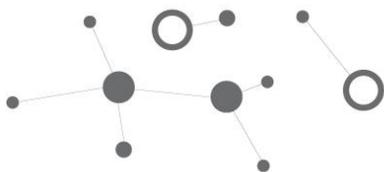




FUNDACIÓN H. A.
BARCELÓ
FACULTAD DE MEDICINA



TÍTULO: PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA DOPAMINÉRGICO RENAL EN FISIOPATOGENIA DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL Y EL DAÑO RENAL EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE SÍNDROME METABÓLICO.

DIRECTOR: Choi, Marcelo

**INVESTIGADORES COLABORADORES: Rukavina Mikusic, Natalia.
Kouyoumdzian, Nicolás. Robbesaul, Gabriel.**

SEDE-LUGAR: Buenos Aires. Instituto Alberto C Taquini de Investigaciones en Medicina Traslacional, Laboratorio de Fisiopatología Cardiometabólica y Renal. Marcelo T de Alvear 2270, 4º piso.

PERIODO: 2017-2020

CONTACTO DEL AUTOR: marcelinkchoi@yahoo.com.ar

Índice

I. Resumen /Abstrac

Antecedentes: El sistema de renina angiotensina (SRA) y el sistema dopaminérgico renal (SDR) actúan como sistemas autocrinos y paracrinos que regulan el manejo e inflamación renal del sodio y sus alteraciones se han asociado con el desarrollo de hipertensión y daño renal. Casi el 30-50% de los pacientes hipertensos tienen resistencia a la insulina (IR), con una fuerte correlación entre hiperinsulinemia y microalbuminuria.

Objetivo: El objetivo de este proyecto fue demostrar la participación del SDR en la fisiopatología de la hipertensión arterial y el daño renal en un modelo de sobrecarga crónica de fructosa. En este sentido, se evaluó la existencia de un desequilibrio entre el SRA y el SDR asociado a IR, hipertensión y daño renal inducido por sobrecarga de fructosa (F), como también evaluar la prevención o retraso de dicho desequilibrio mediante la inhibición farmacológica del SRA con losartán.

Materiales / Métodos: Noventa y seis ratas Sprague-Dawley machos se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos y se estudiaron a las 4, 8 y 12 semanas: grupo de control (C4, C8 y C12; agua para beber); grupo sobrecarga de fructosa (F4, F8 y F12; solución de fructosa al 10% p / v para beber); grupo de control tratado con losartán (L) (L4, L8 y L12; losartán 30 mg / kg / día, en agua de bebida); y grupo sobrecarga de fructosa más losartán (F + L4, F + L8 y F + L12, en solución de fructosa).

Resultados: la F indujo alteraciones metabólicas y hemodinámicas, así como un desequilibrio entre ambos sistemas, caracterizado por un aumento en los niveles de angiotensina II renal y sobreexpresión de AT1R, reducción de la excreción urinaria de dopamina, aumento de la excreción de L-dopa (aumento del índice de L-dopa / dopamina) y regulación en menos del D1R y de los transportadores tubulares de dopamina OCT-2, OCT-N1 y OCTN totales. Este desequilibrio fue acompañado por una sobreexpresión de la Na⁺, K⁺-ATPasa y de los marcadores proinflamatorios (NF-κB, TNF-α, IL-6) y pro-fibróticos (TGF-β1 y colágeno) a nivel tubular como de marcadores de daño renal (microalbuminuria y expresión de nefrina reducida). Losartán previno las alteraciones metabólicas y hemodinámicas inducidas por la F desde la semana 4. El aumento del índice de L-dopa/dopamina urinaria y la disminución de la expresión renal del D1R asociada a F también fueron prevenidos por losartan desde la semana 4. El mismo patrón se observó para la expresión renal de OCT / OCTNs, Na⁺, K⁺-ATPasa, para los marcadores proinflamatorios y pro-fibróticos a partir de la semana 8. Losartán previno la aparición de microalbuminuria y la reducción de la expresión de nefrina en semana 12.

Conclusión: Los resultados de este proyecto proporcionan una nueva visión sobre los mecanismos por los cuales un sistema prohipertensivo y proinflamatorio, como SRA, regula a la baja otro sistema antihipertensivo y antiinflamatorio como el SDR. Además, proponemos el uso del índice L-dopa / dopamina como marcador bioquímico de disfunción renal en estados caracterizados por retención de sodio, resistencia a la insulina y/o hipertensión, y como un predictor de respuesta al tratamiento y seguimiento de estos procesos.

II. Introducción:

a. Planteamiento del Problema (pregunta problema) y su contextualización

La hipertensión esencial es la patología crónica con mayor prevalencia e incidencia en todo el mundo [1]. El manejo renal del sodio es un factor determinante en la regulación de los niveles de presión

arterial y está controlado por diversos factores endocrinos, autocrinos y neurogénicos, que se pueden dividir en dos grupos: un grupo causa retención de sodio y vasoconstricción mientras que el otro, causa natriuresis y vasodilatación [2,3]. Durante muchos años, se ha establecido la existencia de una sobreactivación del sistema de angiotensina renina intrarrenal (SRA) como mecanismo primario de vasoconstricción renal, reabsorción de sodio y desarrollo de hipertensión [4]. Sin embargo, muchos estudios han destacado la participación de otro factor local, la dopamina renal, formada principalmente en células tubulares proximales a partir de la L-dopa filtrada, como un sistema contrarregulador de los efectos hipertensivos de la angiotensina II (Ang II), argumentando que un funcionamiento normal del sistema dopaminérgico renal (SDR) es esencial para el mantenimiento de la presión arterial normal [3]. Apoyando esta teoría, se ha demostrado una interacción compleja entre el SRA y el SDR, con efectos opuestos y contrarreguladores que operan a diferentes niveles [3,5]. Uno de los objetivos principales de ambos sistemas es la bomba Na^+ , K^+ -ATPasa, una enzima cuya alteración se ha asociado con la retención de sodio y la hipertensión [6]. Muchos factores que regulan el transporte renal de sodio también pueden mediar la respuesta inmune, participando en procesos de inflamación, fibrosis y daño renal [7]. En este contexto, Ang II renal y DA pueden modular la inflamación, controlando funciones cuyas alteraciones conducen a hipertensión y daño renal [8-10]. Por otro lado, alrededor del 30 al 50% de los pacientes con hipertensión esencial tienen resistencia a la insulina (IR), con una fuerte correlación entre la hiperinsulinemia y la microalbuminuria [11,12]. Se ha descrito que IR está presente en varios modelos de animales hipertensos, incluidas las ratas hipertensas espontáneamente y las alimentadas con alta fructosa [13]. En este último modelo, la IR conduce a una forma adquirida de hipertensión en la que el aumento de la presión arterial no está determinado genéticamente, sino que es inducido por la dieta [13]. Se desconoce hasta el día de hoy, si el SDR se encuentra alterado en ratas con sobrecarga de fructosa (F), como tampoco se conoce la existencia de un desequilibrio entre el SRA y el SDR en este modelo, así como su asociación con hipertensión, inflamación y daño renal [14, 15]. El objetivo del estudio fue demostrar que el SDR se encuentra alterado en el modelo experimental de IR por sobrecarga de fructosa, y que la misma es producto de la existencia de un desequilibrio entre el SRA y el SDR, a favor del primero y que regula en menos al segundo, y que este desequilibrio se asocia al desarrollo de hipertensión y daño renal inflamatorio inducido por F. Asimismo para confirmar los resultados se evaluará si la inhibición farmacológica del SRA mediante el bloqueo con losartan puede prevenir este desequilibrio y evitar los efectos nocivos hemodinámicos y renales. Finalmente, estudiamos el comportamiento del índice L-dopa/dopamina urinario con el propósito de postularlo como un marcador bioquímico potencial de disfunción renal en estados caracterizados por retención de sodio, resistencia a la insulina y / o hipertensión.

