía una distribución normal dentro de los grupos se aplicaron pruebas paramétricas. Las pruebas paramétricas empleadas fueron la t de Student para comparar dos grupos independientes y el test de ANOVA para la comparación de varios grupos. En el caso de observar diferencias en la

4. MATERIAL Y MÉTODOS

comparación de varios grupos, la prueba paramétrica post-hoc empleada para identificar las ramas experimentales en las que se ubicaban las diferencias fue el test de Bonferroni. En el resto de casos en los que las variables no seguían una distribución normal, se emplearon pruebas no paramétricas. Se utilizó la U de Mann-Whitney para comparar dos grupos independientes y el test Kruskal-Wallis para la comparación de varios grupos. En este caso, si se identificaban diferencias en la comparación de varios grupos, la prueba post-hoc empleada fue el test de Dunn. Los intervalos de confianza del 95% de las diferencias entre dos medias se estimaron con la t de Student o el estimador de Hodges-Lehmann para variables paramétricas y no paramétricas respectivamente. La igualdad de las varianzas entre dos grupos se valoró mediante el estadístico de Levene.

En todos los análisis se evaluó primero la existencia de diferencias entre el grupo no diabético (db/m) y el diabético tratado con vehículo (db/db) mediante los test de comparación de 2 grupos independientes. Posteriormente, con el objetivo de evaluar si alguno de los tratamientos tuvo efecto sobre la variable a estudio, se compararon todas las ramas de tratamiento frente al db/db no tratado empleando los tests de ANOVA o de Kruskal-Wallis. Sólo en los casos en los que se observaron diferencias significativas en estos test, se aplicaron las pruebas post-hoc correspondientes. Asimismo, e incluso sin identificar diferencias significativas en los test de ANOVA o de Kruskal-Wallis, se aplicaron test de comparación para dos grupos independientes (t de Student y U de Mann-Whitney) enfrentado una por una cada rama de tratamiento al grupo db/db. Este último paso, permitió detectar pequeñas diferencias estadísticas que quedaban ocultas por la penalización del valor p al realizar comparaciones múltiples. Así, en los resultados se indica si las diferencias se observaron en pruebas post-hoc o sólo en test de comparación de dos grupos independientes.

Los valores atípicos según los criterios de Tukey (outliers), que se definen por situarse más alejados de 1,5 veces el RIC sumado o restado al percentil 75 o percentil 25 respectivamente, no se han considerado para el análisis estadístico, pero sí se han reflejado en los diagramas de cajas (box plot). Estos valores atípicos son datos muy alejados del grupo de valores centrales y pueden conducir a una interpretación equivocada de los resultados estadísticos. Por otro lado, la significación estadística se ha definido como un valor $p < 0,05$.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Por último, en la presentación de algunos resultados, se ha realizado una transformación de la variable a escala logarítmica de base 2, obteniendo un valor denominado *log fold-change* (LogFC). La variable a estudio se debe ajustar previamente a modo de razón con un grupo que actuará como control y referencia del resto de valores. El *log fold-change* indica entonces el número de veces que incrementa una variable respecto a dicho control y permite obtener con mayor probabilidad una distribución normal de los datos para poder aplicar pruebas paramétricas. Además, al realizar la transformación con un logaritmo de base 2, la variable resultado no pierde significado y su interpretación se mantiene (131). Así, un LogFC de 1 en el siguiente trabajo indica que la variable incrementa 2 veces en esa rama experimental respecto al control, mientras que un LogFC de 2 indica que incrementa 4 veces. Al tratarse de una transformación logarítmica de base 2, este cálculo puede realizarse fácilmente elevando el número 2 al resultado del LogFC.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

Como se indicó previamente, ratones db/db de 12 semanas de edad fueron tratados durante 8 semanas con las combinaciones de: 1.-empagliflozina en monoterapia, 2.-empagliflozina y ramipril, 3.-empagliflozina, ramipril y atrasentán, 4.-atrasentán en monoterapia, 5.-atrasentán y ramipril, y 6.-ramipril en monoterapia. Se incluyeron además un grupo control db/m y otro db/db tratados ambos con vehículo. Durante el procedimiento experimental se registraron parámetros fisiológicos como el peso, la glucemia basal, la presión arterial, la distribución de la grasa corporal, el filtrado glomerular y la excreción urinaria de albúmina. A las 20 semanas de edad se realizó la eutanasia de los ratones y se obtuvieron los riñones para estudios moleculares y análisis histológico.

5.1. EFECTOS EN LOS PARÁMETROS FISIOLÓGICOS

5.1.a. Efectos en el peso, la glucemia y la presión arterial

Durante el tratamiento se midió el peso de los ratones de forma semanal. A las 12 semanas de edad y antes de iniciar el tratamiento, los ratones db/db pesaban de media 18,3 g (IC 95%: 16,6 - 20,0) más que sus controles heterocigotos db/m. Tras 8 semanas de tratamiento la diferencia de peso entre los ratones db/db no tratados y los controles heterocigotos se mantenía, siendo el peso 13,0 g (IC 95%: 9,6 - 16,3) mayor en los ratones diabéticos no tratados (**Figura 5-1 y Tabla 5-1**). No se observaron diferencias en el peso postratamiento entre las distintas ramas de tratamiento y el ratón diabético tratado con vehículo en las pruebas post hoc. No obstante, en la comparación de grupos individuales mediante la t de Student se observó una disminución de 5,5 g (IC 95%: 0,9 - 10,2) en el grupo tratado con atrasentán más ramipril (**Figura 5-1 y Tabla 5-1**).

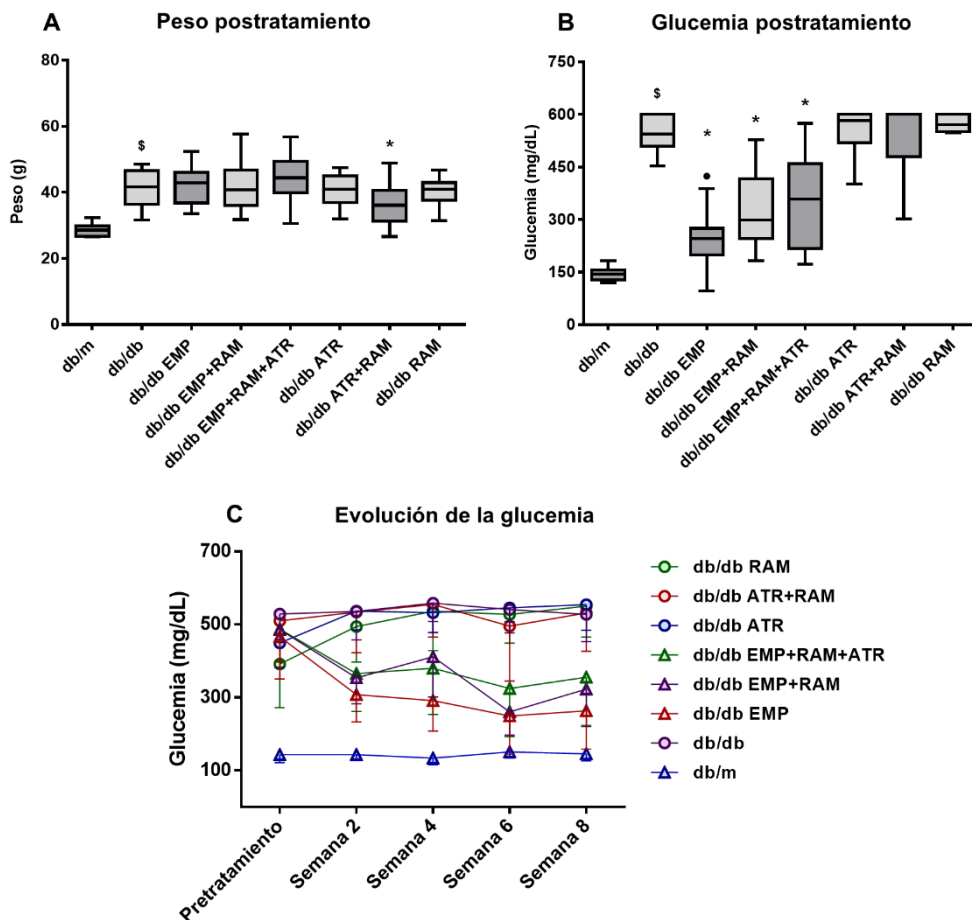


Figura 5-1 - Peso y glucemia postratamiento en los grupos db/m, db/db y los grupos tratados con empagliflozina, ramipril, atrasentán o sus combinaciones.

Peso medido en g y glucemia basal medida en mg/dL. Se muestra el peso de los animales al final del tratamiento, la glucemia postratamiento tras 4 horas de ayuno y la evolución de la glucemia a lo largo de las 8 semanas de tratamiento. **A:** Diagrama de cajas que muestra el peso postratamiento; **B:** Diagrama de cajas que muestra la glucemia basal postratamiento; **C:** Evolución de la glucemia basal a lo largo de las 8 semanas de tratamiento (las barras indican la desviación estándar en cada grupo).

§Diferencias estadísticamente significativas mediante el test de Student o de Mann-Whitney entre db/m y db/db ($p < 0,05$). *Diferencias estadísticamente significativas en la prueba de Student o de Mann-Whitney entre los diferentes tratamientos y el grupo db/db ($p < 0,05$). **db/m:** controles no diabéticos; **db/db:** db/db tratados con vehículo; **db/db EMP:** db/db tratados con empagliflozina; **db/db EMP+RAM:** db/db tratados con empagliflozina y ramipril; **db/db EMP+RAM+ATR:** db/db tratados con empagliflozina, ramipril y atrasentán; **db/db ATR:** db/db tratados con atrasentán; **db/db ATR+RAM:** db/db tratados con ramipril y atrasentán; **db/db RAM:** db/db tratados con ramipril.

5. RESULTADOS

Tabla 5-1 - Peso final tras 8 semanas de tratamiento en los grupos db/m, db/db y los grupos tratados con empagliflozina, ramipril, atrasentán o sus combinaciones. Peso medido en g. Los valores se expresan en media \pm DE para cada rama de tratamiento. Se muestran las comparaciones realizadas de los diferentes grupos de tratamiento frente al grupo db/db mediante el test de ANOVA y el test de Student (los ratones db/m fueron excluidos de este análisis).

Rama de tratamiento	Peso	Test de ANOVA	Test de Bonferroni	Test de Student
db/m	28,5 \pm 1,9	-	-	-
db/db	41,5 \pm 5,8 [§]	Referencia	Referencia	Referencia
db/db EMP	42,4 \pm 6,1	p=0,036	p>0,999	p=0,696
db/db EMP + RAM	42,1 \pm 6,8	p=0,036	p>0,999	p=0,813
db/db EMP + RAM + ATR	44,2 \pm 7,0	p=0,036	p>0,999	p=0,259
db/db ATR	40,6 \pm 5,2	p=0,036	p>0,999	p=0,710
db/db ATR+RAM	35,9 \pm 6,2*	p=0,036	p=0,116	p=0,022
db/db RAM	40,1 \pm 4,5	p=0,036	p>0,999	p=0,532

[§]Diferencias estadísticamente significativas mediante el test de Student entre db/m y db/db ($p < 0,05$).

*Diferencias estadísticamente significativas de los tratamientos contra db/db ($p < 0,05$). **db/m**: controles no diabéticos; **db/db**: db/db tratados con vehículo; **db/db EMP**: db/db tratados con empagliflozina; **db/db EMP+RAM**: db/db tratados con empagliflozina y ramipril; **db/db EMP+RAM+ATR**: db/db tratados con empagliflozina, ramipril y atrasentán; **db/db ATR**: db/db tratados con atrasentán; **db/db ATR+RAM**: db/db tratados con ramipril y atrasentán; **db/db RAM**: db/db tratados con ramipril.

La glucemia basal se midió de forma bisemanal tras mantener a los animales 4 horas en ayuno. Antes de iniciar el tratamiento (11-12 semanas de edad), los ratones diabéticos db/db presentaban una mayor glucemia basal que los ratones control db/m (334 mg/dL, IC 95%: 293-407). Tras 2 semanas de tratamiento, los grupos que recibieron empagliflozina o sus combinaciones mostraron una reducción de la glucemia basal que se mantuvo a lo largo del tratamiento (**Figura 5-1 y Tabla 5-2**). Al final del tratamiento, sólo los grupos que recibieron empagliflozina presentaban una menor glucemia basal, siendo la reducción del 304 mg/dL (IC 95%: 258-352) para el grupo de empagliflozina, 241 mg/dL (IC 95%: 180-290) para el grupo de empagliflozina y ramipril, y de 187 mg/dL (IC 95%: 97-286) para el grupo de empagliflozina, ramipril y atrasentán comparados con los ratones db/db tratados con vehículo (**Figura 5-1 y Tabla 5-2**).

Tabla 5-2 - Evolución de la glucemia basal a lo largo del tratamiento en los grupos db/m, db/db y los grupos tratados con empagliflozina, ramipril, atrasentán o sus combinaciones. Glucemia medida en mg/dL tras 4 horas de ayuno. Los valores se expresan en mediana y rango intercuartílico (RIC), mostrando los percentiles 25 y 75 para cada rama de tratamiento. El test de Kruskal-Wallis se realizó comparando los diferentes tratamientos contra el grupo db/db y excluyendo el db/m.

Rama de tratamiento	Tiempo de tratamiento				
	Pretratamiento	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8
db/m	144 (RIC:130-159)	142 (RIC:131-156)	138 (RIC:118-148)	153 (RIC:132-165)	145 (RIC:127-156)
db/db	561 (RIC:464-600)	579 (RIC:463-600)	583 (RIC:497-600)	555 (RIC:495-600)	544 (RIC:508-600)
db/db EMP	453 (RIC:405-578)	323 (RIC:263-358)*	281 (RIC:217-373)*	235 (RIC:159-306)*	245,0 (RIC:198-274)*
db/db EMP + RAM	520 (RIC:393-600)	342 (RIC:294-395)*	432 (RIC:343-471)*	246 (RIC:204-305)*	299 (RIC:245-416)*
db/db EMP + RAM + ATR	479 (RIC:425-600)	352 (RIC:269-426)*	362 (RIC:274-489)*	311 (RIC:223-402)*	358 (RIC:217-460)*
db/db ATR	468 (RIC:382-501)	540 (RIC:483-589)	527 (RIC:484-591)	543 (RIC:517-575)	582 (RIC:518-600)
db/db ATR+RAM	532 (RIC:453-600)	583 (RIC:512-600)	600 (RIC:540-600)	574 (RIC:339-600)	600 (RIC:479-600)
db/db RAM	393 (RIC:327-463)	515 (RIC:402-583)	600 (RIC:444-600)	533 (RIC:458-600)	571 (RIC:551-600)
Test de Kruskal-Wallis (Tratamientos frente db/db)	p=0,0745	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001

§Diferencias estadísticamente significativas mediante el test de Mann-Whitney entre los grupos db/m y db/db ($p<0,05$). *Diferencias estadísticamente significativas tanto en pruebas post-hoc (Dunn) como en el test Mann-Whitney entre los tratamientos contra db/db ($p<0,05$). **db/m**: controles no diabéticos; **db/db**: db/db tratados con vehículo; **db/db EMP**: db/db tratados con empagliflozina; **db/db EMP+RAM**: db/db tratados con empagliflozina y ramipril; **db/db EMP+RAM+ATR**: db/db tratados con empagliflozina, ramipril y atrasentán; **db/db ATR**: db/db tratados con atrasentán; **db/db ATR+RAM**: db/db tratados con ramipril y atrasentán; **db/db RAM**: db/db tratados con ramipril.

Asimismo, se realizó un segundo análisis comparando las diferentes combinaciones de empagliflozina contra empagliflozina en monoterapia para comprobar si existía un efecto diferencial sobre la glucemia basal en las ramas de tratamiento que incluían el hipoglucemiante (**Tabla 5-3**). Se observó que empagliflozina en monoterapia produjo una mayor reducción de la glucemia que las terapias combinadas, siendo estas diferencias más evidentes al comparar el grupo de empagliflozina con la combinación de empagliflozina, ramipril y atrasentán (**Tabla 5-3**).

5. RESULTADOS

Tabla 5-3 - Diferencias en la reducción de la glucemia basal postratamiento entre las diferentes combinaciones de empagliflozina frente a empagliflozina en monoterapia. Se muestra la diferencia en la glucemia basal (mg/dL) y su intervalo de confianza del 95% para cada combinación de empagliflozina respecto a empagliflozina en monoterapia. Además, se muestra el resultado de los test de Kruskal-Wallis y de Student.

Rama de tratamiento	Diferencia (IC 95%)	Test de Kruskal-Wallis	Test de Dunn	U de Mann-Whitney
db/db EMP + RAM	59,0 (-2,0 - 146,0)	p=0,079	p=0,159	p=0,050
db/db EMP + RAM + ATR	115,0 (-8,0 - 207,0)	p=0,079	p=0,066	p=0,058

db/db EMP+RAM: db/db tratados con empagliflozina y ramipril; **db/db EMP+RAM+ATR:** db/db tratados con empagliflozina, ramipril y atrasentán.

La presión arterial (PA) y la frecuencia cardíaca se midieron antes de iniciar el tratamiento y tras 8 semanas de tratamiento. La PA tanto sistólica como diastólica pretratamiento era similar entre los ratones diabéticos y los controles no diabéticos. Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamiento aleatorizados (**Tabla 5-4**). Tras 8 semanas de tratamiento la presión sistólica era 8,3 mmHg (IC 95%: 0,5-16,2) menor y la diastólica 8,6 mmHg (IC 95%: 3,1-14,1) menor en los ratones db/db respecto a los db/m. En los grupos tratados con: 1.-empagliflozina y ramipril, 2.-empagliflozina, ramipril y atrasentán, 3.-atrasentán y ramipril, y 4.-ramipril en monoterapia se observó una reducción significativa de la presión sistólica en comparación con los ratones diabéticos tratados con vehículo (**Tabla 5-4 y Figura 5-2**). Además, se observó un menor efecto del ramipril en monoterapia sobre la presión sistólica. La reducción de la presión arterial diastólica sólo fue estadísticamente significativa para los grupos que recibieron: 1.- empagliflozina y ramipril, 2.-empagliflozina, ramipril y atrasentán, y 3.-atrasentán y ramipril. Ramipril en monoterapia no logró una reducción significativa de la presión diastólica.

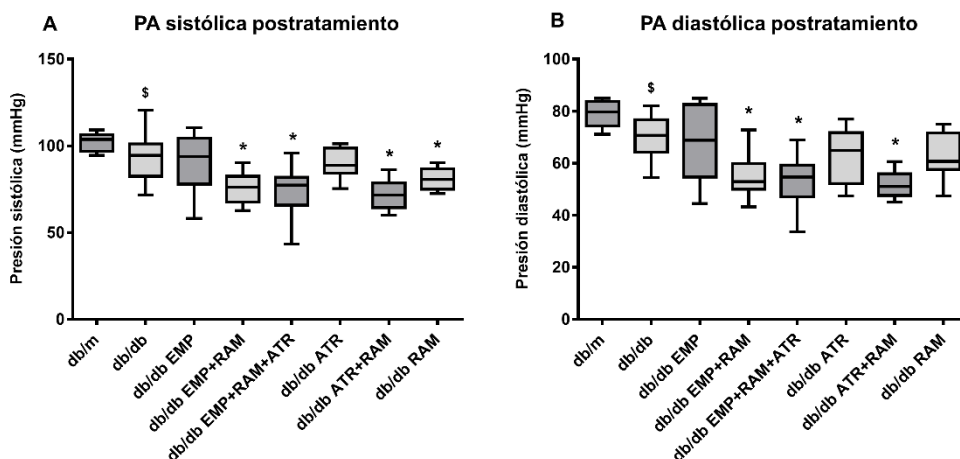


Figura 5-2 - Presión arterial sistólica y diastólica al final del tratamiento en los grupos db/m, db/db y los grupos tratados con empagliflozina, ramipril, atrasentán o sus combinaciones. Presión arterial medida en mmHg tras someter a los ratones a un periodo de aclimatación al procedimiento. **A:** diagrama de cajas de presión sistólica tras 8 semanas de tratamiento; **B:** diagrama de cajas de la presión diastólica tras 8 semanas de tratamiento.

§Diferencias estadísticamente significativas entre db/m y db/db mediante t de Student ($p < 0,05$).

*Diferencias estadísticamente significativas en la prueba t de Student de los tratamientos contra db/db ($p < 0,05$). **db/m:** controles no diabéticos; **db/db:** db/db tratados con vehículo; **db/db EMP:** db/db tratados con empagliflozina; **db/db EMP+RAM:** db/db tratados con empagliflozina y ramipril; **db/db EMP+RAM+ATR:** db/db tratados con empagliflozina, ramipril y atrasentán; **db/db ATR:** db/db tratados con atrasentán; **db/db ATR+RAM:** db/db tratados con ramipril y atrasentán; **db/db RAM:** db/db tratados con ramipril. **PA:** Presión arterial.

5. RESULTADOS

Tabla 5-4 - Presión arterial antes y después de las 8 semanas de tratamiento en los grupos db/m, db/db y los grupos tratados con empagliflozina, ramipril, atrasentán o sus combinaciones. Presión arterial medida en mmHg. Los valores se expresan en media \pm DE para cada rama de tratamiento. El test de ANOVA o de Kruskal-Wallis se realizó comparando los diferentes tratamientos contra el grupo db/db y excluyendo el db/m.

Rama de tratamiento	Pretratamiento		Postratamiento	
	Presión sistólica	Presión diastólica	Presión sistólica	Presión diastólica
db/m	104,8 \pm 10,0	77,9 \pm 11,7	102,6 \pm 5,2	78,9 \pm 5,0
db/db	100,2 \pm 12,0	75,2 \pm 11,3	94,2 \pm 13,4 [§]	70,4 \pm 8,7 [§]
db/db EMP	94,6 \pm 6,8	72,0 \pm 7,4	90,6 \pm 16,3	67,8 \pm 14,0
db/db EMP + RAM	98,2 \pm 13,2	77,1 \pm 11,6	75,6 \pm 8,0*	55,0 \pm 7,8*
db/db EMP + RAM + ATR	101,5 \pm 7,8	77,6 \pm 7,7	75,1 \pm 13,3*	53,6 \pm 8,7*
db/db ATR	97,6 \pm 12,3	72,8 \pm 13,9	89,8 \pm 8,8	63,2 \pm 10,5
db/db ATR+RAM	103,7 \pm 19,9	71,9 \pm 10,6	72,3 \pm 8,1*	51,8 \pm 5,3*
db/db RAM	99,0 \pm 5,1	73,3 \pm 6,6	81,0 \pm 6,3*	62,9 \pm 8,7
Test de ANOVA o Kruskal-Wallis (Tratamientos frente db/db)	p=0,503	p=0,567	p<0,001	p<0,001

[§]Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos db/m y db/db mediante la prueba t de Student ($p<0,05$). *Diferencias estadísticamente significativas en pruebas la prueba t de Student de los tratamientos contra db/db ($p<0,05$). **db/m**: controles no diabéticos; **db/db**: db/db tratados con vehículo; **db/db EMP**: db/db tratados con empagliflozina; **db/db EMP+RAM**: db/db tratados con empagliflozina y ramipril; **db/db EMP+RAM+ATR**: db/db tratados con empagliflozina, ramipril y atrasentán; **db/db ATR**: db/db tratados con atrasentán; **db/db ATR+RAM**: db/db tratados con ramipril y atrasentán; **db/db RAM**: db/db tratados con ramipril.

Al observar las diferencias existentes entre ramipril en monoterapia y las combinaciones de ramipril, se realizó un segundo análisis de los grupos tratados con IECA para estudiar la reducción de la PA ejercida por ramipril en monoterapia en comparación con el efecto de las diferentes combinaciones con ramipril (**Tabla 5-5**). La combinación de ramipril con atrasentán demostró una mayor reducción de la PA sistólica en comparación con el ramipril en monoterapia. En referencia a la PA diastólica, las 3 terapias combinadas con: 1.-empagliflozina y ramipril, 2.-empagliflozina, ramipril y atrasentán, y 3.-atrasentán y ramipril, disminuyeron la presión diastólica de forma estadísticamente significativa frente a ramipril en monoterapia (**Tabla 5-5**).

Tabla 5-5 - Diferencias en la reducción de la presión arterial postratamiento entre las diferentes combinaciones de ramipril y el ramipril en monoterapia. Se muestra la diferencia en la presión arterial (mmHg) y su intervalo de confianza del 95% para cada combinación de tratamiento respecto al ramipril en monoterapia. Además, se muestra el resultado de los test de ANOVA y de la t de Student.

Rama de tratamiento	Presión sistólica			Presión diastólica		
	Diferencia (IC 95%)	Test de Bonferroni	t de Student	Diferencia (IC 95%)	Test de Bonferroni	t de Student
db/db EMP + RAM	5,4 (-1,1-11,9)	p=0,581	p=0,101	7,9 (0,8-15,0)*	p=0,065	p=0,032
db/db EMP + RAM + ATR	5,9 (-2,7-14,5)	p=0,476	p=0,167	9,3 (1,5-17,0)*	p=0,025	p=0,021
db/db ATR + RAM	8,7 (1,6-15,8)*	p=0,166	p=0,019	11,1 (4,2-18,0)*	p=0,011	p=0,004

*Diferencias significativas mediante el test de Student de los tratamientos combinados con ramipril frente a ramipril en monoterapia ($p < 0,05$). **db/db EMP+RAM**: db/db tratados con empagliflozina y ramipril; **db/db EMP+RAM+ATR**: db/db tratados con empagliflozina, ramipril y atrasentán; **db/db ATR+RAM**: db/db tratados con ramipril y atrasentán.

En lo referente a la frecuencia cardíaca, no se observaron diferencias entre los ratones db/m y db/db ni antes del tratamiento ni tras finalizar el mismo (**Ver sección Anexo - Frecuencia cardíaca**). Del mismo modo, tampoco se observó ninguna diferencia entre los ratones db/db tratados con vehículo y las diferentes ramas de tratamiento.

5.1.b. Efectos sobre el volumen y la grasa corporal

A lo largo del procedimiento experimental se realizaron dos tomografías computarizadas antes y después de las 8 semanas de tratamiento con el objetivo de medir tanto el volumen corporal total como el volumen de grasa subcutánea e intraabdominal. Así, se pudo estimar el porcentaje de grasa respecto al volumen corporal total en cada rama de tratamiento y evaluar si alguno de los tratamientos tenía efecto en la reducción del tejido graso. Se estimaron el porcentaje de grasa corporal total, calculado a partir de la suma de la grasa intraabdominal más la subcutánea, así como los porcentajes de grasa subcutánea e intraabdominal de forma individual.

Al igual que con el peso, a las 12 semanas de edad y antes de iniciar el tratamiento, los ratones diabéticos presentaban un volumen corporal 19.067 mm^3 (IC 95%: 17.271 - 20.863) mayor que sus controles no diabéticos. Tras 8 semanas de tratamiento esta diferencia se mantuvo, con un volumen corporal 14.813 mm^3 (IC 95%: 11.427 -

5. RESULTADOS

18.199) más elevado en los ratones db/db respecto a sus controles heterocigotos (Figura 5-3). Sin embargo, no se encontraron diferencias en cuanto al volumen corporal entre los ratones db/db tratados con empagliflozina, ramipril, atrasentán o sus combinaciones, y el grupo diabético tratado con vehículo.

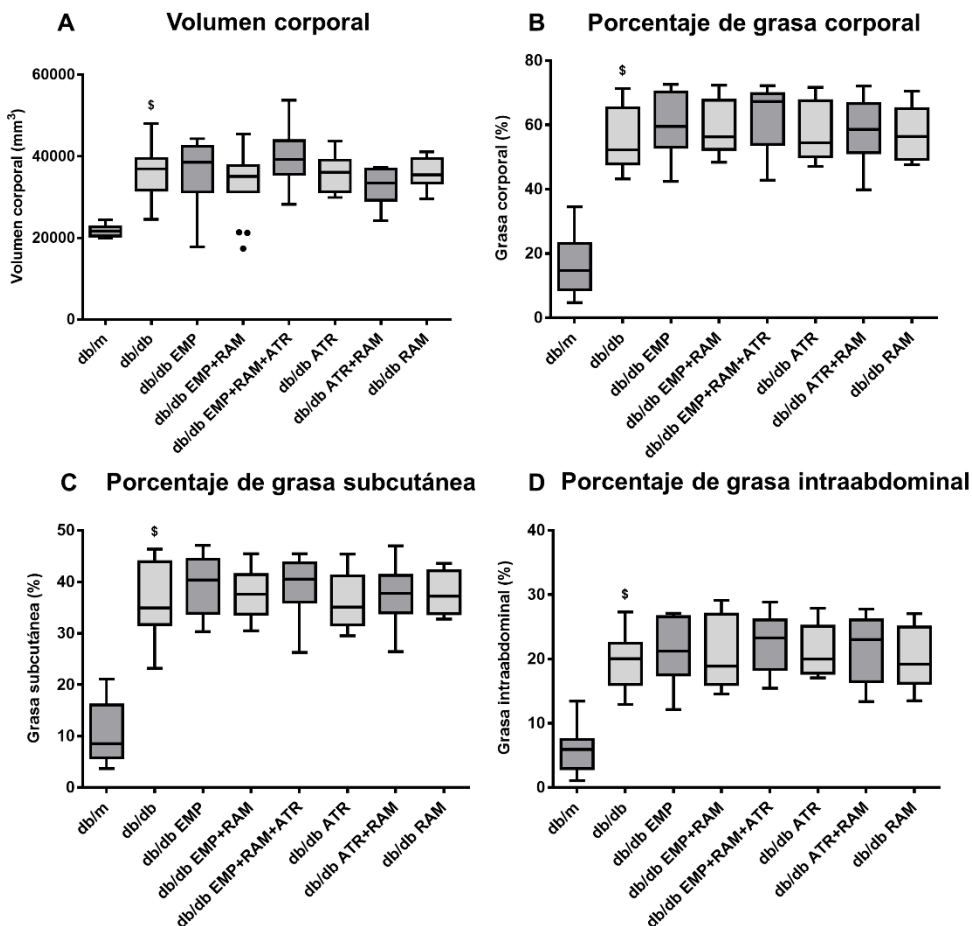


Figura 5-3 - Volumen corporal total y porcentaje de grasa al final del tratamiento en los grupos db/m, db/db y los grupos tratados con empagliflozina, ramipril, atrasentán o sus combinaciones. Volumen de grasa corporal medido en mm³. Porcentajes de grasa ajustados al volumen corporal total. **A:** diagrama de cajas que representa el volumen corporal total; **B:** diagrama de cajas que representa el porcentaje de grasa corporal; **C:** diagrama de cajas que representa el porcentaje de grasa subcutánea; **D:** diagrama de cajas que representa el porcentaje de grasa intraabdominal.

§Diferencias estadísticamente significativas entre db/m y db/db mediante t de Student ($p < 0,05$).
 *Diferencias estadísticamente significativas en la prueba t de Student de los tratamientos contra db/db ($p < 0,05$). **db/m:** controles no diabéticos; **db/db:** db/db tratados con vehículo; **db/db EMP:** db/db tratados con empagliflozina; **db/db EMP+RAM:** db/db tratados con empagliflozina y ramipril; **db/db EMP+RAM+ATR:** db/db tratados con empagliflozina, ramipril y atrasentán; **db/db ATR:** db/db tratados con atrasentán; **db/db ATR+RAM:** db/db tratados con ramipril y atrasentán; **db/db RAM:** db/db tratados con ramipril.

En relación al porcentaje de grasa corporal, tras las 8 semanas de tratamiento los controles heterocigotos presentaban sólo un $16,2 \pm 8,7\%$ de grasa, mientras que en los ratones db/db presentaba un $55,7 \pm 9,2\%$ de grasa corporal (**Figura 5-3**). Al igual que con el volumen corporal, no se encontraron diferencias entre el grupo diabético tratado con vehículo y los grupos db/db tratados con empagliflozina, ramipril, atrasentán o sus combinaciones.

Del mismo modo, se analizó la distribución de la grasa por segmentos corporales y se determinó el volumen de grasa subcutánea y el volumen de grasa intraabdominal. Ambos valores se ajustaron al volumen corporal. Los ratones db/m presentaban un $10,2 \pm 5,6\%$ de grasa subcutánea y $6,0 \pm 3,4\%$ de grasa intraabdominal al final del tratamiento, mientras que los ratones db/db tratados con vehículo tenían un $36,1 \pm 7,2\%$ y un $19,6 \pm 3,7$ de grasa subcutánea y visceral respectivamente. Estas diferencias entre los grupos control no diabético y diabético fueron estadísticamente significativas. Al comparar las ramas de tratamiento con empagliflozina, ramipril, atrasentán o sus combinaciones con el grupo db/db tratado con vehículo no se observaron diferencias en el porcentaje de grasa subcutánea ni intraabdominal (**Figura 5-3**).

5.1.c. Efectos en los parámetros renales

La evaluación del daño renal in vivo se realizó mediante la medición del filtrado glomerular, la excreción urinaria de albúmina, el volumen y el peso renal. El filtrado glomerular transdérmico se midió antes de iniciar el tratamiento, a las 4 semanas de tratamiento y al final del mismo. Antes de iniciar el tratamiento, los ratones db/db asignados a la rama del vehículo presentaban un filtrado glomerular $152,8 \mu\text{L}/100\text{g}/\text{min}$ (IC 95%: $-14,2 - 319,8$) mayor que los ratones control db/m. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, pero si tenemos en cuenta el conjunto total de ratones db/db asignados a cada una de las ramas, antes de iniciar el tratamiento los ratones db/db presentaban un filtrado $204,5 \mu\text{L}/100\text{g}/\text{min}$ (IC 95%: $62,5 - 346,5$) mayor que los ratones db/m. Al cabo de 4 semanas de tratamiento, el grupo de ratones diabéticos tratado con vehículo seguía presentando un filtrado $224,1 \mu\text{L}/100\text{g}/\text{min}$ (IC 95%: $62,0 - 372,2$) mayor que los controles no diabéticos, lo

5. RESULTADOS

que confirmaba una situación de hiperfiltración glomerular en el modelo db/db. Al final del procedimiento experimental, y tras 8 semanas de tratamiento, la hiperfiltración glomerular en el grupo db/db tratado con vehículo había continuado incrementando respecto a los controles no diabéticos, siendo el filtrado 375,0 $\mu\text{L}/100\text{g}/\text{min}$ mayor (IC 95%: 179,0 - 571,0). No se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos tratados y el grupo db/db tratado con vehículo, aunque se apreciaba un leve descenso de la hiperfiltración glomerular en los grupos tratados con: 1.- empagliflozina y ramipril y 2.- empagliflozina, ramipril y atrasentán, siendo las diferencias frente al db/db de 166,7 $\mu\text{L}/100\text{g}/\text{min}$ (IC 95%: -74,1 - 407,5) y de 166,7 $\mu\text{L}/100\text{g}/\text{min}$ (IC 95%: -136,1 - 469,4) respectivamente (**Figura 5-4 y Tabla 5-6**).

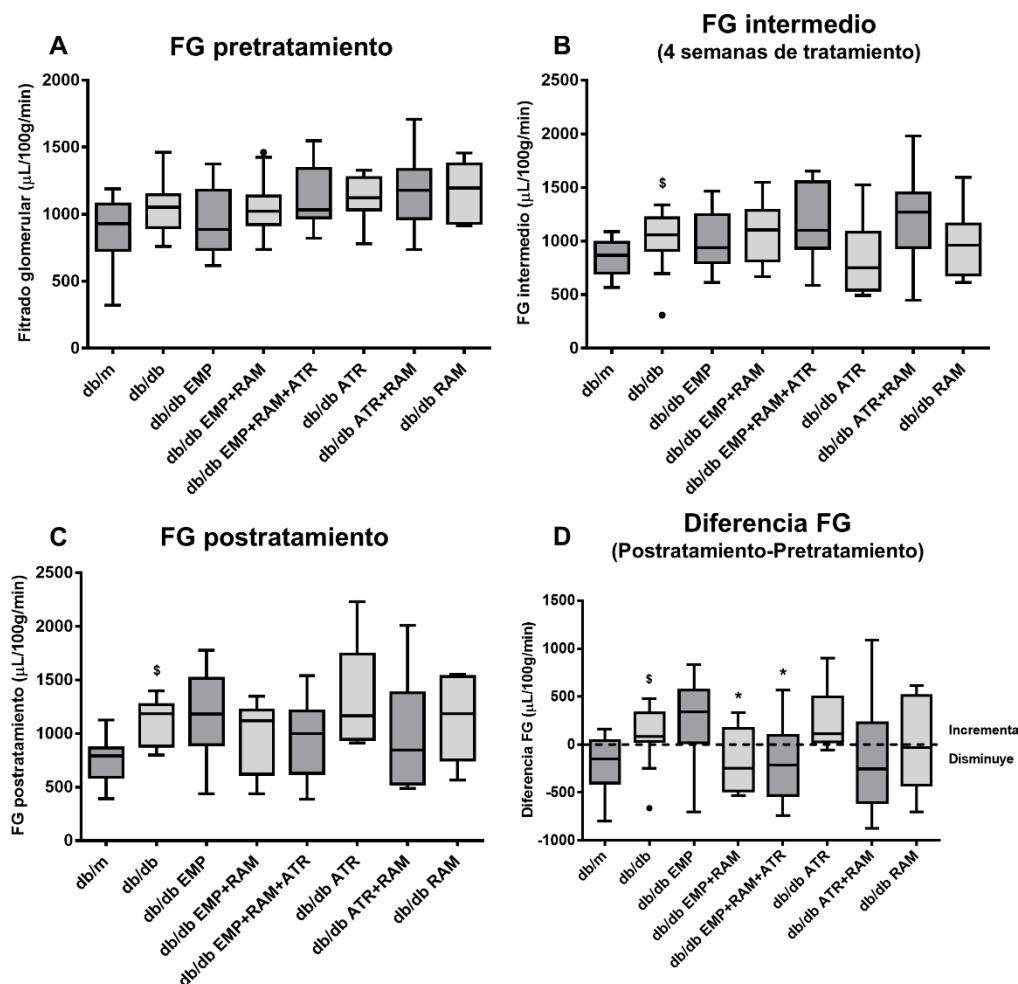


Figura 5-4 - Filtrado glomerular a lo largo del tratamiento en los grupos db/m, db/db y los grupos tratados con empagliflozina, ramipril, atrasentán o sus combinaciones. Filtrado glomerular (FG) medido en $\mu\text{L}/100\text{g}/\text{min}$. **A:** diagrama de cajas que representa el FG pretratamiento; **B:** diagrama de cajas que representa el FG a las 4 semanas de tratamiento; **C:** diagrama de cajas que representa el FG a las 8 semanas de tratamiento (final de tratamiento); **D:** diagrama de cajas que representa las diferencias entre el FG inicial y el final (los valores expuestos se calcularon restando el FG inicial al FG final).

[§]Diferencias estadísticamente significativas entre db/m y db/db mediante el test de Student ($p < 0,05$).

^{*}Diferencias estadísticamente significativas en la prueba t de Student de los tratamientos contra db/db ($p < 0,05$). **db/m:** controles no diabéticos; **db/db:** db/db tratados con vehículo; **db/db EMP:** db/db tratados con empagliflozina; **db/db EMP+RAM:** db/db tratados con empagliflozina y ramipril; **db/db EMP+RAM+ATR:** db/db tratados con empagliflozina, ramipril y atrasentán; **db/db ATR:** db/db tratados con atrasentán; **db/db ATR+RAM:** db/db tratados con ramipril y atrasentán; **db/db RAM:** db/db tratados con ramipril. **FG:** filtrado glomerular.

5. RESULTADOS

Tabla 5-6 - Evolución del filtrado glomerular a lo largo del tratamiento en los grupos db/m, db/db y los grupos tratados con empagliflozina, ramipril, atrasentán o sus combinaciones. Filtrado glomerular medido en $\mu\text{L}/100\text{g}/\text{min}$. Los valores se expresan en media \pm DE para cada rama de tratamiento. Según la distribución paramétrica o no paramétrica de los grupos se realizaron el test de Kruskal-Wallis o de ANOVA comparando los diferentes tratamientos contra el grupo db/db y excluyendo el db/m.

Rama de tratamiento	Tiempo de tratamiento		
	Pretratamiento	Semana 4	Semana 8
db/m	878,5 \pm 243,0	847,6 \pm 159,8	748,1 \pm 214,6
db/db	1031,3 \pm 178,5	1069,0 \pm 190,7 [§]	1123,1 \pm 210,7 [§]
db/db EMP	942,8 \pm 243,7	988,9 \pm 277,4	1168,5 \pm 424,3
db/db EMP + RAM	1017,7 \pm 171,3	1075,8 \pm 252,7	956,4 \pm 327,4
db/db EMP + RAM + ATR	1138,1 \pm 227,9	1158,8 \pm 340,0	956,5 \pm 373,8
db/db ATR	1120,6 \pm 174,3	847,3 \pm 358,1	1334,5 \pm 498,7
db/db ATR+RAM	1192,9 \pm 286,3	1213,2 \pm 408,6	992,9 \pm 530,6
db/db RAM	1155,7 \pm 217,5	973,2 \pm 315,7	1109,6 \pm 408,8
Test de Kruskal-Wallis o ANOVA (Tratamientos frente db/db)	p=0,054	p=0,146	p=0,494

[§]Diferencias estadísticamente significativas mediante el test de Student o test de Mann-Whitney entre los grupos db/m y db/db ($p < 0,05$). **db/m**: controles no diabéticos; **db/db**: db/db tratados con vehículo; **db/db EMP**: db/db tratados con empagliflozina; **db/db EMP+RAM**: db/db tratados con empagliflozina y ramipril; **db/db EMP+RAM+ATR**: db/db tratados con empagliflozina, ramipril y atrasentán; **db/db ATR**: db/db tratados con atrasentán; **db/db ATR+RAM**: db/db tratados con ramipril y atrasentán; **db/db RAM**: db/db tratados con ramipril.

Analizando la evolución del FG transdérmico, se observó que el filtrado incrementaba o se mantenía en todos los grupos de ratones db/db salvo en aquellos tratados con: 1.-empagliflozina y ramipril, 2.-empagliflozina, ramipril y atrasentán, y 3.-atrasentán y ramipril. Por este motivo, se estudió también la diferencia del FG, restando en cada animal el filtrado antes del tratamiento al filtrado final (**Figura 5-4**). En los ratones db/db tratados con vehículo el filtrado incrementaba 92,1 \pm 311,1 $\mu\text{L}/100\text{g}/\text{min}$ tras 8 semanas de tratamiento, mientras que en los ratones no diabéticos el filtrado glomerular disminuía 209,1 \pm 300,5 $\mu\text{L}/100\text{g}/\text{min}$, siendo las diferencias entre ambos grupos estadísticamente significativas (**Figura 5-4**). Al comparar las diferencias del FG de las distintas ramas de tratamiento frente al grupo db/db, los grupos tratados con: 1.-empagliflozina y ramipril, y 2.-empagliflozina, ramipril y atrasentán presentaron una disminución significativa del FG. Este disminuía tras 8 semanas de tratamiento 191,8 \pm 334,9 $\mu\text{L}/100\text{g}/\text{min}$ y 188,9 \pm 406,6 $\mu\text{L}/100\text{g}/\text{min}$ respectivamente (**Figura 5-4 y Tabla 5-7**). En el grupo tratado con ramipril y atrasentán, sólo se identificó una tendencia a la disminución del FG a lo largo del tratamiento respecto al grupo db/db tratado con vehículo (**Figura 5-4 y Tabla 5-7**).

Tabla 5-7 - Diferencia en el filtrado glomerular tras el tratamiento en los grupos db/m, db/db y los grupos tratados con empagliflozina, ramipril, atrasentán o sus combinaciones. Filtrado glomerular (FG) medido en $\mu\text{L}/100\text{g}/\text{min}$. Los valores se expresan en media \pm DE para cada rama de tratamiento. Diferencia calculada restando al FG glomerular final el FG inicial. Valores positivos indican un incremento del filtrado tras 8 semanas de tratamiento y valores negativos una disminución. Se muestran además las comparaciones realizadas de los diferentes grupos de tratamiento frente al grupo db/db mediante el test de Kruskal-Wallis y el test de Mann-Whitney (los ratones db/m fueron excluidos de este análisis).