b. Justificación y Relevancia

El cumplimiento de los objetivos del presente proyecto permitirá el discernimiento y la comprensión de los mecanismos mediante los cuales el SDR contribuye a mejorar la excreción de sal y agua y reducir los efectos inflamatorios, pudiendo aportar nuevas evidencias sobre las causas etiopatogénicas y los mecanismos involucrados en el desarrollo fisiopatológico de la hipertensión arterial y el daño renal por inflamación y abriendo la posibilidad de que se considere a la dopamina renal como un agente nefroprotector potencial para futuras nuevas estrategias terapéuticas. La demostración de estos hallazgos confirmará la posibilidad de utilizar agentes que favorezcan al sistema dopaminérgico renal, a través de la inhibición del sistema contrarregulador (el SRA) y que actualmente están en el mercado como el losartán. Los resultados de este proyecto también permitirán postular al índice urinario L-dopa/dopamina como marcador precoz de disfunción renal previo al daño estructural evidenciado por la presencia de microalbuminuria en situaciones patológicas de alta prevalencia y con impacto renal

como el síndrome metabólico. De confirmarse la utilidad del índice L-Dopa/dopamina en este contexto fisiopatológico, sentará el primer antecedente que podría permitir el empleo de este parámetro bioquímico en futuros estudios clínicos con la finalidad de evaluar su utilidad como marcador diagnóstico, como predictor de la respuesta al tratamiento o como seguimiento de la hipertensión arterial y del daño renal inflamatorio. Asimismo, y también con mirada a la medicina traslacional, se podrá evaluar que sucede en cuanto al desarrollo de hipertensión arterial e injuria renal en pacientes bajo tratamiento crónico con agentes que mejoran el sistema dopaminérgico renal, como los pacientes con enfermedad de Parkinson que presentan alto riesgo cardiovascular. La posible alteración de este sistema en estos contextos podría brindar nuevos indicios sobre la patogénesis de la hipertensión arterial esencial como así también la posibilidad de desarrollar nuevos blancos terapéuticos.

c. Objetivos: General y Especifico

Los objetivos generales de este proyecto consisten en comprobar la existencia de alteraciones presentes en el SDR a nivel renal en el modelo experimental de SM producto de una sobreactivación del SRA, así como también evaluar la prevención de esta alteración del SDR mediante el tratamiento con losartan. Asimismo, se estudiará la asociación de este desequilibrio entre ambos sistemas (SRA y SDR) con los cambios que se produzcan en los parámetros hemodinámicos y funcionales renales y en la expresión de marcadores de inflamación, fibrosis y daño renal. Por último, se estudiará el comportamiento del índice urinario L-dopa/dopamina, con el propósito de postularlo como potencial biomarcador bioquímico de disfunción renal, asociando su alteración a la aparición posterior de daño renal estructural por sobrecarga de fructosa, así como también, evaluando su respuesta al tratamiento con losartan.

Por lo tanto, los objetivos específicos del siguiente proyecto son:

- 1) Determinar parámetros metabólicos y nutricionales que permitan caracterizar el desarrollo de SM en el modelo experimental: glucemia, insulinemia, HOMA-IR, colesterol, triglicéridos plasmáticos, ingesta de bebida, alimento, calorías y peso corporal.
- 2) Determinar los niveles de expresión renal de Ang II y su receptor AT1, como marcadores del SRA intrarrenal.
- 3) Determinar la producción renal de dopamina mediante la determinación de la excreción urinaria de L-Dopa y dopamina (índice urinario L-dopa/dopamina).
- 4) Caracterizar el nivel de expresión de los transportadores tubulares involucrados en la regulación de la biodisponibilidad de L-dopa y dopamina renal: LATs, OCTs y OCTNs, así como del receptor dopaminérgico D1.
- 5) Determinar parámetros de función y daño renal (diuresis, clearance de creatinina, excreción urinaria de sodio, excreción fraccional de sodio y microalbuminuria) y parámetros hemodinámicos como la PAS.
- 6) Determinar si como consecuencia del desbalance entre el SDR y el SRA, a favor de este último, se incrementa la actividad y expresión de la Na⁺, K⁺-ATPasa renal, como así también la expresión de marcadores de inflamación (NF-κB, IL-6, TNF-α), fibrosis (TGFβ1 y colágeno) y de daño renal glomerular (nefrina).
- 7) Determinar si los cambios en el índice L-dopa/dopamina urinario se correlacionan con los cambios en la presión arterial y anteceden a la aparición de daño renal.
- 8) Administrar losartan para determinar si el bloqueo del SRA se asocia a una prevención/atenuación de todos los cambios detallados anteriormente (a nivel metabólico, hemodinámico y de función y daño renal). La mayor actividad del SDR como consecuencia de la administración de losartan, se

comprobará evaluando si el incremento del índice L-dopa/dopamina se previene y si la expresión de los transportadores LATs, OCTs, OCT-Ns y del receptor D1 se normaliza.

9) Determinar la utilidad del índice L-dopa/dopamina como biomarcador de disfunción renal previo al daño estructural por sobrecarga de fructosa, así como de respuesta al tratamiento con losartan.

De esta manera, el cumplimiento de estos objetivos, aportarán nuevas evidencias acerca de los mecanismos mediante los cuales un sistema prohipertensivo y proinflamatorio como el SRA puede regular en menos a otro sistema antihipertensivo y antiinflamatorio como el SDR, estableciendo un circuito de retroalimentación positiva para el desarrollo de la HTA y la inflamación renal. Finalmente, los resultados de este proyecto permitirían postular al índice L-Dopa/dopamina como posible biomarcador diagnóstico, como predictor de la respuesta al tratamiento así como de seguimiento de la HTA y del daño renal inflamatorio.

d. Marco conceptual

La hipertensión arterial es la patología crónica de mayor prevalencia e incidencia mundial, endemia cosmopolita con un 20 a 25 % de incidencia en la población y con- causa de las principales patologías cardiovasculares, que junto con sus complicaciones constituyen la primera causa de muerte con una incidencia actual del 50% de morbimortalidad [1]. Por otra parte, aproximadamente un 30-50% de los pacientes hipertensos poseen insulinoresistencia, y a su vez ésta se asocia a la hipertensión arterial, diabetes mellitus, dislipemia y obesidad [2]. Se ha descrito que la insulinoresistencia está presente en varios modelos de animales hipertensos, incluyendo las ratas alimentadas con fructosa [3]. En este sentido, existen evidencias que demuestran una relación entre la insulinoresistencia y el sistema dopaminérgico renal en la génesis de la hipertensión arterial. Así, se ha demostrado que la inhibición de la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa causada por dopamina se encuentra significativamente atenuada en ratas Zucker obesas hipertensas [4]. También se observó tanto en pacientes con hipertensión esencial como en ratas con insulinoresistencia por sobrecarga de fructosa, una menor excreción urinaria de dopamina y un menor contenido endógeno renal de la amina inversamente proporcional a los niveles de presión arterial [5,6]. La dopamina renal es necesaria para mantener niveles de presión arterial y función renal normales. La estimulación de receptores D_1 induce vasodilatación, natriuresis y diuresis, mientras que los D_2 poseen acciones antiinflamatorias [7]. La activación D_1 incrementa la excreción renal de sodio al inhibir diferentes transportadores encargados de su reabsorción tubular, como la Na^+ , K^+ -ATPasa [8,9]. La dopamina también regula la respuesta inmune y la reacción inflamatoria. Se ha demostrado que la dopamina inhibe la liberación de $\text{IFN}\gamma$, IL-2, e IL-4 y la producción de IL-12p40 [10,11]. En el riñón, la dopamina reduce la infiltración de monocitos, la expresión de IL-6 y mejora la función renal posterior al trasplante [12,13]. También, en ratones hipertensos *knock out* del receptor de D_2 , está aumentada la producción de especies reactivas de oxígeno [14]. Si bien el paso limitante para la síntesis de dopamina intratubular es la captación de su precursor, la L-Dopa, a través de dos transportadores apicales del túbulo proximal (LAT-1 y LAT-2) [15], poco se conoce sobre los mecanismos que regulan la captación y transporte de la L-Dopa en las células del túbulo proximal. En este sentido, se desconoce hasta el momento qué efectos pueden tener sobre ellos la insulina como así también si estos transportadores están alterados en modelos de hipertensión arterial como la producida por sobrecarga de fructosa y que impacto tiene su alteración sobre los niveles de presión arterial y el daño renal inflamatorio. En resumen, este proyecto intenta esclarecer si la hipertensión y el daño renal asociado a insulinoresistencia por sobrecarga de fructosa se acompaña de modificaciones simultáneas en el SRA y en consecuencia en el SDR y si estos cambios se revierten al bloquear farmacológicamente el SRA.

III. Metodología

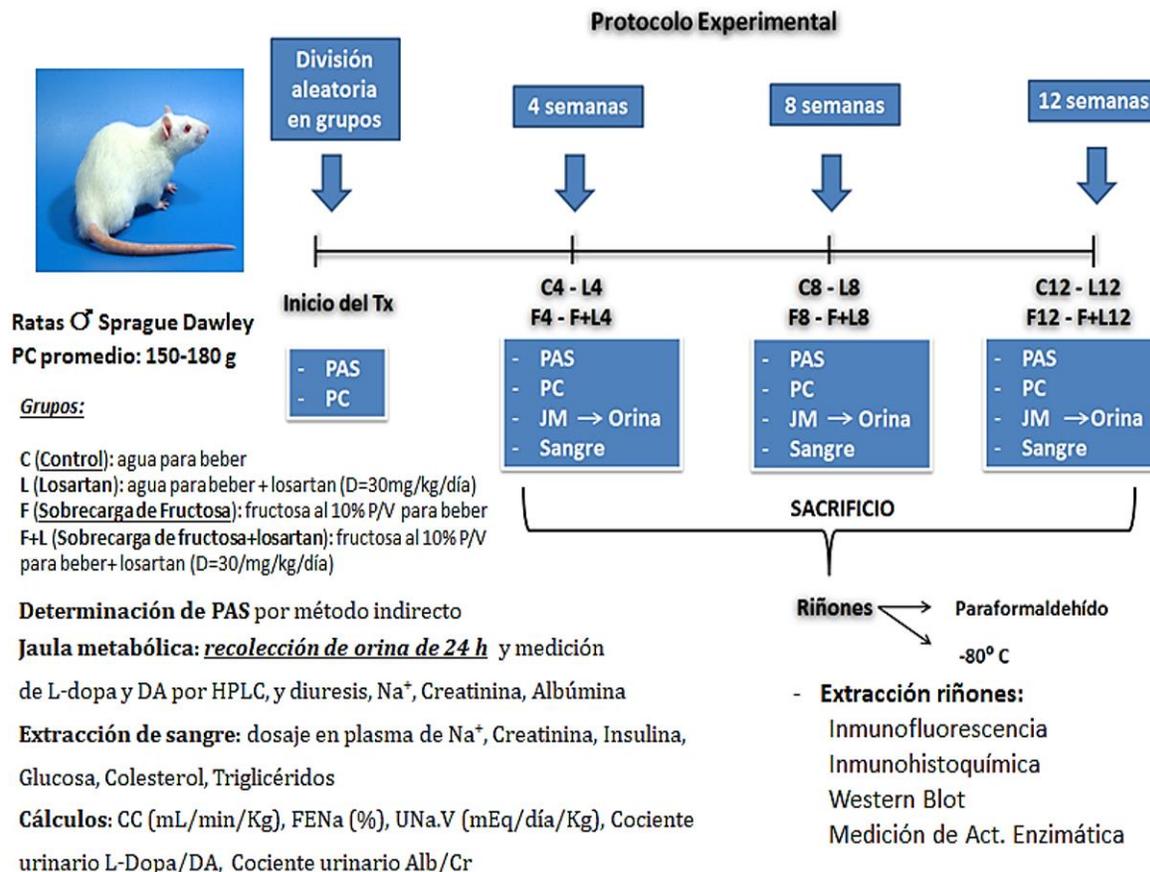
a. Tipo de estudio

Estudio experimental básico.

Diseño experimental: Al día 0, las ratas fueron divididas en los siguientes grupos experimentales:

- Grupo control (C): con dieta balanceada + agua de bebida corriente ad libitum
- Grupo con sobrecarga de fructosa (F): con dieta balanceada + fructosa en el agua de bebida (10% p/v) ad libitum
- Grupo control tratado con losartan (L): ídem grupo C + losartan en el agua de bebida (Dosis= 30mg/kg/día)
- Grupo con sobrecarga de fructosa tratado con losartan (F+L): ídem grupo F + losartan en el agua de bebida (Dosis= 30mg/kg/día).

Todos los grupos fueron estudiados durante los siguientes períodos: a) 4 semanas; b) 8 semanas; c) 12 semanas, con un n= 6-8 /grupo/ período. La figura siguiente esquematiza el protocolo experimental de manera resumida.



C4: Grupo control 4 semanas; L4: Grupo Losartan 4 semanas; F4: Grupo Fructosa 4 semanas; F+L4: Grupo Fructosa con Losartan 4 semanas; C8: Grupo control 8 semanas; L8: Grupo Losartan 8 semanas; F8: Grupo Fructosa 8 semanas; F+L8: Grupo Fructosa con Losartan 8 semanas; C12: Grupo control 12 semanas; L12: Grupo Losartan 12 semanas; F12: Grupo Fructosa 12 semanas; F+L12: Grupo Fructosa con Losartan 12 semanas. CC: clearance de creatinina; D: dosis; FENa: excreción

fraccional de sodio; JM: Jaula metabólica; PAS: presión arterial sistólica; PC: peso corporal; UNaV: excreción urinaria de sodio.

Al inicio del experimento, ratas macho Sprague -Dawley de 150-180 gramos de peso corporal fueron divididas aleatoriamente en 12 grupos experimentales (n=6-8 por grupo): C4, L4, F4, F+L4; C8, L8, F8, F+L8; C12, L12, F12, F+L12. Los valores de peso corporal y presión arterial sistólica se determinaron basalmente y al final de cada período experimental. Previo al sacrificio, los animales fueron colocados en jaulas metabólicas para recolectar orina de 24 horas, con el objetivo de llevar a cabo determinaciones nutricionales y de función renal. Asimismo, se obtuvieron muestras de sangre para determinar parámetros metabólicos y de función renal. Luego del sacrificio, se extirparon los riñones de los animales, los que se procesaron diferencialmente para obtener muestras para realizar determinaciones de expresión proteica por inmunofluorescencia, inmunohistoquímica y western blot, y de actividad enzimática.

b. Muestra

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho, de 150 a 180 gramos de peso corporal al inicio del experimento. Todos los experimentos se llevaron a cabo respetando las normas de ética que prescriben las reglamentaciones internacionales en la materia y de acuerdo a los principios de cuidado de animales de experimentación (protocolo aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) con Res CD 2100-15; EXP-UBA:0035638/15). Los animales fueron mantenidos con ciclos de 12 horas de luz/oscuridad, bajo condiciones de temperatura (22 °C) y humedad (50-70%) controladas. Hasta el día del sacrificio, los animales tuvieron libre acceso a la bebida y fueron alimentados con dieta balanceada para roedores (Asociación Cooperativas Argentinas, Buenos Aires, Argentina) con la siguiente composición (p/p): 20% proteínas, 3% grasas, 2% fibra, 6% minerales y 69% almidón más suplementos vitamínicos. Las ratas se aclimataron al ambiente por 5 días y posteriormente se dividieron en los grupos experimentales al comienzo del estudio.

c. Ámbito de estudio

Laboratorio de Fisiopatología Cardiometabólica y Renal, Instituto Alberto C. Taquini de Investigaciones en Medicina Traslacional, IATIMET, UBA-CONICET.

d. Fuentes e instrumento de recolección de datos

Control del peso corporal y de la presión arterial:

El peso corporal de todos los animales fue registrado al comienzo del tratamiento, durante el mismo y al final de cada período experimental. La PAS se determinó antes de comenzar el estudio y la semana previa al sacrificio (semanas 0, 4, 8 y 12) a través del método indirecto pletismográfico mediante esfingomanómetro en la cola de la rata, usando un manguito inflable y un micrófono conectado a un amplificador Grass D.C. (modelo 7DAC, Grass Instruments Co. Quincy, MA, USA) acoplado a un polígrafo (modelo 79D, Grass Instruments Co. Quincy, MA, USA). Los animales fueron entrenados tres veces por semana al procedimiento de medición de presión arterial, desde la semana previa al cambio dietético. Las sesiones de entrenamiento tuvieron como objetivo adaptar a las ratas al ingreso a los cepos y a la inflación deflación del manguito de presión, sin registro de los valores de la PAS. En cada sesión, tanto de entrenamiento como de toma de PAS, las ratas fueron

primero aclimatadas a la manipulación y al medio externo en un ambiente termostatzado y silencioso por 40 minutos. Se consideró como valor de PAS al promedio de 5 determinaciones por rata.

RECOLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE ORINA:

Al finalizar cada período experimental, mediante la utilización de jaulas metabólicas, se recolectaron muestras de orina de 24 horas de todos los animales. El volumen urinario se determinó por gravimetría. Las muestras de orina obtenidas se utilizaron para determinar la diuresis de 24 horas así como las concentraciones urinarias de sodio, creatinina, albúmina, L dopa y DA. La diuresis se expresó en mL/24 horas/kg de peso corporal. Los valores de sodio, creatinina y albúmina urinarios se midieron mediante autoanalizador (analizador automatizado Spectrum CCX, Abbott diagnostics, Abbott Park, IL, USA) por método espectrofotométrico. Para determinar la concentración urinaria de L-dopa y DA por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), una fracción de orina fue recolectada en tubos de polietileno conteniendo 100 µl de HCl 6N.

Determinación de microalbuminuria como marcador de daño renal: A partir de los valores de concentración urinaria de albúmina y creatinina obtenidos en orina de 24 horas mediante el uso de jaulas metabólicas, se determinó la relación albúmina/creatinina urinaria. La presencia de microalbuminuria se definió como una relación albúmina/creatinina urinaria entre 30-300 mg/g.

Ensayo de determinación de L-dopa y dopamina en orina: Alícuotas de 50 µl de orina fueron parcialmente purificadas mediante una extracción en alúmina y posteriormente separadas mediante HPLC en fase reversa usando una columna Zorbax RxC18 de 4.6x250 mm (DuPont Company, Delaware, USA). Las concentraciones urinarias de L-dopa y DA fueron cuantificadas amperométricamente con electrodo Bioanalytical Systems 0.65 V en relación a electrodos Ag/Ag, mediante la corriente producida por exposición del efluente de columna a potenciales oxidantes y reductores en serie utilizando un sistema de triple electrodo (ESA, Bedford, Mass., USA). El porcentaje de recuperación de la extracción en alúmina fue de 80-90%. Las concentraciones de L-dopa y DA de cada muestra fueron corregidas por recuperación del estándar interno ácido 2,3-dihidroxi-benzoico (DHBA). Los niveles de L-dopa y DA fueron luego corregidos por diferencias en la recuperación del estándar interno en una mezcla de estándares externos. El límite de detección fue de 20 pg/volumen ensayado.

Recolección y procesamiento de muestras de sangre: Al final de cada período experimental, todos los grupos de animales estaban en ayunas durante 5 h. Bajo anestesia con cetamina (80 mg/kg) y oxilazina (12 mg/kg), se recogieron muestras de sangre para medir sodio, creatinina, triglicéridos, colesterol, glucosa e insulina en plasma. analizador Automated Spectrum CCX, Abbott Diagnostics, IL, EE. UU.). Los niveles de triglicéridos y colesterol en plasma se midieron por medio de kits comerciales (Colestat Wiener Labs, Santa Fé, Argentina) utilizando un método espectrofotométrico; la glucosa en plasma se determinó mediante un medidor de glucosa en sangre (Accu-Chek, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) y la insulina mediante inmunoensayo ligado a enzimas (Millipore Corporation, MA, EE. UU.). El modelo de evaluación de la homeostasis en la resistencia a la insulina (índice HOMA-IR) se calculó mediante la siguiente ecuación: $HOMA = \text{glucosa en ayunas (mmol / L)} \times \text{insulina en ayunas (\mu IU / ml)} / 22.5$, con un punto de corte para definir IR de 2.5 puntos o más.

Cálculo de parámetros de función renal: Para evaluar la funcionalidad renal, determinamos la tasa de filtración glomerular estimada por el aclaramiento de creatinina (CrCl), la excreción fraccional de sodio (FENa), la excreción urinaria de sodio (UNa x UV) y la diuresis diaria, que se calcularon de

acuerdo con la fórmula estándar. La diuresis diaria se expresó como ml/día/kg, CrCl como ml/min/kg, UNa x UV como mEq/día/kg y la FENa como el porcentaje (%) de sodio filtrado.

Disección y procesamiento de riñones: Después de la recolección de muestras de orina y sangre, los animales se sacrificaron por decapitación, y ambos riñones se diseccionaron y luego se procesaron para realizar análisis bioquímicos y moleculares. La presencia de colágeno se determinó mediante tinción con Siriusred.

Actividad total de Na⁺, K⁺-ATPasa: Se homogeneizaron muestras de tejidos de la corteza renal que pesaban 50 mg (1:10 peso / volumen) en imidazol 25 mM / EDTA 1 mM / solución de sacarosa 0.25 M y se centrifugaron a 4700 g a 4 ° C durante 15 min. La actividad de Na⁺, K⁺-ATPasa se ensayó en el sobrenadante utilizando el método de Fiske-Subbarow. La actividad de ATPasa se midió mediante la determinación colorimétrica de la liberación de ortofosfato, y la habana se usó para inhibir específicamente la actividad Na⁺, K⁺-ATPasa. Las proteínas se determinaron por el método de Lowry et al. Los resultados se expresan como porcentaje de la actividad de Na⁺, K⁺-ATPasa, considerando los valores de control como 100%.

e. Procesamiento y Análisis de la información

Los datos se procesaron con el programa GraphPad Prism, versión 2.0. La distribución Gaussiana se evaluó por el método Kolmogorov y Smirnov y, para comparar entre los grupos, se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía seguido del test Newman-Keuls o Tukey según corresponda. El análisis estadístico se realizó por medio del test Kruskal-Wallis (ANOVA no paramétrico) y el test de comparación múltiple de Dunn, para aquellos parámetros con distribución no Gaussiana como los datos histológicos. El análisis de correlación se llevó a cabo mediante el test de Pearson. Los resultados se expresaron como la media ± error estándar de la media (ESM). Los resultados con p<0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

IV. Resultados

1) Parámetros nutricionales y metabólicos:

Los parámetros nutricionales y metabólicos se muestran en la Tabla 1. La F se asoció a un aumento de la ingesta de bebida, así como a una reducción de la ingesta de alimentos en ratas F con respecto a C, desde la semana 4. La ingesta calórica no fue diferente entre las ratas F y C para cualquier período experimental. El tratamiento con losartán no alteró la ingesta de bebidas, alimentos o calorías totales en ratas L y F + L en comparación con C y F, respectivamente, en ningún período experimental. El peso corporal no fue modificado por F o losartán en ningún período experimental. La F aumentó significativamente los niveles de insulina en plasma en ratas F con respecto a C desde la semana 4, mientras que los valores de glucosa en sangre mostraron una tendencia no significativa al incremento. La F se asoció al desarrollo de IR a partir de la misma semana, ya que las ratas F mostraron aumento del HOMA-IR, mayores que el punto de corte para definir IR. El tratamiento con losartán no alteró los valores de glucemia en ningún grupo o período experimental. El tratamiento con losartán evitó el aumento de la insulinemia y el desarrollo de IR inducida por F a partir de la semana 4. Los niveles de colesterol total no fueron modificados por F o losartán, en ningún período experimental. En las semanas 8 y 12, los triglicéridos plasmáticos aumentaron significativamente en ratas F en comparación con C, y losartán solo evitó este aumento en ratas F + L en la semana 12. Losartán no mostró ningún efecto sobre los parámetros nutricionales y metabólicos en ratas L en

comparación con C en ninguno periodo experimental El análisis temporal mostró que los niveles de HOMA-IR y triglicéridos aumentaron en las semanas 8 y 12 de FO, con respecto a la semana 4.

Tabla 1 Parámetros metabólicos y nutricionales a las 4,8 y 12 semanas de tratamiento con fructosa en presencia y ausencia de losartan.