Rama de tratamiento	Diferencia FG	Test de Kruskal-Wallis	Test de Dunn	Test de Mann-Whitney
db/m	-209,1 \pm 300,5	-	-	-
db/db	92,1 \pm 311,1 [§]	Referencia	Referencia	Referencia
db/db EMP	241,9 \pm 464,8	p=0,093	p>0,999	p=0,392
db/db EMP + RAM	-191,8 \pm 334,9*	p=0,093	p=0,362	p=0,038
db/db EMP + RAM + ATR	-188,9 \pm 406,6*	p=0,093	p=0,338	p=0,025
db/db ATR	247,1 \pm 349,1	p=0,093	p>0,999	p=0,876
db/db ATR+RAM	-136,9 \pm 630,1	p=0,093	p=0,635	p=0,149
db/db RAM	-17,6 \pm 501,7	p=0,093	p>0,999	p=0,515

[§]Diferencias estadísticamente significativas entre db/m y db/db mediante el test de Mann-Whitney ($p<0,05$).

*Diferencias estadísticamente significativas en la prueba U de Mann-Whitney de los tratamientos contra db/db ($p<0,05$). **db/m**: controles no diabéticos; **db/db**: db/db tratados con vehículo; **db/db EMP**: db/db tratados con empagliflozina; **db/db EMP+RAM**: db/db tratados con empagliflozina y ramipril; **db/db EMP+RAM+ATR**: db/db tratados con empagliflozina, ramipril y atrasentán; **db/db ATR**: db/db tratados con atrasentán; **db/db ATR+RAM**: db/db tratados con ramipril y atrasentán; **db/db RAM**: db/db tratados con ramipril.

La excreción urinaria de albúmina se midió mediante el cociente albúmina/creatinina urinario (CAC). Para ello, se obtuvieron muestras de orina al final del tratamiento. Tras 8 semanas de tratamiento los ratones diabéticos tratados con vehículo presentaban un claro incremento del CAC respecto a los controles no diabéticos, siendo la diferencia en el CAC de 1.575,0 mg/g (IC 95%: 922,3 - 3.268,0). Al comparar los tratamientos de empagliflozina, ramipril, atrasentán o sus combinaciones frente al grupo db/db tratado con vehículo, el grupo tratado con empagliflozina demostró una disminución del CAC de 897,0 mg/g (IC 95%: 215,6 - 2.131,0) (**Figura 5-5 y Tabla 5-8**). En el resto de grupos de tratamiento no se observaron diferencias.

5. RESULTADOS

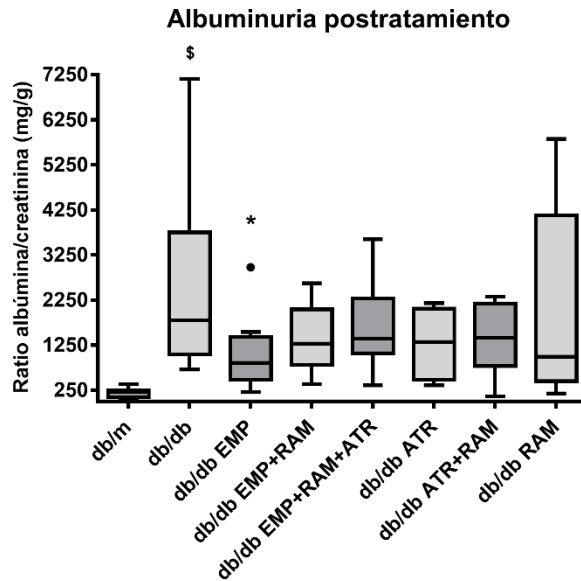


Figura 5-5 - Cociente albúmina/creatinina postratamiento en los grupos db/m, db/db y los grupos tratados con empagliflozina, ramipril, atrasentán o sus combinaciones. Cociente albúmina/creatinina (CAC) postratamiento medido en mg/g. En la figura se muestra tanto el diagrama de cajas que representa la distribución del CAC en cada rama de tratamiento.

[§]Diferencias estadísticamente significativas entre db/m y db/db mediante el test de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

*Diferencias estadísticamente significativas en la prueba de Mann-Whitney entre los diferentes tratamientos contra el grupo db/db no tratado ($p < 0,05$). **db/m**: controles no diabéticos; **db/db**: db/db tratados con vehículo; **db/db EMP**: db/db tratados con empagliflozina; **db/db EMP+RAM**: db/db tratados con empagliflozina y ramipril; **db/db EMP+RAM+ATR**: db/db tratados con empagliflozina, ramipril y atrasentán; **db/db ATR**: db/db tratados con atrasentán; **db/db ATR+RAM**: db/db tratados con ramipril y atrasentán; **db/db RAM**: db/db tratados con ramipril.

Tabla 5-8 - Cociente albumina/creatinina urinario postratamiento en los grupos db/m, db/db y los grupos tratados con empagliflozina, ramipril, atrasentán o sus combinaciones. Los valores se expresan en media \pm DE para cada rama de tratamiento. Cociente albúmina/creatinina (CAC) medido en mg/g. Se muestran además las comparaciones realizadas de los diferentes grupos de tratamiento frente al grupo db/db mediante el test de Kruskal-Wallis y el test de Mann-Whitney (los ratones db/m fueron excluidos de este análisis).

Rama de tratamiento	CAC postratamiento (mg/g)	Test de Kruskal-Wallis	Test de Dunn	Test de Mann-Whitney
db/m	215,1 (RIC: 92,8-245,7)	-	-	-
db/db	1795,0 (RIC: 1049,0-3749,0) [§]	Referencia	Referencia	Referencia
db/db EMP	854,3 (RIC: 484,3-1437,0)*	p=0,216	p=0,048	p=0,012
db/db EMP + RAM	1285,0 (RIC: 804,3- 2043,0)	p=0,216	p=0,776	p=0,111
db/db EMP + RAM + ATR	1399,0 (RIC: 1068,0- 2284,0)	p=0,216	p>0,999	p=0,287
db/db ATR	1321,0 (RIC: 480,3- 2060,0)	p=0,216	p=0,888	p=0,205
db/db ATR+RAM	1414,0 (RIC: 781,6- 2172,0)	p=0,216	p>0,999	p=0,200
db/db RAM	991,5 (RIC: 452,4- 4130,0)	p=0,216	p>0,999	p=0,297

[§]Diferencias estadísticamente significativas entre db/m y db/db mediante el test de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

*Diferencias estadísticamente significativas en las pruebas post-hoc de Dunn y en el test de Mann-Whitney de los tratamientos contra db/db ($p < 0,05$). **db/m**: controles no diabéticos; **db/db**: db/db tratados con vehículo; **db/db EMP**: db/db tratados con empagliflozina; **db/db EMP+RAM**: db/db tratados con empagliflozina y ramipril; **db/db EMP+RAM+ATR**: db/db tratados con empagliflozina, ramipril y atrasentán; **db/db ATR**: db/db tratados con atrasentán; **db/db ATR+RAM**: db/db tratados con ramipril y atrasentán; **db/db RAM**: db/db tratados con ramipril.

El volumen renal se midió al final del tratamiento mediante tomografía computarizada para animales de pequeño tamaño (microTC) (**Ver sección Material y Métodos - Medición de la grasa y el volumen renal mediante tomografía computarizada**)

Se observó un aumento significativo del volumen renal izquierdo en los ratones db/db no tratados frente a los ratones db/m. Los ratones control diabéticos tenían un riñón izquierdo más grande que los ratones control no diabéticos con una diferencia de 39,3 mm³ (IC 95%: 1,5 - 77,1) (**Tabla 5-9**). Esta diferencia también se observó en el volumen renal total calculado a partir de la suma del volumen renal derecho e izquierdos. Los ratones db/db tratados con vehículo presentaban un incremento del volumen renal total de 44,6 mm³ (IC 95%: -9,2 - 98,4) frente a los ratones db/m, aunque este incremento no fue significativo. Estos resultados indican, por tanto, que el ratón db/db tratado con vehículo presenta a las 20 semanas de edad un ligero

5. RESULTADOS

incremento del tamaño renal. Sin embargo, ninguna de las ramas de tratamiento disminuyó de forma significativa el volumen renal al compararlas frente al grupo db/db tratado con vehículo.

Tabla 5-9 - Volumen renal al final del tratamiento en los grupos db/m, db/db y los grupos tratados con empagliflozina, ramipril, atrasentán o sus combinaciones. Volumen renal medido en mm³. Los valores se expresan en media ± DE para cada rama de tratamiento. Se muestran además el resultado de las comparaciones realizadas de los diferentes grupos de tratamiento frente al grupo db/db mediante el test de ANOVA o de Kruskal-Wallis.

Rama de tratamiento	Volumen renal derecho	Volumen renal izquierdo	Volumen renal total
db/m	214,9±41,8	190,5±33,7	405,5±63,6
db/db	216,7±21,0	229,8±55,8 [§]	450,1±68,5
db/db EMP	214,0±44,0	221,8±55,0	435,8±86,3
db/db EMP + RAM	227,3±30,2	241,2±57,6	458,7±70,4
db/db EMP + RAM + ATR	239,6±53,9	240,5±51,1	480,1±99,1
db/db ATR	213,1±12,2	201,7±19,9	414,8±26,6
db/db ATR+RAM	230,4±41,0	224,2±62,3	454,6±98,4
db/db RAM	214,2±28,1	214,0±32,4	428,2±50,0
Test de ANOVA o Kruskal-Wallis (Tratamientos frente db/db)	p=0,385	p=0,585	p=0,452

[§]Diferencias estadísticamente significativas entre db/m y db/db mediante el test de Student ($p < 0,05$). **db/m**: controles no diabéticos; **db/db**: db/db tratados con vehículo; **db/db EMP**: db/db tratados con empagliflozina; **db/db EMP+RAM**: db/db tratados con empagliflozina y ramipril; **db/db EMP+RAM+ATR**: db/db tratados con empagliflozina, ramipril y atrasentán; **db/db ATR**: db/db tratados con atrasentán; **db/db ATR+RAM**: db/db tratados con ramipril y atrasentán; **db/db RAM**: db/db tratados con ramipril.

El peso renal se midió al final del tratamiento, durante el procedimiento de eutanasia de los animales. No se observó un incremento del peso renal en los ratones diabéticos tratados con vehículo respecto a los controles no diabéticos, ni entre los diferentes grupos de tratamiento y el db/db tratado con vehículo (**Tabla 5-10**).

Tabla 5-10 - Peso renal al final del tratamiento en los grupos db/m, db/db y los grupos tratados con empagliflozina, ramipril, atrasentán o sus combinaciones. Peso renal medido en mg. Los valores se expresan en media \pm DE para cada rama de tratamiento. Se muestran además el resultado de las comparaciones realizadas de los diferentes grupos de tratamiento frente al grupo db/db mediante el test de ANOVA o de Kruskal-Wallis.

Rama de tratamiento	Peso renal derecho	Peso renal izquierdo	Peso renal total
db/m	247,4 \pm 38,5	221,8 \pm 32,6	469,2 \pm 68,8
db/db	254,6 \pm 46,4	237,0 \pm 34,4	492,6 \pm 78,8
db/db EMP	238,8 \pm 46,6	218,1 \pm 35,0	456,9 \pm 75,7
db/db EMP + RAM	245,6 \pm 38,6	228,2 \pm 30,3	473,8 \pm 67,1
db/db EMP + RAM + ATR	241,7 \pm 30,5	224,0 \pm 23,3	465,7 \pm 48,2
db/db ATR	224,2 \pm 42,8	216,0 \pm 14,6	440,2 \pm 47,4
db/db ATR+RAM	242,8 \pm 39,2	214,8 \pm 41,6	457,6 \pm 70,4
db/db RAM	254,6 \pm 22,6	232,0 \pm 18,2	483,4 \pm 31,0
Test de ANOVA o Kruskal-Wallis (Tratamientos frente db/db)	p=0,731	p=0,491	p=0,563

db/m: controles no diabéticos; **db/db:** db/db tratados con vehículo; **db/db EMP:** db/db tratados con empagliflozina; **db/db EMP+RAM:** db/db tratados con empagliflozina y ramipril; **db/db EMP+RAM+ATR:** db/db tratados con empagliflozina, ramipril y atrasentán; **db/db ATR:** db/db tratados con atrasentán; **db/db ATR+RAM:** db/db tratados con ramipril y atrasentán; **db/db RAM:** db/db tratados con ramipril.

5.2. EFECTOS SOBRE LA LESIÓN RENAL DIABÉTICA

Los efectos de los tratamientos con empagliflozina, ramipril, atrasentán y sus combinaciones sobre la lesión renal diabética se evaluaron mediante técnicas histológicas, así como el análisis de la expresión génica renal de marcadores de inflamación, fibrosis y estrés oxidativo en las muestras renales obtenidas al final del procedimiento experimental.

5.2.a. Evaluación histológica de la lesión renal

El modelo murino db/db presenta signos histológicos de nefropatía diabética incipiente con una lesión de predominio glomerular (103,115) (**Ver sección Introducción - Modelos murinos de diabetes**). Por este motivo, la evaluación de los efectos de los fármacos sobre la lesión histológica renal se centró en la observación de lesiones glomerulares diabéticas precoces mediante la medición de la expansión mesangial glomerular y del número de podocitos glomerulares.

5. RESULTADOS

Mediante la tinción de PAS se realizó el análisis de la expansión mesangial y de la morfometría glomerular. Dado que entre diferentes secciones histológicas o incluso en la misma sección histológica, el tamaño de los glomérulos corticales podía variar, cada área medida se ajustó al área glomerular o al área del penacho capilar de esa misma imagen para evitar sesgos (**Ver sección Material y Métodos - Evaluación de la morfología renal en secciones teñidas con PAS**). En primer lugar, se midió la proporción del área del penacho respecto al área glomerular sin observar diferencias entre los ratones no diabéticos y los ratones diabéticos tratados con vehículo (**Figura 5-6**). Al comparar esa misma proporción entre las diferentes ramas de tratamiento y los ratones db/db tratados con vehículo no se observaron diferencias (**Figura 5-6**).

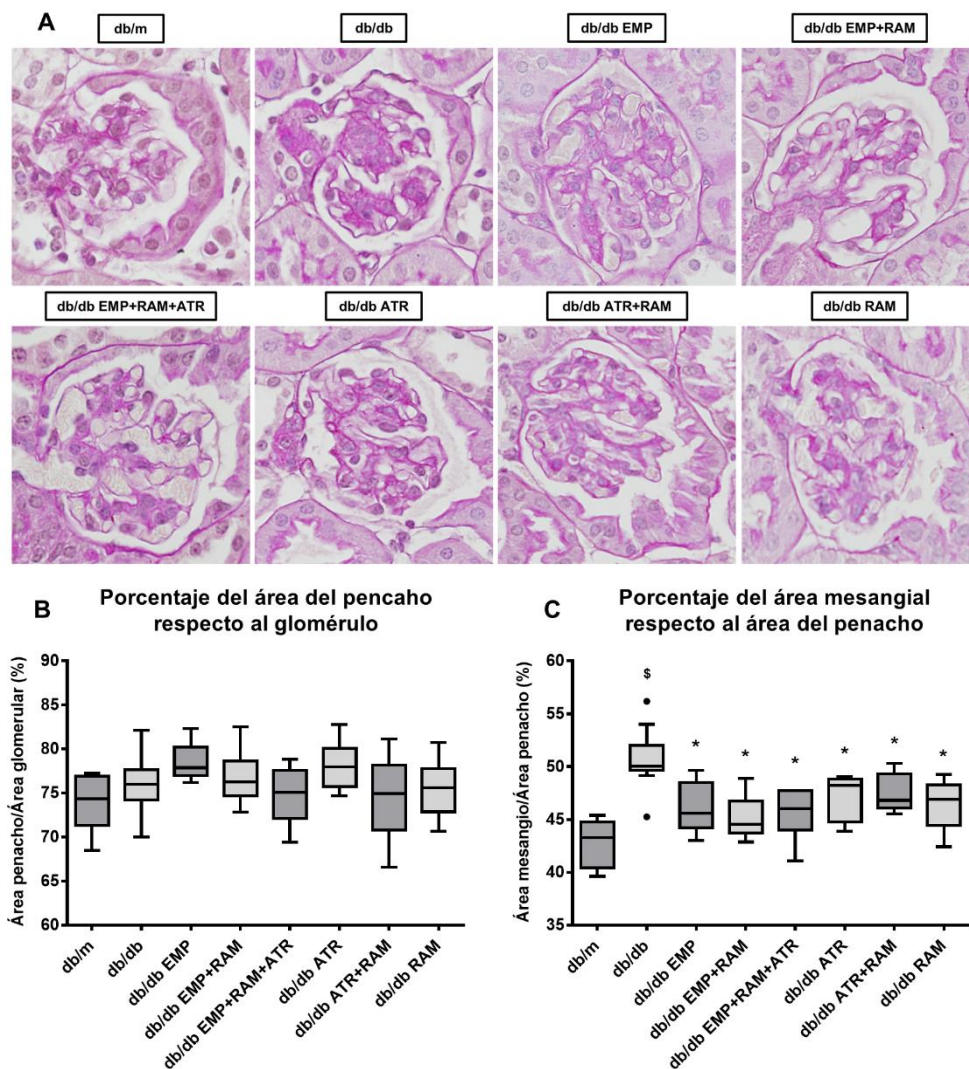


Figura 5-6 - Evaluación morfométrica glomerular y de la expansión de la matriz mesangial mediante la tinción de PAS en los grupos db/m, db/db y los grupos tratados con empagliflozina, ramipril, atrasentán o sus combinaciones. Las áreas se exponen siempre ajustadas en forma de proporción respecto al área glomerular o al área del penacho. **A:** microfotografías glomerulares representativas de la tinción de PAS para cada rama de tratamiento (imágenes realizadas a 40 aumentos); **B:** diagrama de cajas que representa la proporción del área del penacho respecto al área glomerular total; **C:** diagrama de cajas que representan la proporción del área mesangial respecto al área del penacho glomerular.

§Diferencias estadísticamente significativas entre db/m y db/db mediante el test de Mann-Whitney ($p < 0,05$).
 *Diferencias estadísticamente significativas en la prueba de Mann-Whitney entre los diferentes tratamientos contra db/db ($p < 0,05$). **db/m:** controles no diabéticos; **db/db:** db/db tratados con vehículo; **db/db EMP:** db/db tratados con empagliflozina; **db/db EMP+RAM:** db/db tratados con empagliflozina y ramipril; **db/db EMP+RAM+ATR:** db/db tratados con empagliflozina, ramipril y atrasentán; **db/db ATR:** db/db tratados con atrasentán; **db/db ATR+RAM:** db/db tratados con ramipril y atrasentán; **db/db RAM:** db/db tratados con ramipril.

5. RESULTADOS

Por otra parte, se midió la proporción del área de la matriz mesangial ajustada al área del penacho glomerular para estimar el grado de expansión mesangial. En este caso, sí se observó un incremento del 8,0% de la matriz mesangial (IC 95%: 6,0%-10,0%) en los ratones diabéticos no tratados respecto a los controles db/m (**Figura 5-6**). Esto demuestra que los ratones db/db presentan signos de nefropatía diabética incipiente con un incremento de la matriz mesangial glomerular. Al comparar las ramas de tratamiento frente al grupo db/db tratado con vehículo, todas las ramas de tratamiento disminuyeron la expansión de la matriz mesangial glomerular frente al db/db tratado con vehículo, obteniendo una mayor reducción los grupos de: 1.-empagliflozina, 2.- empagliflozina y ramipril, y 3.-empagliflozina, ramipril y atrasentán (**Figura 5-6 y Tabla 5-11**). Estas diferencias también se confirmaron al ajustar el área de la matriz mesangial al área glomerular total de cada imagen en vez de al área del penacho glomerular.

Tabla 5-11 - Porcentaje de reducción de la matriz mesangial en los grupos db/m, db/db y los grupos tratados con empagliflozina, ramipril, atrasentán o sus combinaciones. Se muestran los porcentajes de reducción para la proporción del área de matriz mesangial ajustada al área del penacho glomerular. Junto al porcentaje se indica el intervalo de confianza del 95% de la diferencia respecto al grupo db/db. Se presentan además los análisis realizados de los diferentes grupos de tratamiento frente al grupo db/db mediante los test de comparación múltiple (Dunn) y los test de comparación de dos grupos independientes.

Rama de tratamiento	Porcentaje de reducción (IC 95%)	Test de Dunn	Test de Mann-Whitney
db/db	Referencia	-	-
db/db EMP	5,0% (2,0 - 6,0)*	p<0,001	p<0,001
db/db EMP + RAM	5,0% (3,0 - 6,0)*	p<0,001	p<0,001
db/db EMP + RAM + ATR	5,0% (3,0 - 7,0)*	p<0,001	p<0,001
db/db ATR	2,5% (1,0 - 6,0)*	p=0,075	p<0,001
db/db ATR+RAM	3,0% (1,0-4,0)*	p=0,089	p=0,001
db/db RAM	3,0% (2,0 - 6,0)*	p=0,005	p<0,001

*Diferencias estadísticamente significativas en el test de Mann-Whitney de los tratamientos contra db/db (p<0,05). **db/db**: db/db tratados con vehículo; **db/db EMP**: db/db tratados con empagliflozina; **db/db EMP+RAM**: db/db tratados con empagliflozina y ramipril; **db/db EMP+RAM+ATR**: db/db tratados con empagliflozina, ramipril y atrasentán; **db/db ATR**: db/db tratados con atrasentán; **db/db ATR+RAM**: db/db tratados con ramipril y atrasentán; **db/db RAM**: db/db tratados con ramipril.

Otro signo de nefropatía diabética incipiente es la pérdida precoz de podocitos glomerulares y la disminución de la densidad podocitaria (103). La tinción

inmunohistoquímica de Wilms tumor 1 (WT-1) resalta de forma específica los núcleos de los podocitos frente a los núcleos de otras células, permitiendo así realizar el conteo de los primeros. De nuevo, y para evitar sesgos debidos a la variabilidad del área en las diferentes secciones glomerulares, el número de podocitos se ajustó al área del penacho en cada imagen obteniendo el valor de densidad podocitaria (número de podocitos por cada $100 \mu\text{m}^2$). Los ratones diabéticos db/db tratados con vehículo mostraban una disminución de la densidad podocitaria de 0,4 podocitos/ $100\mu\text{m}^2$ (IC 95%: 0,1 - 0,7) respecto a los controles no diabéticos (**Figura 5-7**). Sin embargo, al comparar las diferentes ramas de tratamiento no se observaron cambios en la densidad podocitaria (**Figura 5-7**). El ratón diabético db/db que recibió empagliflozina, ramipril y atrasentán mostraba una tendencia respecto al grupo diabético db/db tratado con vehículo, con un incremento de la densidad de 0,2 podocitos/ $100\mu\text{m}^2$ (IC 95%: -0,1 - 0,4, $p=0,200$). No obstante esta diferencia no alcanzó la significación estadística.

5. RESULTADOS

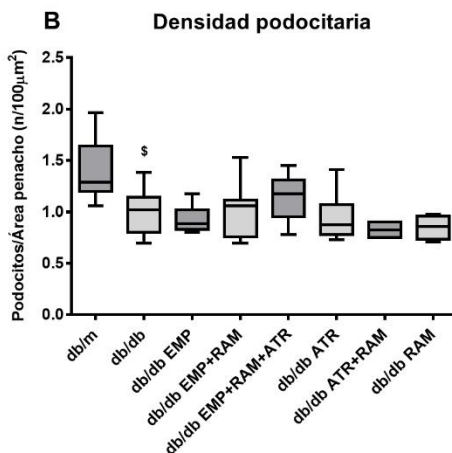
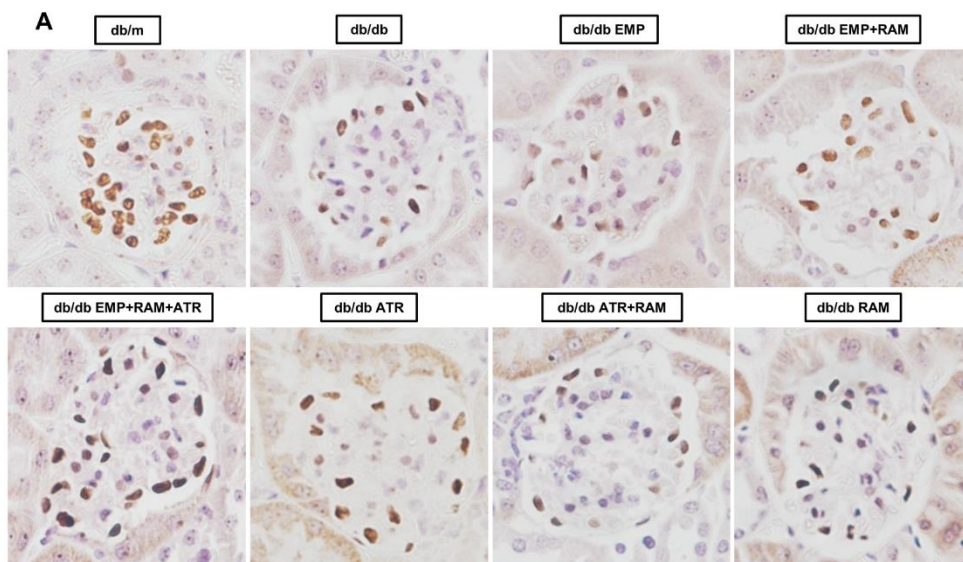


Figura 5-7 - Evaluación de la densidad podocitaria en los grupos db/m, db/db y los grupos tratados con empagliflozina, ramipril, atrasentán o sus combinaciones. El número de podocitos se ajustó al área del penacho glomerular. **A:** microfotografías glomerulares representativas de la tinción de Wilms tumor 1 (WT1) para cada rama de tratamiento (imágenes realizadas a 40 aumentos); **B:** diagrama de cajas que representa la densidad podocitaria en cada rama de tratamiento.

§Diferencias estadísticamente significativas entre db/m y db/db mediante el test de Student ($p < 0,05$). **db/m:** controles no diabéticos; **db/db:** db/db tratados con vehículo; **db/db EMP:** db/db tratados con empagliflozina; **db/db EMP+RAM:** db/db tratados con empagliflozina y ramipril; **db/db EMP+RAM+ATR:** db/db tratados con empagliflozina, ramipril y atrasentán; **db/db ATR:** db/db tratados con atrasentán; **db/db ATR+RAM:** db/db tratados con ramipril y atrasentán; **db/db RAM:** db/db tratados con ramipril.

5.2.b. Evaluación de marcadores de estrés oxidativo, inflamación y fibrosis

Con el objetivo de caracterizar con mayor precisión la lesión renal del modelo db/db y los posibles efectos protectores de la empagliflozina, el atrasentán o sus combinaciones, se midió la expresión del ARNm de genes relacionados con el estrés oxidativo, la inflamación y la fibrosis en el extracto cortical renal.

En primer lugar se analizó la expresión de dos genes relacionados con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) a nivel renal (132–134), que codifican unas enzimas denominadas oxidasas de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH oxidasas). Estos genes analizados fueron el Nox2 y Nox4 responsables de codificar la NADPH oxidasa 2 y 4 respectivamente. La expresión de ambos genes en ratones diabéticos no tratados frente a los controles db/m era 2,6 (RIC: 1,2 - 4,4) veces y 3,9 (RIC: 2,9 - 5,7) veces mayor para Nox2 y Nox4 respectivamente (**Figura 5-8**). Estos resultados demuestran que en el modelo diabético db/db existe un incremento de la expresión génica renal de dos enzimas responsables de la producción de ROS. La triple terapia con empagliflozina, ramipril y atrasentán disminuyó significativamente la expresión génica de Nox4 (**Figura 5-8**). En este último grupo, la expresión frente al grupo control no diabético db/m sólo incrementaba 1,9 (RIC: 1,0 - 3,7) veces comparado con el incremento de 3,9 veces del grupo diabético tratado con vehículo. En cuanto a los tratamientos con monoterapias o biterapias frente a los ratones db/db tratados con vehículo no se observaron diferencias ni en la expresión de Nox2 ni en la de Nox4.

5. RESULTADOS

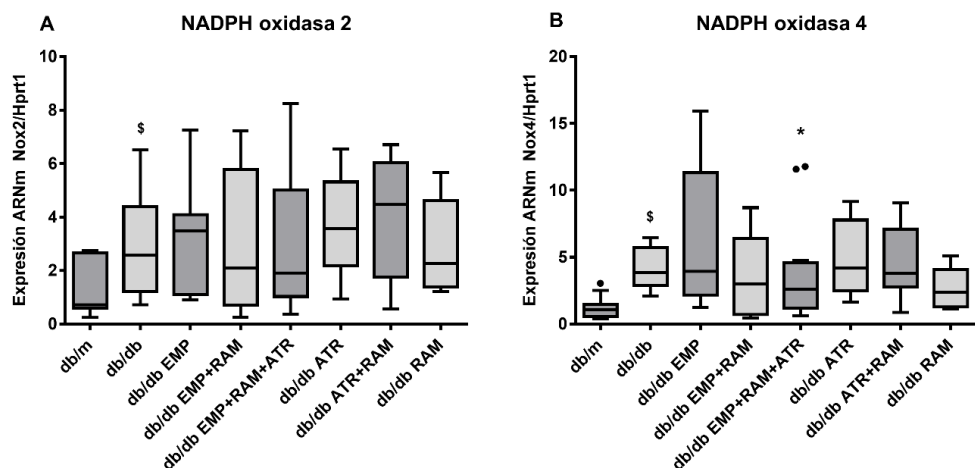


Figura 5-8 - Expresión génica de enzimas relacionadas con el estrés oxidativo en los grupos db/m, db/db y los grupos tratados con empagliflozina, ramipril, atrasentán o sus combinaciones. Valores expresados en cuantificación relativa (RQ) ajustada al grupo control no diabético db/m. Se muestra la expresión génica de 2 enzimas (Nox2 y Nox4) que intervienen en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el incremento del estrés oxidativo renal. **A:** diagrama de cajas que representa la expresión ARNm de Nox2. **B:** diagrama de cajas que representa la expresión ARNm de Nox4.

[§]Diferencias estadísticamente significativas entre db/m y db/db mediante el test de Mann Whitney ($p < 0,05$).

^{*}Diferencias estadísticamente significativas en el test de Mann-Whitney entre las ramas de tratamiento y el grupo db/db ($p < 0,05$). **db/m:** controles no diabéticos; **db/db:** db/db tratados con vehículo; **db/db EMP:** db/db tratados con empagliflozina; **db/db EMP+RAM:** db/db tratados con empagliflozina y ramipril; **db/db EMP+RAM+ATR:** db/db tratados con empagliflozina, ramipril y atrasentán; **db/db ATR:** db/db tratados con atrasentán; **db/db ATR+RAM:** db/db tratados con ramipril y atrasentán; **db/db RAM:** db/db tratados con ramipril.

En relación a la expresión génica de inflamación y fibrosis, se analizó la expresión de genes que codificaban la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), el factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) y la cadena alfa-1 del colágeno IV (COL4A1). No se observaron diferencias en ninguno de estos genes entre el modelo db/db no tratado y los controles no diabéticos (**Figura 5-9**). Del mismo modo, tampoco se identificaron diferencias entre las ramas de tratamiento y el modelo db/db no tratado (**Figura 5-9**).

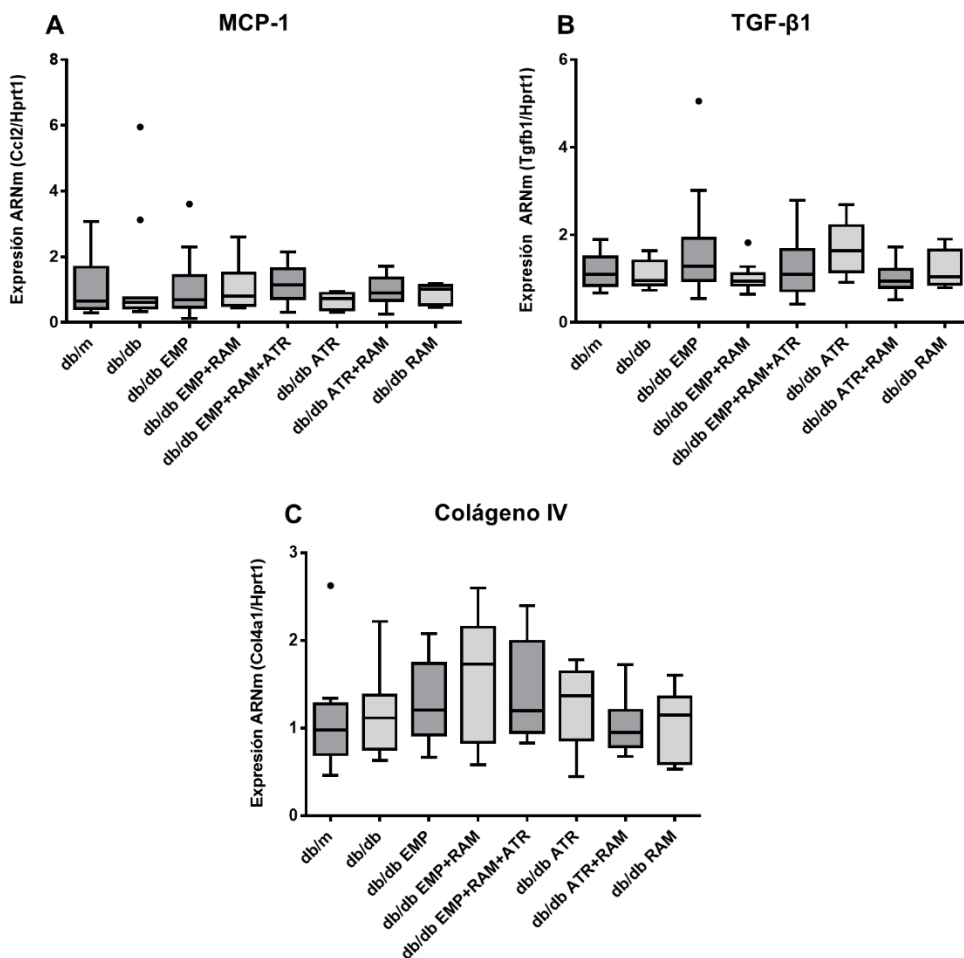


Figura 5-9 - Expresión génica de marcadores relacionados con la inflamación y la fibrosis en los grupos db/m, db/db y los grupos tratados con empagliflozina, ramipril, atrasentán o sus combinaciones. Valores expresados en cuantificación relativa (RQ) ajustada al grupo control no diabético db/m. Se muestra la expresión génica marcadores de inflamación y fibrosis como la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), el factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) y la cadena alfa-1 del colágeno IV (COL4A1).

db/m: controles no diabéticos; **db/db:** db/db tratados con vehículo; **db/db EMP:** db/db tratados con empagliflozina; **db/db EMP+RAM:** db/db tratados con empagliflozina y ramipril; **db/db EMP+RAM+ATR:** db/db tratados con empagliflozina, ramipril y atrasentán; **db/db ATR:** db/db tratados con atrasentán; **db/db ATR+RAM:** db/db tratados con ramipril y atrasentán; **db/db RAM:** db/db tratados con ramipril.

5. RESULTADOS

5.3. MODULACIÓN DEL EJE RENINA-ANGIOTENSINA

5.3.a. Efectos sobre las primeras etapas del SRA

La primera etapa limitante del SRA es la conversión del angiotensinógeno (AGT) en angiotensina I (Ang I) por acción de la renina (135). El angiotensinógeno renal procede del plasma circulante, pero también se ha identificado una producción a nivel local, siendo las células tubulares un posible origen dicho AGT (5,13). Así, dentro del estudio del SRA, se evaluó en primer lugar la expresión renal de AGT y renina.

En relación a la expresión génica, el ARNm de angiotensinógeno se expresaba 2,3 (RIC: 1,6 - 3,6) veces más en los ratones db/db respecto a los controles no diabéticos (db/m). Este incremento se observó en todas las ramas de tratamiento de ratones diabéticos, sin que se observen diferencias en la expresión frente al grupo db/db tratado con vehículo (**Figura 5-10**).

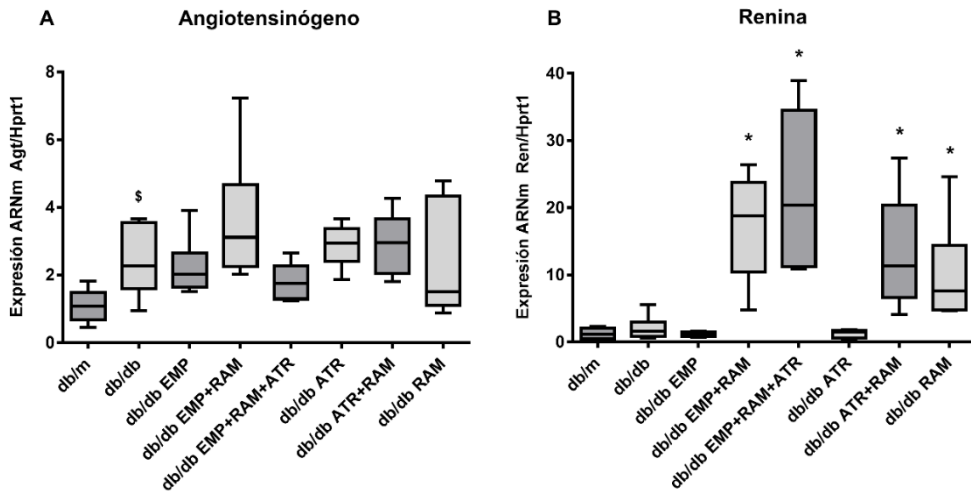


Figura 5-10 - Modulación de la expresión génica de angiotensinógeno y renina en los grupos db/m, db/db y los grupos tratados con empagliflozina, ramipril, atrasentán o sus combinaciones. Diagramas de cajas que muestran las expresiones relativas de ARNm respecto a los controles no diabéticos. **A:** expresión ARNm de angiotensinógeno; **B:** expresión ARNm de renina.

[§]Diferencias estadísticamente significativas mediante el test de Mann-Whitney entre los grupos db/m y db/db ($p < 0,05$). *Diferencias estadísticamente significativas en el test de Mann-Whitney de los tratamientos contra el grupo db/db ($p < 0,05$). **db/m:** controles no diabéticos; **db/db:** db/db tratados con vehículo; **db/db+EMP:** db/db tratados con empagliflozina; **db/db+EMP+RAM:** db/db tratados con empagliflozina y ramipril; **db/db+EMP+RAM+ATR:** db/db tratados con empagliflozina, ramipril y atrasentán; **db/db+ATR:** db/db tratados con atrasentán; **db/db+RAM+ATR:** db/db tratados con ramipril y atrasentán; **db/db+RAM:** db/db tratados con ramipril.

En la expresión del ARNm de renina no se observaron diferencias entre diabéticos y no diabéticos (**Figura 5-10**). No obstante, sí se observó un incremento de la expresión génica de renina en los grupos que recibieron tratamiento con ramipril. El incremento fue estadísticamente significativo para los cuatro grupos tratados con: 1.- empagliflozina y ramipril, 2.-empagliflozina, ramipril y atrasentán, 3.-atrasentán y ramipril, y 4.-ramipril (**Figura 5-10 y Tabla 5-12**). Además, el análisis de la expresión génica de renina demostró que los grupos tratados con empagliflozina y ramipril con o sin atrasentán presentaban una expresión de renina aparentemente mayor que aquellos tratados con ramipril o ramipril más atrasentán (**Figura 5-10 y Tabla 5-12**).

5. RESULTADOS

Tabla 5-12 - Expresión ARNm de la renina en los grupos db/m, db/db y los grupos tratados con empagliflozina, ramipril, atrasentán o sus combinaciones.

Se muestran las cuantificaciones relativas (RQ) de la expresión génica ajustadas al grupo db/m. Los valores se expresan en media \pm DE para cada rama de tratamiento. Se presenta además el resultado de las comparaciones realizadas de los diferentes grupos de tratamiento frente al grupo db/db mediante el test de Kruskal-Wallis.

Rama de tratamiento	Cuantificación relativa (RQ) (Valores ajustados a db/m)	Test de Kruskal-Wallis	Test de Dunn	Test de Mann-Whitney
db/m	1,2 (RIC: 0,5 - 2,0)	-	-	-
db/db	1,6 (RIC: 0,9 - 3,0)	Referencia	Referencia	Referencia
db/db EMP	1,1 (RIC: 0,8 - 1,5)	p<0,001	p>0,999	p=0,474
db/db EMP + RAM	18,8 (RIC: 10,5 - 23,8)*	p<0,001	p=0,025	p=0,004
db/db EMP + RAM + ATR	20,4 (RIC: 11,2 - 34,6)*	p<0,001	p=0,008	p=0,002
db/db ATR	1,5 (RIC: 0,6 - 1,8)	p<0,001	p>0,999	p=0,474
db/db ATR+RAM	11,3 (RIC: 6,6 - 20,4)*	p<0,001	p=0,099	p=0,004
db/db RAM	7,6 (RIC: 4,8 - 14,4)*	p<0,001	p=0,305	p=0,009

*Diferencias estadísticamente significativas en el test de Mann-Whitney de los tratamientos contra el grupo db/db ($p<0,05$). **db/m**: controles no diabéticos; **db/db**: db/db tratados con vehículo; **db/db+EMP**: db/db tratados con empagliflozina; **db/db+EMP+RAM**: db/db tratados con empagliflozina y ramipril; **db/db+EMP+RAM+ATR**: db/db tratados con empagliflozina, ramipril y atrasentán; **db/db+ATR**: db/db tratados con atrasentán; **db/db+RAM+ATR**: db/db tratados con ramipril y atrasentán; **db/db+RAM**: db/db tratados con ramipril.

Al identificar estos cambios en la expresión génica de la renina, se decidió corroborar si estos tenían traducción a nivel proteico. Para ello se realizaron tinciones inmunohistoquímicas específicas para renina en las secciones renales de cada grupo experimental, que identificaron una extensión significativa de la tinción en los grupos que recibían ramipril (**Figura 5-11**). Tras confirmar dicho incremento, se decidió cuantificar el aumento de tamaño, midiendo el área positiva a renina. Así, en la extensión de la tinción no se observaron diferencias entre el grupo no diabético y el diabético tratado con vehículo. Sin embargo, sí se observó un aumento del área teñida en los grupos tratados con ramipril. Curiosamente, este incremento volvía a ser mayor en los grupos que recibían empagliflozina y ramipril con o sin atrasentán comparado con ramipril en monoterapia (**Figura 5-11**).

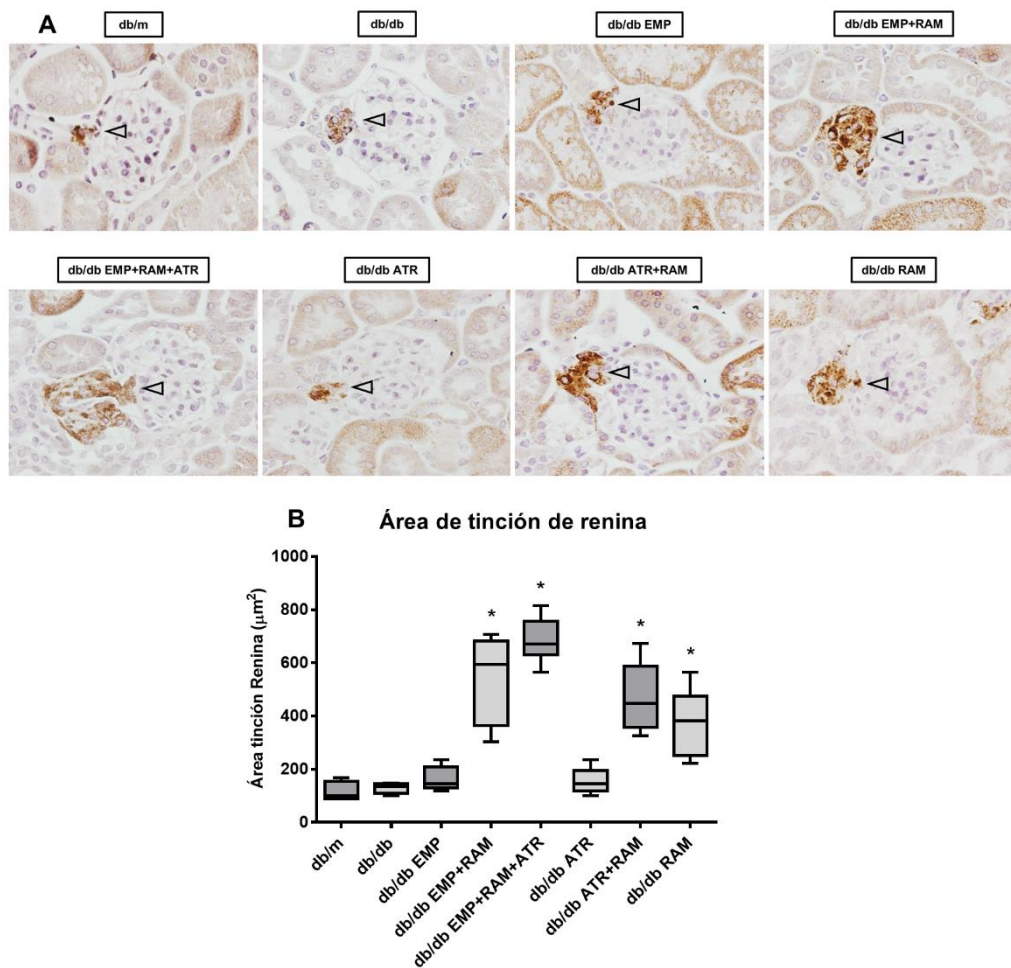


Figura 5-11 - Evaluación de la expresión proteica de renina en los grupos db/m, db/db y los grupos tratados con empagliflozina, ramipril, atrasentán o sus combinaciones. La evaluación se realizó mediante tinción inmunohistoquímica específica de renina, que posteriormente se cuantificó midiendo el área de tinción de la renina. **A:** microfotografías glomerulares representativas de la tinción de renina para cada rama de tratamiento (imágenes realizadas a 40 aumentos). Las células yuxtglomerulares teñidas se indican con una flecha. **B:** diagrama de cajas que representa el área de tinción en cada rama de tratamiento (valores expresados en μm^2).