	Week 4			
	C	L	F	F + L
Fluid intake (ml/day)	45 ± 4	42 ± 6	93 ± 8 [#]	82 ± 3 [#]
Food intake (g/day)	29 ± 3	26 ± 1	17 ± 2 [#]	19 ± 2 [#]
Caloric intake (kcal/day)	96 ± 4	86 ± 7	93 ± 6	96 ± 5
Body weight (g)	317 ± 19	325 ± 13	327 ± 22	313 ± 25
Glycemia (mmol/L)	7.09 ± 0.33	7.00 ± 0.67	8.02 ± 0.39	7.67 ± 0.78
Insulinemia (uUI/ml)	4.88 ± 0.44	4.18 ± 0.66	8.65 ± 1.24 [*]	4.84 ± 1.54 [§]
HOMA-IR	1.54 ± 0.06	1.67 ± 0.08	3.08 ± 0.02 [*]	1.65 ± 0.05 [§]
Cholesterol (mg/dL)	58 ± 7	55 ± 5	64 ± 6	56 ± 3
Triglycerides (mg/dL)	65 ± 8	63 ± 8	54 ± 12	72 ± 16

	Week 8			
	C	L	F	F + L
Fluid intake (ml/day)	44 ± 2	37 ± 4	102 ± 9 [#]	89 ± 6 [#]
Food intake (g/day)	27 ± 2	28 ± 4	16 ± 1 [#]	18 ± 3 [#]
Caloric intake (kcal/day)	89 ± 5	92 ± 5	94 ± 7	95 ± 6
Body weight (g)	413 ± 23	404 ± 5	415 ± 16	407 ± 24
Glycemia (mmol/L)	7.15 ± 0.22	6.94 ± 0.28	8.63 ± 0.78	7.89 ± 0.47
Insulinemia (uUI/ml)	7.65 ± 0.87	7.67 ± 1.32	12.58 ± 1.56 [*]	7.04 ± 1.64 [§]
HOMA-IR	2.43 ± 0.04	2.36 ± 0.09	4.83 ± 0.03 ^{*/ç}	2.47 ± 0.02 [§]
Cholesterol (mg/dL)	49 ± 6	54 ± 5	61 ± 6	57 ± 3
Triglycerides (mg/dL)	49 ± 7	50 ± 7	112 ± 17 ^{*/ç}	105 ± 14 [*]

	Week 12			
	C	L	F	F + L
Fluid intake (ml/day)	42 ± 3	40 ± 1	99 ± 9 [#]	87 ± 4 [#]
Food intake (g/day)	32 ± 3	30 ± 1	21 ± 1 [#]	20 ± 2 [#]
Caloric intake (kcal/day)	106 ± 5	99 ± 3	109 ± 9	101 ± 7
Body weight (g)	436 ± 17	447 ± 14	456 ± 22	461 ± 26
Glycemia (mmol/L)	6.88 ± 0.22	6.89 ± 0.28	8.17 ± 1.05	7.56 ± 1.22
Insulinemia (uUI/ml)	7.58 ± 0.49	6.50 ± 0.88	12.63 ± 2.08 [*]	6.97 ± 0.88 [§]
HOMA-IR	2.32 ± 0.05	2.00 ± 0.09	4.59 ± 0.07 ^{*/ç}	2.35 ± 0.05 [§]
Cholesterol (mg/dL)	65 ± 10	60 ± 4	84 ± 12	58 ± 3
Triglycerides (mg/dL)	69 ± 12	78 ± 14	157 ± 11 ^{*/ç}	72 ± 10 [§]

C: Control, L: Losartán; F: Fructosa; F+L: Fructosa más losartán

#p<0.01vsC y L. *p<0.05vsC y L. §p<0.05vsF. çp<0.05vsF4.

El tratamiento con losartán revirtió el incremento en los niveles de PAS y la reducción en la natriuresis inducidos por SF desde la semana 4 de tratamiento (ver tabla 2). Estos cambios se

asociaron a una reversión del aumento en la actividad de la enzima Na⁺,K⁺-ATPasa renal inducida por F (ver tabla 2).

La alteración del sistema dopaminérgico renal dada por el incremento en el índice urinario L-dopa/dopamina inducido por F fue revertida por losartán desde la semana 4 de tratamiento (ver tabla 2).

Tabla 2. Parámetros hemodinámicos, renales y actividad de la Na⁺,K⁺-ATPasa a las 4,8 y 12 semanas de tratamiento con fructosa en presencia y ausencia de losartán.

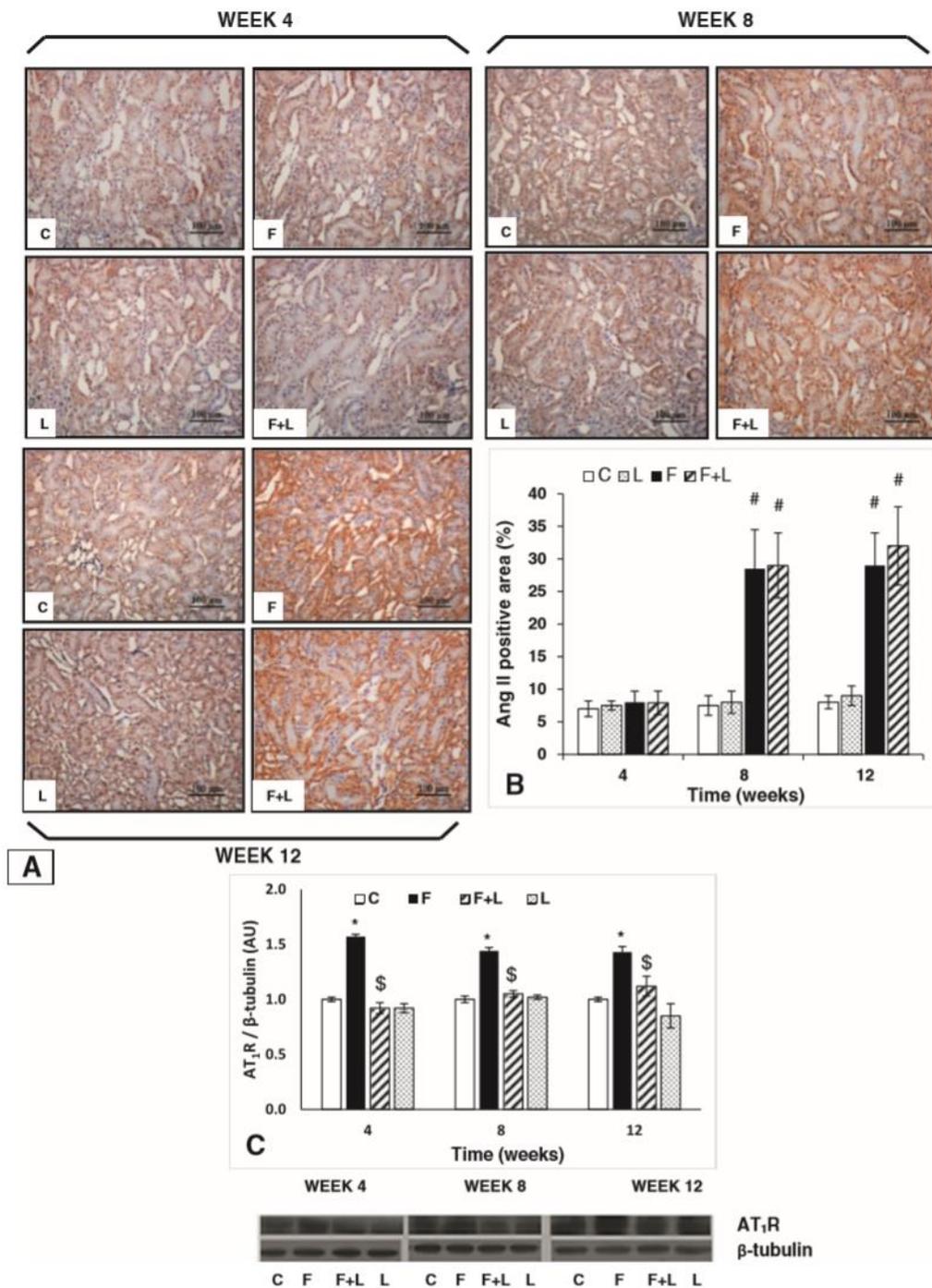
	<i>Semana 4</i>				<i>Semana 8</i>				<i>Semana 12</i>			
	C	L	F	F+L	C	L	F	F+L	C	L	F	F+L
PAS (Hg)	121±5	117±5	145±1^{&}	121±4	125±3	119±2	161±10[€]	122±2	126±4	120±5	163±4[€]	125±3
Diuresis (mL/día/kg)	38.69±4.66	44.55±5.90	75.45±6.30[*]	72.22±6.80[*]	38.12±4.41	32.92±3.11	74.35±6.97[#]	72.41±9.03[#]	35.20±3.84	33.30±1.86	70.10±6.11[#]	69.55±7.68[#]
FeNa (%)	0.41±0.03	0.42±0.06	0.28±0.03^{&}	0.41±0.07	0.32±0.03	0.36±0.05	0.22±0.01^{&}	0.36±0.03	0.35±0.04	0.34±0.02	0.20±0.02^{&}	0.33±0.03
Una.V (mEq/kg/día)	3.31±0.16	3.53±0.18	2.55±0.12^{&}	3.54±0.10	2.49±0.20	2.97±0.20	1.73±0.12^{&}	2.50±0.37	2.50±0.19	2.42±0.36	1.46±0.09^{&}	2.34±0.15
Actividad NKA	120±12	115±13	172±16[*]	136±27	124±16	125±15	186±17[§]	140±9	140±18	112±14	223±21[§]	116±16
Cociente urinario L-dopa/DA	0,49±0,03	0,49±0,02	1,92±0,11[§]	0,50±0,04	0,54±0,01	0,53±0,01	2,16±0,26[§]	1,12±0,07[*]	0,48±0,06	0,56±0,02	2,81±0,27[§]	1,09±0,05[*]