*Diferencias estadísticamente significativas en el test de Student de los tratamientos contra el grupo db/db ($p < 0,05$). **db/m:** controles no diabéticos; **db/db:** db/db tratados con vehículo; **db/db EMP:** db/db tratados con empagliflozina; **db/db EMP+RAM:** db/db tratados con empagliflozina y ramipril; **db/db EMP+RAM+ATR:** db/db tratados con empagliflozina, ramipril y atrasentán; **db/db ATR:** db/db tratados con atrasentán; **db/db RAM+ATR:** db/db tratados con ramipril y atrasentán; **db/db RAM:** db/db tratados con ramipril.

Dado que se observaba un mayor incremento de la renina en las ramas que recibían la combinación de empagliflozina y ramipril frente al ramipril solo, se decidió realizar

5. RESULTADOS

una tercera comparación múltiple de las combinaciones de ramipril contra ramipril en monoterapia. El análisis demostró que los grupos de: 1.-empagliflozina y ramipril, y 2.-empagliflozina, ramipril y atrasentán, incrementaban de forma considerable la expresión génica y proteica de renina (**Tabla 5-13**), alcanzando la significación estadística en el ratón db/db tratado con empagliflozina, ramipril y atrasentán. En este último grupo la expresión ARNm era 2,4 (RIC: 1,3 - 4,1) veces mayor (ajustada al grupo tratado con ramipril) y el área de tinción de renina era 317,6 μm^2 (IC 95%: 171,0 - 464,2) mayor respecto al tratamiento con ramipril solo.

Tabla 5-13 - Comparación de la expresión génica y proteica de renina de las combinaciones con ramipril respecto a ramipril en monoterapia. Se muestra la diferencia en la expresión génica medida mediante RQ ajustado al grupo db/m y la diferencia en la extensión de la tinción de renina sobre el aparato yuxtglomerular medida en μm^2 . Se presentan además los resultados de las pruebas post-hoc de Dunn y Bonferroni, así como el resultado de los test de Mann-Whitney y Student.

Rama de tratamiento	Cuantificación relativa de ARNm (Ajustada a db/m)	Test de Dunn	Test de Mann-Whitney	Diferencias en el área de renina (IC 95%)	Test de Bonferroni	Test de Student
db/db EMP+RAM	17,3±8,1	p=0,363	p=0,180	170,5 (-49,0 - 390,0)	p=0,160	p=0,111
db/db EMP+RAM+ATR	22,5±11,5*	p=0,101	p=0,041	317,6 (171,0 - 464,2)*	p=0,003	p<0,001
db/db ATR+RAM	13,3±8,4	p>0,999	p=0,474	101,1 (-89,9 - 292,1)	p=0,704	p=0,257

*Diferencias estadísticamente significativas en el test de Mann-Whitney o en el test de Student de las combinaciones con ramipril frente al tratamiento con ramipril en monoterapia (p<0,05). **db/db+EMP+RAM**: db/db tratados con empagliflozina y ramipril; **db/db+EMP+RAM+ATR**: db/db tratados con empagliflozina, ramipril y atrasentán; **db/db+RAM+ATR**: db/db tratados con ramipril y atrasentán.

5.3.b. Efectos sobre la expresión renal de ECA y ECA2

Tras analizar cómo se modulan las primeras etapas del SRA, pasamos a analizar los efectos de la empagliflozina, el atrasentán y sus combinaciones sobre la expresión génica y proteica de ECA y ECA2. Mediante tinciones inmunohistoquímicas específicas pudimos observar que ambas enzimas se localizan fundamentalmente en el borde apical de las células tubulares, siendo su expresión mayor en los túbulos de la transición cortico-medular (**Figura 5-12**). Además, esta expresión desaparecía completamente en la médula renal (**Figura 5-12**). La modulación ejercida por los diferentes fármacos del estudio se observó sobre todo en los túbulos corticales, mientras que la tinción de ECA y ECA2 permaneció relativamente estable en la transición cortico-medular. Este hecho es importante para entender los resultados

tanto de la expresión génica como de la actividad de los enzimas, ya que las muestras de estudio se obtuvieron homogeneizando fragmentos de tejido cortical renal, que están predominantemente compuestas por células tubulares. Asumiendo, por tanto, la composición mayoritaria de estos extractos, los análisis de expresión de ARNm y actividad enzimática reflejan cómo se modula la expresión tubular cortical de ambos enzimas.

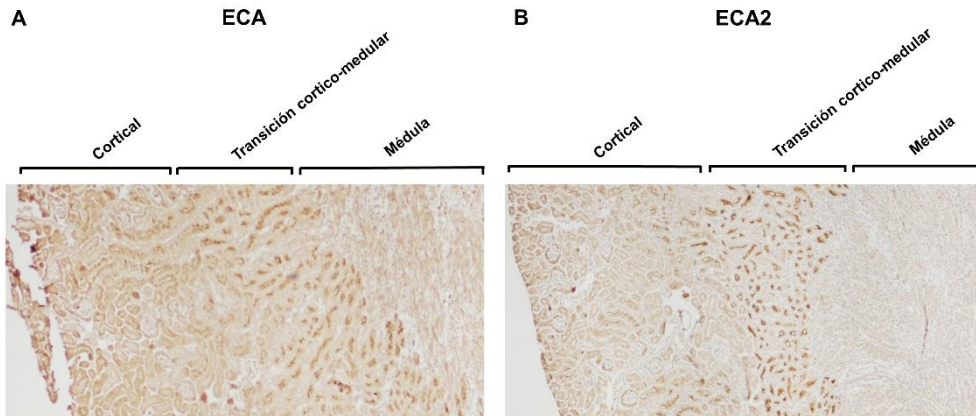


Figura 5-12 - Microfotografías que representan la expresión de ECA y ECA2 a nivel renal en un control no diabético (db/m). Microfotografías realizadas a 4 aumentos. Ambos enzimas se expresan predominante en el borde apical de las células tubulares, siendo su expresión mayor en los túbulos de la transición cortico-medular. La expresión de ECA y ECA 2 desaparece a nivel medular.

La expresión génica de ECA, estaba significativamente disminuida en los ratones db/db no tratados frente a db/m, siendo la expresión 4 veces menor en los primeros (RQ de ECA en el grupo db/db tratado con vehículo 0,27 (RIC: 0,19 - 0,29)) (**Figura 5-13**). Esta disminución de la expresión del ARNm se mantenía en todas las ramas diabéticas. Asimismo, al comparar los grupos de tratamiento frente al grupo db/db tratado con vehículo, no se observaron diferencias en la expresión génica (**Figura 5-13**).

5. RESULTADOS

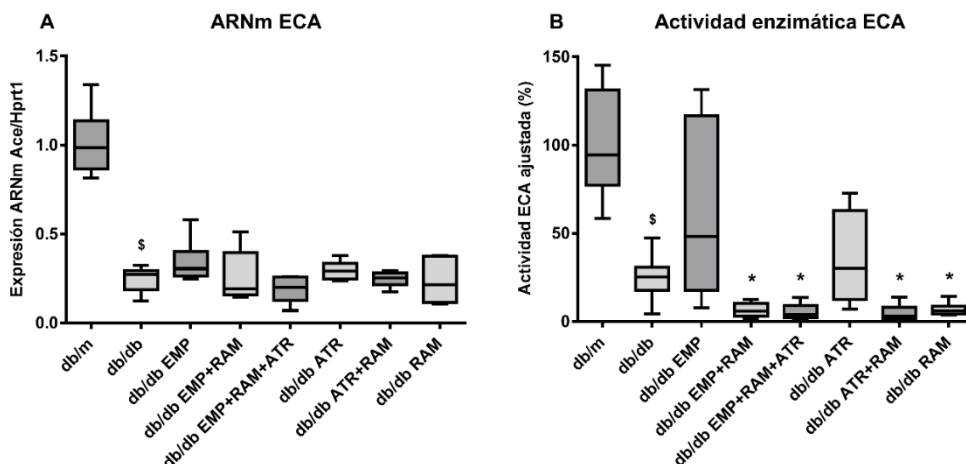


Figura 5-13 - Expresión génica y actividad enzimática de ECA en los grupos db/m, db/db y los grupos tratados con empagliflozina, ramipril, atrasentán o sus combinaciones. La expresión génica se muestra en RQ ajustada contra el grupo db/m y la actividad enzimática en porcentaje ajustada también contra el grupo db/m. **A:** diagrama de cajas que representa la expresión ARNm de ECA en cada grupo experimental; **B:** diagrama de cajas que representa la actividad enzimática de ECA.

§Diferencias estadísticamente significativas mediante el test de Mann-Whitney entre los grupos db/m y db/db ($p < 0,05$). *Diferencias estadísticamente significativas en el test de Mann-Whitney de los tratamientos contra el grupo db/db ($p < 0,05$). **db/m:** controles no diabéticos; **db/db:** db/db tratados con vehículo; **db/db EMP:** db/db tratados con empagliflozina; **db/db EMP+RAM:** db/db tratados con empagliflozina y ramipril; **db/db EMP+RAM+ATR:** db/db tratados con empagliflozina, ramipril y atrasentán; **db/db ATR:** db/db tratados con atrasentán; **db/db RAM+ATR:** db/db tratados con ramipril y atrasentán; **db/db RAM:** db/db tratados con ramipril.

Para comprobar si la modulación de la expresión génica observada tenía traducción a nivel proteico, se analizó la actividad enzimática de ECA y su extensión en inmunohistoquímica. En concordancia con la expresión génica de ECA, la actividad enzimática, se demostró significativamente disminuida en el ratón diabético db/db en comparación con los controles no diabéticos db/m con una diferencia de 34.679 RFU/mg/h (IC 95%: 17.484 - 42.284) entre ambos grupos. Ello suponía una actividad ajustada de 25,3% (RIC: 17,9 - 30,9) en el grupo db/db respecto al grupo db/m (**Figura 5-13**). Además, cuando se comparó el efecto de los tratamientos contra el grupo diabético tratado con vehículo se observó que el tratamiento con ramipril disminuía aún más la actividad de ECA. Este hallazgo era previsible teniendo en cuenta que el ramipril es un inhibidor del ECA. Estas reducciones condicionaban que la actividad ajustada contra el db/m en estos grupos fuera de 5,9% (RIC: 3,0 - 10,3), 4,1% (RIC: 2,3 - 9,1), 3,0% (RIC: 1,6 - 8,1) y 6,1% (RIC: 4,3 - 8,9) respectivamente (**Figura 5-13**).

El estudio de la tinción del ECA en cada grupo experimental mediante inmunohistoquímica confirmó los hallazgos de la expresión génica y la actividad enzimática. Se observó una disminución de la tinción tubular apical de ECA en los ratones db/db. Estos resultados sugieren que además de una disminución de la expresión génica de ECA, existe una disminución de la cantidad de proteína a nivel tubular y, por tanto, de la actividad enzimática de ECA. Sin embargo, no se identificó ninguna clara diferencia en la evaluación semicuantitativa de las diferentes ramas de tratamiento frente al grupo db/db tratado con vehículo (**Figura 5-14**).

5. RESULTADOS

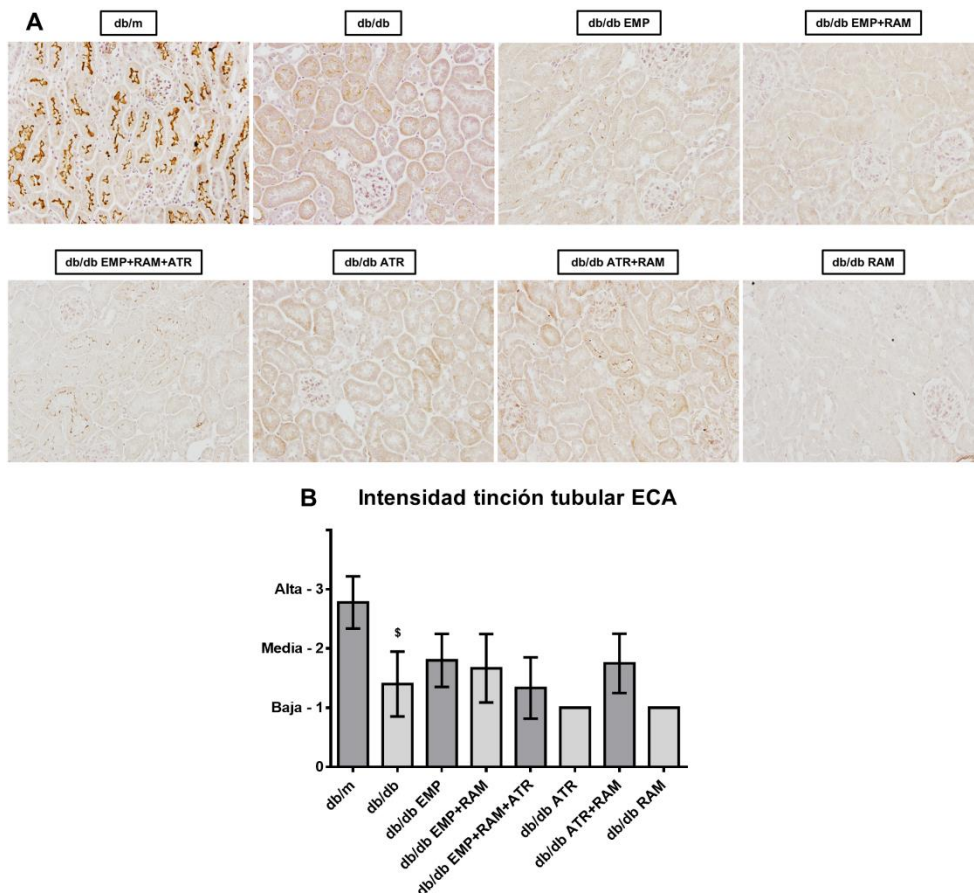


Figura 5-14 - Evaluación de la expresión tubular de ECA mediante tinción inmunohistoquímica en los grupos db/m, db/db y los grupos tratados con empagliflozina, ramipril, atrasentán o sus combinaciones. Se presentan las secciones histológicas teñidas para ECA mediante inmunohistoquímica y la evaluación del grado de tinción a nivel tubular mediante una escala semicuantitativa. Los gráficos de barras representan la media de la intensidad de la tinción \pm DE. **A:** microfotografías representativas de la tinción tubular de ECA para cada rama de tratamiento (imágenes realizadas a 20 aumentos); **B:** valoración semicuantitativa de la tinción tubular de ECA.

[§]Diferencias estadísticamente significativas mediante el test de Mann-Whitney entre los grupos db/m y db/db ($p < 0,05$). **db/m:** controles no diabéticos; **db/db:** db/db tratados con vehículo; **db/db EMP:** db/db tratados con empagliflozina; **db/db EMP+RAM:** db/db tratados con empagliflozina y ramipril; **db/db EMP+RAM+ATR:** db/db tratados con empagliflozina, ramipril y atrasentán; **db/db ATR:** db/db tratados con atrasentán; **db/db RAM+ATR:** db/db tratados con ramipril y atrasentán; **db/db RAM:** db/db tratados con ramipril.

Los extractos corticales renales homogeneizados principalmente representan lo que ocurre a nivel tubular y no se puede precisar lo que acontece a nivel glomerular mediante la actividad enzimática de ECA. Por este motivo, mediante las tinciones de inmunohistoquímica del ECA, se realizó una evaluación específica de la tinción en

los glomérulos. La evaluación de los mismos identificó un incremento de ECA a nivel glomerular en los ratones diabéticos (**Figura 5-15**). Este incremento de tinción glomerular, aunque no era tan evidente como el cambio en la tinción tubular, era especialmente manifiesto en el grupo db/db. En el resto de grupos diabéticos tratados con los fármacos experimentales el grado de tinción glomerular fue variable, con una aparente reducción de la tinción en el grupo tratado con atrasentán y ramipril frente al grupo db/db tratado con vehículo (**Figura 5-15**).

5. RESULTADOS

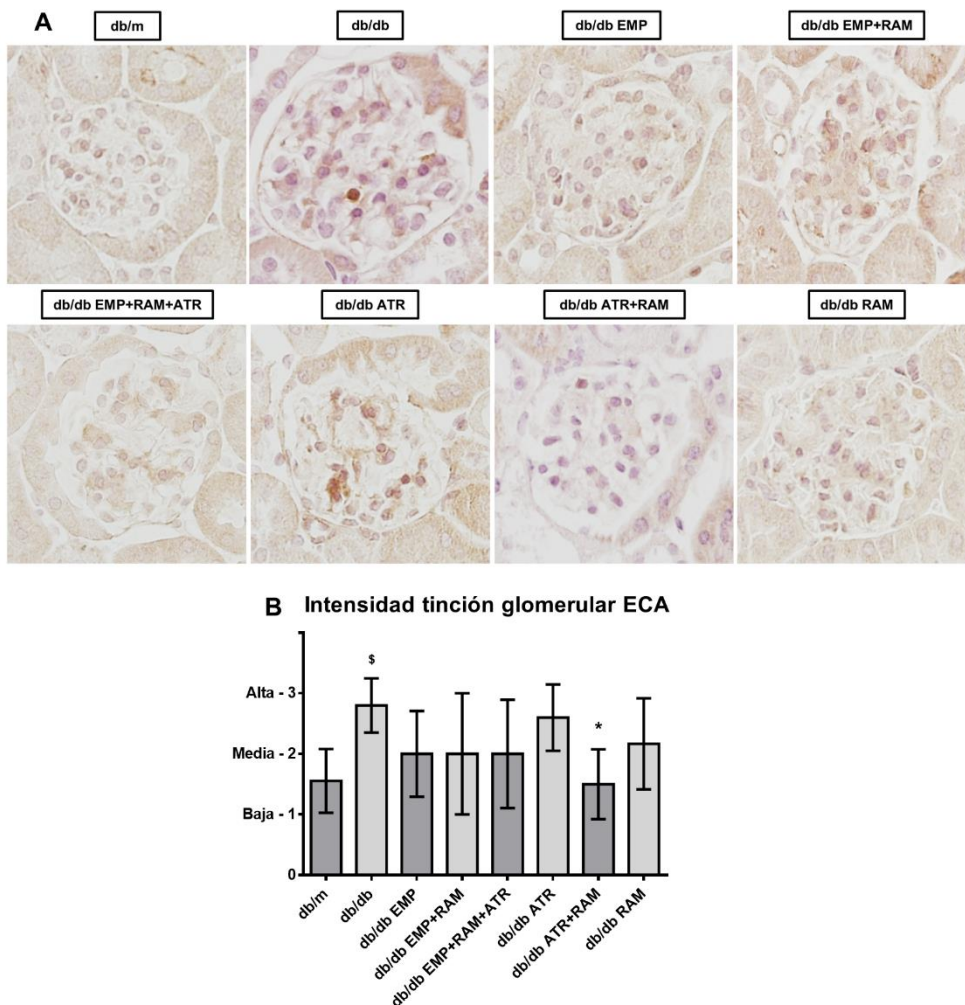


Figura 5-15 - Evaluación la expresión glomerular de ECA mediante inmunohistoquímica en los grupos db/m, db/db y los grupos tratados con empagliflozina, ramipril, atrasentán o sus combinaciones. Se presentan las secciones histológicas teñidas para ECA mediante inmunohistoquímica y la evaluación del grado de tinción a nivel tubular mediante una escala semicuantitativa. Los gráficos de barras representan la media de la intensidad de la tinción \pm DE. **A:** microfotografías representativas de la tinción glomerular de ECA para cada rama de tratamiento (imágenes realizadas a 40 aumentos); **B:** valoración semicuantitativa de la tinción glomerular de ECA.

[§]Diferencias estadísticamente significativas mediante el test de Mann-Whitney entre los grupos db/m y db/db ($p < 0,05$). ^{*}Diferencias estadísticamente significativas en el test de Mann-Whitney de los tratamientos contra el grupo db/db ($p < 0,05$). **db/m:** controles no diabéticos; **db/db:** db/db tratados con vehículo; **db/db+EMP:** db/db tratados con empagliflozina; **db/db+EMP+RAM:** db/db tratados con empagliflozina y ramipril; **db/db+EMP+RAM+ATR:** db/db tratados con empagliflozina, ramipril y atrasentán; **db/db+ATR:** db/db tratados con atrasentán; **db/db+RAM+ATR:** db/db tratados con ramipril y atrasentán; **db/db+RAM:** db/db tratados con ramipril.

En relación a la expresión renal de ECA2, el análisis de ARNm en los extractos corticales renales reveló que la expresión génica de esta enzima estaba incrementada 1,39 (RIC: 1,14 -1,91) veces en el grupo db/db tratado con vehículo frente al control no diabético db/m (**Figura 5-16**). Al comparar los diferentes tratamientos frente al grupo db/db no tratado, el grupo que recibió empagliflozina, ramipril y atrasentán demostró una reducción significativa en la expresión génica de ECA2. Así, en el grupo que recibió la triple terapia, la expresión ARNm respecto al grupo control db/m fue prácticamente idéntica con un valor RQ de 1,03 (RIC: 0,88 - 1,17) (**Figura 5-16**). En el resto de tratamientos no se observaron diferencias frente al grupo db/db no tratado.

5. RESULTADOS

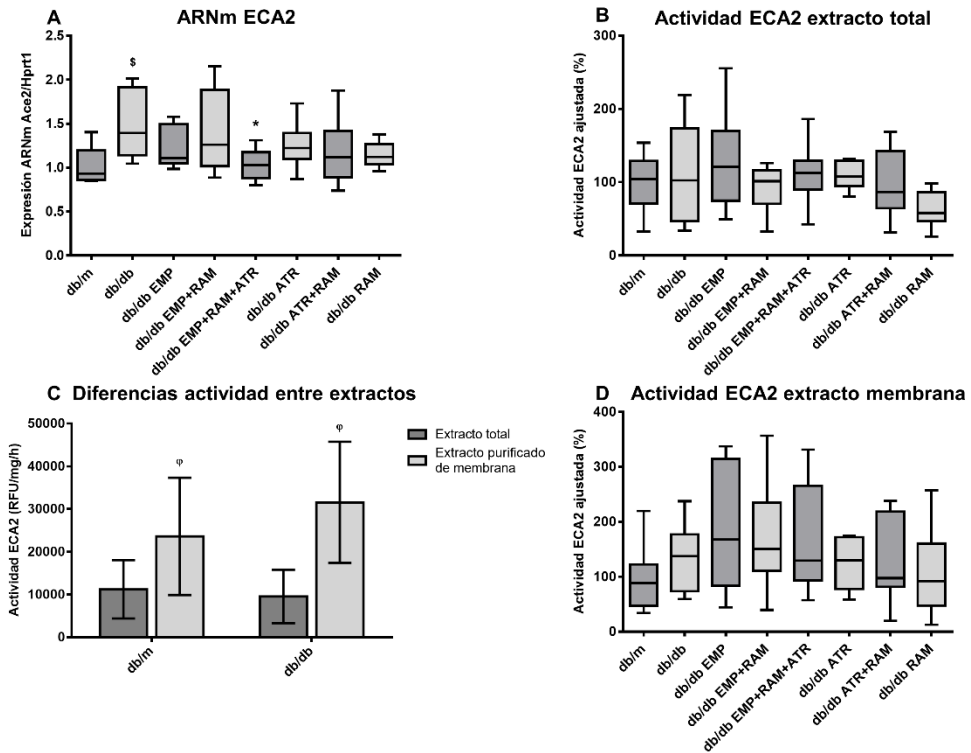


Figura 5-16 - Evaluación de la expresión génica y actividad de ECA2 en los grupos db/m, db/db y los grupos tratados con empagliflozina, ramipril, atrasentán o sus combinaciones. La expresión génica se muestra en RQ ajustada contra el grupo db/m y la actividad enzimática en porcentaje ajustada también contra el grupo db/m. Se muestra además la diferencia en la actividad enzimática en RFU/mg/h entre los extractos renales totales y los extractos purificados de membrana. **A:** diagrama de cajas que representa la expresión ARNm de ECA2 en cada grupo experimental; **B:** diagrama de cajas que representa la actividad enzimática de ECA2 en extracto renal total; **C:** gráfico de barras con media y DE que muestra las diferencias en actividad cruda; **D:** diagrama de cajas que representa la actividad enzimática de ECA2 en extracto purificado de membrana.

§Diferencias estadísticamente significativas mediante el test de Student entre los grupos db/m y db/db ($p < 0,05$). *Diferencias estadísticamente significativas en el test de Student entre los tratamientos y el grupo db/db ($p < 0,05$). ¶Diferencias estadísticamente significativas en el test de Wilcoxon entre extracto total y purificado ($p < 0,05$). **db/m:** controles no diabéticos; **db/db:** db/db tratados con vehículo; **db/db+EMP:** db/db tratados con empagliflozina; **db/db+EMP+RAM:** db/db tratados con empagliflozina y ramipril; **db/db+EMP+RAM+ATR:** db/db tratados con empagliflozina, ramipril y atrasentán; **db/db+ATR:** db/db tratados con atrasentán; **db/db+RAM+ATR:** db/db tratados con ramipril y atrasentán; **db/db+RAM:** db/db tratados con ramipril.

Al igual que en análisis de la ECA, se comprobó si esta pequeña variación en la expresión génica tenía traducción a nivel de la actividad enzimática y niveles de proteína de ECA2. En primer lugar, se realizó la actividad de ECA2 en extracto cortical renal total sin observar diferencias entre el grupo db/m y db/db no tratado. Tampoco se observó ninguna diferencia entre las diferentes ramas experimentales y

el grupo db/db tratado con vehículo (**Figura 5-16**). Dado que en el extracto cortical no se observaba ninguna diferencia en la actividad, y teniendo en cuenta que la ECA2 es un enzima localizado preferentemente en la membrana celular (136), se decidió realizar un extracto purificado de membrana celular a partir de las secciones de córtex renal. Como era de esperar, la actividad cruda de ECA2 era mayor en el extracto purificado de membrana celular que en el extracto renal total (**Figura 5-16**). Sin embargo, la medición de la actividad de ECA2 en estos últimos extractos tampoco mostró diferencias entre el grupo db/m y db/db no tratado. En cualquier caso, sí se observó una tendencia al aumento de la actividad de ECA2 en el grupo diabético con un incremento de 7.956,0 RFU/mg/h (IC 95%: -4.148 - 20.060,0). Al comparar las diferentes ramas de tratamiento contra el grupo db/db no tratado tampoco se identificaron diferencias, aunque sí se observó que el incremento de la actividad de ECA2 se mantenía sobre todo en los grupos tratados con empagliflozina (**Figura 5-16**).

En cuanto a la valoración mediante inmunohistoquímica, ECA2 también se expresaba de forma predominante en el epitelio apical de los túbulos corticales y la expresión a nivel glomerular era baja o negativa (**Figura 5-17 y Figura 5-18**). Al analizar los cortes histológicos de las diferentes ramas experimentales, no se observaron diferencias entre el grupo db/m y el db/db no tratado. Asimismo, al comparar la valoración semicuantitativa de cada rama de tratamiento contra el db/db tratado con vehículo, sólo el tratamiento con empagliflozina y ramipril parecía reducir la expresión tubular de ECA2 (**Figura 5-17**). De hecho, en los grupos tratados con empagliflozina y ramipril con o sin atrasentán, así como en el grupo tratado con atrasentán en monoterapia, existía una expresión aparentemente menor de ECA2. Sin embargo, estas diferencias no se correlacionaban de forma estrecha con los resultados previos de expresión génica o actividad enzimática (**Figura 5-16 y Figura 5-17**). En conjunto, estos resultados demuestran que la expresión de ECA2 aumenta ligeramente en el ratón diabético db/db en comparación con el control db/m.

5. RESULTADOS

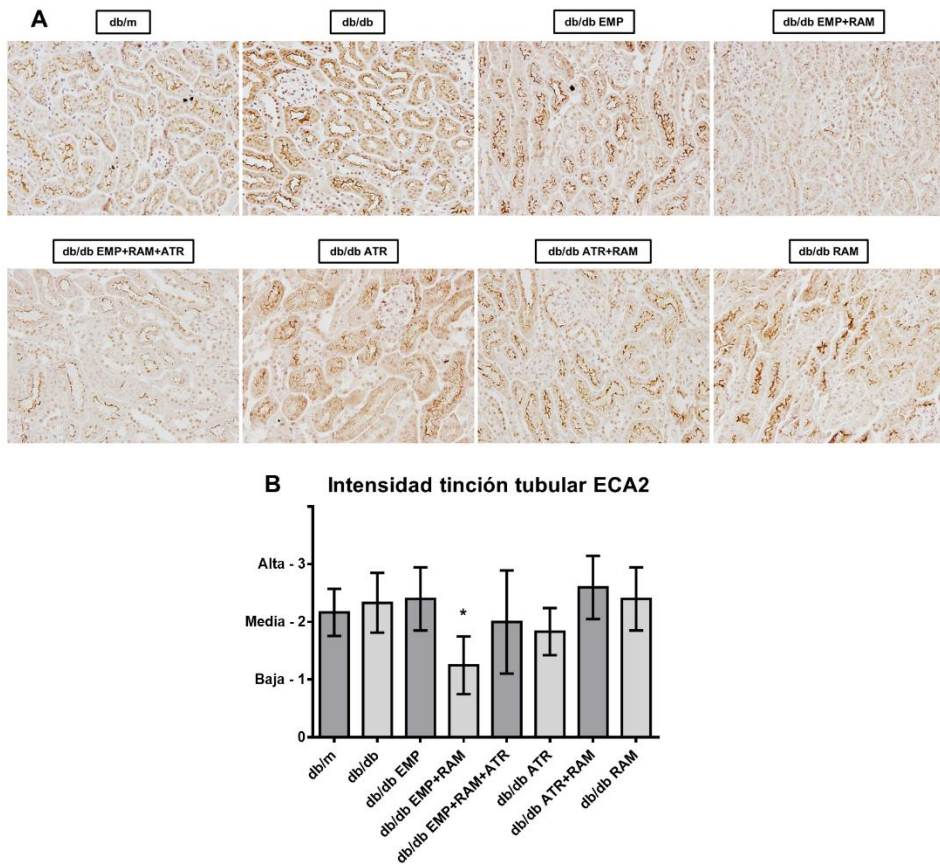
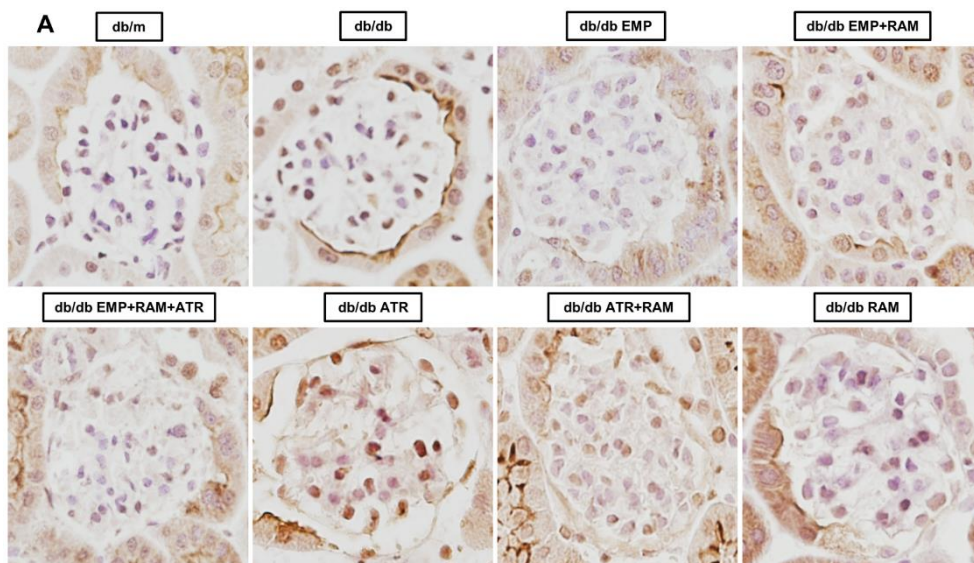


Figura 5-17 - Evaluación de la expresión tubular de ECA2 mediante tinción inmunohistoquímica en los grupos db/m, db/db y los grupos tratados con empagliflozina, ramipril, atrasentán o sus combinaciones. Se presentan las secciones histológicas teñidas para ECA2 mediante inmunohistoquímica y la evaluación del grado de tinción tubular mediante una escala semicuantitativa. Los gráficos de barras representan la media de la intensidad de la tinción \pm DE. **A:** microfotografías representativas de la tinción tubular de ECA2 para cada rama de tratamiento (imágenes realizadas a 20 aumentos); **B:** valoración semicuantitativa de la tinción tubular de ECA.

*Diferencias estadísticamente significativas en el test de Mann-Whitney entre los tratamientos y el grupo db/db ($p < 0,05$). **db/m:** controles no diabéticos; **db/db:** db/db tratados con vehículo; **db/db EMP:** db/db tratados con empagliflozina; **db/db EMP+RAM:** db/db tratados con empagliflozina y ramipril; **db/db EMP+RAM+ATR:** db/db tratados con empagliflozina, ramipril y atrasentán; **db/db ATR:** db/db tratados con atrasentán; **db/db RAM+ATR:** db/db tratados con ramipril y atrasentán; **db/db RAM:** db/db tratados con ramipril.



B Intensidad tinción glomerular ECA2

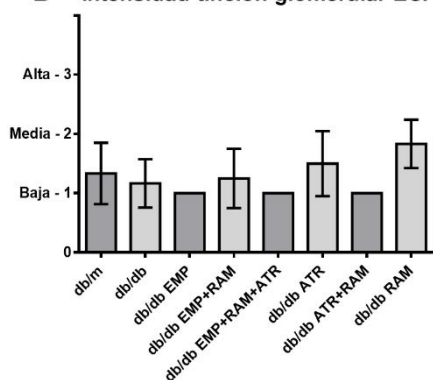


Figura 5-18 - Evaluación de la expresión glomerular de ECA2 mediante inmunohistoquímica en los grupos db/m, db/db y los grupos tratados con empagliflozina, ramipril, atrasentán o sus combinaciones. Se presentan las secciones histológicas teñidas para ECA2 mediante inmunohistoquímica y la evaluación del grado de tinción glomerular mediante una escala semicuantitativa. Los gráficos de barras representan la media de la intensidad de la tinción \pm DE. **A:** microfotografías representativas de la tinción glomerular de ECA2 para cada rama de tratamiento (imágenes realizadas a 20 aumentos); **B:** valoración semicuantitativa de la tinción glomerular de ECA.

db/m: controles no diabéticos; **db/db:** db/db tratados con vehículo; **db/db EMP:** db/db tratados con empagliflozina; **db/db EMP+RAM:** db/db tratados con empagliflozina y ramipril; **db/db EMP+RAM+ATR:** db/db tratados con empagliflozina, ramipril y atrasentán; **db/db ATR:** db/db tratados con atrasentán; **db/db RAM+ATR:** db/db tratados con ramipril y atrasentán; **db/db RAM:** db/db tratados con ramipril.

Dado que ECA y ECA2 son dos enzimas con acciones antagónicas sobre el SRA, el cálculo del cociente ECA2/ECA de la expresión génica y la actividad es un método indirecto para valorar la enzima predominante en el eje. Así, con el objetivo de

5. RESULTADOS

establecer la situación del SRA en cada rama experimental se calculó el cociente ECA2/ECA utilizando la expresión ARNm y la actividad ajustada medida en los extractos renales totales de cada animal. El cociente de expresión génica ECA2/ECA, estaba significativamente incrementado en el grupo db/db tratado con vehículo respecto al grupo db/m no tratado, siendo el cociente 5,58 (RIC: 3,84 - 9,50) veces mayor en el grupo db/db (**Figura 5-19**). Esta relación se mantenía incrementada con valores similares al grupo diabético en el resto de grupos tratados con empagliflozina, ramipril, atrasentán o sus combinaciones.

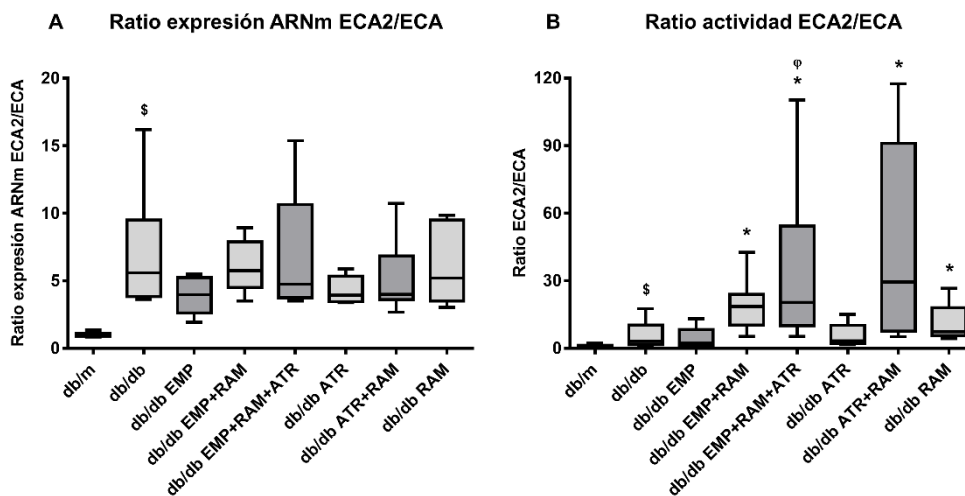


Figura 5-19 - Ratio ECA2/ECA de la expresión génica y de la actividad ajustada en los grupos db/m, db/db y los grupos tratados con empagliflozina, ramipril, atrasentán o sus combinaciones. Los controles no diabéticos (db/m) presentan una ratio mediana de 1. Ratios superiores a 1 indican un predominio de ECA2 sobre ECA y viceversa. Los valores de la actividad estaban también ajustados al grupo db/m que actúa como control. **A:** diagrama de cajas que representa la ratio ECA2/ECA de la expresión génica. **B:** diagrama de cajas que representa la ratio ECA2/ECA de la actividad enzimática.

§Diferencias estadísticamente significativas mediante el test de Mann-Whitney entre los grupos db/m y db/db ($p < 0,05$). *Diferencias estadísticamente significativas en el test de Mann-Whitney entre los tratamientos y el grupo db/db ($p < 0,05$). φDiferencias estadísticamente significativas en el test de Mann-Whitney entre las combinaciones con ramipril y ramipril en monoterapia ($p < 0,05$). **db/m:** controles no diabéticos; **db/db:** db/db tratados con vehículo; **db/db EMP:** db/db tratados con empagliflozina; **db/db EMP+RAM:** db/db tratados con empagliflozina y ramipril; **db/db EMP+RAM+ATR:** db/db tratados con empagliflozina, ramipril y atrasentán; **db/db ATR:** db/db tratados con atrasentán; **db/db RAM+ATR:** db/db tratados con ramipril y atrasentán; **db/db RAM:** db/db tratados con ramipril.

En cuanto al cociente de la actividad enzimática del ECA2/ECA, este estaba incrementado en el modelo diabético db/db en comparación al ratón control no diabético db/m. En los ratones diabéticos no tratados la actividad de ECA2 era 3,1

veces mayor (RIC: 1,5 - 10,2) que la de ECA (**Figura 5-19**). Al comparar las diferentes ramas de tratamiento frente al grupo db/db tratado con vehículo, los ratones que recibieron ramipril combinado o en monoterapia presentaron un mayor incremento del cociente ECA2/ECA (**Figura 5-19**). Asimismo, llamaba la atención que el incremento de la actividad de ECA2 frente a ECA era mayor en los grupos tratados con combinaciones de ramipril que en monoterapia. Por este motivo, se realizó una tercera comparación de los cocientes de las combinaciones de ramipril frente a ramipril en monoterapia. A pesar de que todas las combinaciones de ramipril incrementaban la ratio ECA2/ECA comparadas con ramipril en monoterapia, sólo la triple terapia con empagliflozina, ramipril y atrasentán demostró elevar esta proporción de forma estadísticamente significativa (**Figura 5-19**), sugiriendo que la triple terapia es capaz de incrementar aún más la actividad de ECA2 que ramipril en monoterapia.

5.3.c. Efectos sobre la actividad sérica de ECA y ECA2

Para analizar si existía correlación entre la actividad sérica y renal de ECA y ECA2, así como para comprobar si los hallazgos observados a nivel renal podrían ser en parte explicados por la actividad sérica de estas enzimas, se analizó también la actividad enzimática sérica de ECA y ECA2. Se comprobó que en el suero de los ratones diabéticos db/db, al igual que ocurría en el tejido renal, también disminuía significativamente la actividad de ECA 41,0 RFU/ μ L/h (IC 95%: 28,9 - 57,0) frente al grupo control db/m. Así, el grupo diabético db/db tratado con vehículo presentó una actividad ajustada del 56,3% (RIC: 48,6 - 73,0), lo que supone una reducción de 2 veces la actividad en el modelo diabético frente al ratón no diabético (**Figura 5-20**). Al comparar los grupos de tratamiento con el grupo db/db tratado con vehículo se identificó una disminución significativa de la actividad de ECA en los grupos tratados con ramipril, siendo la actividad ajustada de 23,1% (RIC: 12,6 - 29,8) en el grupo tratado con empagliflozina y ramipril, 20,0% (RIC: 17,1 - 23,6) en el grupo tratado con empagliflozina, ramipril y atrasentán, 15,6% (RIC: 11,6 - 19,4) en el grupo tratado con atrasentán y ramipril, y 26,3% (RIC: 12,8 - 40,8) en el grupo tratado con ramipril en monoterapia (**Figura 5-20**).

5. RESULTADOS

La actividad sérica de ECA2 fue menor que la actividad sérica de ECA y las mediciones crudas realizadas no superaban 1 RFU/ μ L/h. Además, la actividad en suero de ECA2 era claramente inferior que la renal. Los resultados demostraron que esta estaba aumentada en los ratones db/db no tratados frente a los db/m. El modelo diabético tratado con vehículo presentaba una actividad de ECA2 ajustada contra el grupo db/m de 141,0% (RIC: 95,2 - 180,7), lo que se traduce en un incremento de la actividad de casi 1,5 veces respecto a dicho grupo (**Figura 5-20**). Al comparar las diferentes ramas de tratamiento contra el grupo db/db no tratado, se observó un aparente incremento de la actividad en los tres grupos tratados con empagliflozina y en el grupo tratado con atrasentán y ramipril. Sin embargo, este incremento sólo fue significativo los grupos tratados con: 1.-empagliflozina, y 2.-empagliflozina y ramipril. Ambos grupos presentaban una actividad de ECA2 ajustada al grupo db/m de 206,3% (RIC: 193,9 - 357,2) y 195,5% (RIC: 173,4 - 274,4) respectivamente. Ello supone un aumento de la actividad de 2 veces respecto al grupo db/m y un incremento claramente mayor que el grupo db/db (**Figura 5-20**).