C: Control, L: Losartán; F: Fructosa; F+L: Fructosa más losartán

[&] p<0.05 vs Todos los grupos; [§] p<0.01 vs Todos los grupos; [€] p<0.005 vs Todos los grupos; ^{*} p<0.05 vs Grupos C y L; [#] p<0.01 vs Grupos C y L

La inmunotinción de Ang II aumentó significativamente en la corteza renal en ratas F con respecto a C, a las 8 y 12 semanas. El tratamiento con losartán (grupo F + L) careció de efectos en la prevención de este aumento. La expresión del receptor Ang II tipo 1 (AT1R) aumentó significativamente en la corteza renal de ratas F en comparación con C, a partir de la semana 4, efecto prevenido por losartán (grupo F + L). Losartán no mostró efectos sobre la inmunotinción renal de Ang II y AT1R en ratas L en comparación con C en ningún período experimental (Figura 1).

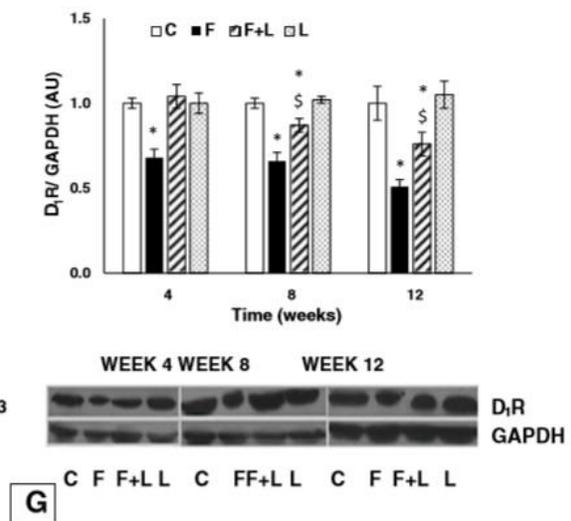
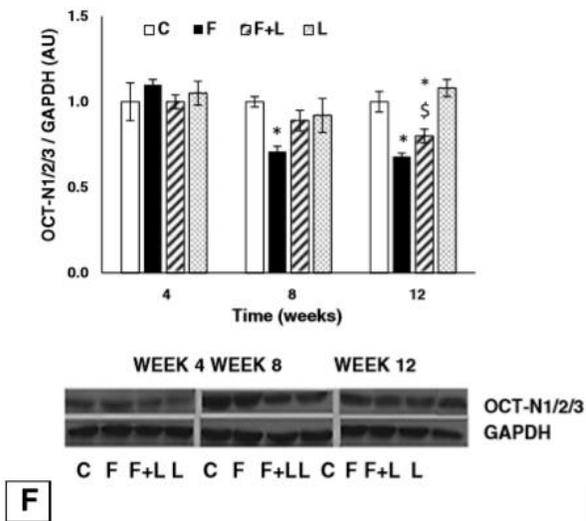
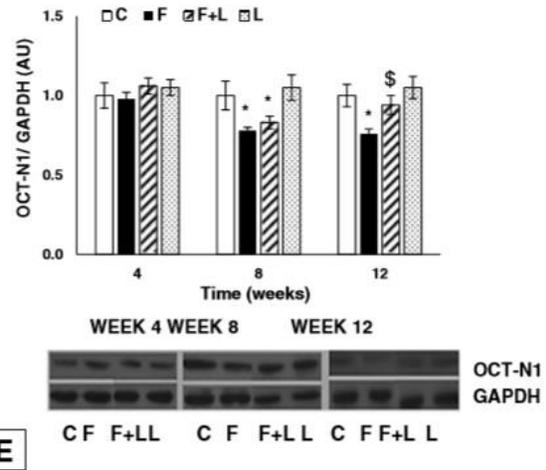
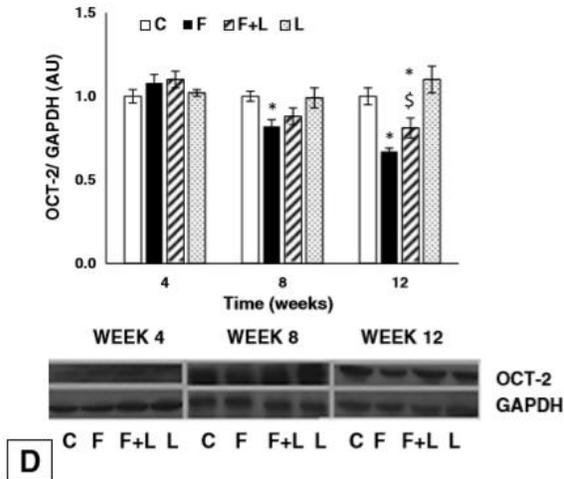
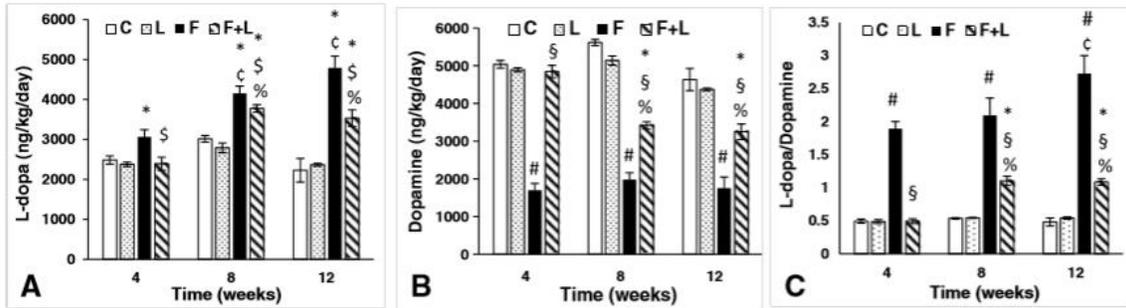
Figura 1. Cambios en el SRA a las 4,8 y 12 semanas de tratamiento con fructosa en presencia y ausencia de losartan.



#p < 0.01 vs C y L; *p < 0.05 vs C y L; \$p < 0.05 vs F.

La excreción urinaria de L-dopa aumentó mientras que la excreción urinaria de dopamina disminuyó en ratas F, en comparación con C, en todos los períodos experimentales. En consecuencia, la proporción de L-dopa / dopamina en orina aumentó significativamente en ratas F en comparación con C, a partir de la semana 4. El tratamiento con Losartan evitó la alteración de la excreción urinaria de L-dopa y dopamina en ratas F + L con respecto a F, evitando, de esta manera, el aumento de la relación L-dopa / dopamina urinaria (Figura 2). La prevención de las alteraciones del SDR asociadas al tratamiento con losartán fue total en la semana 4, mientras que fue parcial en las semanas 8 y 12. El análisis temporal mostró que la excreción urinaria de L-dopa aumentó en las semanas 8 y 12 en ratas F y también en ratas F + L, con respecto a la semana 4. Los niveles de dopamina urinaria fueron más bajos en las semanas 8 y 12 en ratas F + L con respecto a la semana 4. La proporción de L-dopa / dopamina en orina fue más alta en la semana 12 de F con respecto a la semana 4, mientras que la proporción fue mayor en las semanas 8 y 12 en comparación con la semana 4 en ratas F + L. La expresión en corteza renal de los transportadores de cationes orgánicos (OCT) OCT-2, OCT-N1 y OCT-Ns totales (OCTN 1/2/3) que median el transporte tubular de dopamina, se redujo significativamente desde la semana 8 en ratas F en comparación con C (Figura 2). Losartán mostró una tendencia a prevenir la reducción de la expresión de OCT-2 y OCTN 1/2/3 en ratas F + L con respecto a F en la semana 8, mientras que en la semana 12, la prevención fue parcial pero significativa. El tratamiento con losartán evitó la reducción de la expresión de OCT-N1 en ratas F + L en comparación con la semana 12 de grasa. La expresión del receptor D1 (D1R) en la corteza renal disminuyó en ratas F en comparación con C desde la semana 4, efecto que fue prevenido por losartán. Esta prevención fue total en la semana 4, mientras que fue parcial en las semanas 8 y 12. En cualquier caso, losartán no mostró efectos sobre RDS en ratas L con respecto a C.