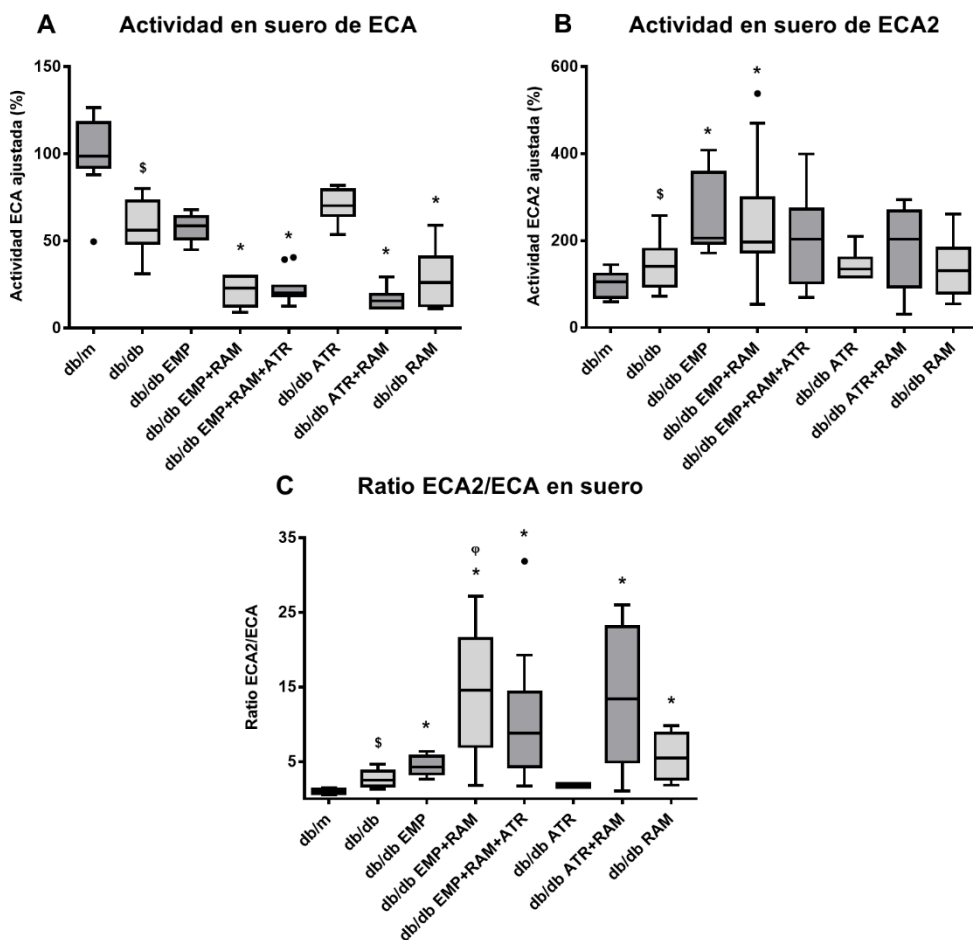


Figura 5-20 - Actividad de ECA y ECA2 en suero en los grupos db/m, db/db y los grupos tratados con empagliflozina, ramipril, atrasentán o sus combinaciones. Se muestra la actividad de ECA y ECA2 ajustadas al grupo db/m y expresadas en porcentaje. El grupo no diabético (db/m) actúa como control presentando indicando la actividad de referencia en torno al 100%. Además, se presenta la ratio ECA2/ECA de las actividades ajustadas, donde el grupo db/m es de nuevo referencia con una ratio de 1. **A:** diagrama de cajas que representa la actividad sérica de ECA ajustada, **B:** diagrama de cajas que representa la actividad sérica de ECA2 ajustada, **C:** diagrama de cajas que representa la proporción ECA2/ECA.

§Diferencias estadísticamente significativas mediante el test de Mann-Whitney entre los grupos db/m y db/db ($p < 0,05$). *Diferencias estadísticamente significativas en el test de Mann-Whitney entre los tratamientos y el grupo db/db ($p < 0,05$). †Diferencias estadísticamente significativas en el test de Mann-Whitney entre las combinaciones con ramipril y ramipril en monoterapia ($p < 0,05$). **db/m:** controles no diabéticos; **db/db:** db/db tratados con vehículo; **db/db+EMP:** db/db tratados con empagliflozina; **db/db+EMP+RAM:** db/db tratados con empagliflozina y ramipril; **db/db+EMP+RAM+ATR:** db/db tratados con empagliflozina, ramipril y atrasentán; **db/db+ATR:** db/db tratados con atrasentán; **db/db+RAM+ATR:** db/db tratados con ramipril y atrasentán; **db/db+RAM:** db/db tratados con ramipril.

5. RESULTADOS

De la misma forma que hicimos con la actividad renal, se calculó el cociente ECA2/ECA empleando las actividades ajustadas de cada enzima en suero. Dado que la actividad de ECA estaba disminuida en el modelo diabético, el cociente ECA2/ECA estaba incrementada en grupo db/db no tratado frente al grupo db/m. De este modo, los ratones diabéticos tratados con vehículo presentaban una actividad de ECA2 2,7 veces mayor (RIC: 1,7 - 3,7) que la de ECA (**Figura 5-20**). Al comparar las ramas de tratamiento contra el grupo db/db no tratado se objetivo un incremento aún mayor del cociente ECA2/ECA en los grupos de: 1.-empagliflozina, 2.-empagliflozina y ramipril, 3.-empagliflozina, ramipril y atrasentán, 4.-atrasentán y ramipril, y 5.-ramipril. Este incremento era especialmente llamativo de nuevo en los grupos tratados con ramipril (**Figura 5-20**). Sin embargo, y al igual que ocurría en el riñón, se observó un mayor incremento de la proporción de ECA2/ECA en las combinaciones de ramipril con empagliflozina y atrasentán frente a ramipril en monoterapia. Por este motivo, se realizó una segunda comparación múltiple entre dichas combinaciones y el tratamiento con ramipril sólo. El tratamiento con empagliflozina y ramipril incrementó significativamente el cociente ECA2/ECA al comparar el grupo contra ramipril en monoterapia.

5.4. MODULACIÓN DEL SISTEMA DE LA ENDOTELINA

Al incluir en los grupos el tratamiento con atrasentán, que es un antagonista selectivo de los receptores de endotelina tipo A, se analizó la modulación que sufría dicho sistema en las diferentes ramas experimentales. Para ello, se midió la expresión génica de endotelina-1, así como de sus dos receptores principales: el tipo A (ET-A) y el tipo B (ET-B).

La expresión del ARNm de endotelina-1 incrementó significativamente en el ratón diabético db/db+vehículo en comparación al ratón control no diabético (db/m). Los ratones diabéticos presentaban una expresión génica 1,8 veces mayor (RIC: 1,1 - 2,2) que los controles no diabéticos (**Figura 5-21**). Al comparar las diferentes ramas de tratamiento frente al grupo db/db tratado con vehículo, se observó un incremento significativo en las combinaciones con: 1.-empagliflozina, ramipril y atrasentán, y 2.-atrasentán y ramipril. En estos grupos la expresión génica de endotelina-1 respecto

al grupo db/m incremento 3,0 veces (RIC: 2,5 - 4,7) y 3,0 veces (RIC: 1,9 - 4,7) respectivamente (**Figura 5-21**).

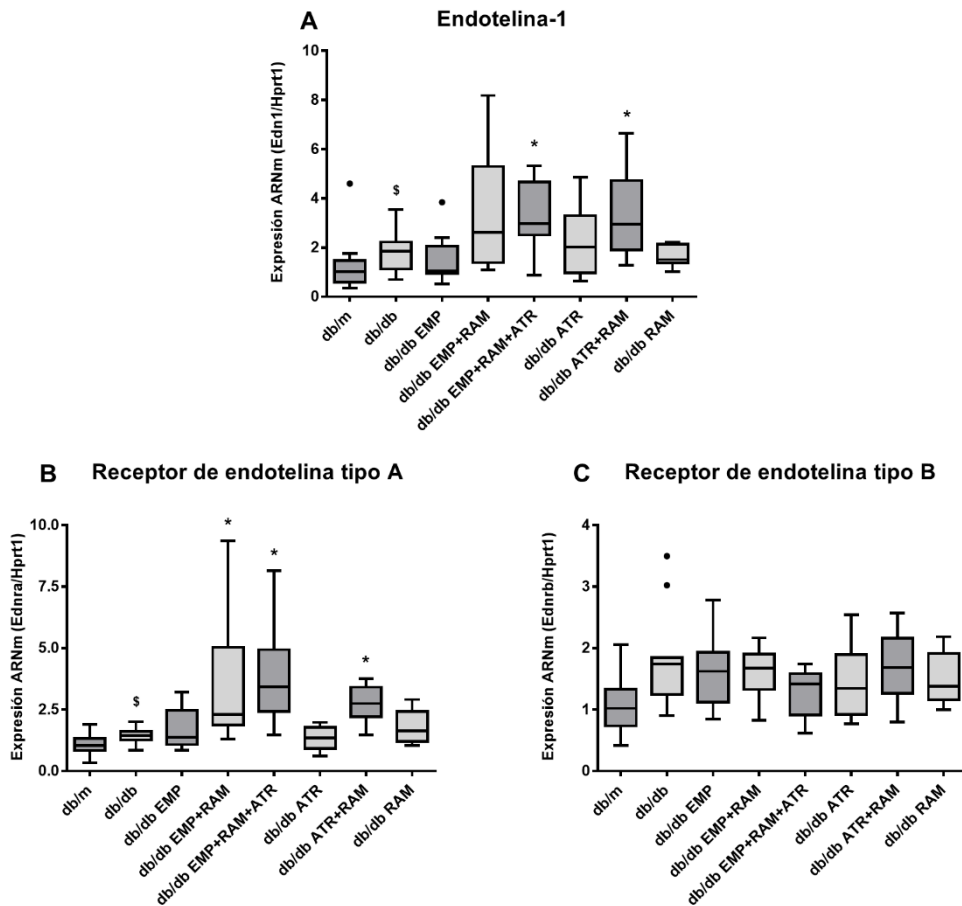


Figura 5-21 - Expresión génica de la endotelina-1 (ET-1), receptor de endotelina tipo A (ET-A) y receptor de endotelina tipo B (ET-B) en los grupos db/m, db/db y los grupos tratados con empagliflozina, ramipril, atrasentán o sus combinaciones. Se muestran las expresiones relativas de ARNm respecto a los controles no diabéticos (db/m). **A:** diagrama de cajas que muestra la expresión de ET-1; **B:** diagrama de cajas que muestra la expresión de ET-A; **C:** diagrama de cajas que muestra la expresión de ET-B.

§Diferencias estadísticamente significativas mediante el test de Mann-Whitney entre los grupos db/m y db/db ($p < 0,05$). *Diferencias estadísticamente significativas en el test de Mann-Whitney entre los tratamientos y el grupo db/db ($p < 0,05$). **db/m:** controles no diabéticos; **db/db:** db/db tratados con vehículo; **db/db+EMP:** db/db tratados con empagliflozina; **db/db+EMP+RAM:** db/db tratados con empagliflozina y ramipril; **db/db+EMP+RAM+ATR:** db/db tratados con empagliflozina, ramipril y atrasentán; **db/db+ATR:** db/db tratados con atrasentán; **db/db+RAM+ATR:** db/db tratados con ramipril y atrasentán; **db/db+RAM:** db/db tratados con ramipril.

5. RESULTADOS

La expresión génica del receptor ET_A, que es responsable de los efectos vasoconstrictores de la endotelina-1, estaba significativamente aumentada en el grupo diabético db/db tratado con vehículo en comparación con el ratón no diabético. La expresión del mismo era 1,4 veces mayor (RIC: 1,3 - 1,6) al compararla con el grupo db/m (**Figura 5-21**). En este caso las combinaciones que incluían el tratamiento con ramipril y atrasentán, así como la rama que recibió empagliflozina y ramipril, incrementaron de forma aún más manifiesta la expresión de ET_A frente al grupo diabético tratado con vehículo. La expresión génica de este receptor respecto al grupo db/m fue 2,3 veces mayor (RIC: 1,9 - 5,0) en el grupo tratado con empagliflozina y ramipril, 3,4 veces mayor (RIC: 2,4 - 4,9) en el grupo tratado con empagliflozina, ramipril y atrasentán, y 2,7 veces mayor (RIC: 2,2 - 3,4) en el grupo tratado con atrasentán y ramipril (**Figura 5-21**).

Los receptores ET_B, por el contrario, tiene una actividad opuesta a la de los receptores ET_A, participando en la vasodilatación y la relajación vascular. El análisis de la expresión génica de los ET_B no reveló modificaciones estadísticamente relevantes entre ninguno de los grupos experimentales (**Figura 5-21**).

5.5. EFECTOS EN LOS TRANSPORTADORES DE MEMBRANA

Como parte del estudio, y dado que la empagliflozina es un inhibidor directo del SGLT2, se estudió la expresión del cotransportador de sodio glucosa. Además, la inhibición de SGLT2 también se ha relacionado con la modulación de otros transportadores tubulares (137). Entre ellos, el intercambiador de sodio-hidrógeno tipo 3 (NHE3) (137,138). Este transportador es de especial interés para nuestro estudio, ya que como se comentaba previamente es estimulado por Ang II y en un contexto diabético con hiperactivación del SRA participa en la reabsorción de sodio (107). Por este motivo, también decidimos valorar su expresión en el presente trabajo.

En primer lugar, se analizó la expresión de ARNm tanto del SGLT2 como del NHE3. La expresión génica de SGLT2 incrementaba en el modelo db/db no tratado frente al control db/db con un incremento en la expresión de 1,7 veces (RIC: 1,1-1,8) (**Figura 5-22**). Este incremento se mantenía de forma estable en el resto de ramas de tratamiento con empagliflozina, ramipril, atrasentán o sus combinaciones, y al

comparar las mismas frente al grupo db/db tratado con vehículo ninguna mostró modificar de forma significativa la expresión ARNm de SGLT2 (**Figura 5-22**).

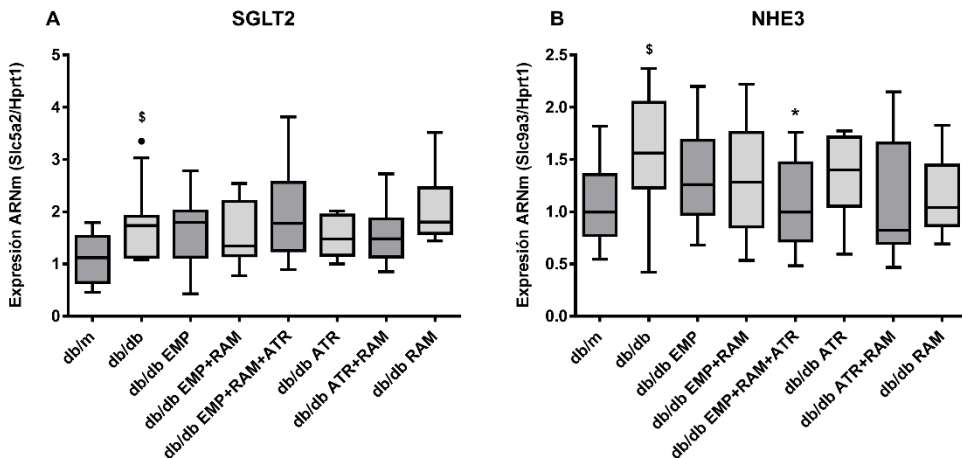


Figura 5-22 - Modulación de la expresión génica del cotransportador sodio-glucosa tipo 2 (SGLT2) y el intercambiador de sodio-hidrógeno tipo 3 (NHE3) en los grupos db/m, db/db y los grupos tratados con empagliflozina, ramipril, atrasentán o sus combinaciones. Se muestran las expresiones relativas de ARNm respecto a los controles no diabéticos. **A:** diagrama de cajas que representa la expresión ARNm de SGLT2; **B:** diagrama de cajas que representa la expresión ARNm de NHE3.

§Diferencias estadísticamente significativas mediante el test de Mann-Whitney o el test de Student entre los grupos db/m y db/db ($p < 0,05$). *Diferencias estadísticamente significativas en el test de Student de los tratamientos contra el grupo db/db ($p < 0,05$). **db/m:** controles no diabéticos; **db/db:** db/db tratados con vehículo; **db/db+EMP:** db/db tratados con empagliflozina; **db/db+EMP+RAM:** db/db tratados con empagliflozina y ramipril; **db/db+EMP+RAM+ATR:** db/db tratados con empagliflozina, ramipril y atrasentán; **db/db+ATR:** db/db tratados con atrasentán; **db/db+RAM+ATR:** db/db tratados con ramipril y atrasentán; **db/db+RAM:** db/db tratados con ramipril.

La expresión génica de NHE3 también estaba incrementada en el ratón diabético db/db tratado con vehículo en comparación con el control no diabéticos db/m, siendo la expresión génica 1,6 (RIC: 1,2 - 2,0) veces mayor en los ratones diabéticos (**Figura 5-22**). Al comparar los grupos de tratamiento frente al grupo db/db tratado con vehículo, la triple terapia con empagliflozina ramipril y atrasentán disminuyó significativamente la expresión génica de NHE3 (**Figura 5-22**). En este último grupo la expresión génica de NHE3 apenas incrementó con un RQ ajustado al grupo control db/m prácticamente sin variación y un valor 1,0 (RIC: 0,7 - 1,5). Además, en los grupos tratados con: 1.-atrasentán y ramipril, y 2.-ramipril en monoterapia, la expresión tampoco incrementó de manera evidente con un RQ de 0,8 (RIC: 0,7 - 1,7) y 1,0 (RIC: 0,9 - 1,4) respectivamente.

5. RESULTADOS

Por otro lado, también se evaluó la expresión proteica de SGLT2 mediante tinciones inmunohistoquímicas específicas para dicho transportador. Como era de esperar, la tinción se localizaba en el borde apical del epitelio tubular cortical. No obstante, la tinción de SGLT2, a diferencia de las tinciones de ECA y ECA2 que exhibían una tinción tubular cortical global, mostraba un patrón de tinción parcheado (**Figura 5-23**). Este hallazgo se relaciona con la ubicación específica del transportador en el segmento 1 del túbulo contorneado proximal (72), mientras que la distribución de ECA y ECA2 es más extensa e involucra a otros segmentos tubulares (**Figura 5-23**) (139).

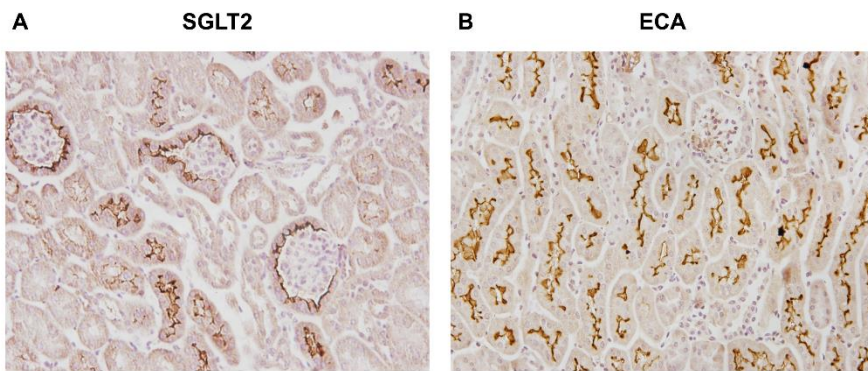


Figura 5-23 - Distribución de la tinción tubular de SGLT2 y ECA en control no diabético db/m. Se muestran 2 microfotografías representativas de las tinciones inmunohistoquímicas de SGLT2 y ECA que muestran la distribución parcheada de la primera frente a la segunda (imágenes realizadas a 20 aumentos). **A:** distribución tubular de SGLT2; **B:** distribución tubular de ECA.

En cuanto a la evaluación de la expresión de SGLT2 mediante la valoración semicuantitativa de las tinciones, no se observaron diferencias de expresión entre el grupo no diabético y el diabético no tratado (**Figura 5-24**).

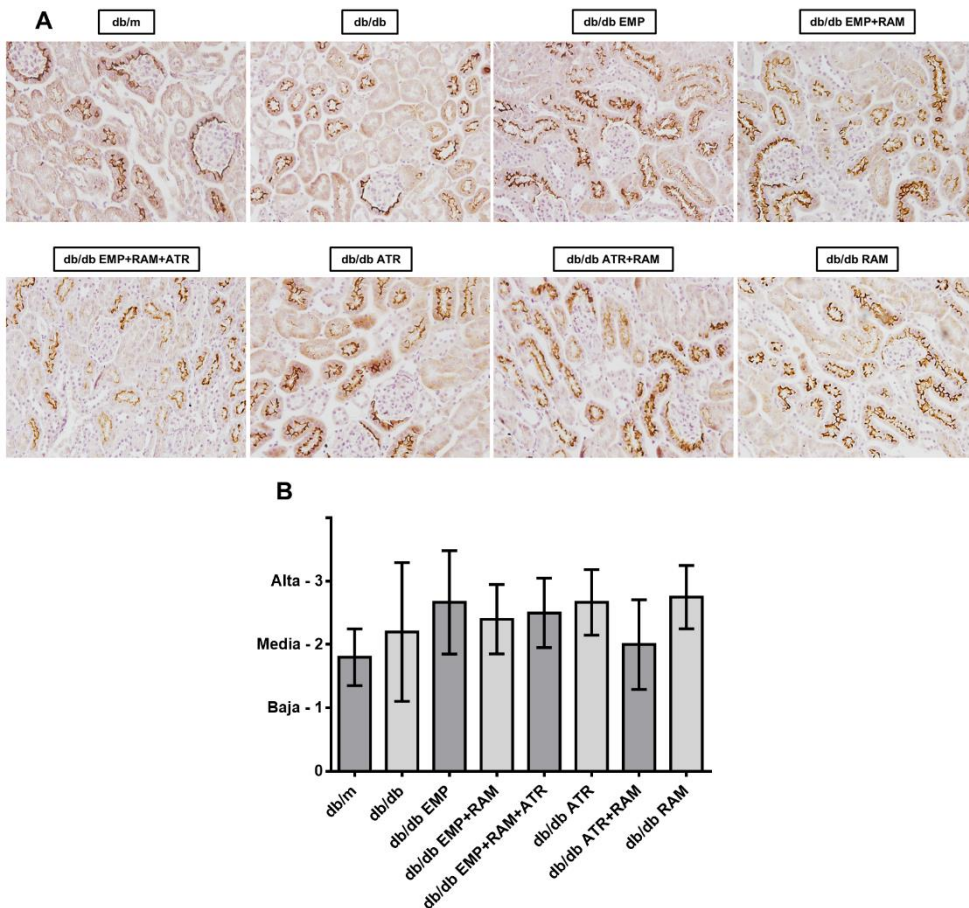


Figura 5-24 - Evaluación de la expresión proteica de SGLT2 mediante inmunohistoquímica en los grupos db/m, db/db y los grupos tratados con empagliflozina, ramipril, atrasentán o sus combinaciones. Se presentan las secciones histológicas teñidas para SGLT2 mediante inmunohistoquímica y la evaluación de la intensidad de la tinción a nivel tubular mediante una escala semicuantitativa. Los gráficos de barras representan la media \pm DE. **A:** microfotografías representativas de la tinción tubular de SGLT2 para cada rama de tratamiento (imágenes realizadas a 20 aumentos); **B:** valoración semicuantitativa de la tinción tubular de SGLT2.

db/m: controles no diabéticos; **db/db:** db/db tratados con vehículo; **db/db+EMP:** db/db tratados con empagliflozina; **db/db+EMP+RAM:** db/db tratados con empagliflozina y ramipril; **db/db+EMP+RAM+ATR:** db/db tratados con empagliflozina, ramipril y atrasentán; **db/db+ATR:** db/db tratados con atrasentán; **db/db+RAM+ATR:** db/db tratados con ramipril y atrasentán; **db/db+RAM:** db/db tratados con ramipril.

5. RESULTADOS

5.6. RESULTADOS DEL ANÁLISIS PROTEÓMICO

Con el objetivo de identificar posibles vías moduladas por el tratamiento con empagliflozina y que pudiesen ser objeto de futuros estudios o dianas terapéuticas realizamos un estudio de proteómica diferencial en el tejido cortical renal (**Ver sección Material y Métodos - Estudio de proteómica**). En los procedimientos experimentales previos, no se observaron claras diferencias en los parámetros fisiológicos entre la doble terapia con empagliflozina y ramipril, y la triple terapia con empagliflozina, ramipril y atrasentán. Por este motivo, y para no añadir complejidad innecesaria a la interpretación de los datos, se decidió no incluir la terapia de empagliflozina combinada con ramipril y atrasentán. Así, en el estudio de proteómica se incluyeron los siguientes grupos experimentales: 1.-el grupo control no diabético (db/m), 2.-el grupo control diabético (db/db), 3.-el grupo tratado con empagliflozina, 4.-el grupo tratado con ramipril, y 5.-el grupo tratado con empagliflozina y ramipril. Asimismo, sólo se incluyeron 6 ratones de cada uno de estos cinco grupos experimentales en esta parte del estudio.

El análisis proteómico identificó 4.725 proteínas válidas (**Ver sección Material y Métodos - Análisis de los datos de la espectrometría de masas**) que fueron reconocidas por la cuantificación de al menos 2 péptidos únicos para cada una de las proteínas. Tras controlar la variabilidad existente entre las 3 tandas de lectura (batch effects) y normalizar las lecturas, la intensidad de la señal en cada grupo se ajustó a la señal de aquel grupo que servía como control y frente al que se realizaba la comparación. Estos resultados transformados a una escala logarítmica de base 2 nos permitieron obtener los valores de LogFC previamente descritos (**Ver sección Material y Métodos - Análisis de los datos de la espectrometría de masas**). Las proteínas con un cambio en la expresión de 2 veces o más entre al menos dos de los grupos incluidos (LogFC mayor de 1 o menor de -1) y que presentaban una tasa de falsos descubrimientos (FDR por sus siglas en inglés: *False Discovery Rate*) menor de 0,05, fueron consideradas proteínas expresadas de manera significativamente diferencial y denominadas *hit proteins*. Por otro lado, aquellas proteínas que no cumplían criterios para ser consideradas *hit proteins*, pero que mostraban un cambio de expresión de 1,5 veces o más en alguna de las comparaciones entre grupos

(LogFC mayor o igual a 0,585 o menor o igual a -0,585) y un FDR menor de 0,10 fueron denominadas *candidate proteins*. En estas últimas proteínas, la variación en la expresión entre grupos era menor que en las *hit proteins*, pero su análisis puede también aportar información relevante. De las 4.725 proteínas validadas, sólo 207 cumplieron criterios para ser consideradas *hit proteins*, mientras que 582 fueron clasificadas como *candidate proteins*. Esto supone que, de 4.725 proteínas correctamente identificadas, un 16,7% (suma de *hit* y *candidate proteins*) variaba de forma aparentemente relevante y podía aportar información útil sobre las modificaciones que sufre el proteoma en cada rama experimental.

5.6.a. Diferencias en el proteoma entre el modelo db/m y db/db

Entre las 207 *hit proteins* identificadas, 131 proteínas eran diferenciales entre el grupo db/m y el grupo db/db tratado con vehículo (**Ver sección Anexo - Proteínas diferenciales entre los ratones db/m y db/db tratados con vehículo**). Las 76 *hit proteins* restantes se identificaban al comparar los ratones db/db tratados con empagliflozina, ramipril o su combinación frente al grupo control no diabético db/m, o al comparar estos tratamientos entre sí. Las 131 proteínas diferencialmente expresadas en el grupo db/db respecto a db/m suponen el 63,3% de las *hit proteins* y un 2,8% del total de proteínas validadas. Estos resultados demuestran que las principales variaciones en el estudio de proteómica se observaron entre el modelo no diabético db/m y el db/db, manteniéndose en el resto de grupos diabéticos tratados la tendencia observada en control db/db (**Figura 5-25**). Es decir, en la mayoría de las proteínas, cuando incrementaba o disminuía la expresión en el grupo db/db tratado con vehículo respecto al control no diabético, también tenía lugar un incremento o descenso similar en los tratamientos con empagliflozina, ramipril o sus combinaciones comparados con el db/m. Estos hallazgos indican que un importante número de *hit proteins* se modulaban por el fenotipo diabético (**Figura 5-25**).

5. RESULTADOS

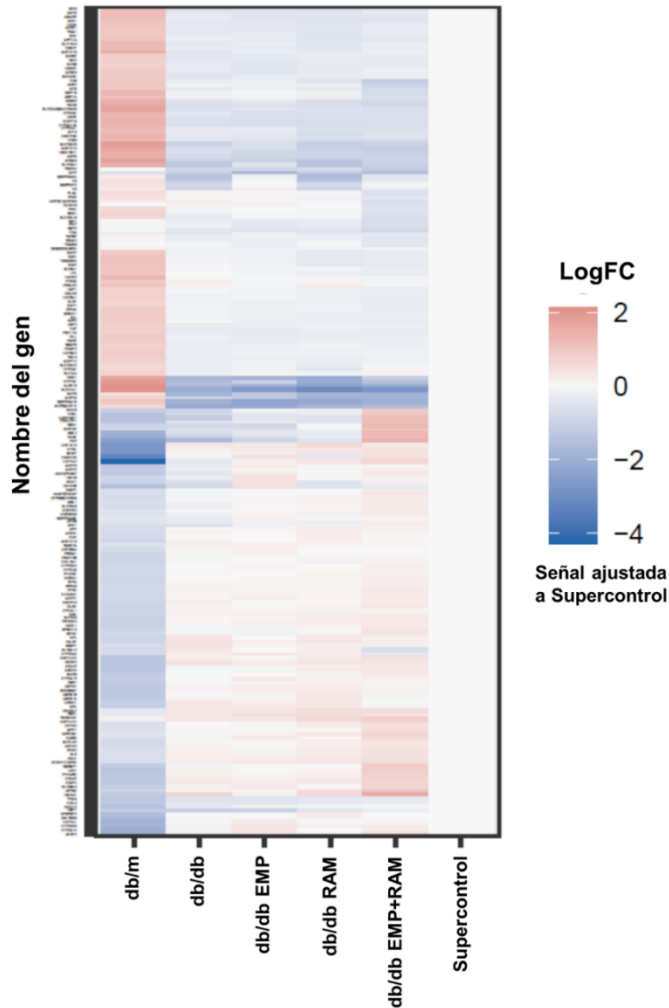


Figura 5-25 - Mapa gráfico de las 207 *hit proteins*. Cada línea del mapa muestra la señal ajustada al grupo Supercontrol de cada una de las 207 proteínas expresadas de forma significativamente diferencial. En cada línea, las casillas de color rojo de cada rama indican que la expresión incrementa respecto al Supercontrol y las azules que disminuye. Como se puede observar la mayoría de proteínas que incrementan en el grupo db/m disminuyen en el db/db y a la inversa (los colores habitualmente se invierten en las primeras dos columnas). Del mismo modo, los grupos de tratamiento mantienen una tendencia similar al db/db y por tanto mantienen el mismo color que el db/db no tratado en sus casillas.

db/m: controles no diabéticos; **db/db:** db/db tratados con vehículo; **db/db+EMP:** db/db tratados con empagliflozina; **db/db+RAM:** db/db tratados con ramipril; **db/db+EMP+RAM:** db/db tratados con empagliflozina y ramipril.

Entre las 131 proteínas que se expresaron de forma significativamente diferencial entre los modelos diabético tratado con vehículo y no diabético, 53 incrementaban en

el modelo db/db no tratado y 78 disminuían (**Ver sección Anexo - Proteínas diferenciales entre los ratones db/m y db/db tratados con vehículo**).

Estas diferencias en el proteoma entre los animales diabéticos y no diabéticos se analizaron mediante estudios de enriquecimiento funcional empleando la herramienta g:Profiler (Elixir). Esta herramienta enlaza los nombres de genes y proteínas a la información contenida sobre las mismas en diferentes bases de datos como el GO (*Gene Ontology*), el KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) o el REAC (*Reactome Pathway Database*). Entre otra información, en estas bases de datos se registran las funciones biológicas conocidas para cada una de las proteínas. Así, mediante la herramienta g:Profiler se buscaron específicamente términos relacionados con las funciones biológicas que estuviesen frecuentemente representados en el listado de proteínas introducidas. Además, se consultó de forma manual la base de datos de proteínas UniProt (Elixir) para identificar las palabras clave de procesos biológicos relacionadas con cada una de las proteínas (**Tabla 5-14**).

5. RESULTADOS

Tabla 5-14 - Vías biológicas relacionadas con las proteínas diferencialmente expresadas entre los ratones db/db tratados con vehículo y los controles db/m.

Se muestran las vías biológicas relacionadas tanto con las proteínas que incrementan como con las que disminuyen en los ratones db/db. Se indica además que base de datos fue consultada en el análisis de enriquecimiento funcional, cuantas proteínas se identificaron relacionadas con dicha vía y que genes codifican dichas proteínas.

Proteínas que INCREMENTAN en los ratones db/db tratado con vehículo respecto a los controles db/m			
Función biológica	Base de datos consultada	Número de proteínas relacionadas	Genes que codifican las proteínas
Metabolismo de drogas y xenobióticos	KEGG	7	Cbr1; Gm10639; Gsto1; Maob; Ugt1a1; Ugt1a10; Ugt1a2
Metabolismo lipídico	REAC	6	Acaa2; Acot3; Acsf2; Cbr1; Cyp4a14; Hsl1
Metabolismo lipídico	UniProt	6	Acaa2; Acot3; Acsf2; Cyp2c44; Hsl1; Hmgcs2
Funciones de transporte y traslocación de moléculas	UniProt	5	Abcb1a; Abcb1b; Abcc4; Slc38a3; Slc7a8
Proteínas que DISMINUYEN en los ratones db/db tratado con vehículo respecto a los controles db/m			
Función biológica	Base de datos consultada	Número de proteínas relacionadas	Genes que codifican las proteínas
Vías relacionadas con el peroxisoma	KEGG	16	Acox1; Acox3; Agps; Amacr; Cat; Crot; Ddo; Eci3; Ehhadh; Far1; Gnpat; Nudt19; Pecr; Pex11g; Pipox; Pxmp2
Vía de señalización del PPAR	KEGG	3	Cd36; Lpl; Me1
Metabolismo lipídico	REAC	14	Aacs; Acot12; Akr1c14; Akr1c18; Alox15; Cyp2e1; Cyp4a12a; Cyp4b1; Cyp51a1; Cyp7b1; Far1; Hacd2; Hsd17b11; Hsd17b2
Vías relacionadas con el peroxisoma	REAC	11	Acox1; Acox3; Amacr; Cat; Crot; Ddo; Ehhadh; Gnpat; Nudt19; Pecr; Pipox
Metabolismo lipídico	UniProt	19	Aacs; Acot12; Acox1; Acox3; Acsm3; Agps; Alox15; Crot; Cyp2e1; Cyp51a1; Cyp7b1; Ehhadh; Far1; Hacd2; Hsd17b11; Hsd17b2; Idi1; Lpl; Pecr
Funciones de transporte y traslocación de moléculas	UniProt	9	Aqp4; Atp11a; Cd36; Slc1a4; Slc22a19; Slc22a7; Slc3a1; Slco1a1; Tmem30a
Inmunidad e inflamación	UniProt	4	C5; C9; Mep1b; P04224

PPAR: receptores activados por proliferadores de peroxisomas (*Peroxisome proliferator-activated receptors* por sus siglas en inglés)

Las proteínas expresadas de forma diferencial entre los ratones db/m y db/db estaban fundamentalmente implicadas en el metabolismo de lípidos, las funciones del peroxisoma y el transporte y translocación de moléculas a través de membranas celulares (**Tabla 5-14**)

5.6.b. Proteínas diferenciales entre el control db/m y los grupos db/db tratados con empagliflozina, ramipril y sus combinaciones

Como se comentó anteriormente, la mayoría de *hit proteins* se modulaban de la misma manera en el grupo db/db tratado con vehículo y en los grupos db/db tratados con empagliflozina, ramipril o sus combinaciones. No obstante, se identificaron también proteínas que no se modulaban de forma equivalente en todos los grupos db/db. Es decir, que proteínas que incrementaban, por ejemplo, en los ratones tratados con empagliflozina, pero no en los ratones diabéticos tratados con vehículo o tratados con ramipril. Se identificaron 72 *hit proteins* más al comparar los ratones tratados con empagliflozina, ramipril o su combinación frente al grupo db/m. Estas últimas 72 proteínas no eran diferenciales en el grupo db/db tratado con vehículo. Así, 131 *hit proteins* expresadas de forma diferencial entre los ratones db/m y db/db tratados con vehículo, más 72 *hit proteins* expresadas de forma diferencial entre los grupos db/db tratados y el grupo db/m, dejaban sólo 4 *hit proteins* restantes que fueron identificadas en las comparaciones entre tratamientos.

En los estudios de proteómica, para tratar de identificar proteínas diferenciales entre grupos se pueden emplear 2 herramientas: los gráficos de volcán y los diagramas de Venn. Los gráficos de distribución tipo volcán (*volcano plots*), permiten en un único gráfico representar los resultados de la comparación de un gran número de proteínas o genes. Este dibuja en el eje de abscisas (X) el LogFC que nos indica cuanto incrementa o disminuye la expresión de una proteína, siendo el eje central el 0 ó dicho de otro modo la ausencia de cambio. En el eje de ordenadas (Y), en cambio, se dibuja el p valor, que nos indicará la significación estadística de la diferencia observada. Así, las proteínas que se encuentren en los extremos superior izquierdo y derechos del gráfico serán aquellas que más diferencialmente se expresen por presentar un elevado LogFC asociado a un p valor muy significativo.

En nuestro caso los *volcano plots* de las comparaciones de los diferentes grupos db/db contra db/m mostraban un gran número de proteínas diferencialmente expresadas, que cumplían criterios de *hit proteins*, y que fueron resaltadas en color

5. RESULTADOS

rojo. Asimismo, las *candidate proteins* fueron resaltadas en azul (Figura 5-26). Como se puede apreciar, la distribución de las *hit* y *candidate proteins* es similar cuando comparamos los grupos db/db tratado con vehículo, db/db tratado con empagliflozina, db/db tratado con ramipril o db/db tratado con ramipril y empagliflozina frente a los ratones control no diabéticos. Esto demuestra otra vez que la modulación de la mayoría de proteínas diferenciales es debido al fenotipo diabético.

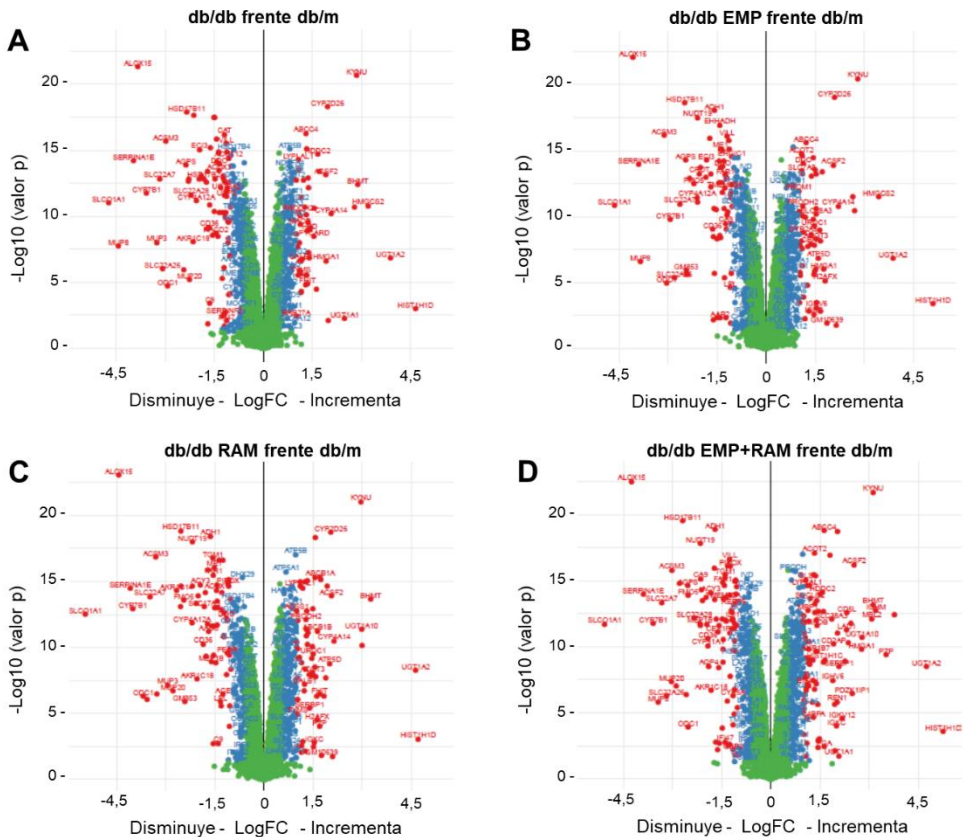


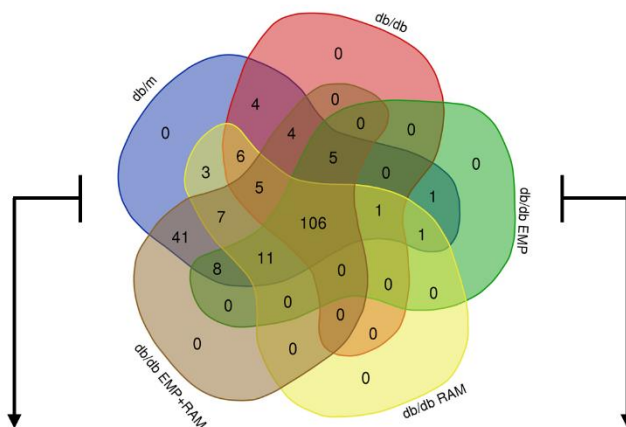
Figura 5-26 - Representación de la expresión diferencial de las proteínas mediante volcano plots de la comparación contra el control db/m de los grupos db/db tratado con vehículo, empagliflozina, ramipril o sus combinaciones. El eje de abscisas representa el LogFC. El eje de ordenada representa el valor p. En el encabezado de cada gráfico figura que grupos se han comparado. **A:** comparación de db/db no tratado frente a db/m; **B:** comparación de db/db tratado con empagliflozina frente a db/m; **C:** comparación de db/db tratado con ramipril frente a db/m; **D:** comparación de db/db tratado con empagliflozina y ramipril frente a db/m.

db/m: controles no diabéticos; **db/db:** db/db tratados con vehículo; **db/db+EMP:** db/db tratados con empagliflozina; **db/db+RAM:** db/db tratados con ramipril; **db/db+EMP+RAM:** db/db tratados con empagliflozina y ramipril.

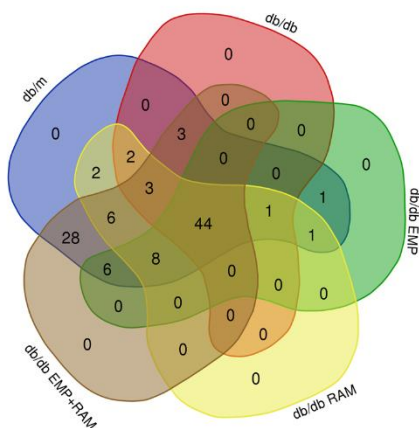
Sin embargo, las proteínas identificadas fueron tan numerosas que los gráficos tipo volcán perdían utilidad para identificar exactamente qué proteínas estaban incrementadas específicamente en cada grupo. Por este motivo, se decidió dibujar de nuevo la distribución de estas proteínas, pero este caso utilizando diagramas de Venn. Los diagramas de Venn permiten dibujar el listado de proteínas diferencialmente expresadas en este caso frente al grupo db/m, indicando cuales se expresan de forma común en varios grupos y cuáles no (**Figura 5-27**). Así, mediante estos diagramas se identificó, que de las 131 proteínas diferencialmente expresadas entre el modelo db/m y db/db no tratado, 106 proteínas eran comunes al grupo db/db tratado con vehículo y a las 3 ramas de tratamiento. Es decir, un total de 106 proteínas se modulaban en la misma dirección en el modelo db/db no tratado y en el tratado con empagliflozina, ramipril o su combinación, de forma que si incrementaba en el db/db también lo hacía en las 3 ramas de tratamiento. Esto supone que un 51,2% de las 207 *hit proteins* identificadas incrementaban o disminuían en el modelo db/db y que los tratamientos no producían ninguna modulación posterior sobre dicho incremento o descenso. Asimismo, de estas 106 proteínas, 44 incrementaban y 62 disminuían.

5. RESULTADOS

A Proteínas diferenciales frente al grupo db/m



B Proteínas que aumentan frente a db/m



C Proteínas que disminuyen frente a db/m

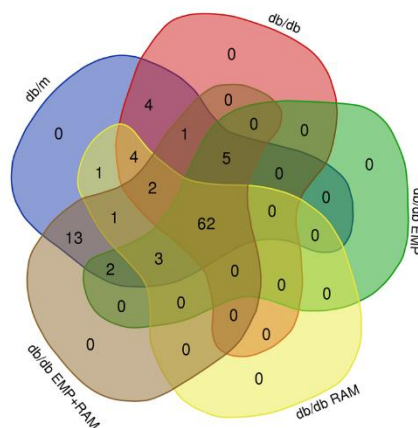


Figura 5-27 - Diagramas de Venn que muestran el número de proteínas expresadas de forma significativa diferencial entre los controles db/m y los grupos db/db tratado con vehículo, empagliflozina, ramipril o sus combinaciones. Se observa que 106 proteínas se modulan de forma equivalente en los 3 grupos. 44 de ellas aumentan frente al db/m y 62 disminuyen. **A:** diagrama de Venn con todas las proteínas expresadas de forma diferencial frente al db/m, **B:** diagrama de Venn con aquellas proteínas que incrementan frente al db/m; **C:** diagrama de Venn con aquellas proteínas que disminuyen frente al db/m.

db/m: controles no diabéticos; **db/db:** db/db tratados con vehículo; **db/db+EMP:** db/db tratados con empagliflozina; **db/db+RAM:** db/db tratados con ramipril; **db/db+EMP+RAM:** db/db tratados con empagliflozina y ramipril.

Asimismo, 97 proteínas se expresaban de forma significativa diferencial frente al db/m, pero el incremento o descenso no eran común para los 4 grupos db/db. 61 de estas 97 proteínas incrementaban y 36 disminuían. El mayor número de ellas se

concentraba en la terapia con empagliflozina y ramipril, que contaba con 41 proteínas que se expresaban de forma significativamente diferencial contra el grupo db/m exclusivamente en este tratamiento (**Figura 5-27**).

5.6.c. Proteínas diferenciales entre el modelo db/db y los tratamientos

Una vez establecidas las diferencias proteómicas entre el modelo db/m y db/db tratado con vehículo, y tras identificar cuáles de estas proteínas eran comunes a los 4 grupos db/db y cuáles no, se procedió a comparar los grupos db/db tratados con empagliflozina, ramipril o sus combinaciones frente al ratón diabético db/db no tratado. Siguiendo una dinámica similar a las comparaciones realizadas previamente, se revisó qué proteínas se expresaban de forma significativamente diferencial entre el grupo db/db y cada una de las ramas de tratamiento incluidas en el estudio, empleando de nuevo los *volcano plots*. En este caso, y a diferencia de los *volcano plots* de las comparaciones contra db/m, no se identificaron un número tan elevado de *hit proteins* (**Figura 5-28**). De hecho, sólo se identificaban *hit proteins* ($\text{LogFC} \leq -1$ ó ≥ 1 con un $\text{FDR} < 0,05$) al comparar el grupo db/db tratado con vehículo con el grupo db/db tratado con empagliflozina y ramipril. La comparación de los grupos tratados con empagliflozina o ramipril contra el db/db no identificó ninguna proteína expresada de forma diferencial. En la comparación del grupo db/db no tratado con el grupo tratado con empagliflozina y ramipril, se identificaron 13 proteínas, de las cuales 1 disminuía y las 12 restantes incrementaban en el grupo tratado con empagliflozina y ramipril (**Tabla 5-14 y Figura 5-28**).

5. RESULTADOS

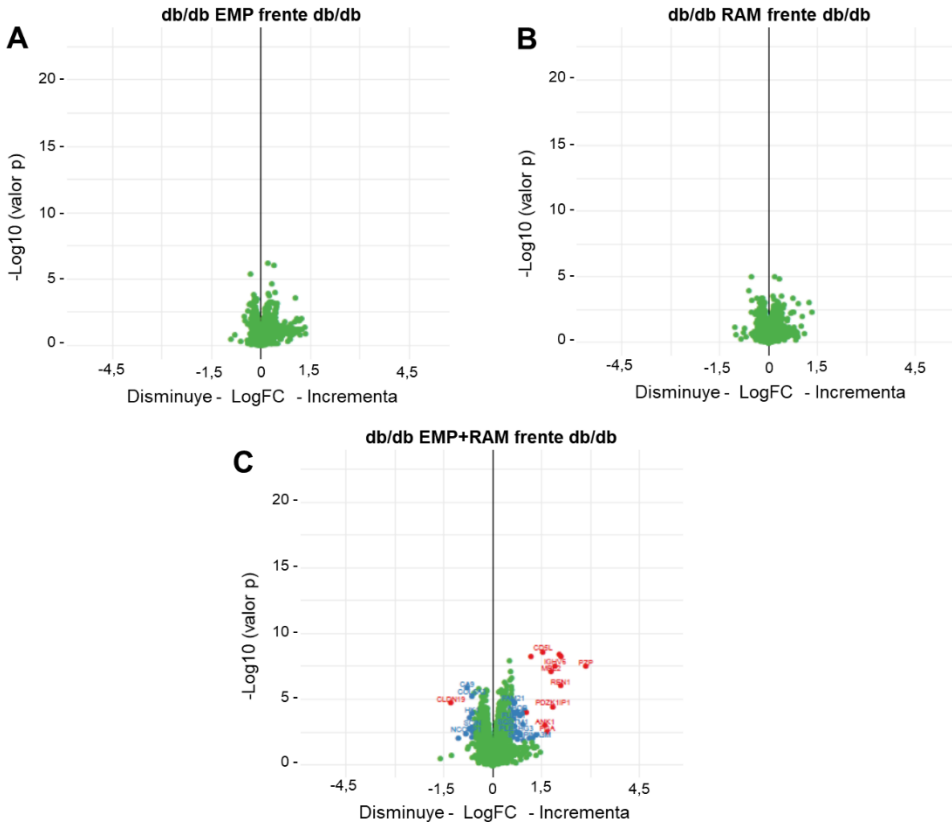


Figura 5-28 - Representación de la expresión diferencial de las proteínas mediante volcano plots de la comparación contra db/db de los tratamientos con empagliflozina, ramipril o sus combinaciones. El eje de abscisas representa el LogFC. El eje de ordenada representa el valor p. En el encabezado de cada gráfico figura que grupos se han comparado. **A:** comparación de db/db tratado con empagliflozina frente a db/db; **B:** comparación de db/db tratado con ramipril frente a db/db; **C:** comparación de db/db tratado con empagliflozina y ramipril frente a db/db.

db/m: controles no diabéticos; **db/db:** db/db tratados con vehículo; **db/db+EMP:** db/db tratados con empagliflozina; **db/db+RAM:** db/db tratados con ramipril; **db/db+EMP+RAM:** db/db tratados con empagliflozina y ramipril.

Tabla 5-15 - Proteínas diferencialmente expresadas entre el grupo db/db y el grupo db/db tratado con empagliflozina y ramipril. Se muestra además la vía celular relacionada, la magnitud de cambio mediante el LogFC y el valor de significación estadística mediante el FDR.

Proteínas que incrementan en db/db EMP+RAM respecto a db/db no tratado					
Gen	Proteína	Vía celular relacionada	Identificador de proteína	LogFC	FDR
Akr1b7	<i>Aldo-keto reductase family 1 member B7</i>	Procesos de oxidación y reducción	P21300 Q5M9J9	1,1789	<0,001
Ank1	<i>Ankyrin-1</i>	Citoesqueleto y adhesión celular	A0A0R4J1N7 B7ZW98 D3YTV8 D3Z5M4 E9QNT8 G5E8J2 G8JL84 Q02357 Q02357-2 Q02357-3 Q02357-4 Q02357-5 Q02357-6 Q0VGY9	1,6046	0,020
Atp5d	<i>ATP synthase subunit delta, mitochondrial</i>	Transporte y traslocación	Q4FK74 Q9D3D9	1,0328	0,006
Cd5l	<i>CD5 antigen-like</i>	Inmunidad e inflamación	Q9QWK4	1,5444	<0,001
Fga	<i>Fibrinogen alpha chain</i>	Hemostasia	E9PV24	1,6705	0,0387
Ighm	<i>Immunoglobulin heavy constant mu</i>	Inmunidad e inflamación	A0A075B5P6 A0A075B6A0 P01872 P01872-2	2,0469	<0,001
Ighv6	<i>Immunoglobulin heavy variable 6-3</i>	Inmunidad e inflamación	A0A075B5T2	1,9167	<0,001
Mbl2	<i>Mannose-binding protein C</i>	Inmunidad e inflamación	P41317 Q3UEK1	1,7906	<0,001
Pdzk1ip1	<i>PDZK1-interacting protein 1</i>	Transporte y traslocación	G3UW41 Q9CQH0	1,8466	0,003
Pzp	<i>Pregnancy zone protein</i>	Inhibidor de proteasas	Q61838	2,8593	<0,001
Ren1	<i>Renin-1</i>	Proteasa	P06281	2,0851	<0,001
Uhrf1bp1	<i>UHRF1 (ICBP90)-binding protein 1</i>	Incierta	B2KF50	2,1033	<0,001
Proteínas que disminuyen en db/db EMP+RAM respecto a db/db no tratado					
Gen	Proteína	Vía celular relacionada	Identificador de proteína	LogFC	FDR
Cldn19	<i>Claudin-19</i>	Citoesqueleto y adhesión celular	Q9ET38 Q9ET38-2	-1,2795	0,002

db/db: db/db tratados con vehículo; **db/db+EMP+RAM:** db/db tratados con empagliflozina y ramipril.

Entre las proteínas diferencialmente expresadas entre el grupo db/db no tratado y el grupo tratado con empagliflozina y ramipril, llamaba la atención que al menos 4 proteínas cuya expresión incrementaba estaban relacionadas con la inflamación y la inmunidad: la proteína similar al antígeno CD5, dos proteínas relacionadas con las

5. RESULTADOS

cadena pesada de las inmunoglobulinas y la lectina fijadora de manosa. Estos hallazgos sugieren una posible modulación del sistema inmune en el tratamiento combinado con empagliflozina y ramipril.

Por otro lado, una de estas 13 proteínas diferenciales era la renina. Esta enzima se encontró incrementada en los grupos tratados con: 1.-ramipril, y 2.-empagliflozina y ramipril respecto al grupo db/m con un incremento de la expresión proteica de 2,3 y 4,1 veces respectivamente (**Figura 5-29**). Además, como se indicaba, esta diferencia también era significativa entre los grupos db/db tratado con vehículo y el tratado con empagliflozina y ramipril, siendo el incremento en este último grupo de 4,2 veces respecto al no tratado (**Figura 5-29**). Estos resultados son consistentes con los hallazgos previamente obtenidos este trabajo (**Ver sección Resultados - Efectos sobre las primeras etapas del SRA**).

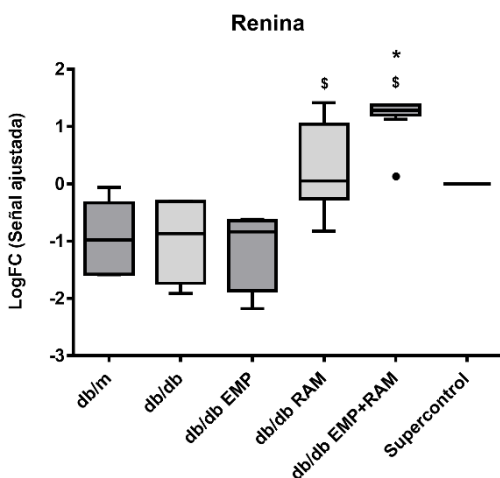


Figura 5-29 - Expresión proteica de renina en el estudio de proteómica para los grupos db/m, db/db y los tratamientos con empagliflozina, ramipril o sus combinaciones. Se muestra la expresión proteica ajustada al grupo Supercontrol y en escala logarítmica de base 2 (LogFC).

§Diferencias estadísticamente significativas (LogFC ≥ 1 y FDR $< 0,05$) entre los diferentes grupos db/db y el grupo db/m. *Diferencias estadísticamente significativas (LogFC ≥ 1 y FDR $< 0,05$) entre los grupos db/db tratados y el grupo db/db no tratado. **db/m**: controles no diabéticos; **db/db**: db/db tratados con vehículo; **db/db+EMP**: db/db tratados con empagliflozina; **db/db+RAM**: db/db tratados con ramipril; **db/db+EMP+RAM**: db/db tratados con empagliflozina y ramipril.

Curiosamente, una de las proteínas diferencialmente expresada entre el grupo db/db tratado con empagliflozina y ramipril y el grupo db/db tratado con vehículo (**Tabla 5-**

14), es una proteína transmembrana que interviene en la regulación de otros transportadores celulares y que se denomina proteína 1 que interactúa con la proteína 1 que contiene dominios PDZ (PDZK1IP1). No obstante, es más comúnmente conocida como proteína asociada a membrana de 17KDa (MAP17). Recientemente se ha descrito que esta proteína es necesaria para permitir que el transportador SGLT2 funcione con mayor eficiencia. La interacción entre este transportador y MAP17 tiene lugar a través de los dominios transmembrana de MAP17 (140). Al comparar la expresión de MAP17 contra el grupo no diabético, esta estaba significativamente incrementada en las ramas de tratamiento con: 1.- empagliflozina, y 2.- empagliflozina y ramipril (**Figura 5-30**). El incremento de la expresión en ambos grupos era de 2,9 y de 5,6 veces respectivamente. Además, el grupo tratado con empagliflozina y ramipril mostraba la expresión más elevada de MAP17, alcanzando incluso una diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo db/db tratado con vehículo y al grupo db/db tratado con ramipril. El incremento de la expresión frente a estos últimos fue de 3,9 y 3,1 respectivamente (**Figura 5-30**).

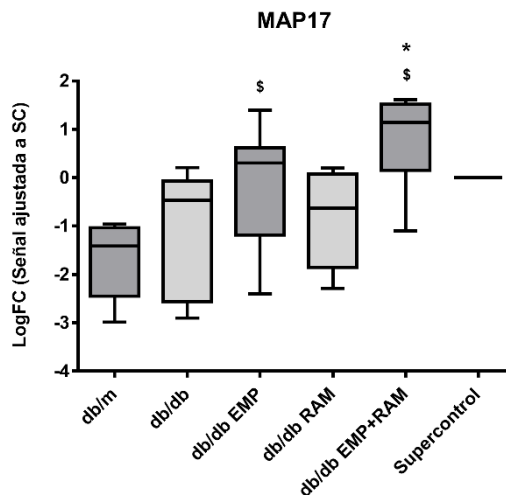


Figura 5-30 - Expresión proteica de MAP17 en el estudio de proteómica para los grupos db/m, db/db y los tratamientos con empagliflozina, ramipril o sus combinaciones. Se muestra la expresión proteica ajustada al grupo Supercontrol y en escala logarítmica de base 2 (LogFC).

§Diferencias estadísticamente significativas (LogFC ≥ 1 y FDR $< 0,05$) entre los diferentes grupos db/db y el grupo db/m. *Diferencias estadísticamente significativas (LogFC ≥ 1 y FDR $< 0,05$) entre los grupos db/db tratados y el grupo db/db no tratado. **db/m**: controles no diabéticos; **db/db**: db/db tratados con vehículo; **db/db+EMP**: db/db tratados con empagliflozina; **db/db+RAM**: db/db tratados con ramipril; **db/db+EMP+RAM**: db/db tratados con empagliflozina y ramipril.

5. RESULTADOS

Dado que MAP17 es una proteína encargada de regular SGLT2 y quizá otros transportadores de membrana, resultaba de especial interés para nuestro estudio. Se decidió validar los hallazgos mediante la realización de un western blot. Esta técnica confirmó los hallazgos de la expresión diferencial de MAP17. Al comparar la intensidad de la señal de MAP17 ajustada a MAPK (Proteína quinasa A activada por mitógenos), esta estaba incrementada en el grupo db/db tratado con vehículo frente al grupo db/m (**Figura 5-31**). Asimismo, la combinación de empagliflozina y ramipril incrementó aún más la expresión proteica de MAP17. (**Figura 5-31**).

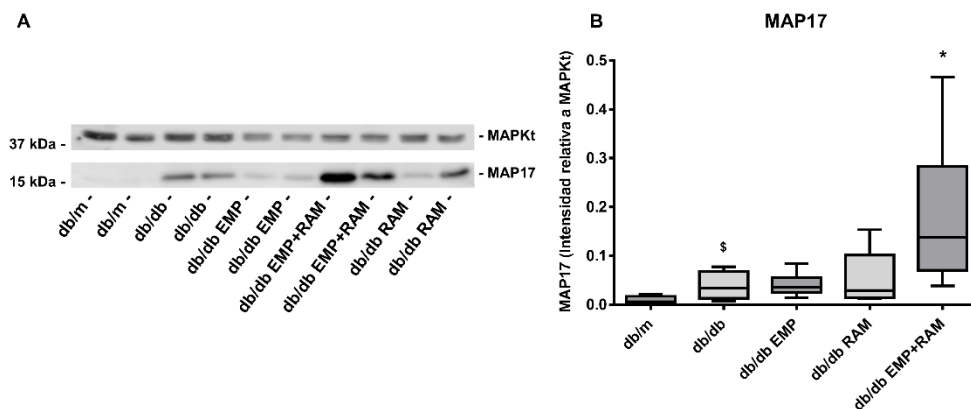


Figura 5-31 - Evaluación de la expresión proteica de MAP17 mediante western blot en db/m, db/db y los grupos tratados con empagliflozina, ramipril o sus combinaciones. Se muestran las bandas para MAP17 y el control de carga MAPKt en una de las membranas de PVDF así como la medición de la señal ajustada en cada grupo incluido. **A:** imagen representativa de las bandas de MAP17 en cada grupo de tratamiento; **B:** diagrama de cajas que representa la intensidad de MAP17 ajustada en cada grupo de tratamiento.

§Diferencias estadísticamente significativas mediante el test de Mann-Whitney entre los grupos db/m y db/db ($p < 0,05$). *Diferencias estadísticamente significativas en el test de Student de los tratamientos contra el grupo db/db ($p < 0,05$). **db/m:** controles no diabéticos; **db/db:** db/db tratados con vehículo; **db/db+EMP:** db/db tratados con empagliflozina; **db/db+RAM:** db/db tratados con ramipril; **db/db+EMP+RAM:** db/db tratados con empagliflozina y ramipril.

Tras validar los hallazgos de la proteómica y realizar una revisión de la evidencia existente sobre MAP17, se decidió evaluar en el estudio de proteómica la expresión de otras proteínas relacionadas con esta última. SGLT2 y NHE3, ambos relacionados con MAP17 (141), no modificaban su expresión en el estudio de proteómica, al igual que en los resultados obtenidos previamente en actual trabajo (**Ver sección Resultados - Efectos en los transportadores de membrana**). Por otra parte, la proteína MAP17 interacciona en la cara intracelular de la membrana, a través de su extremo C-terminal, con una proteína estructural denominada PDZK1. PDKZ1 es de

ubicación citosólica pero interacciona directamente con varios transportadores, uniéndose a los mismos en la cara intracelular de la membrana lipídica (140). De hecho, PDZK1 se considera una proteína estructural que mantiene enlazados los distintos transportadores en microdominios de membrana conocidos como balsas lipídicas (estructuras denominadas *lipid rafts* en inglés). Asimismo, el cuarto dominio PDZ de PDZK1 interacciona con otra proteína responsable del anclaje de PKA y denominada proteína 2 de anclaje de la proteína quinasa A (AKAP2 por sus siglas en inglés *A-Kinase Anchor Protein 2*). Esta última liga PDZK1 a la proteína quinasa A y posiblemente participe en la modulación de otras proteínas mediante su actividad quinasa. Por último, MAP17 también se ha relacionado con otro factor regulador de NHE3 denominado como factor regulador 1 de NHE (NHERF1) que también contiene dominios PDZK y al que también puede unirse (142,143).

El análisis proteómico reveló que PDZK1 no variaba en los 5 grupos incluidos (**Figura 5-32**). AKAP2, por el contrario, incrementaba de forma significativa en el grupo tratado con empagliflozina y ramipril respecto al grupo control db/m con incremento de la expresión de 2,0 veces (**Figura 5-32**). Además, la distribución de la expresión proteica de AKAP2 se asemejaba mucho a la de MAP17 (**Figura 5-32**). Finalmente, NHERF1 no variaba tampoco entre los grupos de incluidos en el estudio, aunque se observaba un incremento de la expresión de este factor en el grupo tratado con empagliflozina y ramipril, cuya diferencia rozaba la significación al compararlo contra db/m frente al que tenía un incremento de expresión de 1,6 veces (FDR <0,001) (**Figura 5-32**). Además, al igual que ocurría con AKAP2, la distribución de la expresión era muy similar a MAP17 y un análisis de correlación mostro una asociación significativa con la señal de esta proteína (**Ver sección Anexo - Correlación de la expresión de la proteína MAP17 y otras proteínas asociadas a la membrana**).

5. RESULTADOS

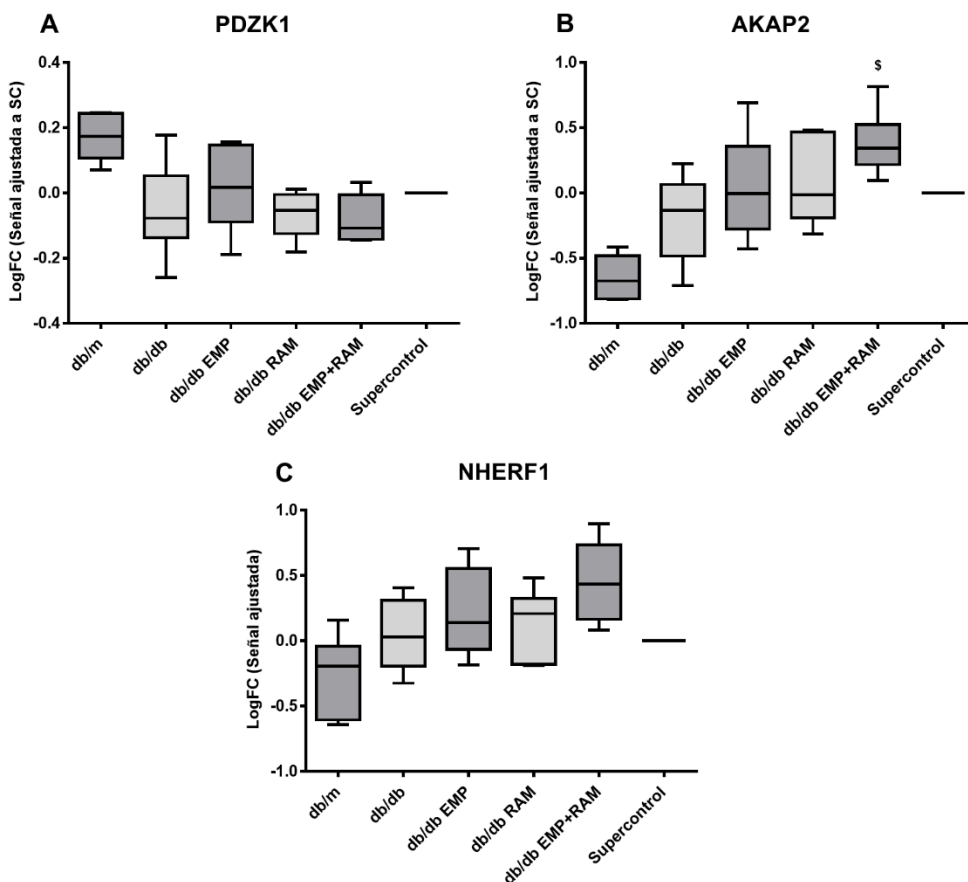


Figura 5-32 - Expresión proteica de PDZK1, AKAP2 y NHERF1 en el estudio de proteómica para los grupos db/m, db/db y los tratamientos con empagliflozina, ramipril o sus combinaciones. Se muestra la expresión proteica ajustada al grupo Supercontrol y en escala logarítmica de base 2 (LogFC). **A:** diagrama de cajas que representa la expresión proteica de PDZK1; **B:** diagrama de cajas que representa la expresión proteica de AKAP2; **C:** diagrama de cajas que representa la expresión proteica de NHERF1.

[§]Diferencias estadísticamente significativas (LogFC ≥ 1 y FDR $< 0,05$) entre los diferentes grupos db/db y el grupo db/m. ^{*}Diferencias estadísticamente significativas (LogFC ≥ 1 y FDR $< 0,05$) entre los grupos db/db tratados y el grupo db/db no tratado. **db/m:** controles no diabéticos; **db/db:** db/db tratados con vehículo; **db/db+EMP:** db/db tratados con empagliflozina; **db/db+RAM:** db/db tratados con ramipril; **db/db+EMP+RAM:** db/db tratados con empagliflozina y ramipril.

Estos hallazgos indican la posibilidad de que la interacción de la empagliflozina, pero especialmente de la empagliflozina con ramipril, module proteínas asociadas a SGLT2, así como proteínas reguladoras de otros transportadores de membrana.

6. DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

El presente trabajo describe el efecto de la combinación de los inhibidores del cotransportador sodio-glucosa tipo 2, los inhibidores del enzima conversor de la angiotensina y de los antagonistas selectivos del receptor tipo A de la endotelina en la nefropatía diabética experimental en un modelo murino de diabetes tipo 2. Este estudio identifica un efecto beneficioso aditivo de la combinación de dichos fármacos, que demuestran una mayor protección frente al estrés oxidativo, y efectos similares a la terapia combinada de empagliflozina con ramipril en la prevención de la hiperfiltración y reducción de la albuminuria.

Además, el estudio analiza la modulación renal del SRA ejercida por el tratamiento conjunto con iSGLT2 y los antagonistas selectivos de la endotelina sobre el bloqueo previo del SRA. En este caso demuestra cómo la terapia de empagliflozina, atrasentán y ramipril incrementa de manera sinérgica la expresión renal de ECA2 sobre ECA comparada con el bloqueo simple del SRA. Este hallazgo implica un futuro a nivel terapéutico para la combinación de los iSGLT2 con los antagonistas selectivos de la endotelina, ya que la terapia con ambos fármacos parece inactivar con mayor eficacia los efectos deletéreos del SRA y, además, el efecto diurético de los iSGLT2 podría prevenir la retención hidrosalina condicionada por el atrasentán.

Finalmente, este trabajo incluye un estudio de proteómica diferencial a nivel renal que reconoce diferentes vías patogénicas implicadas en la nefropatía diabética en el ratón db/db. Además, identifica algunos hallazgos que pueden ser la base para entender cómo los iSGLT2 sobre el bloqueo previo del SRA modulan la expresión de diferentes transportadores tubulares a través de proteínas estructurales intermedias como MAP17, AKAP2 y NHERF1.

Dado que los resultados del presente trabajo son numerosos y afectan a varias vías fisiopatológicas, los hallazgos más relevantes del mismo serán discutidos por apartados.

6.1. EFECTOS EN LOS PARÁMETROS FISIOLÓGICOS

Nuestro trabajo demuestra que las combinaciones de: 1.-empagliflozina y ramipril, 2.- empagliflozina, ramipril y atrasentán y 3.-atrasentán y ramipril fueron las más eficaces en la disminución de la **presión arterial**. Así, teniendo en cuenta que un adecuado control de la presión arterial, incluso en pacientes sin hipertensión (144), es un pilar fundamental en todas las guías para prevenir la progresión de la ERD (37,58,91,145,146), estos hallazgos sugieren un potencial efecto beneficioso de las 3 combinaciones en este aspecto.

Todos los fármacos empleados en el estudio han demostrado reducir la presión arterial en diferentes modelos murinos (89,147,148) y en ensayos clínicos (149–151), aunque la potencia hipotensora de cada uno es distinta. En este trabajo los grupos tratados con ramipril o sus combinaciones lograron una reducción efectiva de la presión arterial. Asimismo, las combinaciones mostraron mayor potencia que el ramipril en monoterapia. Los tratamientos con empagliflozina y atrasentán en monoterapia no tuvieron ningún efecto sobre la presión arterial.

Entre los 3 fármacos empleados, ramipril es, por tanto, aquel con una mayor potencia hipotensora a través de la inhibición directa del ECA. Empagliflozina, por el contrario, ha demostrado reducir la presión sólo en algunos estudios en modelos murinos (147,152). En otros, la terapia única con empagliflozina no tuvo ningún efecto sobre la presión arterial (153,154). La capacidad de la empagliflozina para reducir la presión arterial se explica en parte a través de la diuresis inducida por este fármaco (154). La inhibición en la reabsorción de glucosa y sodio que producen los iSGLT2 incrementa la diuresis y la glucosuria (113,155), lo que disminuye la volemia y la presión arterial (86). No obstante, estos efectos parecen más evidentes al inicio del tratamiento y se atenúan a lo largo del mismo (134,153). Este hallazgo se explica porque a medida que el iSGLT2 controla la glucemia y mejora la respuesta a la insulina, la carga filtrada de glucosa disminuye, reduciendo la concentración de esta última en la luz tubular y su poder osmótico. Por otro lado, la participación de la natriuresis en el efecto hipotensor de los SGLT2 es más discutida. Algunos estudios en modelos murinos y en humanos demuestran que los iSGLT2 no incrementan excreción urinaria de sodio

6. DISCUSIÓN

(137,153,156,157), mientras que otros revelan que esta incrementa y se mantiene incluso tras 14 días de tratamiento (158). La potencia transitoria de la diuresis osmótica podría justificar en parte una menor potencia de la empagliflozina en monoterapia.

Atrasentán también ha demostrado reducir la presión arterial de forma moderada sólo en algunos estudios en modelos murinos (96), mientras que en otros no se observan diferencias (159). En cualquier caso, los receptores de endotelina tipo A si parecen estar estrechamente ligados a la vasoconstricción e hipertensión, mientras que los receptores de endotelina tipo B participan en la vasodilatación (87). En una serie de experimentos en el ratón C57BL/6 realizados por Fryer y cols. demostraron que el bloqueo de los receptores ET_B producía hipertensión, mientras que el bloqueo de los receptores ET_A con atrasentán producía hipotensión (89). En ensayos clínicos, las reducciones de presión obtenidas con atrasentán fueron moderadas y no superaban los 5 mmHg (102,151).

La empagliflozina, a través de su efecto glucosúrico, fue el único tratamiento capaz de reducir la **glucemia** en el presente estudio. Los efectos se observaron de forma temprana, siendo evidentes a las 2 semanas de haber iniciado el tratamiento, y se mantuvieron a lo largo del tiempo de estudio. Este último es el efecto mejor caracterizado de los iSGLT2 (78,113,160,161). En otros trabajos utilizando el mismo ratón diabético db/db, se detectó una reducción aún más precoz de la glucemia basal a los 3 días de comenzar el tratamiento con empagliflozina (113). Además, la reducción de la glucosa sanguínea obtenida con empagliflozina en monoterapia fue mayor que aquella obtenida con otros fármacos como la metformina o la linagliptina (un DPP4i) (113,160). Sorprendentemente en el presente estudio la potencia hipoglucemiante de la empagliflozina resultó ser mayor en monoterapia que en combinación con ramipril o ramipril atrasentán. Este hallazgo podría explicarse en parte por la interacción de los diferentes fármacos a nivel farmacocinético y farmacodinámico. En ratas Sprague-Dawley, por ejemplo, se observó que la administración crónica por vía oral de canagliflozina y telmisartán reducía el área bajo la curva de la canagliflozina y su concentración plasmática máxima, sugiriendo una menor absorción del fármaco. No obstante, la terapia combinada también aumentaba las concentraciones de esta última en tejidos como el riñón o el corazón comparado

con la administración en monoterapia de canagliflozina (162). En el presente estudio la empagliflozina sola mostró una mediana de reducción de la glucemia casi 90 mg/dL mayor que las combinaciones. Así, al administrar fármacos de forma conjunta se deben tener en cuenta posibles interacciones de los mismos tanto a nivel de absorción como de metabolismo, que pueden alterar sus efectos.

Por otra parte, el tratamiento durante 8 semanas con empagliflozina, ramipril, atrasentán o sus combinaciones no modificó el **peso corporal** y tampoco fue capaz de disminuir el volumen de grasa corporal total frente al grupo db/db tratado con vehículo. El ratón diabético db/db presentaba un evidente aumento del peso corporal a expensas de un incremento de la masa grasa tanto subcutánea como intraabdominal. En el actual trabajo aproximadamente un 56% del volumen corporal del ratón db/db era grasa, lo que correlaciona con otros estudios de caracterización que indican que en este modelo en torno al 50-60% del volumen corporal es grasa (163,164). Del mismo modo, los controles heterocigotos db/m presentaban un volumen de grasa alrededor del 16%, que concuerda con el 10-18% de grasa corporal descrito en otros análisis (163,164).

La empagliflozina y otros iSGLT2 han demostrado previamente disminuir el peso corporal tanto en modelos murinos como en ensayos clínicos a través del incremento en la excreción de glucosa y el balance calórico negativo que esta puede generar (74,86,165). Sin embargo, en el presente trabajo en concordancia con estudios previos (134), en el ratón diabético db/db tratado con iSGLT2 no se han observado variaciones en el peso corporal. De hecho, muchas de las investigaciones objetivan un incremento paradójico del peso corporal en el ratón diabético db/db tratado con iSGLT2 (113,153,161,164,166). Por el contrario, este incremento no se observa en modelos murinos no diabéticos alimentados con dietas ricas en grasa, donde los iSGLT2 sí demostraron prevenir el incremento del peso corporal (167,168). Entre otros efectos beneficiosos, los iSGLT2 incrementan en modelos murinos de diabetes tipo 2 la insulina basal, la secreción de insulina en respuesta a la ingesta, así como la sensibilidad a la misma (78,113,160). Esta recuperación de la secreción de insulina, podría en parte justificar un efecto nulo o incluso paradójico de estos fármacos sobre el peso de determinados modelos murinos. Por ejemplo, en el caso del ratón diabético db/db, además de la ingesta mantenida por la ausencia de

6. DISCUSIÓN

saciedad, se asociaría una mejoría de la secreción de insulina y de sus efectos anabólicos como consecuencia del tratamiento con empagliflozina (113,153). Asimismo, observando los resultados del presente estudio, otro aspecto a destacar del tratamiento con empagliflozina es que reduce la glucemia sin incrementar el peso corporal al compararlo con otros tratamientos como la insulina. Estudios previos en el ratón diabético db/db, demostraron que la dapagliflozina aumenta el peso corporal respecto al ratón diabético db/db tratado con vehículo. No obstante, dicho incremento es menor que el que se observó con la administración de insulina en monoterapia (169). Este último aspecto, es una ventaja importante frente a la insulina, ya que la obesidad es otro factor relacionado con la progresión de la ERD y la hiperfiltración (31,84).

En nuestro trabajo la administración de atrasentán en el ratón diabético db/db no se acompañó de ninguna modificación del peso corporal. En concordancia, estudios previos no demostraron ningún efecto de este fármaco en monoterapia o en combinación con losartán sobre el peso corporal en modelos murinos experimentales de diabetes tipo 2 (170,171).

6.2. EFECTOS EN LA LESIÓN RENAL DIABÉTICA

En el presente estudio, se demostró una prevención de la **hiperfiltración diabética** en los grupos tratados con: 1.-empagliflozina y ramipril, y 2.-empagliflozina, ramipril y atrasentán. Así, mientras en los ratones diabéticos db/db tratados con vehículo el FG incrementó 92 $\mu\text{L}/100\text{g}/\text{min}$ tras 8 semanas de tratamiento, en los grupos tratados con: 1.-empagliflozina y ramipril, y 2.-empagliflozina, ramipril y atrasentán, el FG disminuyó 192 y 189 $\mu\text{L}/100\text{g}/\text{min}$, respectivamente. Dado que la hiperfiltración es una de las primeras manifestaciones de la enfermedad renal diabética (172), estos hallazgos sugieren un efecto renoprotector de ambos tratamientos desde etapas tempranas de la enfermedad. En estudios anteriores en animales diabéticos, la administración de iSGLT2 en monoterapia ha demostrado prevenir la hiperfiltración diabética (134,147,157,173). Asumiendo que gran parte de los modelos murinos diabéticos empleados en investigación básica exhiben signos de nefropatía diabética incipiente (**Ver sección Introducción - Modelos murinos de diabetes**)

(103,134,174), muchos estudios evidencian que entre las 18 y 22 semanas de edad los ratones diabéticos no tratados presentan hiperfiltración respecto a sus controles no diabéticos (134,147). En ratones Akita de 19 semanas de edad, por ejemplo, se objetivó que el grupo diabético tratado con vehículo exhibía un FG ajustado al peso corporal un 30% mayor que los controles no diabéticos. Además, el tratamiento con empagliflozina logró revertir dicha hiperfiltración (147). En nuestro trabajo, el FG ajustado al peso corporal fue un 47% mayor en los ratones diabéticos db/db tratados con vehículo que en los controles no diabéticos db/m. No obstante, empagliflozina en monoterapia no logró prevenir un incremento del filtrado glomerular. En otro estudio realizado por Motrapu y cols. no se observó una disminución del FG en ratones db/db tratados con empagliflozina, ramipril y metformina (174). Por el contrario, en el presente estudio los tratamientos combinados de empagliflozina con ramipril o empagliflozina con ramipril y atrasentán, sí previnieron el desarrollo de hiperfiltración tras 8 semanas de tratamiento.

Entre los mecanismos de los iSGLT2 involucrados en la corrección de la hiperfiltración glomerular, el más aceptado es la restauración del *feedback* túbulo-glomerular. Los iSGLT2 al bloquear la reabsorción de glucosa, también bloquean la reabsorción de sodio dependiente del transportador SGLT2. Este mecanismo incrementa el débito de NaCl a la mácula densa, que lo interpreta como un aumento del FG, reduciendo el calibre de la arteriola aferente y disminuyendo la secreción de renina (**Ver sección Introducción - La interacción túbulo-glomerular**). Un estudio en ratones Akita de 5-6 semanas de edad que utilizaba microscopía láser multifotón para evaluar el filtrado de glomerular de una única nefrona (SNGFR), demostró que los ratones diabéticos mostraron un incremento del SNGFR. Asimismo, el tratamiento con empagliflozina redujo la hiperfiltración de cada nefrona individual, probablemente a través de un mecanismo de vasoconstricción de la arteriola aferente (157). Este último mecanismo dependía de la señalización local mediada por adenosina y se inhibía con antagonistas del receptor de adenosina A1 (157). Otro hallazgo del presente estudio es que, en los ratones diabéticos con una menor presión arterial, no se observó un aumento del FG. Esta disminución de la presión arterial también puede ser otro mecanismo protector a través del cual se atenúa en parte la hiperfiltración glomerular. En este sentido, en estudios previos, un control estricto de la presión arterial se ha relacionado con una menor hiperfiltración (60).

6. DISCUSIÓN

Todos los tratamientos experimentales también atenuaron la **albuminuria** urinaria reduciendo los valores medianos del CAC postratamiento y su variabilidad frente al grupo db/db tratado con vehículo, excepto el ramipril. No obstante, y debido a la elevada variabilidad de las mediciones, especialmente en el grupo db/db tratado con vehículo, sólo empagliflozina logró una reducción significativa de la albuminuria con una disminución del CAC de 897 mg/g. Esta reducción de la albuminuria ha sido contrastada también en estudios previos en modelos murinos tratados con iSGLT2 (147,161,175). Sin embargo, en otros trabajos, y probablemente en relación a la elevada desviación estándar de las mediciones del CAC sólo se identificaron tendencias (134,157). Incluso existen estudios donde no se observaron diferencias en la albuminuria tras el tratamiento (113), aunque en general la mayoría de las investigaciones con iSGLT2 en ratones diabéticos coinciden en observar un mayor o menor grado de reducción de la albuminuria medida tanto por cociente como por excreción urinaria en 24 horas. En este trabajo, demostramos que, aunque la empagliflozina en monoterapia no modifica la hiperfiltración diabética, sí presenta un claro efecto protector sobre la albuminuria.

Los tratamientos con empagliflozina, ramipril, atrasentán y sus combinaciones redujeron todos ellos la **expansión de la matriz mesangial** sin observarse ninguna superioridad de un tratamiento sobre el otro. Estos hallazgos concuerdan con estudios previos en modelos murinos diabéticos tratados con iSGLT2 (113,153,175–177) y con atrasentán (96,171) que también demostraron una disminución de la expansión mesangial glomerular a expensas de un menor depósito de fibras de colágeno. Otros trabajos también han demostrado un incremento del volumen del penacho glomerular que traduce una hipertrofia del mismo debida a la hiperfiltración diabética y al mayor flujo de sangre que accede a los capilares glomerulares en esa condición (152,177). En nuestro caso, los valores del área del penacho ajustados al área glomerular no mostraron diferencias significativas, aunque sí se observó un ligero incremento del área del penacho no ajustada en los ratones diabéticos tratados con vehículo (**Ver sección Anexos - Área del penacho glomerular**).

El tratamiento combinado con empagliflozina, ramipril y atrasentán disminuyó la expresión de enzimas relacionadas con la producción de **ROS** y activadas por la PKC

como son las NADPH oxidasas (53). En el presente trabajo, la triple terapia fue capaz de revertir frente a otros tratamientos la expresión génica de la NADPH oxidasa tipo 4, que se expresa predominantemente en el riñón y se ha visto relacionada con la progresión de la nefropatía diabética (178,179). Este hallazgo traduce probablemente una menor activación de la PKC y una menor exposición de las células tubulares renales a las ROS. Ello supone un mayor efecto nefroprotector de la triple terapia frente a la progresión de la ERD, ya que el estrés oxidativo es probablemente una de las primeras alteraciones en la fisiopatología de la nefropatía diabética y uno de los principales motores de lesión renal en este contexto (**Ver sección Introducción - Mecanismos patológicos implicados en la nefropatía diabética**) (53,133).

En cuanto a la evaluación de otros marcadores de **fibrosis e inflamación**, no se observaron efectos de los tratamientos sobre la expresión génica de MCP-1, TGF- β 1 o el colágeno IV. No obstante, trabajos previos en modelos murinos experimentales de diabetes se demostró que la administración de iSGLT2 disminuyó la expresión génica de marcadores como el TGF- β 1 o MCP-1 (113,147).

6.3. MODULACIÓN DEL EJE SRA

La modulación del SRA ejercida por empagliflozina, atrasentán o sus combinaciones con ramipril es uno de los objetivos principales de nuestro estudio. Comenzando por los primeros reguladores del eje, el análisis de expresión génica de **AGT** demostró que este estaba incrementado en todos los grupos diabéticos db/db al compararlo contra el grupo control no diabético db/m. Asimismo, ninguno de los tratamientos experimentales mostró una reducción de la expresión génica de AGT. Estudios previos han demostrado también un incremento de la expresión tanto génica como proteica de AGT en modelos murinos diabéticos (152,176,180). Los estudios en relación a los efectos de los iSGLT2 sobre la expresión de AGT no son concluyentes. Algunos trabajos demuestran que los iSGLT2 reducen los niveles de AGT intrarrenal (152), mientras que otros observan que no tienen ningún efecto (176).

En nuestro estudio, la expresión génica y proteica de **renina**, estaba claramente incrementada en los grupos tratados con ramipril, tanto en combinación como en

6. DISCUSIÓN

monoterapia. Además, la expresión de este enzima era aún mayor en la triple terapia con empagliflozina, ramipril y atrasentán, y resultaba significativamente elevada cuando se comparaba contra ramipril. Curiosamente en el grupo de empagliflozina también se observó un ligero incremento de la expresión proteica de renina en los estudios de IHQ, pero no se confirmó en la expresión génica. Un estudio de Gallo y cols. en el modelo db/db también demostró que en el tejido cortical renal la actividad de renina no incrementa en diabéticos, mientras que el tratamiento con empagliflozina incrementó de manera significativa la actividad cortical de renina (113). En otros estudios en varios modelos murinos también se demostró un incremento de la expresión génica de renina tras el tratamiento con iSGLT2 (106,152,181), que también se ha corroborado en ensayos clínicos (182). Por tanto, podemos deducir que ramipril incrementa la expresión de renina en las células yuxtglomerulares y que el tratamiento combinado de ramipril y empagliflozina parece tener un efecto sinérgico sobre esta expresión.

Este incremento de la renina en los grupos tratados con ramipril podría explicarse por dos mecanismos: 1.-la inhibición del ECA por el ramipril reduce la conversión de Ang I en Ang II, lo que disminuye los niveles renales de esta proteína y sus efectos inhibitorios sobre la secreción de renina, y 2.-una disminución de la presión arterial contribuiría a una menor perfusión renal y a un incremento compensatorio de la secreción de renina para mantener constante el FG (106). Estos hallazgos sugieren también que un menor flujo sanguíneo renal secundario a hipotensión es un estímulo más potente que la propia restauración del *feedback* túbulo glomerular y el aumento del débito de NaCl al túbulo distal mediado por empagliflozina. Al fin y al cabo, si la presión de perfusión renal es baja, el FG también disminuiría. Este menor, y probablemente más lento, flujo urinario a través de los primeros segmentos del túbulo, alargaría el tiempo para permitir una mayor reabsorción del sodio urinario. De esta forma, a pesar del efecto de los iSGLT2, en contexto de hipotensión la carga filtrada de sodio que alcanzaría la mácula densa seguiría siendo baja. Esta última hipótesis, sin embargo, no sería tan eficaz para explicar por qué el tratamiento con empagliflozina en monoterapia incrementa la expresión de renina. Este fármaco no tiene un efecto hipotensor tan potente y tampoco interfiere con la conversión de angiotensina como para desencadenar una disminución del flujo sanguíneo renal y una estimulación marcada de la renina. No obstante, Onishi y cols. demostraron cómo

la empagliflozina tiende a disminuir la presión arterial y este descenso es capaz de generar un leve incremento de la secreción de renina en un modelo murino NHE3 *knockout* (181). En otro ensayo clínico reciente, Bommel y cols. observaron un incremento de la actividad de renina plasmática en pacientes diabéticos tipo 2 tratados durante 12 semanas con dapagliflozina. En estos pacientes se observó también un descenso de la presión arterial en relación al tratamiento con iSGLT2 (182). Estos hallazgos deberán ser evaluados en futuros estudios, ya que un incremento de la secreción de renina por parte de los iSGLT2 no encaja completamente en la teoría de la inhibición de la mácula densa y es posible que sus mecanismos protectores en la hiperfiltración sean independientes de la restauración del feedback túbulo-glomerular. Nuestros resultados, que también muestran un incremento leve de la expresión de renina en el grupo tratado con empagliflozina y un efecto sinérgico sobre este incremento en el tratamiento con empagliflozina y ramipril, reforzarían esta idea.