Figura 2. Cambios en el SDR a las 4,8 y 12 semanas de tratamiento con fructosa en presencia y ausencia de losartan.

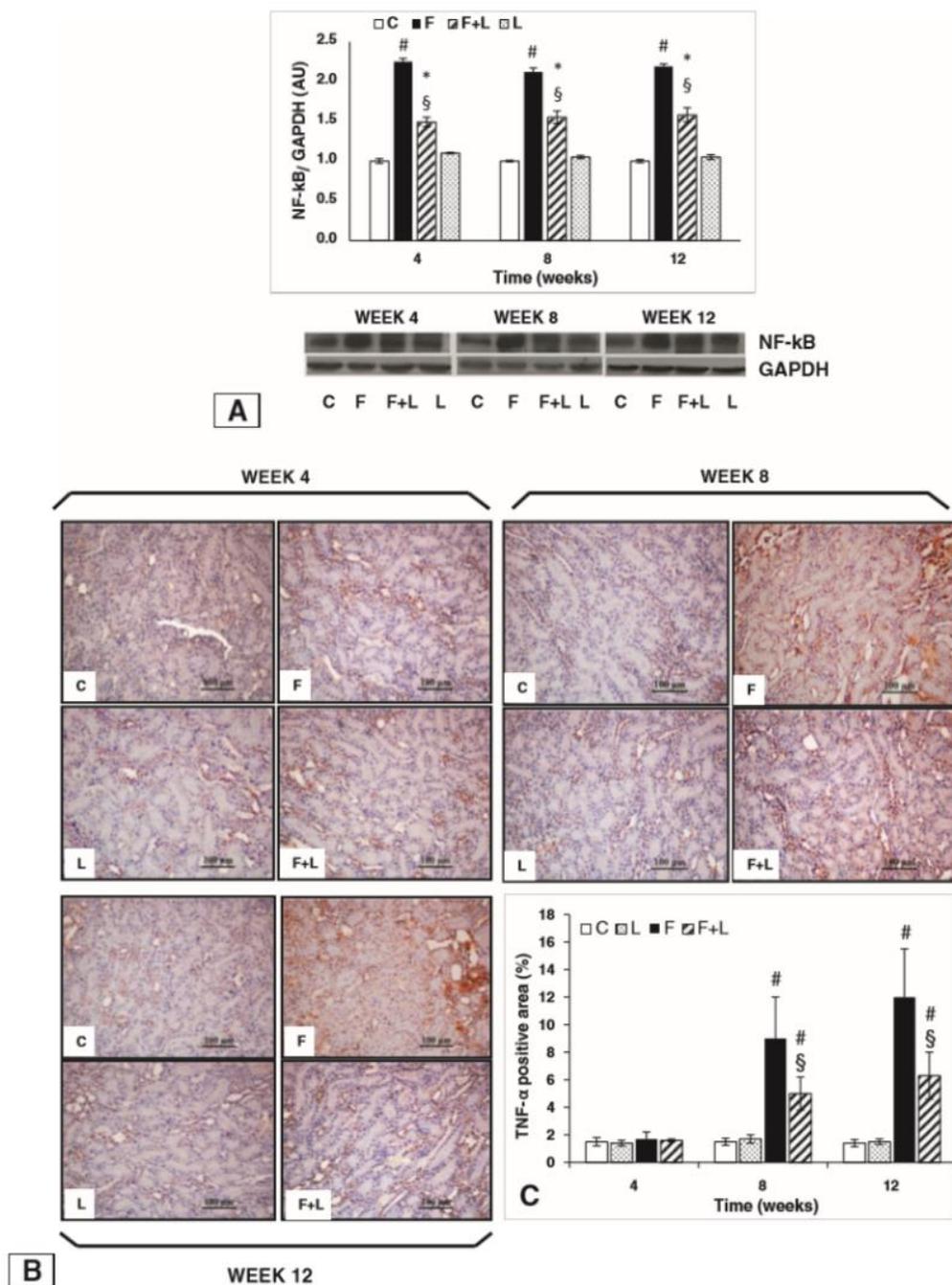


#p < 0.01vsC y L; *p < 0.05 vsC y L; §p < 0.01vsF; \$p < 0.05 vsF; ¢p < 0.05 vsF4; %p < 0.05 vs F + L4.

La expresión de la corteza renal del factor de transcripción nuclear kappa B (NF-kB) aumentó en ratas F con respecto a C, a partir de la semana 4. Losartan evitó parcialmente este aumento en ratas F + L con respecto a F, en todos los períodos experimentales (Figura 3). La expresión de la corteza

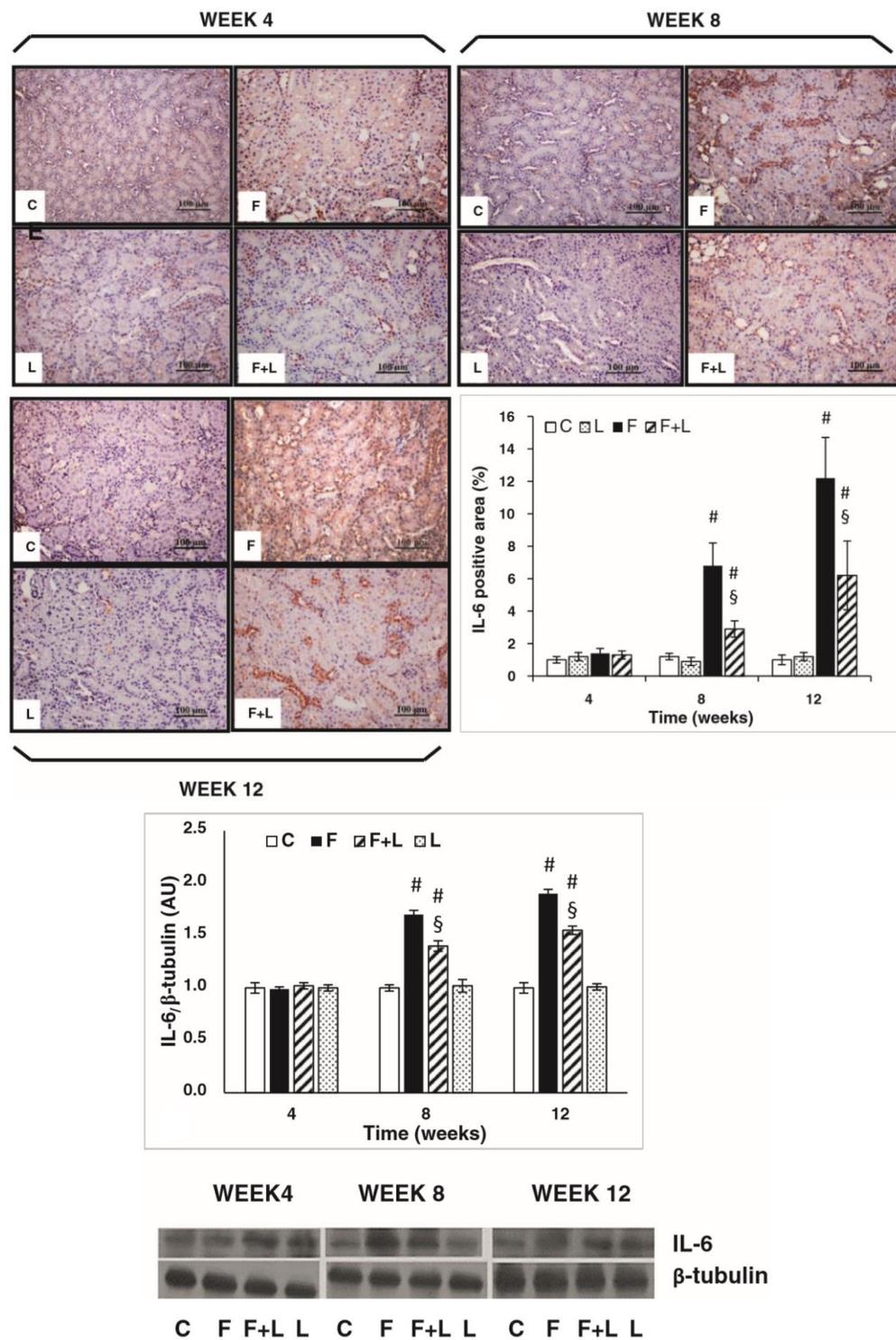
renal de las citoquinas inflamatorias como factor de necrosis tumoral α (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6), así como el marcador de fibrosis factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β 1) aumentó en ratas F en comparación con C, en las semanas 8 y 12, un efecto que fue parcialmente evitado por losartan (grupo F + L) (Figura 4 a 6).