En cuanto a la expresión renal de **ECA** y **ECA2**, los resultados muestran que en el tejido cortical renal del ratón diabético db/db, la expresión de ECA disminuye. Por el contrario, la expresión génica de ECA2 en el córtex renal está aumentada. Además, se observa una tendencia al incremento de la actividad de ECA2 en extractos enriquecidos de membrana. Trabajos previos demostraron que en el modelo db/db a las 8 semanas de edad y en un modelo murino diabetes tipo 1 inducido con STZ disminuye tanto la expresión proteica como la actividad de ECA, mientras que incrementa la de ECA2 (183,184). Por el contrario, en ratas Sprague-Dawley en las que se indujo diabetes con STZ, disminuye la actividad cortical de ECA y ECA2 a las 24 semanas de inducida la diabetes (185). Además, en este último estudio el tratamiento con ramipril recuperó los niveles de ECA2 renales. En nuestro caso, observamos un aumento del cociente ECA2/ECA en el ratón diabético db/db en comparación al control no diabético db/m. Además, los hallazgos de las tinciones IHQ confirman que los cambios observados en los extractos corticales renales traducen lo que ocurre fundamentalmente en el borde apical de las células tubulares, donde ambos enzimas son más abundantes. Este descenso de ECA e incremento de ECA2 en un modelo murino de enfermedad renal diabética incipiente, podría revelar un mecanismo protector tubular que trata de contrarrestar los efectos de la Ang II e inactivar la reabsorción de sodio (183,184). En el grupo db/db tratado con vehículo

6. DISCUSIÓN

existiría un menor débito de sodio a la mácula densa por una mayor reabsorción de sodio y glucosa en el túbulo proximal. Así, con el objetivo de restaurar el flujo de sodio distal, ECA2 incrementaría sobre ECA en el epitelio apical para inactivar la Ang II y prevenir que esta estimule directamente la reabsorción de sodio a nivel tubular (183,186). En contraposición a esta hipótesis, en el presente trabajo el tratamiento de los ratones db/db con empagliflozina, que muestra efectos natriuréticos y restaura el *feedback* túbulo-glomerular, no modificó el cociente ECA2/ECA, aunque sí se observó una leve tendencia al incremento de ECA. Por otra parte, el tratamiento con ramipril en monoterapia, pero especialmente las combinaciones de tratamiento con: 1.-empagliflozina y ramipril, 2.-empagliflozina, ramipril y atrasentan, y 3.-atrasentan y ramipril, incrementaron de forma significativa el cociente ECA2/ECA. Los dos últimos grupos, presentaron además los cocientes ECA2/ECA más elevados. Considerando que la triple terapia con empagliflozina, ramipril y atrasentan incrementa además de forma sinérgica la expresión de renina, esta combinación de tratamiento es probablemente aquella con un mayor poder para dirigir la conversión de AGT a Ang-(1-7) a nivel renal en el ratón diabético db/db (**Figura 6-1**). Esta última hormona, a través de su acción sobre los receptores Mas, tiene efectos protectores a nivel renal reduciendo el estrés oxidativo, la inflamación y la fibrosis, además de oponerse a los efectos de la Ang II (22). Así, la triple terapia con empagliflozina, ramipril y atrasentan exhibe probables efectos renoprotectores en la nefropatía diabética a través de la modulación del SRA, que superan a los del ramipril en monoterapia (**Figura 6-1**).

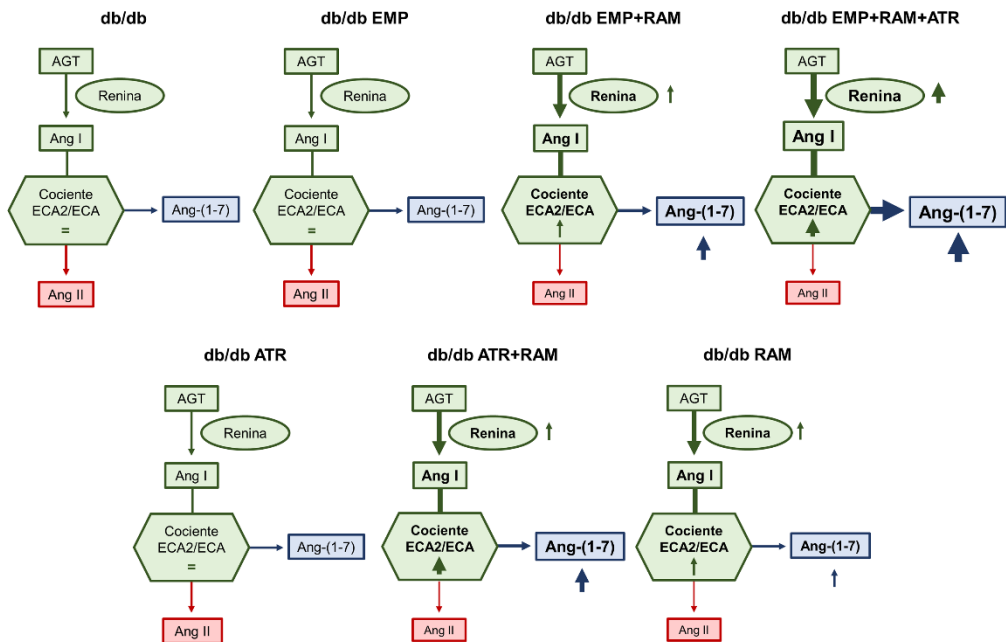


Figura 6-1 - Hipótesis sobre la modulación que ejercen sobre el sistema renina-angiotensina intrarrenal el tratamiento empagliflozina, ramipril, atrasentán o sus combinaciones en ratón db/db. Se emplea como referencia el ratón db/db tratado con vehículo. Empagliflozina y atrasentán no ejercen ninguna modificación significativa sobre el SRA intrarrenal. Ramipril incrementa el cociente ECA/ECA2 renal y dirige el SRA a la formación de Ang-(1-7). Este incremento es aún más evidente en las combinaciones de tratamiento con ramipril. Por último, la triple terapia es la más eficaz en dirigir el SRA intrarrenal a la producción de Ang-(1-7) a través de un incremento de en la expresión de renina (primera etapa limitante del eje) y de un aumento marcado del cociente ECA2/ECA.

AGT: angiotensinógeno; **ECA:** enzima convertor de angiotensina, **ECA2:** enzima convertor de angiotensina 2; **Ang I:** angiotensina I; **Ang II:** angiotensina II; **Ang-(1-7):** angiotensina (1-7). **db/db:** db/db tratados con vehículo; **db/db EMP:** db/db tratados con empagliflozina; **db/db EMP+RAM:** db/db tratados con empagliflozina y ramipril; **db/db EMP+RAM+ATR:** db/db tratados con empagliflozina, ramipril y atrasentán; **db/db ATR:** db/db tratados con atrasentán; **db/db RAM+ATR:** db/db tratados con ramipril y atrasentán; **db/db RAM:** db/db tratados con ramipril.

En este estudio, salvo en el análisis IHQ específico de ECA y ECA2, no se realizó una evaluación sobre la expresión diferencial de ambos enzimas a nivel glomerular y a nivel tubular. Estudios previos han demostrado que a nivel glomerular ECA2 se expresa en los podocitos y ECA en las células endoteliales del penacho glomerular (6). Además, en ese mismo trabajo por Ye y cols. se demostró que la expresión de ECA estaba incrementada en glomérulo del ratón diabético db/db frente al control db/m, mientras que la expresión de ECA2 estaba disminuida. En el presente estudio, no se identificaron diferencias en la expresión de ECA2 a nivel glomerular, pero sí se observó un incremento de la expresión de ECA en los ratones diabéticos tratados con

6. DISCUSIÓN

vehículo frente a los controles no diabéticos. Asimismo, los tratamientos parecían disminuir ligeramente la expresión del ECA glomerular sin llegar a normalizar los valores a los ratones db/m. Esta valoración tiene, sin embargo, la limitación de ser subjetiva y debería completarse con estudios que extraigan específicamente proteína y ARNm de los glomérulos en vez del tejido cortical completo. En cualquier caso, otros estudios que extrajeron glomérulos murinos en el modelo db/db mediante *beads* magnéticos, no observaron diferencias en la actividad glomerular de ECA2 entre los grupos db/db y db/m (186).

En nuestro trabajo, los resultados de la actividad de ECA y ECA2 en suero son controvertidos. La actividad sérica de ECA disminuyó y mientras que la actividad de ECA2 incrementó en el ratón diabético db/db a las 20 semanas de edad. Así, el cociente ECA2/ECA en los ratones diabéticos tratados con vehículo era 2,7 veces mayor en que en los controles no diabéticos, indicando un predominio de la actividad sérica de ECA2 sobre ECA. Contrariamente, otros estudios en los modelos murinos NOD han demostrado un incremento de la actividad de ECA y ECA2 en suero de los controles diabéticos tratados con vehículo (187). A pesar de que los hallazgos en el modelo db/db no tratado no se correlacionan con estudios previos en este modelo, lo que sí parece es que la empagliflozina y ramipril, así como sus combinaciones, son capaces de incrementar la actividad de ECA2 frente a ECA en suero. Estos hallazgos, indican una activación del SRA no-clásico (ECA2/Ang-(1-7)/Mas) a nivel sérico que podría traducirse en efectos protectores sistémicos. Además, y al igual que ocurría con el SRA intrarrenal, en suero el incremento del cociente ECA2/ECA es mayor en las combinaciones con: 1.-empagliflozina y ramipril, 2.-empagliflozina, ramipril y atrasentan, y 3.-atrasentan y ramipril. Esto demuestra que el tratamiento con empagliflozina y atrasentan sobre el bloqueo previo del SRA, ofrece probablemente mayores efectos protectores que el bloqueo SRA en monoterapia, a través de una mayor estimulación del eje ECA2/Ang-(1-7)/Mas.

6.4. MODULACIÓN DEL SISTEMA ENDOTELINA

Considerando que uno de los tratamientos experimentales fue el atrasentan, se realizó un estudio de expresión génica del **sistema de la endotelina**. En el presente

trabajo la expresión de la ET-1 estaba incrementada en diabéticos en consonancia con lo descrito en otros estudios (188–190). La hiperglucemia es un importante estímulo para la secreción de ET-1 y esta tiene efectos lesivos principalmente sobre los podocitos (87). Así, este estudio confirma el incremento de la expresión génica de **ET-1** renal en relación a la diabetes y la hiperglucemia. Además, todos los tratamientos con atrasentán incrementaron la expresión génica de ET-1. Estos hallazgos contrastan con otros estudios en los que el bloqueo de ET_A redujo la expresión proteica de ET-1 en diferentes modelos murinos (90,188,189). Esta diferencia en los resultados podría deberse al uso de diferentes antagonistas de los receptores de endotelina que presentan una selectividad variable por los receptores de endotelina. Sin embargo, estudios previos donde se administró el atrasentán en ratas diabéticas tipo 1 mediante STZ también se observó una disminución de la expresión génica de ET-1 que no se observa en el presente estudio (90). Las diferencias entre estudios quizás podrían estar en relación con los diferentes modelos murinos de diabetes.

En cuanto a la expresión de los dos principales subtipos de receptores del sistema de endotelina, la expresión génica de **ET_A** incrementó ligeramente en el grupo diabético tratado con vehículo, expresándose 1,4 veces más que en el control db/m. Este hallazgo se correlaciona con lo observado en otros estudios, donde ET_A también incrementa en modelos diabéticos (190). No obstante, lo que llamaba la atención era el marcado incremento de la expresión de este receptor en los grupos tratados con: 1.-empagliflozina y ramipril, 2.-empagliflozina, ramipril y atrasentán y 3.-atrasentán y ramipril. Por el contrario, **ET_B** no sufrió modificaciones entre el grupo db/m y el db/db no tratado, aunque se sí se observó una tendencia a una mayor expresión de este receptor en los grupos db/db.

6.5. EFECTOS EN EL TRANSPORTE DE MEMBRANA

En este trabajo se estudiaron dos transportadores estrechamente relacionados con los iSGLT2 que fueron el propio transportador sobre el que actúa el fármaco: el **cotransportador de sodio-glucosa tipo 2 (SGLT2)**, y el intercambiador de **sodio-hidrógeno tipo 3 (NHE3)**. Por un lado, la expresión génica de SGLT2 estaba

6. DISCUSIÓN

incrementada en el modelo db/db, pero los diferentes tratamientos no indujeron ningún tipo de cambio sobre su expresión. Existen trabajos previos en el modelo db/db con resultados similares al presente estudio, mostrando un incremento de la expresión génica de SGLT2 en el modelo db/db, pero sin cambios en la expresión proteica. Además, el tratamiento con empagliflozina no modificó la expresión ARNm de este transportador (113). No obstante, los resultados sobre la expresión de SGLT2 en relación al tratamiento con iSGLT2 no son concluyentes y varían entre estudios. En la mayoría de trabajos en modelos murinos de diabetes se demostró que la expresión tanto génica como proteica de SGLT2 está incrementada (147,177). Además, los tratamientos con empagliflozina fueron capaces de reducir la expresión del ARNm del transportador, pero no modificaron la expresión proteica en todos los casos (147,177). Curiosamente, en algunos estudios, a pesar de que la expresión del ARNm de SGLT2 disminuye, su expresión proteica incrementa en estudios de western blot (177), lo que sugiere una posible modulación postranscripcional. En contraposición, otros estudios han demostrado que la expresión génica de SGLT2 disminuye en ratones con diabetes inducida con STZ (191).

En relación a la modulación de **NHE3**, observamos que su expresión génica incrementaba ligeramente en el ratón diabético db/db, expresándose 1,5 veces más que en el ratón no diabético db/m. Asimismo, la triple terapia con empagliflozina, ramipril y atrasentán revirtió este incremento de expresión. Ma y cols. que analizaron la expresión de varios transportadores tubulares en ratones con diabetes inducida con STZ y alimentados con dieta de alto contenido graso, evidenciaron que en los ratones diabéticos no tratados la expresión de NHE3 disminuye, mientras que el tratamiento con dapagliflozina incrementa claramente su expresión génica y proteica (191). Este hallazgo se podría explicar por una estimulación compensatoria de otros transportadores como el NHE3, que tratan de recuperar el sodio filtrado ante la incapacidad del transportador SGLT2 de reabsorber el mismo en situación de inhibición.

6.6. VÍAS MODULADAS EN EL ESTUDIO DE PROTEÓMICA

El estudio de proteómica permitió caracterizar las diferencias existentes entre el ratón control db/m y el ratón diabético db/db e identificó 131 proteínas que se expresaban de forma significativamente diferencial entre el grupo no diabético y el grupo diabético tratado con vehículo. Se observó un incremento de 53 y una disminución de 78 de estas proteínas.

Entre las proteínas que incrementan, se identificaron algunas relacionadas con la cadena de **respiración mitocondrial** y la producción de ATP como la ATP sintasa codificada por el gen *Atp5d* que estaba expresada 2,5 veces más en el grupo diabético (192). Esto demuestra que en el ratón diabético db/db existe probablemente una activación de la cadena de respiración mitocondrial. Este es un fenómeno descrito previamente que participa en la fisiopatología de la lesión renal diabética a través de la generación de superóxidos (31,53)

En el ratón diabético db/db también incrementó 2,2 veces respecto al ratón no diabético la **cadena alfa-1 del colágeno XII** (gen *Col12a1*). Este tipo de colágeno participa en la organización de otras fibras de colágeno y su expresión se ha visto relacionada con la fibrosis en otros tejidos como el pulmón o la piel (193,194). Asimismo, la expresión del colágeno XII se ha relacionado con la captación en el tejido de subpoblaciones de macrófagos M1, que se relacionan con la secreción de citocinas proinflamatorias (194). Por tanto, en el ratón diabético el incremento de la expresión de colágeno XII puede traducir un mayor estímulo proinflamatorio y profibrótico en el córtex renal secundario a la hiperglucemia.

Otras proteínas incrementadas en el ratón diabético db/db tratado con vehículo fueron aquellas relacionadas con la superfamilia del citocromo P450 y codificadas por los genes *Cyp2a5*, *Cyp2c44*, *Cyp2d26* y *Cyp4a14*. Entre estos 4, destacan los 2 últimos citocromos pertenecientes a las familias 2D y 4A por su incremento de expresión de 3,9 y 4,2 veces respectivamente frente al grupo control db/m. Tanto las proteínas de la superfamilia del citocromo P450 y las NADPH oxidasas previamente descritas (**Ver sección Resultados - Evaluación de marcadores de estrés**

6. DISCUSIÓN

oxidativo, inflamación y fibrosis), se han relacionado con el incremento del **estrés oxidativo** en la ERD por su participación en varios procesos responsables de la generación de ROS (133). De hecho, el incremento del citocromo P450 de la familia 4A se ha descrito en podocitos en cultivo expuestos a altas concentraciones de glucosa, así como en el modelo murino de diabetes tipo 1 OVE26 (195).

Asimismo, el estudio de proteómica permitió confirmar otros hallazgos que habíamos identificado previamente en nuestros experimentos como el descenso de la actividad de ECA cortical, que también se correlacionó con un descenso de la proteína de ECA en este estudio o el aumento de la renina en los grupos tratados con ramipril.

6.7. ROL DE LAS PROTEÍNAS ADAPTADORAS (*SCAFOLDER*)

Un hallazgo relevante del estudio de proteómica fue la modulación de varias proteínas relacionadas con la regulación de los **canales de membrana**. Entre ellas destaca la llamada proteína 1 que interacciona con PDZK1 (PDZK1IP1), aunque es más comúnmente denominada como proteína asociada a membrana de 17KDa (MAP17). Esta estaba incrementada de forma significativa en las ramas de: 1.- empagliflozina, 2.-ramipril y 3.-empagliflozina y ramipril comparada contra el ratón no diabético, aunque la asociación estadística era más fuerte (LogFC mayor de 1 y FDR <0,05) sólo para los grupos de: 1.-empagliflozina y 2.-empagliflozina y ramipril. De hecho, en este último grupo de tratamiento fue donde más incrementó, alcanzando incluso diferencias significativas al compararlo contra el ratón diabético db/db tratado con vehículo y el ratón diabético db/db tratado con ramipril. Así los datos apuntan a que MAP17 incrementa en el tratamiento con empagliflozina, pero este incremento es mucho más acusado en la terapia conjunta con empagliflozina y ramipril.

MAP17 se describió por primera vez en 1996 como una proteína frecuentemente sobreexpresada en carcinomas (196,197) y que en condiciones fisiológicas se identifica principalmente en el borde apical de las células tubulares. Inicialmente su función se desconocía, hasta que se relacionó con los cotransportadores de sodio-fosfato y sodio-manosa (142,198). Recientemente se ha sugerido que esta es una proteína que interacciona también con SGLT2, probablemente a través de sus

dominios transmembrana y que es necesaria para que el cotransportador de sodio-glucosa funcione con mayor eficiencia (140). En un estudio sobre SGLT2 y MAP17, Coady y cols. demostraron que la presencia de MAP17 incrementa la actividad transportadora de SGLT2 sin incrementar su expresión proteica (140). De hecho, la mutación de esta proteína se ha relacionado con casos de glucosuria familiares. En nuestro caso, en el mismo estudio de proteómica la expresión de MAP17 se correlacionó significativamente con la expresión proteica de SGLT2 con un coeficiente de correlación de 0,42 ($p=0,017$) (**Ver sección Anexo - Correlación de la expresión de la proteína MAP17 y otras proteínas asociadas a la membrana**). La interacción de MAP17 con SGLT2 (141), al igual que la interacción con el cotransportador sodio-fosfato, parece dependiente de los dominios transmembrana (140,141).

En la cara intracelular, se ha descrito también que MAP17 interactúa a través de su extremo C-terminal con una proteína estructural denominada proteína 1 con dominios PDZ (PDZK1) (142,196). Esta proteína también se denomina factor regulador 3 del intercambio de sodio-hidrógeno (NHERF3) por su capacidad para interactuar con el intercambiador de sodio-hidrógeno, así como con otros transportadores. La PDKZ1 es de ubicación citosólica y se sitúa próxima al borde apical de las células tubulares donde colocaliza con MAP17 (196). Además, MAP17 es necesaria para el anclaje de PDZK1 a la membrana (142). Como se comentaba, PDKZ1 tiene la capacidad de interactuar con varios transportadores, manteniéndolos unidos en microdominios de membrana conocidos como balsas lipídicas. Entre los transportadores relacionados con PDKZ1 se han identificado los cotransportadores de sodio-fosfato I y II, el transportador de cationes orgánicos I (OCTN I) o el propio NHE3 (142,199). Esta proteína se expresa en todos los segmentos tubulares y tiene 4 dominios PDZ. Los dominios PDZ son estructuras proteicas ubicuas, que se repiten en numerosas proteínas de un mismo organismo y que se han conservado evolutivamente. En el caso de PDZK1 le permiten interactuar con otras proteínas que contienen dominios PDZ para unirse a ellas (200,201). El cuarto dominio PDZ de PDZK1 interacciona con otra proteína responsable del anclaje de la proteína quinasa A (PKA) y denominada proteína 2 de anclaje de la proteína quinasa A (AKAP2) (**Figura 6-2**) (202). AKAP2 actúa como una proteína adaptadora que enlaza PKA a PDZK1 (203). Por otra parte,

6. DISCUSIÓN

PKA, entre otros sustratos, se encarga de realizar la fosforilación de NHE3 induciendo su internalización (204,205).

Curiosamente, en el estudio de proteómica AKAP2 presenta una distribución de la expresión proteica similar a MAP17 y estaba incrementada de forma significativa en el grupo tratado con empagliflozina y ramipril al compararlo contra los ratones db/m. PDZK1, por el contrario, no se encontraba diferencialmente expresada entre grupos. Asimismo, tanto MAP17 como AKAP2 interactúan con el cuarto dominio PDZ de PDZK1 (199). La relación de los cotransportadores NHE3 y SGLT2 con el complejo PDZK1 y MAP17 podría explicar la interdependencia de ambos. Además, puede que en la relación entre ambos transportadores intervenga un mecanismo que implica a AKAP2 y su unión a PKA. Se ha descrito previamente que la actividad de NHE3 depende de su estado de fosforilación. Cuantos más residuos de fosfato acumula el NHE3 menor actividad presenta (204,206). Por tanto, puede que la inhibición de SGLT2, a través de la interacción de este transportador con MAP17 y PDZK1, incremente la fosforilación de NHE3 vía AKAP2/PKA e inhiba este transportador (**Figura 6-2**).

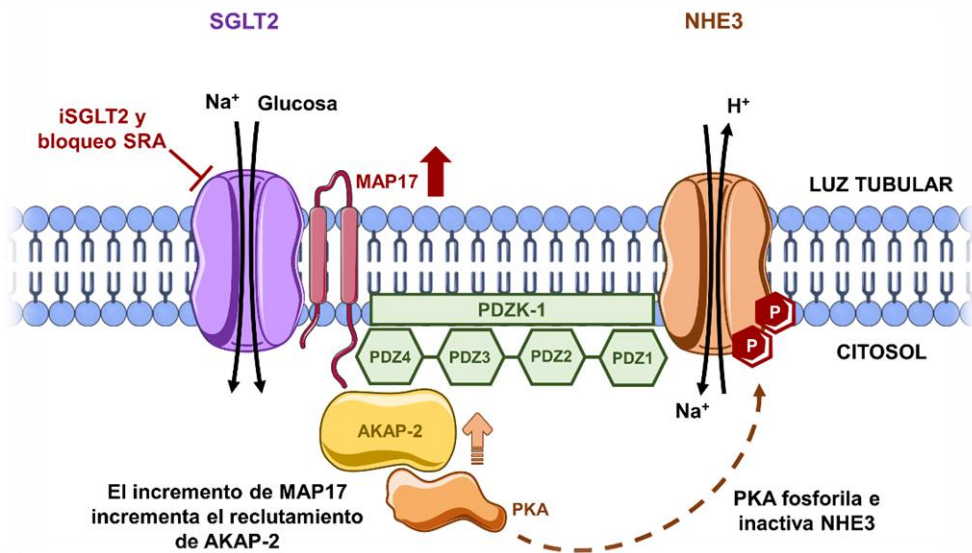


Figura 6-2 - Mecanismo propuesto de interacción entre los iSGLT2 y la expresión de NHE3. La inhibición de SGLT2 mediante este grupo farmacológico incrementa la expresión de MAP17 que a su vez se une a PDZK1 a través del dominio PDZ4. Esta interacción incrementa el reclutamiento de AKAP2 y PKA que fosforilan NHE3, inactivando el intercambiador de sodio-hidrógeno tipo 3.

SGLT2: cotransportador de sodio-glucosa tipo 2; **NHE3:** intercambiador de sodio-hidrógeno tipo 3; **iSGLT2:** inhibidor de SGLT2; **SRA:** sistema renina-angiotensina; **PDZK1:** proteína 1 con dominios PDZ; **AKAP-2:** proteína 2 de anclaje de la proteína quinasa A; **PKA:** proteína quinasa A.

Imagen creada con recursos visuales de Servier Medical Art (2).

Por último, el análisis de la expresión de otro factor regulador del cotransporte en el túbulo proximal denominado factor regulador 1 del intercambio de sodio-hidrógeno (NHERF1) mostró una distribución similar aquella de MAP17 y tuvo una estrecha correlación con la expresión de esta última, alcanzando un coeficiente de 0,62 ($p < 0,001$) (**Ver sección Anexo - Correlación de la expresión de la proteína MAP17 y otras proteínas asociadas a la membrana**). Este último factor regulador se ha relacionado con el eje ACE/Ang II/AT₁R y parece que actúa como intermediario en la estimulación de la reabsorción de sodio por parte de la Ang II (207). Como se comentó previamente, Ang II además de sus efectos vasopresores, es capaz de estimular la reabsorción de sodio a través de la expresión de NHE3. De hecho, en ratones *knockout* para el receptor AT₁R, la expresión de NHE3 en el epitelio apical del túbulo proximal disminuye por la ausencia del efecto de la angiotensina (207). En este mismo estudio, Peijian y cols. describen que el modelo murino AT₁R *knockout*

6. DISCUSIÓN

también disminuye la expresión de NHERF1 y confirmaron la co-expresión de NHE3 con NHERF1. Del mismo modo, otros trabajos también demostraron que la infusión de Ang II en ratas estimulaba la traslocación de NHE3 y NHERF1 a la membrana celular (208). Además, NHERF1 también es capaz de interactuar con los cotransportadores de sodio-fosfato, al igual que lo hace PDZK1 (143).

Todos estos hallazgos sugieren a que MAP17 parece al menos relacionada con dos factores reguladores de NHE3 como son la PDZK1 y el NHERF1. Así, puede que la inhibición de SGLT2, a través de la interacción de este último con MAP17, sea capaz de inhibir también la actividad de NHE3 y explicar la interdependencia de ambos transportadores. No obstante, son necesarios futuros estudios para analizar si esta inhibición puede estar mediada por la fosforilación de NHE3 a través de la vía PDZK1/AKAP2/PKA o si están implicados otros mecanismos.

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

A través del presente trabajo podemos extraer las siguientes conclusiones:

1.-En el ratón diabético db/db, la combinación de empagliflozina y atrasentan sobre el bloqueo del sistema renina-angiotensina comparada con el tratamiento con ramipril en monoterapia, ofrece a nivel fisiológico una mayor protección frente a la progresión de la nefropatía diabética mediante el control de la glucemia, una mayor reducción de la presión arterial y la corrección de la hiperfiltración glomerular.

2.-En el ratón diabético db/db, la combinación de empagliflozina y atrasentan sobre el bloqueo previo del sistema renina-angiotensina comparada con ramipril en monoterapia, ofrece a nivel histológico una mayor protección frente a la lesión renal diabética a través de una disminución de la expansión de la matriz mesangial y una reducción del estrés oxidativo.

3.-En ratón diabético db/db, la combinación de empagliflozina y atrasentan sobre el bloqueo previo del sistema renina-angiotensina comparada con ramipril en monoterapia, incrementa de forma sinérgica el cociente de ECA2/ECA tanto a nivel del córtex renal como a nivel sérico, indicando una activación del eje protector ECA2/Ang (1-7)/Mas.

4.-Mediante estudios de proteómica hemos identificado un incremento de la expresión de MAP17/AKAP-2 en los ratones diabéticos db/db tratados con empagliflozina. Dicha modificación podría ser un mecanismo implicado en la modulación de otros transportadores de membrana ejercida por los iSGLT2 y relacionada con los efectos nefroprotectores en la ERD de este grupo farmacológico.

8. LIMITACIONES Y LÍNEAS FUTURAS

8. LIMITACIONES Y LÍNEAS FUTURAS

8.1. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

El presente trabajo presenta una serie de limitaciones. Los estudios se han realizado sobre el ratón diabético db/db y los resultados no siempre son extrapolables a lo que ocurre en el humano. En el caso de la expresión de ECA2, por ejemplo, varios estudios demuestran que esta incrementa o no modifica su expresión renal en el ratón db/db (183,184), mientras que estudios en humanos comprueban que la expresión disminuye (209,210). Además, se debe tener en consideración que el ratón db/db exhibe signos de nefropatía diabética incipiente (103) con lesiones glomerulares leves y con un tejido tubulointerstitial conservado, mientras que en humanos, el diagnóstico de ERD suele acontecer en fases más avanzadas de la enfermedad. Esta situación condiciona la interpretación y la comparación de resultados de expresión génica y proteica renal en el ratón db/db.

En cuanto a los resultados, existen determinados sistemas que solamente se evaluaron mediante expresión génica, como es el caso de la endotelina. Algunos hallazgos como la modulación de los receptores ET_A (**Figura 5-21**) o la disminución de la expresión génica del intercambiador de sodio-hidrógeno tipo 3 (NHE3) en el ratón diabético tratado con empagliflozina, ramipril y atrasentán (**Figura 5-22**), deberían evaluarse también mediante expresión proteica y confirmar si correlacionan con lo observado en la expresión del ARNm.

Por otra parte, el estudio de proteómica muestra un gran número de proteínas expresadas de forma diferencial entre el ratón db/m y el db/db, pero también entre el ratón db/db tratado con vehículo y las ramas de tratamiento con empagliflozina, ramipril o sus combinaciones. No obstante, se debe recordar que este estudio sólo se realizó con 6 extractos de proteínas renales de cada uno de los grupos indicados. Así, los resultados orientan sobre posibles vías fisiopatológicas, pero estas deben ser sometidas tanto a validación interna como externa. En este trabajo, sólo se realizó la validación interna de la expresión proteica de MAP17 (**Figura 5-31**), por lo que la expresión del resto de proteínas implicadas en la hipótesis propuesta debe ser confirmada en las muestras de tejido de renal disponibles.

8.2. LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURAS

El presente trabajo muestra que la combinación de tratamiento con empagliflozina y atrasentan sobre el bloqueo previo del SRA tiene mayores efectos protectores frente a la progresión de la enfermedad renal diabética que el tratamiento con ramipril en monoterapia. Además, el estudio de proteómica revela que el tratamiento con empagliflozina incrementa la expresión de una proteína transmembrana denominada MAP17, que podría estar implicada en la modulación de otros transportadores de membrana relacionada con este fármaco. De este modo, se abren las siguientes líneas de investigación futuras:

- 1.- Evaluar la protección ejercida por la empagliflozina, atrasentan, ramipril o sus combinaciones en otros órganos como el corazón, para confirmar si disminuyen la hipertrofia de los miocardiocitos, reducen la fibrosis miocárdica o mejoran el estrés oxidativo.
- 2.- Ampliar estudios de determinados sistemas como el de la endotelina o de algunos transportadores celulares como el NHE3 con el análisis de expresión proteica.
- 3.- Confirmar en extractos de proteínas renales independientes los hallazgos de la expresión proteica de MAP17 y AKAP2 observados en el estudio de proteómica.
- 4.- Evaluar la hipótesis sobre la posible modulación de NHE3 por parte de MAP17 y AKAP2.
- 5.- Estudiar en un ensayo clínico randomizado la combinación de los antagonistas del receptor de endotelina A y los iSGLT2 sobre el bloqueo previo del SRA en pacientes con diabetes tipo 2 y enfermedad renal diabética.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Hall J. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology. 13th ed. Elsevier. 2016.
2. SMART - Servier Medical ART [Internet]. [cited 2021 May 28]. Available from: <https://smart.servier.com/>
3. Vergara A, Martínez A, Górriz J, Moreno F, Navarro J, Soler M. Enfermedad Diabética Renal: Albuminuria y Progresión. *Nefrol al día*. 2020;1.
4. Ross M, Pawlina W. Histology: A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology. 6th ed. Wolters Kluwer. 2011.
5. Yanagawa N, Capparelli AW, Jo OD, Friedal A, Barrett JD, Eggena P. Production of angiotensinogen and renin-like activity by rabbit proximal tubular cells in culture. *Kidney Int*. 1991;39(5):938–41.
6. Ye M, Wysocki J, William J, Soler MJ, Cokic I, Battle D. Glomerular localization and expression of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-converting enzyme: Implications for albuminuria in diabetes. *J Am Soc Nephrol*. 2006 Nov;17(11):3067–75.
7. Li XC, Hopfer U, Zhuo JL. AT1 receptor-mediated uptake of angiotensin II and NHE-3 expression in proximal tubule cells through a microtubule-dependent endocytic pathway. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2009 Nov;297(5).
8. Wikimedia Commons [Internet]. [cited 2021 May 28]. Available from: https://commons.wikimedia.org/wiki/Main_Page
9. Roscioni SS, Heerspink HJL, De Zeeuw D. The effect of RAAS blockade on the progression of diabetic nephropathy. Vol. 10, *Nature Reviews Nephrology*. *Nat Rev Nephrol*; 2014. p. 77–87.
10. Tigerstedt R, Bergman PQ. Niere und Kreislauf. *Skand Arch Physiol*. 1898 Jan 1;8(1):223–71.
11. Santos RAS, Brosnihan KB, Chappell MC, Pesquero J, Chernicky CL, Greene LJ, et al. Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. *Hypertension*. 1988;11(2):1-153-I–157.
12. Chappell MC, Marshall AC, Alzayadneh EM, Shaltout HA, Diz DI. Update on the angiotensin converting enzyme 2-angiotensin (1-7)-Mas receptor axis: Fetal programming, sex differences, and intracellular pathways. Vol. 5, *Frontiers in Endocrinology*. Frontiers Research Foundation; 2014.
13. Morgan L, Pipkin FB, Kalsheker N. Angiotensinogen: Molecular biology,

9. BIBLIOGRAFÍA

- biochemistry and physiology. Vol. 28, International Journal of Biochemistry and Cell Biology. *Int J Biochem Cell Biol*; 1996. p. 1211–22.
14. Sparks MA, Crowley SD, Gurley SB, Mirotsov M, Coffman TM. Classical renin-angiotensin system in kidney physiology. *Compr Physiol*. 2014;4(3):1201–28.
 15. Ribeiro-Oliveira A, Nogueira AI, Pereira RM, Vilas Boas WW, Souza dos Santos RA, Simões e Silva AC. The renin-angiotensin system and diabetes: An update. Vol. 4, Vascular Health and Risk Management. *Vasc Health Risk Manag*; 2008. p. 787–803.
 16. Gomez RA, Chevalier RL, Everett AD, Elwood JP, Peach MJ, Lynch KR, et al. Recruitment of renin gene-expressing cells in adult rat kidneys. *Am J Physiol - Ren Fluid Electrolyte Physiol*. 1990;259(4 28-4).
 17. Hackenthal E, Paul M, Ganten D, Taugner R. Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. Vol. 70, Physiological Reviews. *Physiol Rev*; 1990. p. 1067–116.
 18. Skøtt O, Briggs JP. Direct demonstration of macula densa - Mediated renin secretion. *Science (80-)*. 1987;237(4822):1618–20.
 19. Santos RAS, Oudit GY, Verano-Braga T, Canta G, Steckelings UM, Bader M. The renin-angiotensin system: Going beyond the classical paradigms. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2019 May 1;316(5):H958–70.
 20. Steckelings UM, Paulis L, Namsolleck P, Unger T. AT2 receptor agonists: Hypertension and beyond. Vol. 21, Current Opinion in Nephrology and Hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*; 2012. p. 142–6.
 21. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res*. 2000;87(5).
 22. Battle D, Wysocki J, Soler MJ, Ranganath K. Angiotensin-converting enzyme 2: Enhancing the degradation of angiotensin II as a potential therapy for diabetic nephropathy. Vol. 81, *Kidney International*. Nature Publishing Group; 2012. p. 520–8.
 23. Eriksson U, Danilczyk U, Penninger JM. Just the beginning: Novel functions for angiotensin-converting enzymes. Vol. 12, *Current Biology*. *Curr Biol*; 2002.
 24. Paul M, Mehr AP, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. Vol. 86, Physiological Reviews. *Physiol Rev*; 2006. p. 747–803.
 25. Santos RAS, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DMR, Machado RP, De Buhr

- I, et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jul 8;100(14):8258–63.
26. International Diabetes Federation. *IFD Diabetes Atlas*. IFD. 2019.
 27. Anders HJ, Huber TB, Isermann B, Schiffer M. CKD in diabetes: Diabetic kidney disease versus nondiabetic kidney disease. Vol. 14, *Nature Reviews Nephrology*. Nature Publishing Group; 2018. p. 361–77.
 28. Cole JB, Florez JC. Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications. Vol. 16, *Nature Reviews Nephrology*. Nature Research; 2020.
 29. Morrish NJ, Wang SL, Stevens LK, Fuller JH, Keen H. Mortality and causes of death in the WHO multinational study of vascular disease in diabetes. *Diabetologia*. 2001;44:S14–21.
 30. Yau JWY, Rogers SL, Kawasaki R, Lamoureux EL, Kowalski JW, Bek T, et al. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 2012 Mar;35(3):556–64.
 31. Thomas MC, Brownlee M, Susztak K, Sharma K, Jandeleit-Dahm KAM, Zoungas S, et al. Diabetic kidney disease. Vol. 1, *Nature Reviews Disease Primers*. 2015.
 32. Thomas MC, Cooper ME, Zimmet P. Changing epidemiology of type 2 diabetes mellitus and associated chronic kidney disease. Vol. 12, *Nature Reviews Nephrology*. Nature Publishing Group; 2016. p. 73–81.
 33. Slabaugh SL, Curtis BH, Clore G, Fu H, Schuster DP. Factors associated with increased healthcare costs in Medicare Advantage patients with type 2 diabetes enrolled in a large representative health insurance plan in the US. *J Med Econ*. 2015 Feb 1;18(2):106–12.
 34. Alicic RZ, Rooney MT, Tuttle KR. Diabetic kidney disease: Challenges, progress, and possibilities. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2017 Dec 7;12(12):2032–45.
 35. Akhtar M, Taha NM, Nauman A, Mujeeb IB, Al-Nabet ADMH. Diabetic Kidney Disease: Past and Present. Vol. 27, *Advances in Anatomic Pathology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2020. p. 87–97.
 36. Tervaert TWC, Mooyaart AL, Amann K, Cohen AH, TerenceCook H, Drachenberg CB, et al. Pathologic classification of diabetic nephropathy. Vol. 21, *Journal of the American Society of Nephrology*. *J Am Soc Nephrol*; 2010. p. 556–63.

9. BIBLIOGRAFÍA

37. KDIGO 2020 Clinical Practice Guideline for Diabetes Management in Chronic Kidney Disease. *Kidney Int.* 2020 Oct 1;98(4):S1–115.
38. KDIGO. Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int Suppl.* 2013;3(1):9.
39. Montero N, Soler MJ, Pascual MJ, Barrios C, M-rquez E, Rodrìguez E, et al. Correlation between the protein/creatinine ratio in spot urine and 24-hour urine protein. *Nefrologia.* 2012 Jul;32(4):494–501.
40. Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, Li Z, Naicker S, Plattner B, et al. Chronic kidney disease: Global dimension and perspectives. Vol. 382, *The Lancet.* Lancet Publishing Group; 2013. p. 260–72.
41. Registro Español de Enfermos Renales (REER). Informe de Diálisis y Trasplante 2019 [Internet]. [cited 2020 Dec 31]. Available from: https://www.senefro.org/contents/webstructure/INFORME_REER_SEN_2020_WEB_SEN.pdf
42. Parving HH, Lewis JB, Ravid M, Remuzzi G, Hunsicker LG. Prevalence and risk factors for microalbuminuria in a referred cohort of type II diabetic patients: A global perspective. *Kidney Int.* 2006 Jun;69(11):2057–63.
43. Retnakaran R, Cull CA, Thorne KI, Adler AI, Holman RR. Risk factors for renal dysfunction in type 2 diabetes: U.K. Prospective Diabetes Study 74. *Diabetes.* 2006;55(6):1832–9.
44. Pambianco G, Costacou T, Ellis D, Becker DJ, Klein R, Orchard TJ. The 30-year natural history of type 1 diabetes complications: The Pittsburgh epidemiology of diabetes complications study experience. *Diabetes.* 2006;55(5):1463–9.
45. Hovind P, Tarnow L, Rossing K, Rossing P, Eising S, Larsen N, et al. Decreasing incidence of severe diabetic microangiopathy in type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2003 Apr 1;26(4):1258–64.
46. Glovaci D, Fan W, Wong ND. Epidemiology of Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease. Vol. 21, *Current Cardiology Reports.* Current Medicine Group LLC 1; 2019.
47. Ho KKL, Pinsky JL, Kannel WB, Levy D. The epidemiology of heart failure: The Framingham Study. *J Am Coll Cardiol.* 1993;22(4 SUPPL. 1).
48. Gu K, Cowie CC, Harris MI. Diabetes and decline in heart disease mortality in US adults. *J Am Med Assoc.* 1999 Apr 14;281(14):1291–7.

49. Wei M, Gaskill SP, Haffner SM, Stern MP. Effects of diabetes and level of glycemia on all-cause and cardiovascular mortality: The San Antonio heart study. *Diabetes Care*. 1998;21(7):1167–72.
50. Afkarian M, Sachs MC, Kestenbaum B, Hirsch IB, Tuttle KR, Himmelfarb J, et al. Kidney disease and increased mortality risk in type 2 diabetes. *J Am Soc Nephrol*. 2013 Jan 31;24(2):302–8.
51. Adler AI, Stevens RJ, Manley SE, Bilous RW, Cull CA, Holman RR, et al. Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64). *Kidney Int*. 2003 Jan;63(1):225–32.
52. Soldatos G, Cooper ME. Diabetic nephropathy: Important pathophysiologic mechanisms. *Diabetes Res Clin Pract*. 2008 Nov 13;82.
53. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Vol. 414, *Nature*. *Nature*; 2001. p. 813–20.
54. Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*. 2000;49(11):1939–45.
55. Du XL, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F, et al. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Oct 24;97(22):12222–6.
56. Herman-Edelstein M, Thomas MC, Thallas-Bonke V, Saleem M, Cooper ME, Kantharidis P. Dedifferentiation of immortalized human podocytes in response to transforming growth factor- β : A model for diabetic podocytopathy. *Diabetes*. 2011 Jun;60(6):1779–88.
57. Vallon V, Thomson SC. The tubular hypothesis of nephron filtration and diabetic kidney disease. Vol. 16, *Nature Reviews Nephrology*. *Nature Research*; 2020. p. 317–36.
58. Umanath K, Lewis JB. Update on Diabetic Nephropathy: Core Curriculum 2018. *Am J Kidney Dis*. 2018 Jun 1;71(6):884–95.
59. García-Carro C, Vergara A, Agraz I, Jacobs-Cachá C, Espinel E, Seron D, et al. The New Era for Reno-Cardiovascular Treatment in Type 2 Diabetes. *J Clin*

9. BIBLIOGRAFÍA

- Med. 2019 Jun 17;8(6):864.
60. Ruggenenti P, Porrini EL, Gaspari F, Motterlini N, Cannata A, Carrara F, et al. Glomerular hyperfiltration and renal disease progression in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2012 Oct;35(10):2061–8.
 61. Gerstein HC, Yusuf S, Mann JFE, Hoogwerf B, Zinman B, Held C, et al. Effects of ramipril on cardiovascular and microvascular outcomes in people with diabetes mellitus: Results of the HOPE study and MICRO-HOPE substudy. *Lancet*. 2000 Jan 22;355(9200):253–9.
 62. Ruggenenti P, Perna A, Ganeva M, Ene-lordache B, Remuzzi G. Impact of blood pressure control and angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy on new-onset microalbuminuria in type 2 diabetes: A post hoc analysis of the BENEDICT trial. *J Am Soc Nephrol*. 2006 Dec;17(12):3472–81.
 63. Hebert LA, Bain RP, Verme D, Cattran D, Whittier FC, Tolchin N, et al. Remission of nephrotic range proteinuria in type I diabetes. In: *Kidney International*. Nature Publishing Group; 1994. p. 1688–93.
 64. Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR, Berl T, Pohl MA, Lewis JB, et al. Renoprotective Effect of the Angiotensin-Receptor Antagonist Irbesartan in Patients with Nephropathy Due to Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2001 Sep 20;345(12):851–60.
 65. Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving H-H, et al. Effects of Losartan on Renal and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes and Nephropathy. *N Engl J Med*. 2001 Sep 20;345(12):861–9.
 66. Yusuf S, Teo K, Pogue J, Dyal L, Copland I, Schumacher H, et al. Telmisartan, Ramipril, or Both in Patients at High Risk for Vascular Events. *N Engl J Med*. 2008 Apr 10;358(15):1547–59.
 67. Mann JF, Schmieder RE, McQueen M, Dyal L, Schumacher H, Pogue J, 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(9638):547–53.
 68. Fried LF, Emanuele N, Zhang JH, Brophy M, Conner TA, Duckworth W, et al. Combined Angiotensin Inhibition for the Treatment of Diabetic Nephropathy. *N Engl J Med*. 2013 Nov 14;369(20):1892–903.
 69. Parving H-H, Brenner BM, McMurray JJV, de Zeeuw D, Haffner SM, Solomon

- SD, et al. Cardiorenal End Points in a Trial of Aliskiren for Type 2 Diabetes. *N Engl J Med.* 2012 Dec 6;367(23):2204–13.
70. Staruschenko A, Bhalla V, Rangaswami J. SGLT2 inhibitors: Diabetic kidney disease and beyond. Vol. 319, *American Journal of Physiology - Renal Physiology.* American Physiological Society; 2020. p. F780–1.
71. Wanner C, Inzucchi SE, Lachin JM, Fitchett D, von Eynatten M, Mattheus M, et al. Empagliflozin and Progression of Kidney Disease in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med.* 2016 Jul;375(4):323–34.
72. DeFronzo RA, Norton L, Abdul-Ghani M. Renal, metabolic and cardiovascular considerations of SGLT2 inhibition. Vol. 13, *Nature Reviews Nephrology.* Nature Publishing Group; 2017. p. 11–26.
73. Yale J-F, Bakris G, Cariou B, Nieto J, David-Neto E, Yue D, et al. Efficacy and safety of canagliflozin over 52 weeks in patients with type 2 diabetes mellitus and chronic kidney disease. *Diabetes Obes Metab.* 2014 Oct;16(10):1016–27.
74. Stenlöf K, Cefalu WT, Kim KA, Alba M, Usiskin K, Tong C, et al. Efficacy and safety of canagliflozin monotherapy in subjects with type 2 diabetes mellitus inadequately controlled with diet and exercise. *Diabetes, Obes Metab.* 2013;15(4):372–82.
75. Perkovic V, Jardine MJ, Neal B, Bompoint S, Heerspink HJL, Charytan DM, et al. Canagliflozin and Renal Outcomes in Type 2 Diabetes and Nephropathy. *N Engl J Med.* 2019 Apr;NEJMoa1811744.
76. McMurray JJV, Wheeler DC, Stefánsson B V., Jongs N, Postmus D, Correa-Rotter R, et al. Effect of dapagliflozin on clinical outcomes in patients with chronic kidney disease, with and without cardiovascular disease. *Circulation.* 2021;143(5):438–48.
77. Câmara NOS, Iseki K, Kramer H, Liu ZH, Sharma K. Kidney disease and obesity: Epidemiology, mechanisms and treatment. Vol. 13, *Nature Reviews Nephrology.* Nature Publishing Group; 2017. p. 181–90.
78. Tahara A, Takasu T. SGLT2 inhibitor ipragliflozin alone and combined with pioglitazone prevents progression of nonalcoholic steatohepatitis in a type 2 diabetes rodent model. *Physiol Rep.* 2019 Nov 1;7(22).
79. Jurczak MJ, Lee HY, Birkenfeld AL, Jornayvaz FR, Frederick DW, Pongratz RL, et al. SGLT2 deletion improves glucose homeostasis and preserves pancreatic β -cell function. *Diabetes.* 2011 Mar;60(3):890–8.

9. BIBLIOGRAFÍA

80. Ferrannini E, Muscelli E, Frascerra S, Baldi S, Mari A, Heise T, et al. Metabolic response to sodium-glucose cotransporter 2 inhibition in type 2 diabetic patients. *J Clin Invest*. 2014 Feb 3;124(2):499–508.
81. Welsh GI, Hale LJ, Eremina V, Jeansson M, Maezawa Y, Lennon R, et al. Insulin signaling to the glomerular podocyte is critical for normal kidney function. *Cell Metab*. 2010 Oct;12(4):329–40.
82. Piwkowska A, Rogacka D, Kasztan M, Angielski S, Jankowski M. Insulin increases glomerular filtration barrier permeability through dimerization of protein kinase G type Ia subunits. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2013 Jun;1832(6):791–804.
83. Morrissey K, Evans RA, Wakefield L, Phillips AO. Translational regulation of renal proximal tubular epithelial cell transforming growth factor- β 1 generation by insulin. *Am J Pathol*. 2001;159(5):1905–15.
84. García-Carro C, Vergara A, Bermejo S, Azancot MA, Sellarés J, Soler MJ. A Nephrologist Perspective on Obesity: From Kidney Injury to Clinical Management. *Front Med*. 2021 Apr 13;8.
85. Vallon V, Thomson SC. Targeting renal glucose reabsorption to treat hyperglycaemia: the pleiotropic effects of SGLT2 inhibition. Vol. 60, *Diabetologia*. Springer Verlag; 2017. p. 215–25.
86. Vergara A, Jacobs-Cachá C, Soler MJ. Sodium-glucose cotransporter inhibitors: beyond glycaemic control. *Clin Kidney J*. 2019 Jun;12(3):322–5.
87. Kohan DE, Barton M. Endothelin and endothelin antagonists in chronic kidney disease. Vol. 86, *Kidney International*. Nature Publishing Group; 2014. p. 896–904.
88. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1988;332(6163):411–5.
89. Fryer RM, Rakestraw PA, Banfor PN, Cox BF, Opgenorth TJ, Reinhart GA. Blood pressure regulation by ETA and ETB receptors in conscious, telemetry-instrumented mice and role of ETA in hypertension produced by selective ETB blockade. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2006 Jun;290(6).
90. Saleh MA, Pollock JS, Pollock DM. Distinct actions of endothelin A-selective versus combined endothelin A/B receptor antagonists in early diabetic kidney disease. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011 Jul;338(1):263–70.

91. Patel DM, Bose M, Cooper ME. Glucose and blood pressure-dependent pathways—the progression of diabetic kidney disease. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences*. 2020.
92. Morigi M, Buelli S, Zanchi C, Longaretti L, Macconi D, Benigni A, et al. Shigatoxin-induced endothelin-1 expression in cultured podocytes autocrinally mediates actin remodeling. *Am J Pathol*. 2006;169(6):1965–75.
93. Li F, Hagaman JR, Kim HS, Maeda N, Jennette JC, Faber JE, et al. eNOS deficiency acts through endothelin to aggravate sFlt-1-induced pre-eclampsia-like phenotype. *J Am Soc Nephrol*. 2012 Apr;23(4):652–60.
94. Hargrove GM, Dufresne J, Whiteside C, Muruve DA, Wong NCW. Diabetes mellitus increases endothelin-1 gene transcription in rat kidney. *Kidney Int*. 2000;58(4):1534–45.
95. Khan MA, Dashwood MR, Mumtaz FH, Thompson CS, Mikhailidis DP, Morgan RJ. Upregulation of endothelin A receptor sites in the rabbit diabetic kidney: Potential relevance to the early pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nephron*. 1999;83(3):261–7.
96. Sasser JM, Sullivan JC, Hobbs JL, Yamamoto T, Pollock DM, Carmines PK, et al. Endothelin A receptor blockade reduces diabetic renal injury via an anti-inflammatory mechanism. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Jan;18(1):143–54.
97. Gagliardini E, Corna D, Zoja C, Sangalli F, Carrara F, Rossi M, et al. Unlike each drug alone, lisinopril if combined with avosentan promotes regression of renal lesions in experimental diabetes. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2009 Nov;297(5).
98. Ding SS, Qiu C, Hess P, Xi JF, Zheng N, Clozel M. Chronic endothelin receptor blockade prevents both early hyperfiltration and late overt diabetic nephropathy in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2003 Jul 1;42(1):48–54.
99. Dhaun N, MacIntyre IM, Melville V, Lilitkarntakul P, Johnston NR, Goddard J, et al. Blood pressure-independent reduction in proteinuria and arterial stiffness after acute endothelin-a receptor antagonism in chronic kidney disease. *Hypertension*. 2009 Jul 1;54(1):113–9.
100. Dhaun N, MacIntyre IM, Melville V, Lilitkarntakul P, Johnston NR, Goddard J, et al. Effects of endothelin receptor antagonism relate to the degree of renin-angiotensin system blockade in chronic proteinuric kidney disease. Vol. 54, *Hypertension*. *Hypertension*; 2009.

9. BIBLIOGRAFÍA

101. Wenzel RR, Littke T, Kuranoff S, Jürgens C, Bruck H, Ritz E, et al. Avosentan reduces albumin excretion in diabetics with macroalbuminuria. *J Am Soc Nephrol*. 2009 Mar;20(3):655–64.
102. Heerspink HJL, Parving HH, Andress DL, Bakris G, Correa-Rotter R, Hou FF, et al. Atrasentan and renal events in patients with type 2 diabetes and chronic kidney disease (SONAR): a double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2019 May 11;393(10184):1937–47.
103. Giralt-López A, Den Bosch MM Van, Vergara A, García-Carro C, Seron D, Jacobs-Cachá C, et al. Revisiting experimental models of diabetic nephropathy. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2020.
104. Soler MJ, Riera M, Batlle D. New experimental models of diabetic nephropathy in mice models of type 2 diabetes: efforts to replicate human nephropathy. *Exp Diabetes Res*. 2012;2012:616313.
105. Azushima K, Gurley SB, Coffman TM. Modelling diabetic nephropathy in mice. *Nat Rev Nephrol*. 2017;14(1):48–56.
106. Song P, Huang W, Onishi A, Patel R, Kim YC, Ginkel C Van, et al. Knockout of Na⁺-glucose cotransporter SGLT1 mitigates diabetes-induced upregulation of nitric oxide synthase NOS1 in the macula densa and glomerular hyperfiltration. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2019 Jul 1;317(1):F207–17.
107. Li XC, Zhu D, Chen X, Zheng X, Zhao C, Zhang J, et al. Proximal tubule-specific deletion of the NHE3 (Na⁺/H⁺ Exchanger 3) in the kidney attenuates ang II (Angiotensin II)-Induced hypertension in Mice. *Hypertension*. 2019 Sep 1;74(3):526–35.
108. Zhao HJ, Wang S, Cheng H, Zhang M, Takahashi T, Fogo AB, et al. Endothelial nitric oxide synthase deficiency produces accelerated nephropathy in diabetic mice. *J Am Soc Nephrol*. 2006 Oct;17(10):2664–9.
109. Zhang MZ, Wang S, Yang S, Yang H, Fan X, Takahashi T, et al. Role of blood pressure and the renin-angiotensin system in development of diabetic nephropathy (DN) in eNOS ^{-/-} db/db mice. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2012 Feb;302(4).
110. Korzh V, Grunwald D. Nadine Dobrovolskaïa-Zavadskaïa and the dawn of developmental genetics. Vol. 23, *BioEssays*. Bioessays; 2001. p. 365–71.
111. Hudkins KL, Pichaiwong W, Wietecha T, Kowalewska J, Banas MC, Spencer

- MW, et al. BTBR Ob/Ob mutant mice model progressive diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2010 Sep;21(9):1533–42.
112. Peters V, Schmitt CP. Murine models of diabetic nephropathy. Vol. 120, *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*. Exp Clin Endocrinol Diabetes; 2012. p. 191–3.
113. Gallo LA, Ward MS, Fotheringham AK, Zhuang A, Borg DJ, Flemming NB, et al. Once daily administration of the SGLT2 inhibitor, empagliflozin, attenuates markers of renal fibrosis without improving albuminuria in diabetic db/db mice. *Sci Rep*. 2016 May 26;6.
114. Schreiber A, Shulhevich Y, Geraci S, Hesser J, Stsepankou D, Neudecker S, et al. Transcutaneous measurement of renal function in conscious mice. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2012 Sep;303(5):F783-8.
115. Brosius FC, Alpers CE, Bottinger EP, Breyer MD, Coffman TM, Gurley SB, et al. Mouse models of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(12):2503–12.
116. Gregor A, Kostrzewska E, Godorowska W. Determination of serum proteins in the presence of dextran by means of the Biuret reaction. *Infusionstherapie und Klin Ernährung - Forsch und Prax*. 1977;4(1):48–50.
117. Oliveira EM, Santos RAS, Krieger JE. Standardization of a fluorimetric assay for the determination of tissue angiotensin-converting enzyme activity in rats. *Brazilian J Med Biol Res*. 2000;33(7):755–64.
118. Santos RAS, Krieger EM, Greene LJ. An improved fluorometric assay of rat serum and plasma converting enzyme. *Hypertension*. 1985;7(2):244–52.
119. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001;25(4):402–8.
120. Hughes CS, Moggridge S, Müller T, Sorensen PH, Morin GB, Krijgsveld J. Single-pot, solid-phase-enhanced sample preparation for proteomics experiments. *Nat Protoc*. 2019 Jan 1;14(1):68–85.
121. Hughes CS, Foehr S, Garfield DA, Furlong EE, Steinmetz LM, Krijgsveld J. Ultrasensitive proteome analysis using paramagnetic bead technology. *Mol Syst Biol*. 2014 Oct;10(10):757.
122. Werner T, Sweetman G, Savitski MF, Mathieson T, Bantscheff M, Savitski MM. Ion coalescence of neutron encoded TMT 10-plex reporter ions. *Anal Chem*. 2014 Apr 1;86(7):3594–601.

9. BIBLIOGRAFÍA

123. Reichel M, Liao Y, Rettel M, Ragan C, Evers M, Alleaume AM, et al. In planta determination of the mRNA-binding proteome of arabidopsis etiolated seedlings. *Plant Cell*. 2016 Oct 1;28(10):2435–52.
124. Franken H, Mathieson T, Childs D, Sweetman GMA, Werner T, Tögel I, et al. Thermal proteome profiling for unbiased identification of direct and indirect drug targets using multiplexed quantitative mass spectrometry. *Nat Protoc*. 2015 Oct 29;10(10):1567–93.
125. R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing; 2008.
126. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*. 2015 Jan 6;43(7):e47.
127. Huber W, Von Heydebreck A, Sültmann H, Poustka A, Vingron M. Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. In: *Bioinformatics*. Oxford University Press; 2002.
128. Gatto L, Lilley KS. Msnbase-an R/Bioconductor package for isobaric tagged mass spectrometry data visualization, processing and quantitation. *Bioinformatics*. 2012 Jan;28(2):288–9.
129. Raudvere U, Kolberg L, Kuzmin I, Arak T, Adler P, Peterson H, et al. G:Profiler: A web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Res [Internet]*. 2019 Jul 1 [cited 2021 Jun 2];47(W1):W191–8. Available from: <https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>
130. UniProt [Internet]. [cited 2021 Jun 2]. Available from: <https://www.uniprot.org/>
131. Lee DK. Data transformation: A focus on the interpretation. *Korean J Anesthesiol*. 2020 Dec 1;73(6):503–8.
132. Montezano AC, Touyz RM. Oxidative stress, Noxs, and hypertension: Experimental evidence and clinical controversies. *Ann Med*. 2012 Jun;44(SUPPL. 1).
133. Østergaard JA, Cooper ME, Jandeleit-Dahm KAM. Targeting oxidative stress and anti-oxidant defence in diabetic kidney disease. Vol. 33, *Journal of Nephrology*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2020. p. 917–29.
134. Nørgaard SA, Briand F, Sand FW, Galsgaard ED, Søndergaard H, Sørensen DB, et al. Nephropathy in diabetic db/db mice is accelerated by high protein

- diet and improved by the SGLT2 inhibitor dapagliflozin. *Eur J Pharmacol.* 2019 Oct 5;860.
135. Romero CA, Orias M, Weir MR. Novel RAAS agonists and antagonists: Clinical applications and controversies. Vol. 11, *Nature Reviews Endocrinology.* Nature Publishing Group; 2015. p. 242–52.
 136. Wiese O, Zemlin AE, Pillay TS. Molecules in pathogenesis: angiotensin converting enzyme 2 (ACE2). *J Clin Pathol.* 2021 May;74(5):285–90.
 137. Chung S, Kim S, Son M, Kim M, Koh ES, Shin SJ, et al. Empagliflozin Contributes to Polyuria via Regulation of Sodium Transporters and Water Channels in Diabetic Rat Kidneys. *Front Physiol.* 2019;10.
 138. Pessoa TD, Campos LCG, Carraro-Lacroix L, Girardi ACC, Malnic G. Functional role of glucose metabolism, osmotic stress, and sodium-glucose cotransporter isoform-mediated transport on Na⁺/H⁺ exchanger isoform 3 activity in the renal proximal tubule. *J Am Soc Nephrol.* 2014 Sep;25(9):2028–39.
 139. Soler MJ, Lloveras J, Batlle D. Enzima conversiva de la angiotensina 2 y su papel emergente en la regulación del sistema renina-angiotensina. Vol. 131, *Medicina Clínica.* Ediciones Doyma, S.L.; 2008. p. 230–6.
 140. Coady MJ, El Tarazi A, Santer R, Bissonnette P, Sasseville LJ, Calado J, et al. MAP17 Is a necessary activator of renal Na⁺/glucose cotransporter SGLT2. *J Am Soc Nephrol.* 2017 Jan 1;28(1):85–93.
 141. Lanaspá MA, Giral H, Breusegem SY, Halaihel N, Baile G, Catalán J, et al. Interaction of MAP17 with NHERF3/4 induces translocation of the renal Na/Pi Ila transporter to the trans-Golgi. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2007 Jan;292(1).
 142. Pribanic S, Gisler SM, Bacic D, Madjdpour C, Hernando N, Sorribas V, et al. Interactions of MAP17 with the NaPi-Ila/PDZK1 protein complex in renal proximal tubular cells. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2003 Oct 1;285(4 54-4).
 143. Ketchem CJ, Khundmiri SJ, Gaweda AE, Murray R, Clark BJ, Weinman EJ, et al. Role of Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 1 in forward trafficking of the type Ila Na⁺-Pi cotransporter. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2015 Jul 15;309(2):F109–19.
 144. De Galan BE, Perkovic V, Ninomiya T, Pillai A, Patel A, Cass A, et al. Lowering blood pressure reduces renal events in type 2 diabetes. *J Am Soc Nephrol.* 2009 Apr;20(4):883–92.

9. BIBLIOGRAFÍA

145. Turner R, Holman R, Stratton I, Cull C, Frighi V, Manley S, et al. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. *Br Med J.* 1998 Sep 12;317(7160):703–13.
146. Strippoli GFM, Craig M, Deeks JJ, Schena FP, Craig JC. Effects of angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor antagonists on mortality and renal outcomes in diabetic nephropathy: Systematic review. Vol. 329, *British Medical Journal. BMJ*; 2004. p. 828–31.
147. Vallon V, Gerasimova M, Rose MA, Masuda T, Satriano J, Mayoux E, et al. SGLT2 inhibitor empagliflozin reduces renal growth and albuminuria in proportion to hyperglycemia and prevents glomerular hyperfiltration in diabetic Akita mice. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2014 Jan 15;306(2).
148. Schlimmer N, Kratz M, Böhm M, Baumhäkel M. Telmisartan, ramipril and their combination improve endothelial function in different tissues in a murine model of cholesterol-induced atherosclerosis. *Br J Pharmacol.* 2011 Jun;163(4):804–14.
149. Wright JT, Bakris G, Greene T, Agodoa LY, Appel LJ, Charleston J, et al. Effect of blood pressure lowering and antihypertensive drug class on progression of hypertensive kidney disease: Results from the AASK trial. *J Am Med Assoc.* 2002 Nov 20;288(19):2421–31.
150. Tikkanen I, Narko K, Zeller C, Green A, Salsali A, Broedl UC, et al. Empagliflozin reduces blood pressure in patients with type 2 diabetes and hypertension. *Diabetes Care.* 2015 Mar 1;38(3):420–8.
151. De Zeeuw D, Coll B, Andress D, Brennan JJ, Tang H, Houser M, et al. The endothelin antagonist atrasentan lowers residual albuminuria in patients with type 2 diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2014 May 1;25(5):1083–93.
152. Woods TC, Satou R, Miyata K, Katsurada A, Dugas CM, Klingenberg NC, et al. Canagliflozin Prevents Intrarenal Angiotensinogen Augmentation and Mitigates Kidney Injury and Hypertension in Mouse Model of Type 2 Diabetes Mellitus. *Am J Nephrol.* 2019 Apr 1;49(4):331–41.
153. Lin B, Koibuchi N, Hasegawa Y, Sueta D, Toyama K, Uekawa K, et al. Glycemic control with empagliflozin, a novel selective SGLT2 inhibitor, ameliorates cardiovascular injury and cognitive dysfunction in obese and type 2 diabetic mice. *Cardiovasc Diabetol.* 2014;13(1).
154. Habibi J, Aroor AR, Sowers JR, Jia G, Hayden MR, Garro M, et al. Sodium

- glucose transporter 2 (SGLT2) inhibition with empagliflozin improves cardiac diastolic function in a female rodent model of diabetes. *Cardiovasc Diabetol*. 2017 Jan 13;16(1).
155. Adingupu DD, Göpel SO, Grönros J, Behrendt M, Sotak M, Miliotis T, et al. SGLT2 inhibition with empagliflozin improves coronary microvascular function and cardiac contractility in prediabetic ob/ob *-/-* mice. *Cardiovasc Diabetol*. 2019 Feb 7;18(1).
 156. Scholtes RA, Muskiet MHA, Van Baar MJB, Hesp AC, Greasley PJ, Karlsson C, et al. Natriuretic effect of two weeks of dapagliflozin treatment in patients with type 2 diabetes and preserved kidney function during standardized sodium intake: Results of the dapasalt trial. *Diabetes Care*. 2021 Feb 1;44(2):440–7.
 157. Kidokoro K, Cherney DZI, Bozovic A, Nagasu H, Satoh M, Kanda E, et al. Evaluation of Glomerular Hemodynamic Function by Empagliflozin in Diabetic Mice Using In Vivo Imaging. *Circulation*. 2019 Jul 23;140(4):303–15.
 158. Griffin M, Rao VS, Ivey-Miranda J, Fleming J, Mahoney D, Maulion C, et al. Empagliflozin in heart failure: Diuretic and cardiorenal effects. *Circulation*. 2020;142(11):1028–39.
 159. Boels MGS, Avramut MC, Koudijs A, Dane MJC, Lee DH, Van Der Vlag J, et al. Atrasentan reduces albuminuria by restoring the glomerular endothelial glycocalyx barrier in diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2016 Aug 1;65(8):2429–39.
 160. Kern M, Klötting N, Mark M, Mayoux E, Klein T, Blüher M. The SGLT2 inhibitor empagliflozin improves insulin sensitivity in db/db mice both as monotherapy and in combination with linagliptin. *Metabolism*. 2016 Feb 1;65(2):114–23.
 161. Nagata T, Fukuzawa T, Takeda M, Fukazawa M, Mori T, Nihei T, et al. Tofogliflozin, a novel sodium-glucose co-transporter 2 inhibitor, improves renal and pancreatic function in db/db mice. *Br J Pharmacol*. 2013 Oct;170(3):519–31.
 162. Wang XN, Li Y, Meng L, Ding CY, Dong ZJ. Evaluation of influence of telmisartan on the pharmacokinetics and tissue distribution of canagliflozin in rats and mice. *Ann Palliat Med*. 2021;10(3):3086–96.
 163. Guest PC, Rahmoune H. Characterization of the db/db Mouse Model of Type 2 Diabetes. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc.; 2019. p.

9. BIBLIOGRAFÍA

- 195–201.
164. Korbut AI, Taskaeva IS, Bgatova NP, Muraleva NA, Orlov NB, Dashkin M V., et al. SGLT2 inhibitor empagliflozin and DPP4 inhibitor linagliptin reactivate glomerular autophagy in db/db mice, a model of type 2 diabetes. *Int J Mol Sci*. 2020 Apr 2;21(8).
 165. Rosenstock J, Jelaska A, Frappin G, Salsali A, Kim G, Woerle HJ, et al. Improved glucose control with weight loss, lower insulin doses, and no increased hypoglycemia with empagliflozin added to titrated multiple daily injections of insulin in obese inadequately controlled type 2 diabetes. In: *Diabetes Care*. American Diabetes Association Inc.; 2014. p. 1815–23.
 166. Terami N, Ogawa D, Tachibana H, Hatanaka T, Wada J, Nakatsuka A, et al. Long-term treatment with the sodium glucose cotransporter 2 inhibitor, dapagliflozin, ameliorates glucose homeostasis and diabetic nephropathy in db/db mice. *PLoS One*. 2014 Jun 24;9(6).
 167. Osataphan S, Macchi C, Singhal G, Chimene-Weiss J, Sales V, Kozuka C, et al. SGLT2 inhibition reprograms systemic metabolism via FGF21-dependent and -independent mechanisms. *JCI insight*. 2019 Mar 7;4(5).
 168. Ji W, Zhao M, Wang M, Yan W, Liu Y, Ren S, et al. Effects of canagliflozin on weight loss in high-fat diet-induced obese mice. *PLoS One*. 2017 Jun 1;12(6).
 169. Omori K, Nakamura A, Miyoshi H, Takahashi K, Kitao N, Nomoto H, et al. Effects of dapagliflozin and/or insulin glargine on beta cell mass and hepatic steatosis in db/db mice. *Metabolism*. 2019 Sep 1;98:27–36.
 170. Chou JC, Rollins SD, Ye M, Battle D, Fawzi AA. Endothelin receptor-a antagonist attenuates retinal vascular and neuroretinal pathology in diabetic mice. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2014 Mar 18;55(4):2516–25.
 171. Hudkins KL, Wietecha TA, Steegh F, Alpers CE. Beneficial effect on podocyte number in experimental diabetic nephropathy resulting from combined atrasentan and RAAS inhibition therapy. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2020 May 1;318(5):F1295–305.
 172. Tonneijck L, Muskiet MHA, Smits MM, Van Bommel EJ, Heerspink HJL, Van Raalte DH, et al. Glomerular hyperfiltration in diabetes: Mechanisms, clinical significance, and treatment. Vol. 28, *Journal of the American Society of Nephrology*. American Society of Nephrology; 2017. p. 1023–39.
 173. Tahara A, Kurosaki E, Yokono M, Yamajuku D, Kihara R, Hayashizaki Y, et al.

- Effects of sodium-glucose cotransporter 2 selective inhibitor ipragliflozin on hyperglycaemia, oxidative stress, inflammation and liver injury in streptozotocin-induced type 1 diabetic rats. *J Pharm Pharmacol*. 2014;66(7):975–87.
174. Motrapu M, Świdarska MK, Mesas I, Marschner JA, Lei Y, Valenzuela LM, et al. Drug testing for residual progression of diabetic kidney disease in mice beyond therapy with metformin, ramipril, and empagliflozin. *J Am Soc Nephrol*. 2020 Aug 1;31(8):1729–45.
175. Abdel-Wahab AF, Bamagous GA, Al-Harizy RM, ElSawy NA, Shahzad N, Ibrahim IA, et al. Renal protective effect of SGLT2 inhibitor dapagliflozin alone and in combination with irbesartan in a rat model of diabetic nephropathy. *Biomed Pharmacother*. 2018 Jul 1;103:59–66.
176. Miyata KN, Zhao S, Wu CH, Lo CS, Ghosh A, Chenier I, et al. Comparison of the effects of insulin and SGLT2 inhibitor on the Renal Renin-Angiotensin system in type 1 diabetes mice. *Diabetes Res Clin Pract*. 2020 Apr 1;162.
177. Wang XX, Levi J, Luo Y, Myakala K, Herman-Edelstein M, Qiu L, et al. SGLT2 protein expression is increased in human diabetic nephropathy: SGLT2 protein inhibition decreases renal lipid accumulation, inflammation, and the development of nephropathy in diabetic mice. *J Biol Chem*. 2017 Mar 31;292(13):5335–48.
178. Jha JC, Gray SP, Barit D, Okabe J, El-Osta A, Namikoshi T, et al. Genetic targeting or pharmacologic inhibition of NADPH oxidase Nox4 provides renoprotection in long-term diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2014 Jun 1;25(6):1237–54.
179. Jha JC, Thallas-Bonke V, Banal C, Gray SP, Chow BSM, Ramm G, et al. Podocyte-specific Nox4 deletion affords renoprotection in a mouse model of diabetic nephropathy. *Diabetologia*. 2016 Feb 1;59(2):379–89.
180. Wysocki J, Goodling A, Burgaya M, Whitlock K, Ruzinski J, Battle D, et al. Urine RAS components in mice and people with type 1 diabetes and chronic kidney disease. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2017 Aug 2;313(2):F487–94.
181. Onishi A, Fu Y, Patel R, Darshi M, Crespo-Masip M, Huang W, et al. A role for tubular Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 in the natriuretic effect of the SGLT2 inhibitor empagliflozin. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2020 Oct 1;319(4):F712–28.
182. van Bommel EJM, Muskiet MHA, van Baar MJB, Tonneijck L, Smits MM,

9. BIBLIOGRAFÍA

- Emanuel AL, et al. The renal hemodynamic effects of the SGLT2 inhibitor dapagliflozin are caused by post-glomerular vasodilatation rather than pre-glomerular vasoconstriction in metformin-treated patients with type 2 diabetes in the randomized, double-blind RED trial. *Kidney Int.* 2020 Jan 1;97(1):202–12.
183. Wysocki J, Ye M, Soler MJ, Gurley SB, Xiao HD, Bernstein KE, et al. ACE and ACE2 activity in diabetic mice. *Diabetes.* 2006 Jul;55(7):2132–9.
184. Ye M, Wysocki J, Naaz P, Salabat MR, LaPointe MS, Battle D. Increased ACE 2 and Decreased ACE Protein in Renal Tubules from Diabetic Mice: A Renoprotective Combination? *Hypertension.* 2004 May;43(5):1120–5.
185. Tikellis C, Johnston CI, Forbes JM, Burns WC, Burrell LM, Risvanis J, et al. Characterization of renal angiotensin - Converting enzyme 2 in diabetic nephropathy. *Hypertension.* 2003 Mar 1;41(3 1):392–7.
186. Wysocki J, Garcia-Halpin L, Ye M, Maier C, Sowers K, Burns KD, et al. Regulation of urinary ACE2 in diabetic mice. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2013 May 8;305(4).
187. Roca-Ho H, Riera M, Palau V, Pascual J, Soler MJ. Characterization of ACE and ACE2 expression within different organs of the NOD mouse. *Int J Mol Sci.* 2017 Mar;18(3).
188. Caires A, Convento MB, Castino B, Leme AM, Pessoa E de A, Aragão A, et al. Antioxidant effect of endothelin-1 receptor antagonist protects the rat kidney against chronic injury induced by hypertension and hyperglycemia. *J Bras Nefrol.* 2019 Oct 1;41(4):451–61.
189. Sen S, Chen S, Feng B, Iglarz M, Chakrabarti S. Renal, retinal and cardiac changes in type 2 diabetes are attenuated by macitentan, a dual endothelin receptor antagonist. In: *Life Sciences.* Life Sci; 2012. p. 658–68.
190. Minchenko AG, Stevens MJ, White L, Abatan OI, Komjáti K, Pacher P, et al. Diabetes-induced overexpression of endothelin-1 and endothelin receptors in the rat renal cortex is mediated via poly(ADP-ribose) polymerase activation. *FASEB J.* 2003;17(11):1514–6.
191. Ma C, De Baaij JHF, Millar PJ, Gault VA, De Galan BE, Bindels RJM, et al. Effect of Dapagliflozin Treatment on the Expression of Renal Sodium Transporters/Channels on High-Fat Diet Diabetic Mice. *Nephron.* 2019 May 1;142(1):51–60.

192. Cadenas S. Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. Vol. 1859, *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. Elsevier B.V.; 2018. p. 940–50.
193. Tzortzaki EG, Koutsopoulos A V., Dambaki KI, Lambiri I, Plataki M, Gordon MK, et al. Active remodeling in idiopathic interstitial pneumonias: Evaluation of collagen types XII and XIV. *J Histochem Cytochem*. 2006 Jun;54(6):693–700.
194. Schönborn K, Willenborg S, Schulz JN, Imhof T, Eming SA, Quondamatteo F, et al. Role of collagen XII in skin homeostasis and repair. *Matrix Biol*. 2020 Dec 1;94:57–76.
195. Eid AA, Gorin Y, Fagg BM, Maalouf R, Barnes JL, Block K, et al. Mechanisms of podocyte injury in diabetes role of cytochrome P450 and NADPH oxidases. *Diabetes*. 2009 May;58(5):1201–11.
196. Kocher O, Comella N, Tognazzi K, Brown LF. Identification and partial characterization of PDZK1: A novel protein containing PDZ interaction domains. *Lab Invest*. 1998 Jan;78(1):117–25.
197. Guijarro M V., Leal JFM, Fominaya J, Blanco-Aparicio C, Alonso S, Lleonat M, et al. MAP17 overexpression is a common characteristic of carcinomas. *Carcinogenesis*. 2007 Aug;28(8):1646–52.
198. Blasco T, Aramayona JJ, Alealde AI, Catalán J, Sarasa M, Sorribas V. Rat kidney MAP17 induces cotransport of Na-mannose and Na-glucose in *Xenopus laevis* oocytes. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2003 Oct 1;285(4 54-4).
199. Gisler SM, Pribanic S, Bacic D, Forrer P, Gantenbein A, Sabourin LA, et al. PDZK1: I. A major scaffolder in brush borders of proximal tubular cells. *Kidney Int*. 2003;64(5):1733–45.
200. Nourry C, Grant SGN, Borg JP. PDZ domain proteins: plug and play! Vol. 2003, *Science's STKE: signal transduction knowledge environment*. Sci STKE; 2003.
201. Murciano-Calles J. The conformational plasticity vista of pdz domains. Vol. 10, *Life*. MDPI AG; 2020. p. 1–13.
202. Sarma GN, Moody IS, Ilouz R, Phan RH, Sankaran B, Hall RA, et al. D-AKAP2:PKA RII:PDZK1 ternary complex structure: Insights from the nucleation of a polyvalent scaffold. *Protein Sci*. 2015 Jan 1;24(1):105–16.
203. Gisler SM, Madjdpour C, Bacic D, Pribanic S, Taylor SS, Biber J, et al. PDZK1: II. An anchoring site for the PKA-binding protein D-AKAP2 in renal proximal

9. BIBLIOGRAFÍA

- tubular cells. *Kidney Int.* 2003;64(5):1746–54.
204. Chen T, Kocinsky HS, Cha B, Murtazina R, Yang J, Tse CM, et al. Cyclic GMP kinase II (cGKII) inhibits NHE3 by altering its trafficking and phosphorylating NHE3 at three required sites: Identification of a multifunctional phosphorylation site. *J Biol Chem.* 2015 Jan 23;290(4):1952–65.
205. Zhao H, Wiederkehr MR, Fan L, Collazo RL, Crowder LA, Moe OW. Acute inhibition of Na/H exchanger NHE-3 by cAMP: Role of protein kinase a and NHE-3 phosphoserines 552 and 605. *J Biol Chem.* 1999 Feb 12;274(7):3978–87.
206. He P, Klein J, Yun CC. Activation of Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 by angiotensin II is mediated by inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) receptor-binding protein released with IP3 (IRBIT) and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem.* 2010 Sep 3;285(36):27869–78.
207. He P, Zhao L, No YR, Karvar S, Yun CC. The NHERF1 PDZ1 domain and IRBIT interact and mediate the activation of Na⁺/H⁺ exchanger 3 by ANG II. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2016 Aug 1;311(2):F343–51.
208. Riquier-Brison ADM, Leong PKK, Pihakaski-Maunsbach K, McDonough AA. Angiotensin II stimulates trafficking of NHE3, NaPi2, and associated proteins into the proximal tubule microvilli. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2010 Jan;298(1).
209. Reich HN, Oudit GY, Penninger JM, Scholey JW, Herzenberg AM. Decreased glomerular and tubular expression of ACE2 in patients with type 2 diabetes and kidney disease. *Kidney Int.* 2008 Dec;74(12):1610–6.
210. Mizuiri S, Hemmi H, Arita M, Ohashi Y, Tanaka Y, Miyagi M, et al. Expression of ACE and ACE2 in Individuals With Diabetic Kidney Disease and Healthy Controls. *Am J Kidney Dis.* 2008 Apr;51(4):613–23.

10. ANEXOS

10.1. PARÁMETROS FISIOLÓGICOS Y RENALES

En el siguiente apartado del anexo se muestran algunos datos adicionales de los parámetros fisiológicos y renales no expuestos en la sección de resultados.

10.1.a. Frecuencia cardíaca

No se observaron diferencias en la frecuencia cardíaca entre los grupos de ratones (Figura 10-1).

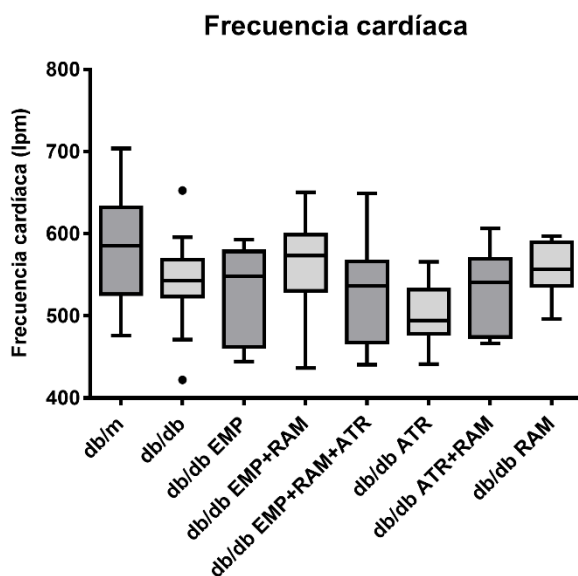


Figura 10-1 - Frecuencia cardíaca en los grupos db/m, db/db y los grupos tratados con empagliflozina, ramipril, atrasentán o sus combinaciones. La frecuencia cardíaca se midió en latidos por minuto. Se muestra el diagrama de cajas que presenta la distribución de los valores de frecuencia cardíaca en los diferentes grupos.

db/m: controles no diabéticos; **db/db:** db/db tratados con vehículo; **db/db EMP:** db/db tratados con empagliflozina; **db/db EMP+RAM:** db/db tratados con empagliflozina y ramipril; **db/db EMP+RAM+ATR:** db/db tratados con empagliflozina, ramipril y atrasentán; **db/db ATR:** db/db tratados con atrasentán; **db/db ATR+RAM:** db/db tratados con ramipril y atrasentán; **db/db RAM:** db/db tratados con ramipril. **PA:** Presión arterial.

10.1.b. Área del penacho glomerular

A pesar de que el área ajustada del penacho glomerular con al área glomerular total no mostraba diferencias entre los grupos de ratones, en el área del penacho sin ajustar sí se observaba un ligero incremento de la misma entre los ratones db/db tratados con vehículo y los controles no diabéticos (**Figura 10-2**). Sin embargo, estas diferencias no eran estadísticamente significativas.

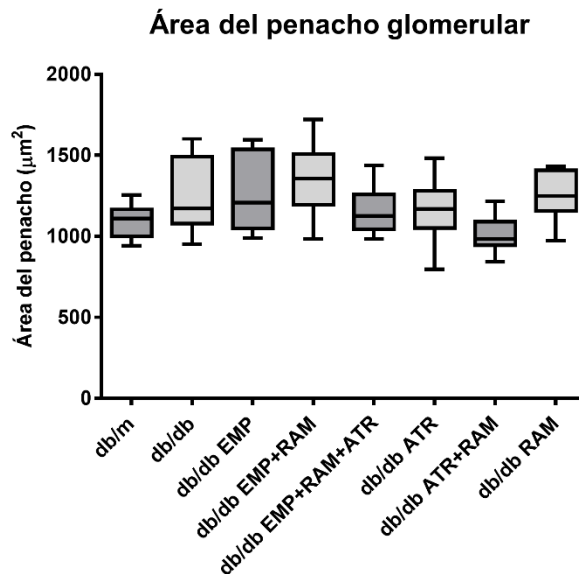


Figura 10-2 - Área del penacho glomerular en los grupos db/m, db/db y los grupos tratados con empagliflozina, ramipril, atrasentán o sus combinaciones. El área del penacho glomerular se midió en μm^2 . Se muestra el diagrama de cajas que presenta la distribución de los valores del área glomerular en los diferentes grupos.

db/m: controles no diabéticos; **db/db:** db/db tratados con vehículo; **db/db EMP:** db/db tratados con empagliflozina; **db/db EMP+RAM:** db/db tratados con empagliflozina y ramipril; **db/db EMP+RAM+ATR:** db/db tratados con empagliflozina, ramipril y atrasentán; **db/db ATR:** db/db tratados con atrasentán; **db/db ATR+RAM:** db/db tratados con ramipril y atrasentán; **db/db RAM:** db/db tratados con ramipril. **PA:** Presión arterial.

10.2. ESTUDIO DE PROTEÓMICA

En el siguiente apartado del anexo se muestran algunos datos adicionales del estudio de proteómica no incluidos en la sección de resultados.

10. ANEXOS

10.2.a. Proteínas diferenciales entre los ratones db/m y db/db tratados con vehículo

Se identificaron 131 *hit proteins* que se expresaban de forma diferencial entre los ratones db/m y los ratones db/db. 53 de estas 131 proteínas incrementaban en los ratones db/db no tratado y 78 disminuían. En las siguientes 2 tablas se presentan aquellas proteínas que incrementan y aquellas que disminuyen.

Tabla 10-1 - Proteínas que incrementan significativamente en el grupo db/db frente al db/m. Se muestra listado de las 53 *hit proteins* que incrementa en el modelo db/db y su correspondiente LogFC. Al tratarse de *hit proteins* todas presentan LogFC ≥ 1 y FDR $< 0,05$.

Gen	Proteína	Vía celular relacionada	Identificador de proteína	LogFC	FDR
Abcb1a	<i>ATP-dependent translocase ABCB1</i>	Transporte y traslocación	P21447	1,3764	<0,001
Abcb1b	<i>ATP-dependent translocase ABCB1</i>	Transporte y traslocación	B2RUR3 P06795	1,3742	<0,001
Abcc4	<i>Protein Abcc4</i>	Transporte y traslocación	E9Q236	1,3097	<0,001
Acaa2	<i>3-ketoacyl-CoA thiolase</i>	Metabolismo lipídico	Q8BWT1	1,2313	<0,001
Acot3	<i>Isoform 2 of Acyl-coenzyme A thioesterase 3</i>	Metabolismo lipídico	Q9QYR7-2	1,1197	<0,001
Acsf2	<i>Acyl-CoA synthetase family member 2, mitochondrial</i>	Metabolismo lipídico	Q8VCW8	1,9166	<0,001
Akr1c13	<i>Aldo-keto reductase family 1 member C13</i>	Procesos de oxidación y reducción	Q8VC28	1,0106	<0,001
Atp5d	<i>ATP synthase subunit delta, mitochondrial</i>	Cadena de respiración mitocondrial	Q4FK74 Q9D3D9	1,3324	<0,001
Bc089597	<i>Cis-retinol/3alpha hydroxysterol short-chain dehydrogenase-like protein</i>	Procesos de oxidación y reducción	Q8K3M1	1,3902	<0,001
Bhmt	<i>Betaine-homocysteine S-methyltransferase 1</i>	Transferasa	O35490	2,8953	<0,001
Calb1	<i>Calbindin</i>	Señalización intra o intercelular	P12658	1,1605	<0,001
Cbr1	<i>Carbonyl reductase 1</i>	Metabolismo de drogas y xenobióticos	B2RXY7 P48758	1,1976	<0,001
Cd2ap	<i>CD2-associated protein</i>	Citoesqueleto y adhesión celular	Q9JLQ0	1,3811	<0,001
Col12a1	<i>Collagen alpha-1(XII) chain</i>	Citoesqueleto y adhesión celular	E9PX70 Q60847 Q60847-2 Q60847-5	1,1105	<0,001
Cyp2a5	<i>Cytochrome P450 2A5</i>	Procesos de oxidación y reducción	Q91X75	1,3184	<0,001

Cyp2c44	<i>Cytochrome P450 2C44</i>	Metabolismo lipídico	E9Q5K4	1,1099	<0,001
Cyp2d26	<i>Cytochrome P450 2D26</i>	Procesos de oxidación y reducción	A0A0R4IZY2 Q8CIM7	1,9663	<0,001
Cyp4a14	<i>Cytochrome P450 4A14</i>	Procesos de oxidación y reducción	O35728	2,0803	<0,001
Ddc	<i>Aromatic-L-amino-acid decarboxylase</i>	Metabolismo de aminoácidos	O88533 Q5SUV8	1,0887	<0,001
Fhit	<i>Bis(5'-adenosyl)-triphosphatase</i>	Apoptosis	E9PVU9 E9PZ91 O89106	1,3533	<0,001
Ftcd	<i>Formimidoyltransferase-cyclodeaminase</i>	Metabolismo de aminoácidos	Q91XD4	1,0580	<0,001
Gldc	<i>Glycine dehydrogenase (decarboxylating), mitochondrial</i>	Procesos de oxidación y reducción	Q91W43	1,1564	<0,001
Gm10639	<i>Glutathione transferase</i>	Metabolismo de drogas y xenobióticos	E9Q6L7	1,9900	0,019
Gsto1	<i>Glutathione S-transferase omega-1</i>	Metabolismo de drogas y xenobióticos	O09131	1,5675	<0,001
H2afx	<i>Histone H2AX</i>	Reparación del DNA	P27661	1,6246	<0,001
Hacl1	<i>2-hydroxyacyl-CoA lyase 1</i>	Metabolismo lipídico	D3Y254 Q9QXE0	1,1356	<0,001
Hddc2	<i>5'-deoxynucleotidase HDDC2</i>	Hidrolasa	Q3SXD3	1,6676	<0,001
Hebp1	<i>Heme-binding protein 1</i>	Metabolismo de grupos hemo	A0A140T8J4 Q9R257	1,3119	<0,001
Hist1h1c	<i>Histone H1.2</i>	Regulación del DNA y transcripción	P15864 Q5SZA3	1,0674	<0,001
Hist1h1d	<i>Histone H1.3</i>	Regulación del DNA y transcripción	P43277 Q149Z9	4,6560	0,003
Hmga1	<i>High mobility group protein HMG-I/HMG-Y</i>	Regulación del DNA y transcripción	P17095	1,9277	<0,001
Hmgcs2	<i>Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial</i>	Metabolismo lipídico	P54869	3,2081	<0,001
Hpd	<i>4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase</i>	Metabolismo de aminoácidos	P49429	1,4188	<0,001
Ighm	<i>Immunoglobulin heavy constant mu</i>	Inmunidad e inflamación	A0A075B5P6 A0A075B6A0 P01872 P01872-2	1,1632	<0,001
Kynu	<i>Kynureninase</i>	Metabolismo de nucleótidos	A2ARD6 Q9CXF0	2,8615	<0,001
Lad1	<i>Ladinin-1</i>	Citoesqueleto y adhesión celular	P57016	1,4134	<0,001
Lyplal1	<i>Lysophospholipase-like protein 1</i>	Hidrolasa	E9QLB2	1,0741	<0,001
Maob	<i>Amine oxidase [flavin-containing] B</i>	Metabolismo de drogas y xenobióticos	Q8BW75	1,1292	<0,001
Mbl2	<i>Mannose-binding protein C</i>	Inmunidad e inflamación	P41317 Q3UEK1	1,2963	<0,001
Ndufv3	<i>Complex I-9kD</i>	Cadena de respiración mitocondrial	Q3U422 Q8BK30	1,3342	<0,001
Npl	<i>N-acetylneuraminate lyase</i>	Metabolismo carbohidratos	Q9DCJ9	1,2711	<0,001
Prodh2	<i>Hydroxyproline dehydrogenase</i>	Metabolismo de aminoácidos	Q8VCZ9	1,0741	<0,001

10. ANEXOS

Pycard	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing CARD</i>	Apoptosis	Q54AA2 Q9EPB4	1,5562	<0,001
Rab27a	<i>Small monomeric GTPase</i>	Exocitosis	Q544U7 Q9ERI2	1,0096	0,011
Serbp1	<i>Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein</i>	Apoptosis	A0A0N4SV32 A0A0N4SV40 A0A0N4SWH2 Q3UMP4 Q9CY58 Q9CY58-2 Q9CY58-3 Q9CY58-4	1,1606	<0,001
Slc38a3	<i>Sodium-coupled neutral amino acid transporter 3</i>	Transporte y traslocación	A0A0A6YWF5 A0A0A6YX60 Q9DCP2	1,3378	<0,001
Slc7a8	<i>Large neutral amino acids transporter small subunit 2</i>	Transporte y traslocación	Q9QXW9	1,0173	<0,001
Tyms	<i>Thymidylate synthase</i>	Metabolismo de nucleótidos	A0A0G2JF31 P07607 Q544L2	1,1424	<0,001
Ugt1a1	<i>UDP-glucuronosyl transferase 1A1</i>	Metabolismo de drogas y xenobióticos	Q63886	2,4886	0,016
Ugt1a10	<i>UDP-glucuronosyl transferase</i>	Metabolismo de drogas y xenobióticos	E9PXN7	2,7983	<0,001
Ugt1a2	<i>UDP-glucuronosyl transferase 1-2</i>	Metabolismo de drogas y xenobióticos	P70691	3,8879	<0,001
Uroc1	<i>Imidazolonepropionate hydrolase</i>	Metabolismo de aminoácidos	Q3UEL5 Q8VC12	1,4465	<0,001
Xpnpep2	<i>Xaa-Pro aminopeptidase 2</i>	Hidrolasa	B1AVD1 B1AVD2	1,7175	<0,001

Tabla 10-2 - Proteínas que disminuyen significativamente en el grupo db/db frente al db/m. Se muestra listado de las 78 *hit proteins* que disminuyen en el modelo db/db y su correspondiente LogFC.

Gen	Proteína	Vía celular relacionada	Identificador de proteína	LogFC	FDR
Aacs	<i>Acetoacetyl-CoA synthetase</i>	Metabolismo lipídico	Q9D2R0	-1,6348	<0,001
Ace	<i>Angiotensin-converting enzyme</i>	Carboxipeptidasa	P09470	-1,1944	<0,001
Acot12	<i>Acetyl-coenzyme A thioesterase</i>	Metabolismo lipídico	A2RSC2 Q9DBK0	-1,0536	<0,001
Acox1	<i>Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1</i>	Metabolismo lipídico	Q9R0H0 Q9R0H0-2	-1,4144	<0,001
Acox3	<i>Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 3</i>	Metabolismo lipídico	Q9EPL9	-1,3485	<0,001
Acsm3	<i>Acyl-coenzyme A synthetase ACSM3, mitochondrial</i>	Metabolismo lipídico	Q3UNX5 Q3UNX5-2	-2,9811	<0,001
Acy3	<i>N-acyl-aromatic-L-amino acid amidohydrolase (carboxylate-forming)</i>	Hidrolasa	Q91XE4	-1,7013	<0,001
Adh1	<i>Alcohol dehydrogenase 1</i>	Procesos de oxidación y reducción	P00329 Q3UKA4	-1,5038	<0,001

10. ANEXOS

Agps	<i>Alkylidihydroxyacetonephosphate synthase, peroxisomal</i>	Metabolismo lipídico	A2AL50 H3BKN2 Q8C011	-2,3629	<0,001
Akr1c14	<i>3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase type 1</i>	Procesos de oxidación y reducción	Q91WT7	-2,2860	<0,001
Akr1c18	<i>Aldo-keto reductase family 1 member C18</i>	Procesos de oxidación y reducción	Q8K023 Q8K023-2	-2,1434	<0,001
Alox15	<i>Polyunsaturated fatty acid lipoygenase ALOX15</i>	Metabolismo lipídico	A2CF88 P39654	-3,8372	<0,001
Amacr	<i>Alpha-methylacyl-CoA racemase</i>	Metabolismo lipídico	O09174	-1,6103	<0,001
Aqp4	<i>Aquaporin-4</i>	Transporte y traslocación	A0A0R4J0Z3 P55088 P55088-3	-1,2479	<0,001
Atp11a	<i>Phospholipid-transporting ATPase 1H</i>	Transporte y traslocación	E9Q3G7 P98197	-1,2387	<0,001
C5	<i>Complement C5</i>	Inmunidad e inflamación	P06684	-1,2386	0,011
C9	<i>Complement C9</i>	Inmunidad e inflamación	A0A0R4J032 P06683	-1,6322	0,001
Ca9	<i>Carbonic anhydrase 9</i>	Liasa	Q8VHB5	-1,3423	<0,001
Cat	<i>Catalase</i>	Procesos de oxidación y reducción	P24270	-1,1819	<0,001
Cd36	<i>Platelet glycoprotein 4</i>	Transporte y traslocación	Q08857 Q3UAI3	-1,6490	<0,001
Ces1f	<i>Carboxylesterase 1F</i>	Hidrolasa	Q91WU0	-1,4895	<0,001
Ces2c	<i>Acylcarnitine hydrolase</i>	Hidrolasa	Q91WG0	-1,2932	<0,001
Cml3	<i>N-acetyltransferase family 8 member 3</i>	Transferasa	Q9JIY8	-1,0632	<0,001
Crot	<i>Peroxisomal carnitine O-octanoyltransferase</i>	Metabolismo lipídico	Q9DC50	-1,9559	<0,001
Cyp2e1	<i>Cytochrome P450 2E1</i>	Metabolismo lipídico	Q05421	-1,0234	<0,001
Cyp4a12a	<i>Cytochrome P450 4A12A</i>	Procesos de oxidación y reducción	Q91WL5	-2,0408	<0,001
Cyp4b1	<i>Cytochrome P450 4B1</i>	Procesos de oxidación y reducción	Q3TNA0 Q64462	-1,8924	<0,001
Cyp51a1	<i>Lanosterol 14-alpha demethylase</i>	Metabolismo lipídico	Q8K0C4	-1,7124	<0,001
Cyp7b1	<i>Cytochrome P450 7B1</i>	Metabolismo lipídico	Q60991	-3,5689	<0,001
D930020b18rik	<i>RIKEN cDNA D930020B18 gene</i>	Incierta	D3Z3G0 F6XLN3	-1,0590	<0,001
Ddo	<i>D-aspartate oxidase</i>	Procesos de oxidación y reducción	Q922Z0	-1,3448	<0,001
Eci3	<i>Enoyl-CoA delta isomerase 3, peroxisomal</i>	Isomerasa	Q78JN3	-1,9488	<0,001
Ehhadh	<i>Peroxisomal bifunctional enzyme</i>	Metabolismo lipídico	Q9DBM2	-1,4849	<0,001
Far1	<i>Fatty acyl-CoA reductase 1</i>	Metabolismo lipídico	Q922J9 Q922J9-3 Q922J9-4	-1,1853	<0,001
Fmo5	<i>Flavin-containing monooxygenase 5</i>	Procesos de oxidación y reducción	P97872	-2,2760	<0,001
Ggct	<i>Gamma-glutamylcyclotransferase</i>	Liasa	Q9D7X8	-1,2236	<0,001
Gm853	<i>Gene model 853</i>	Incierta	Q3UNZ2	-2,4283	<0,001

10. ANEXOS

Gnpat	<i>Dihydroxyacetone phosphate acyltransferase</i>	Transferasa	P98192 Q545P6	-1,3607	<0,001
Gusb	<i>Beta-glucuronidase</i>	Hidrolasa	P12265	-1,1445	<0,001
Hacd2	<i>Very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 2</i>	Metabolismo lipídico	Q9D3B1	-1,4416	<0,001
Hsd17b11	<i>Estradiol 17-beta-dehydrogenase 11</i>	Metabolismo lipídico	Q9EQ06	-2,3349	<0,001
Hsd17b2	<i>Estradiol 17-beta-dehydrogenase 2</i>	Metabolismo lipídico	P51658	-1,8158	<0,001
Idi1	<i>Isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase 1</i>	Metabolismo lipídico	P58044	-1,0041	<0,001
Ifi47	<i>GTP-binding protein</i>	Actividad GTPasa	Q61635	-1,1229	0,021
Inmt	<i>Indolethylamine N-methyltransferase</i>	Transferasa	P40936	-1,0713	<0,001
Ldhd	<i>Probable D-lactate dehydrogenase, mitochondrial</i>	Procesos de oxidación y reducción	Q7TNG8	-1,4738	<0,001
Lpl	<i>Lipoprotein lipase</i>	Metabolismo lipídico	P11152	-1,0101	<0,001
Me1	<i>NADP-dependent malic enzyme</i>	Procesos de oxidación y reducción	P06801	-1,3576	<0,001
Mep1a	<i>Mepirin A subunit alpha</i>	Metaloproteasa	A0A0R4J043 P28825	-1,3869	<0,001
Mep1b	<i>Mepirin A subunit beta</i>	Inmunidad e inflamación	Q61847 Q61847-2	-1,5477	<0,001
Mup20	<i>Major urinary protein 20</i>	Feromona	Q5FW60	-2,2531	<0,001
Mup3	<i>Major urinary protein 3</i>	Unión a proteínas	P04939 Q3KQQ2	-3,2540	<0,001
Mup8 mup14	<i>Major urinary protein 8</i>	Unión a proteínas	A2AKN8 A2CEK7	-4,4245	<0,001
Nudt19	<i>Nucleoside diphosphate-linked moiety X motif 19</i>	Hidrolasa	P11930	-2,1158	<0,001
Odc1	<i>Ornithine decarboxylase</i>	Biosíntesis de poliaminas	P00860	-2,9189	<0,001
P04224	<i>H-2 class II histocompatibility antigen, E-K alpha chain</i>	Inmunidad e inflamación	P04224	-1,1882	0,046
Pecr	<i>Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase</i>	Metabolismo lipídico	Q3UXD9 Q99MZ7	-1,1616	<0,001
Pex11g	<i>Peroxisomal membrane protein 11C</i>	Vías de los peroxisomas	Q6P6M5	-1,2138	<0,001
Pipox	<i>Peroxisomal sarcosine oxidase</i>	Procesos de oxidación y reducción	Q3UEJ8 Q9D826	-1,1040	<0,001
Pxmp2	<i>Peroxisomal membrane protein 2</i>	Vías de los peroxisomas	Q5D073	-1,0963	<0,001
Reep5	<i>Receptor expression-enhancing protein</i>	Incierta	G3X8R0	-1,0695	<0,001
Serpina1e	<i>Alpha-1-antitrypsin 1-5</i>	Inhibidor de proteasas	Q00898	-3,9629	<0,001
Serpina3k	<i>Serine protease inhibitor A3K</i>	Inhibidor de proteasas	A0A0R4J0I1	-1,6908	0,031
Serpinf2	<i>Alpha-2-antiplasmin</i>	Inhibidor de proteasas	Q5ND35 Q5ND36 Q61247	-1,1845	0,008
Slc17a3	<i>Solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 3</i>	Transporte y traslocación	G5E894 Q5SZ92 Q5SZ93	-1,7322	<0,001
Slc1a4	<i>Neutral amino acid transporter A</i>	Transporte y traslocación	O35874 Q3UTP8	-1,0640	<0,001

Slc22a19	<i>Solute carrier family 22 member 19</i>	Transporte y traslocación	Q8VCA0	-1,1503	0,006
Slc22a26	<i>Solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 26</i>	Transporte y traslocación	E9Q6M5 Q91WJ2	-3,0761	<0,001
Slc22a28 Slc22a30	<i>Solute carrier family 22, member 30</i>	Transporte y traslocación	B2RT89 Q96LX3	-2,2051	<0,001
Slc22a7	<i>Solute carrier family 22 member 7</i>	Transporte y traslocación	A0A0R4J122 Q91WU2 Q91WU2-2	-3,1627	<0,001
Slc3a1	<i>Neutral and basic amino acid transport protein rBAT</i>	Transporte y traslocación	Q91WV7	-1,0814	<0,001
Slco1a1	<i>Solute carrier organic anion transporter family member 1A1</i>	Transporte y traslocación	Q53ZW9 Q9QXZ6	-4,7276	<0,001
Tgm1	<i>Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase K</i>	Queratinización	Q9JLF6	-1,4299	<0,001
Tmem30a	<i>Cell cycle control protein 50A</i>	Transporte y traslocación	Q8VEK0	-1,1864	<0,001
Ugt3a1	<i>UDP-glucuronosyltransferase 3A1</i>	Transferasa	Q3UP75	-1,0181	<0,001
Ugt3a2	<i>UDP-glucuronosyltransferase 3A2</i>	Transferasa	Q8JZZ0	-1,1198	<0,001
Usp2	<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 2</i>	Ciclo celular	O88623 O88623-2 O88623-3 O88623-4	-1,1221	<0,001
Vill	<i>Villin-like protein</i>	Unión a proteínas	G5E8C6	-1,1339	<0,001

10.2.b. Correlación de la expresión de la proteína MAP17 y otras proteínas asociadas a la membrana

Considerando que la proteína MAP17 interactúa con otros transportadores y proteínas de membrana como el SGLT2 o PDZK1, se estudio la correlación de la expresión de esta con otras proteínas de interés. Estas proteínas de interés fueron seleccionadas mediante la revisión bibliográfica de estudios previos y basándonos en los resultados del estudio de proteómica.

MAP17, que interactúa con SGLT2, mostró una correlación moderada pero estadísticamente significativa en su expresión, con un coeficiente de correlación de 0,432 (**Figura 10-3**). Asimismo, MAP17 demostró una correlación fuerte con el factor regulador de NHE número 1 (NHERF1) (**Figura 10-3**). En este caso el coeficiente de correlación era de 0,616 y se puede observar que el incremento de MAP17 va muy

10. ANEXOS

estrechamente ligado a un incremento de la expresión proteica de NHERF1. Por último, no se identificó correlación entre MAP17 y NHE3, mientras que la correlación de MAP17 y NHE3 rozaba la significación estadística (**Figura 10-3**).

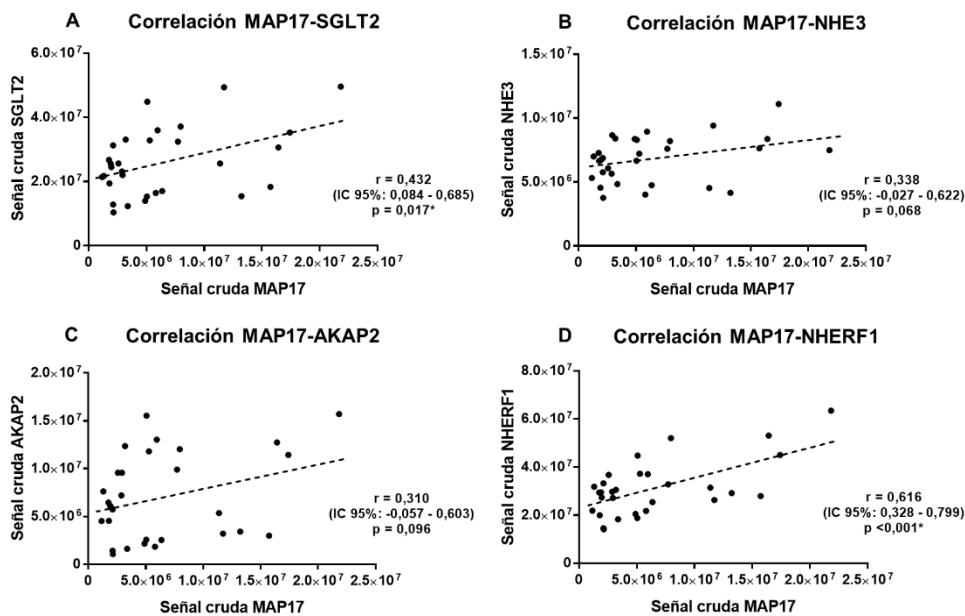


Figura 10-3 - Estudios de correlación de la expresión de MAP17 con otros transportadores y proteínas de membrana. Se muestran los resultados del test de correlación de Pearson con el coeficiente r y su intervalo de confianza, así como la significación estadística de la asociación. Cada punto en la gráfica se ubica en base a la señal de MAP17 y de la proteína estudiada. **A:** estudio de correlación de MAP17 y SGLT2; **B:** estudio de correlación de MAP17 y NHE3; **C:** estudio de correlación de MAP17 y AKAP2; **D:** estudio de correlación de MAP17 y NHERF1.

10.3. PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES

Del presente trabajo de tesis derivaron varios artículos y comunicaciones que se presentaron en congresos tanto nacionales como internacionales. Estas publicaciones y comunicaciones se detallan a continuación.

10.3.a. Publicaciones relacionadas

Giralt-López, A.; Molina-Van den Bosch, M.; **Vergara, A.**; García-Carro, C.; Seron, D.; Jacobs-Cachá, C.; Soler, M.J. Revisiting Experimental Models of Diabetic Nephropathy. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 3587. doi.org/10.3390/ijms21103587. PMID 32438732.



International Journal of
Molecular Sciences



Review

Revisiting Experimental Models of Diabetic Nephropathy

Anna Giralt-López ^{1,†}, Mireia Molina-Van den Bosch ^{1,†}, Ander Vergara ^{1,2,†},
Clara Garcia-Carro ^{1,2}, Daniel Seron ^{1,2}, Conxita Jacobs-Cachá ^{1,*} and Maria José Soler ^{1,2,*}

¹ Nephrology Research Group, Vall d'Hebrón Institut de Recerca, 08035 Barcelona, Spain; anna.giralt@alumni.vhir.org (A.G.-L.); mireiamoli@gmail.com (M.M.-V.d.B.); vergara.ander@gmail.com (A.V.); clara.garcia@vhebron.net (C.G.-C.); dseron@vhebron.net (D.S.)

² Nephrology Department, Vall d'Hebrón Hospital, 08035 Barcelona, Spain

* Correspondence: conxita.jacobs@vhir.org (C.J.-C.); mjsoler01@gmail.com (M.J.S.)

† These authors have contributed equally.

Received: 14 April 2020; Accepted: 13 May 2020; Published: 19 May 2020



Abstract: Diabetes prevalence is constantly increasing and, nowadays, it affects more than 350 million people worldwide. Therefore, the prevalence of diabetic nephropathy (DN) has also increased, becoming the main cause of end-stage renal disease (ESRD) in the developed world. DN is characterized by albuminuria, a decline in glomerular filtration rate (GFR), hypertension, mesangial matrix expansion, glomerular basement membrane thickening, and tubulointerstitial fibrosis. The therapeutic advances in the last years have been able to modify and delay the natural course of diabetic kidney disease (DKD). Nevertheless, there is still an urgent need to characterize the pathways that are involved in DN, identify risk biomarkers and prevent kidney failure in diabetic patients. Rodent models provide valuable information regarding how DN is set and its progression through time. Despite the utility of these models, kidney disease progression depends on the diabetes induction method and susceptibility to diabetes of each experimental strain. The classical DN murine models (Streptozotocin-induced, Akita, or obese type 2 models) do not develop all of the typical DN features. For this reason, many models have been crossed to a susceptible genetic background. Knockout and transgenic strains have also been created to generate more robust models. In this review, we will focus on the description of the new DN rodent models and, additionally, we will provide an overview of the available methods for renal phenotyping.

Keywords: diabetic nephropathy; experimental models of DN; renal function; histological lesions

Vergara, A.; Jacobs-Cachá, C.; Molina-Van den Bosch, M.; Domínguez-Báez, P.; Benito, B.; García-Carro, C.; Serón, D.; Soler, M.J. Effect of ramipril on kidney, lung and heart ACE2 in a diabetic mice model. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2021, 529, 111263. doi.org/10.1016/j.mce.2021.111263. PMID 33811970.



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular and Cellular Endocrinology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mce



Effect of ramipril on kidney, lung and heart ACE2 in a diabetic mice model

Ander Vergara^{a,b,1}, Conxita Jacobs-Cachá^{b,c,*}, Mireia Molina-Van den Bosch^b, Pamela Domínguez-Báez^b, Begoña Benito^{c,d}, Clara García-Carro^{a,b,c}, Daniel Serón^{a,b,c}, María José Soler^{a,b,c,**}

^a Nephrology Department, Vall d'Hebrón Hospital Universitari, Vall d'Hebrón Barcelona Hospital Campus, Barcelona, Spain

^b Nephrology Research Group, Vall d'Hebrón Research Institute (VHIR), Vall d'Hebrón Hospital Universitari, Vall d'Hebrón Barcelona Hospital Campus, Barcelona, Spain

^c Cardiology Group, Vall d'Hebrón Research Institute (VHIR), Barcelona, Spain

^d Cardiology Department, Vall d'Hebrón Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

^e REDinREN (RD16/0009/0030), Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
ACE2
COVID-19
Diabetes
RAAS blockade
Lung

ABSTRACT

Background: Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is responsible for the current coronavirus disease 2019 (COVID-19). The main organ affected in this infection is the lung and the virus uses the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a receptor to enter the target cells. In this context, a controversy raised regarding the use of renin-angiotensin system (RAAS) blockers, as these drugs might increase ACE2 expression in some tissues and potentially increase the risk for SARS-CoV-2 infection. This is specially concerning in diabetic patients as diabetes is a risk factor for COVID-19.

Methods: 12-week old diabetic mice (db/db) were treated with ramipril, or vehicle control for 8 weeks. Non-diabetic db/m mice were included as controls. ACE2 expression and activity were studied in lung, kidney and heart of these animals.

Results: Kidney ACE2 activity was increased in the db/db mice as compared to the db/m ($143.2\% \pm 23\%$ vs $100\% \pm 22.3\%$, $p = 0.004$), whereas ramipril had no significant effect. In the lung, no differences were found in ACE2 when comparing db/db mice to db/m and ramipril also had no significant effect. In the heart, diabetes decreased ACE2 activity ($83\% \pm 16.8\%$, vs $100\% \pm 23.1\%$ $p = 0.02$), and ramipril increased ACE2 significantly ($83\% \pm 16.8\%$ vs $98.2\% \pm 15\%$, $p = 0.04$).

Conclusions: In a mouse model of type 2 diabetes, ramipril had no significant effect on ACE2 activity in either kidneys or in the lungs. Therefore, it is unlikely that RAAS blockers or at least angiotensin-converting enzyme inhibitors increase the risk of SARS-CoV-2 infection through increasing ACE2.

10.3.b. Comunicaciones relacionadas

10.3.b.I. Comunicaciones en congresos internacionales

Vergara, A.; Jacobs Cachá, C.; Domínguez Báez, P.; Molina-Van den Bosch, M.; Giralt-López, A.; García-Carro, C.; Serón, D.; Soler, M.J. Ramipril Decreases Lung and Kidney Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) in Diabetic Mice: Lessons for COVID-19 (Abstract). *J. Am. Soc. Nephrol.* 2020, 31: 320.

PO0852

Ramipril Decreases Lung and Kidney Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) in Diabetic Mice: Lessons for COVID-19 Infection

Ander Vergara,^{1,2} Conxita Jacobs Cachá,² Pamela Domínguez Báez,² Mirela Molina Van den Bosch,² Anna Giralt-López,² Clara García-Carro,^{1,2} Daniel Serón,^{1,2} Maria Jose Soler.^{1,2} Nephrology Research Group *Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain;* *Vall d'Hebron Institut de Recerca, Barcelona, Spain.*

Background: ACE2 is a component of the renin-angiotensin system(RAS) that mainly degrades angiotensin II to angiotensin(1-7). It is expressed in renal tubular cells. Lung type 2 alveolar cells also express ACE2 where it acts as a receptor for SARS-CoV-2, which is responsible for the current coronavirus disease 2019(COVID-19) pandemic. A controversy raised regarding the use of RAS blockers in COVID-19 patients despite its demonstrated efficacy in cardiovascular disease. We studied the effect of ramipril on ACE2 expression in experimental diabetes.

Methods: 12 weeks old diabetic db/db mice were given ramipril(8 mg/Kg/day) or vehicle during 8 weeks. db/m mice were used as controls. ACE2 expression and enzymatic activity were studied in kidney, heart and lung.

Results: In non-treated db/db, ACE2 mRNA expression was increased in kidney(p<0.0001) and ramipril treatment reversed this effect. In heart, ACE2 expression decreased in db/db when compared to db/m(p=0.028) and ramipril had no effect. We found no differences in lung. ACE2 enzymatic activity was increased 23% in kidney and 22% in lung of db/db mice when compared to db/m. Ramipril treatment decreased ACE2 activity 25% in the lung and 13% in the kidney when compared to untreated db/db. In the heart, ACE2 activity tended to decrease in db/db mice when compared to db/m, and increased with ramipril, but did not exceed the cardiac ACE2 activity of the db/m.

Conclusions: ACE2 is increased in the kidney and in the lung, and decreased in the heart of diabetic mice. Ramipril treatment restores ACE2. Our results suggest that diabetes and hypertension may *per se* be risk factors for COVID-19 and not the treatment with ACE inhibitors, which may exert a protective effect on COVID-19 infection.

Funding: Government Support - Non-U.S.

10. ANEXOS

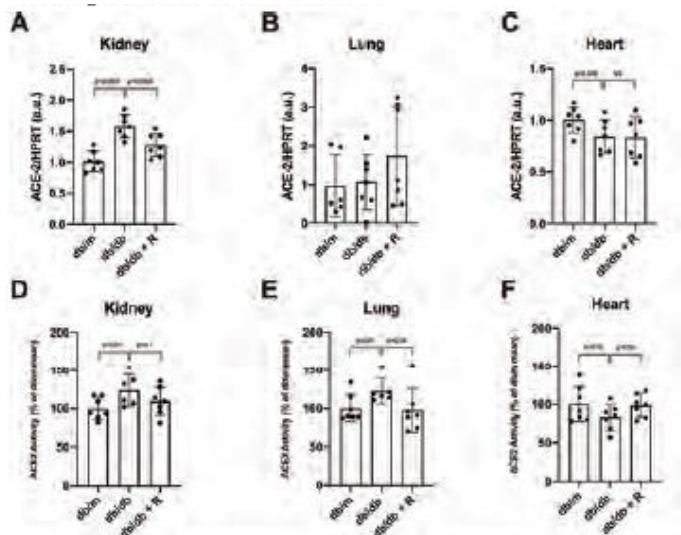


Figure 1. ACE2 gene expression and activity in kidney (A and D), lung (B and E) and heart (C and F) of dox, doxdo and doxdo + R treated with ramipril.

Vergara, A.; Molina, M.; Jacobs Cachá, C.; Domínguez, P.; Benito, B.; Agraz, I.; Serón Micas, D.; Soler, M.J. Dual blockade of endothelin a receptor (ET_A) and sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2) to prevent diabetic kidney disease progression on a type 2 murine model (Abstract). *Nephrol. Dial. Transplant.* 2021, 36(Issue Supplement_1): gfab143.005. doi.org/10.1093/ndt/gfab143.005.

FC088

DUAL BLOCKADE OF ENDOTHELIN A RECEPTOR (ETA) AND SODIUM-GLUCOSE COTRANSPORTER 2 (SGLT2) TO PREVENT DIABETIC KIDNEY DISEASE PROGRESSION ON A TYPE 2 MURINE MODEL

Ander Vergara Arana^{1,2}, Mireia Molina², Conxita Jacobs Cachá², Pamela Dominguez², Begoña Benito³, Irene Agraz^{1,2}, Daniel Seron Micas^{1,2}, María José Soler^{1,2}

¹Vall d'Hebron University Hospital, Nephrology, Barcelona, Spain, ²Vall d'Hebron Research Institute, Nephrology Group, Barcelona, Spain and ³Vall d'Hebron University Hospital, Cardiology, Barcelona, Spain

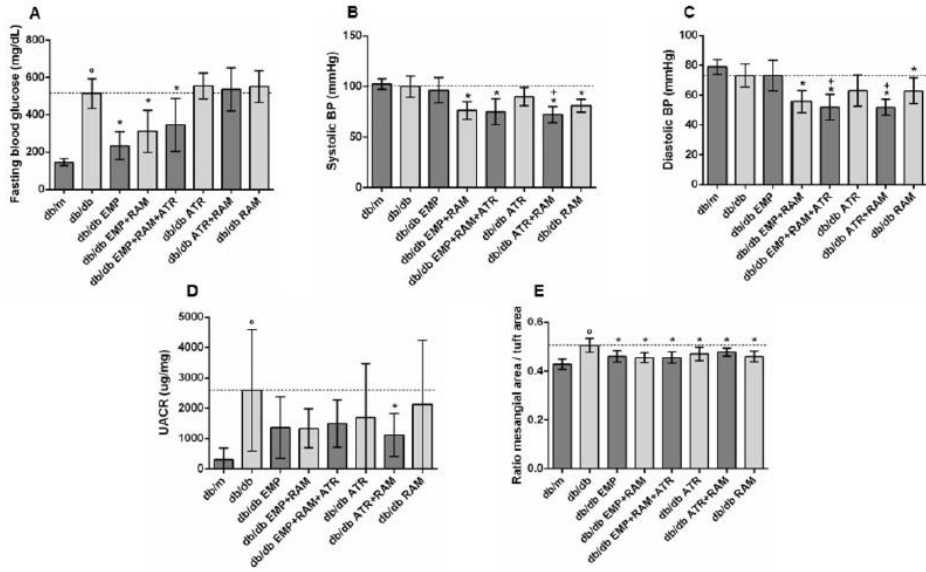
BACKGROUND AND AIMS: Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors (SGLT2i) and endothelin A receptor (ETA) antagonist have shown nephroprotective effects in diabetic kidney disease (DKD) through blood pressure and urinary albumin loss reduction. The protective impact and the pathways through which they exert this protection have not yet been elucidated. This study aimed to investigate the effects of the add-on therapy of SGLT2i and ETA antagonists on a type 2 diabetes murine model.

METHOD: 12 weeks-old db/db mice were treated for 8 weeks with different combinations of empagliflozin 10 mg/Kg/day (SGLT2i), atrasentan 7 mg/Kg/day (ETA antagonist) or ramipril 8 mg/Kg/day. A group of non-diabetic mice (db/m) was included as negative control. In vivo variables were recorded during treatment, including transdermal measured glomerular filtration rate (GFR) and urinary albumin-to-creatinine ratio (UACR). After treatment kidneys were preserved for histopathological studies.

RESULTS: After 8 weeks of treatment empagliflozin decreased fasting blood glucose alone or in combination with atrasentan or ramipril (234.2 mg/dL mean reduction in three treated groups when compared to db/db). Ramipril decreased blood pressure (BP) in monotherapy or in add-on therapy. Empagliflozin or atrasentan alone did not have any effect on blood pressure, but combination of atrasentan and ramipril had a synergistic effect and reduced both systolic (9.0 mmHg, CI 95%: -16.3 to -1.1; P=0.028) and diastolic BP (11.9 mmHg, CI 95%: -17.7 to -3.1; P=0.005) when compared to ramipril alone. The combination of atrasentan and ramipril significantly reduced UACR (1002 ug/mg, CI 95%: -2312.0 to -32.4; P=0.043). Empagliflozin treatment alone or in combination also reduced UACR (686.0 ug/mg mean reduction in three treated groups), although this reduction was not statistically significant. In the kidney, empagliflozin in monotherapy or combination reduced glomerular mesangial matrix expansion (4.85% mean mesangial reduction in three treated groups). Treatments with atrasentan and ramipril also reduced mesangial matrix expansion.

CONCLUSION: Both empagliflozin and atrasentan demonstrated possible beneficial effects in DKD by reducing BP, UACR, and mesangial matrix expansion. The add-on therapy did not show greater protective effects in the analysed variables. Further studies are needed to characterize these protective effects and pathways involved.

10. ANEXOS



FC088 Figure: Effects of treatments with empagliflozin and atrasentan. A: fasting blood glucose, B: systolic blood pressure (BP), C: diastolic blood pressure (BP), D: urinary albumin-to-creatinine ratio (UACR), E: mesangial area in relation to tuft area measured by periodic acid-Schiff. db/m: non-diabetic controls, db/db: diabetic mice, EMP: empagliflozin, RAM: ramipril, ATR: atrasentan.

10.3.b.II. Comunicaciones en congresos nacionales

Vergara, A.; Jacobs-Cachá, C.; Molina-Van den Bosch, M.; Domínguez-Báez, P.; Benito, B.; García-Carro, C.; Serón, D.; Soler, M.J. Caracterización de un modelo murino de diabetes tipo 2. ¿Qué variables podemos medir in vivo? (Abstract). Nefrología. 2020, 40(S1):5-10. doi:10.3265/Nefrología.pre2020.Oct.n40.vS1.

15 CARACTERIZACIÓN DE UN MODELO MURINO DE DIABETES TIPO 2. ¿QUÉ VARIABLES PODEMOS MEDIR IN VIVO?

A. VERGARA¹, C. JACOBS-CACHÁ², M. MOLINA-VAN DEN BOSCH³, P. DOMÍNGUEZ-BÁEZ², B. BENITO¹, C. GARCÍA-CARRO¹, D. SERÓN¹, M.J. SOLER¹

¹NEFROLOGÍA. HOSPITAL UNIVERSITARIO VALL D'HEBRON (BARCELONA),²GRUPO NEFROLOGÍA. INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN VALL D'HEBRON (BARCELONA),³CARDIOLOGÍA. HOSPITAL UNIVERSITARIO VALL D'HEBRON (BARCELONA)

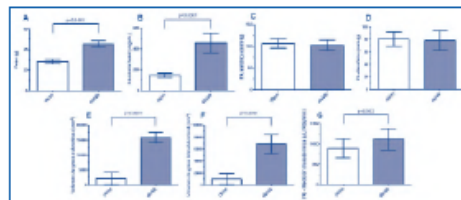
Introducción: Los modelos murinos diabéticos son ampliamente utilizados para el estudio de la nefropatía diabética y de la lesión cardiovascular derivada de esta enfermedad. La mayoría de los análisis se realizan con muestras biológicas obtenidas tras la eutanasia del ratón. No obstante, existen numerosas variables que podemos medir in vivo para caracterizar un modelo.

Material y Método: En 130 ratones db/db y en 15 controles no diabéticos db/m (BKS. Cg-Dock7m +/- Lep^{db}/J) se midió el peso y la glucemia basal a las 12 semanas de edad. La presión arterial (PA) se registró de manera no invasiva entre las 11-12 semanas de edad empleando un manguito de cola. El volumen de grasa subcutánea y grasa visceral intraabdominal se midieron a las 11 semanas de edad mediante tomografía computarizada. El filtrado glomerular (FG) se midió de forma no invasiva a las 11 semanas de edad con un método de medición transdérmica que emplea FITC-sinistrina.

Resultados: Los ratones db/db presentaban un mayor peso (45,6±3,1g) y una glucemia basal más elevada (458,3±93,4mg/dL) que sus controles no diabéticos (28,2±2,1 g y 145±21,8mg/dL respectivamente). El aumento de peso se correlacionó con un mayor volumen de grasa subcutánea e intraabdominal en los ratones db/db (15.907,0±1.673,8mm³ y 6.877,2±1.567,3mm³ respectivamente) frente a los ratones db/m (2.189,1±1.999,0mm³ y 1.007,4±905,1mm³ respectivamente). No se encontraron diferencias en la PA. Los ratones db/db presentaban una mayor tasa de filtración glomerular (1.115,0±269,6μL/100g/min) que sus controles db/m (888,7±230,0μL/100g/min).

Conclusión: El ratón diabético db/db presenta hiperglucemia y un incremento del peso corporal a expensas de la masa grasa tanto subcutánea como visceral. No exhibe diferencias de PA respecto a sus controles no diabéticos, pero sí tiene un mayor FG, que sugiere hiperfiltración diabética. Todas las mediciones realizadas in vivo, puede repetirse a lo largo de un procedimiento experimental para caracterizar la evolución del modelo.

Figure 1. Características basales de los ratones db/db y db/m. A Peso; B Glucemia basal; C Presión arterial (PA) sistólica; D PA diastólica; E Volumen de grasa subcutánea; F Volumen de grasa intraabdominal; G Filtrado glomerular (FG).



Vergara, A.; Jacobs-Cachá, C.; Molina-Van den Bosch, M.; Domínguez-Báez, P.; Benito, B.; García-Carro, C.; Serón, D.; Soler, M.J. Ramipril disminuye el enzima conversor de angiotensina 2 (ECA2) pulmonar y renal en ratones diabéticos. Lecciones para el COVID19 (Abstract). Nefrología. 2020, 40(S1): 70-74. doi:10.3265/Nefrologia.pre2020.Oct.n40.vS1.

245

RAMIPRIL DISMINUYE EL ENZIMA CONVERSOR DE ANGIOTENSINA 2 (ECA2) PULMONAR Y RENAL EN RATONES DIABÉTICOS. LECCIONES PARA EL COVID-19

A. VERGARA¹, C. JACOBS-CACHÁ², M. MOLINA-VAN DEN BOSCH³, P. DOMÍNGUEZ-BÁEZ³, B. BENITO¹, C. GARCÍA-CARRO¹, D. SERÓN¹, M.J. SOLER¹

¹NEFROLOGÍA. HOSPITAL UNIVERSITARIO VALL D'HEBRON (BARCELONA),²GRUPO NEFROLOGÍA. INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN VALL D'HEBRON (BARCELONA),³CARDIOLOGÍA. HOSPITAL UNIVERSITARIO VALL D'HEBRON (BARCELONA)

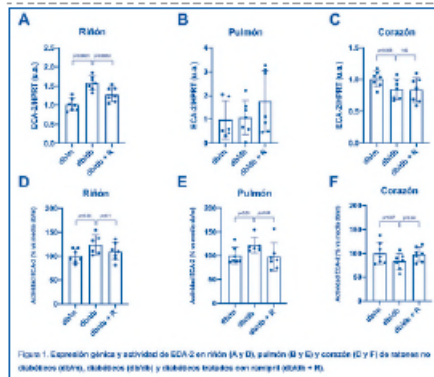
Introducción: El enzima conversor de angiotensina-2 (ECA2) es un enzima del sistema renina-angiotensina, que degrada la angiotensina-II a angiotensina-(1-7). En el riñón y en el pulmón se expresa principalmente en células epiteliales (células tubulares renales y células alveolares tipo-2 respectivamente). En el pulmón, el ECA2 actúa como receptor de entrada para el SARS-CoV-2, responsable de la actual pandemia por coronavirus-2019 (COVID-19).

Material y Método: Administramos durante 8 semanas ramipril (8mg/Kg/día) o vehículo a un modelo de diabetes tipo 2 (ratones db/db). Se incluyeron controles no diabéticos (db/m). La expresión de ECA2 y la actividad del enzima se analizaron en riñón, pulmón y corazón.

Resultados: En ratones diabéticos no tratados, la expresión del mRNA de ECA2 incrementó en el riñón(p<0,0001) y el tratamiento con ramipril revertía dicho incremento. En el corazón, se redujo la expresión de mRNA de ECA2 en ratones db/db respecto a db/m(p=0,028) y el tratamiento con ramipril no modificó dicha expresión. No identificamos diferencias en la expresión mRNA en pulmón. La actividad enzimática de ECA2 incrementó un 23% en riñón y un 22% en pulmón de los ratones db/db respecto a los controles. El tratamiento con ramipril en db/db, disminuyó un 13% la actividad renal y un 25% la actividad pulmonar respecto a db/db no tratados (diferencias significativas). En el corazón, la actividad de ECA2 disminuyó en db/db respecto a db/m y el ramipril incrementó la actividad de ECA2 a valores similares a los db/m.

Conclusión: En ratones diabéticos la expresión génica y la actividad de ECA2 se encuentran incrementados en el pulmón y el riñón, mientras que disminuyen en el corazón. El tratamiento con ramipril restaura los niveles de ECA2. Nuestros resultados sugieren que son la propia diabetes o la hipertensión los factores de riesgo para el COVID-19 y no el tratamiento con inhibidores del ECA, que podrían incluso ejercer un efecto protector.

Figura 1.



10.4. FINANCIACIÓN

El presente trabajo de tesis pudo llevarse a cabo gracias a la financiación recibida a través de las siguientes becas y ayudas:

-Fondos de Investigación en Salud, PI17/00257. Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) - Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Investigadora principal: Dra. María José Soler Romeo.

-Red de Investigación renal, RD16/0009/0030. Instituto de Salud Carlos III - Redes temáticas de investigación cooperativa en salud (RETICS). Investigador principal: Daniel Serón Micas.