Figura 3. Expresión renal de NF- κ B a nivel renal a las 4,8 y 12 semanas de tratamiento con fructosa en presencia y ausencia de losartan.



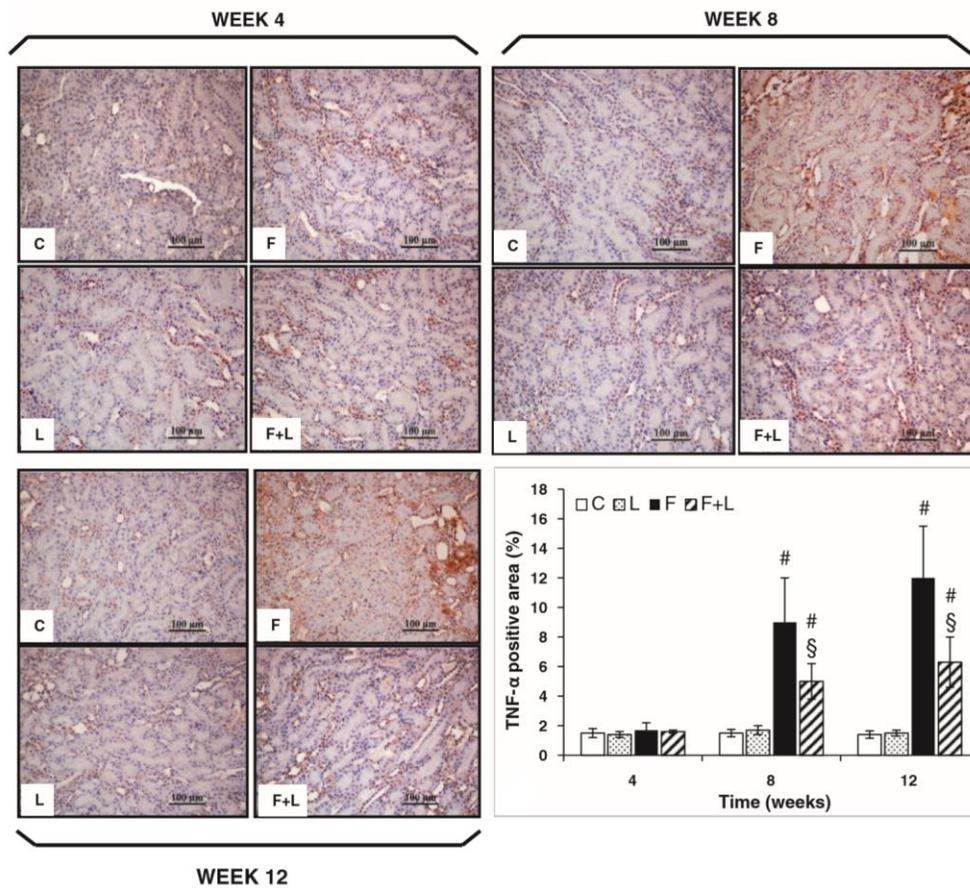
#p < 0.01 vsC y L; *p < 0.05vsC y L; §p < 0.01vsF.

Figura 4. Expresión renal de IL-6 a nivel renal a las 4,8 y 12 semanas de tratamiento con fructosa en presencia y ausencia de losartan.



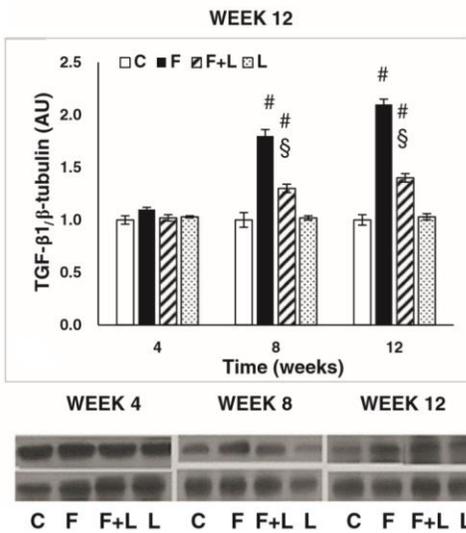
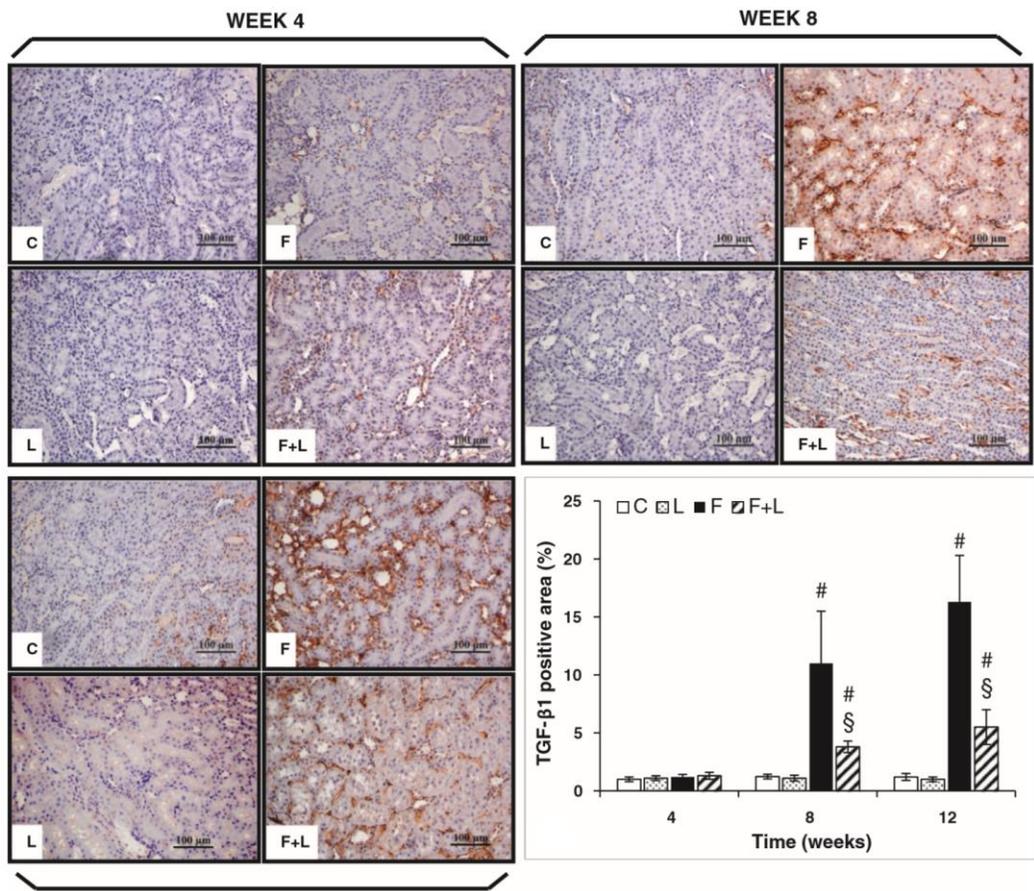
C:Control, L:Losartan; F:Fructosa; F + L:Fructosa y losartan; IL-6: Interleuquina 6; #p < 0.01 vs C and L; §p < 0.01 vs F.

Figura 5. Expresión renal de TNF- α a nivel renal a las 4,8 y 12 semanas de tratamiento con fructosa en presencia y ausencia de losartan.



C: Control, L: Losartan; F: Fructosa; F + L: Fructosa y losartan; NF-kB: Nuclear transcription factor kappa B; TNF- α : Tumor necrosis factor α ; #p < 0.01 vs C + L; *p < 0.05 vs C + L; §p < 0.01 vs F

Figura 6. Expresión renal de TGF- β 1 a nivel renal a las 4,8 y 12 semanas de tratamiento con fructosa en presencia y ausencia de losartan.

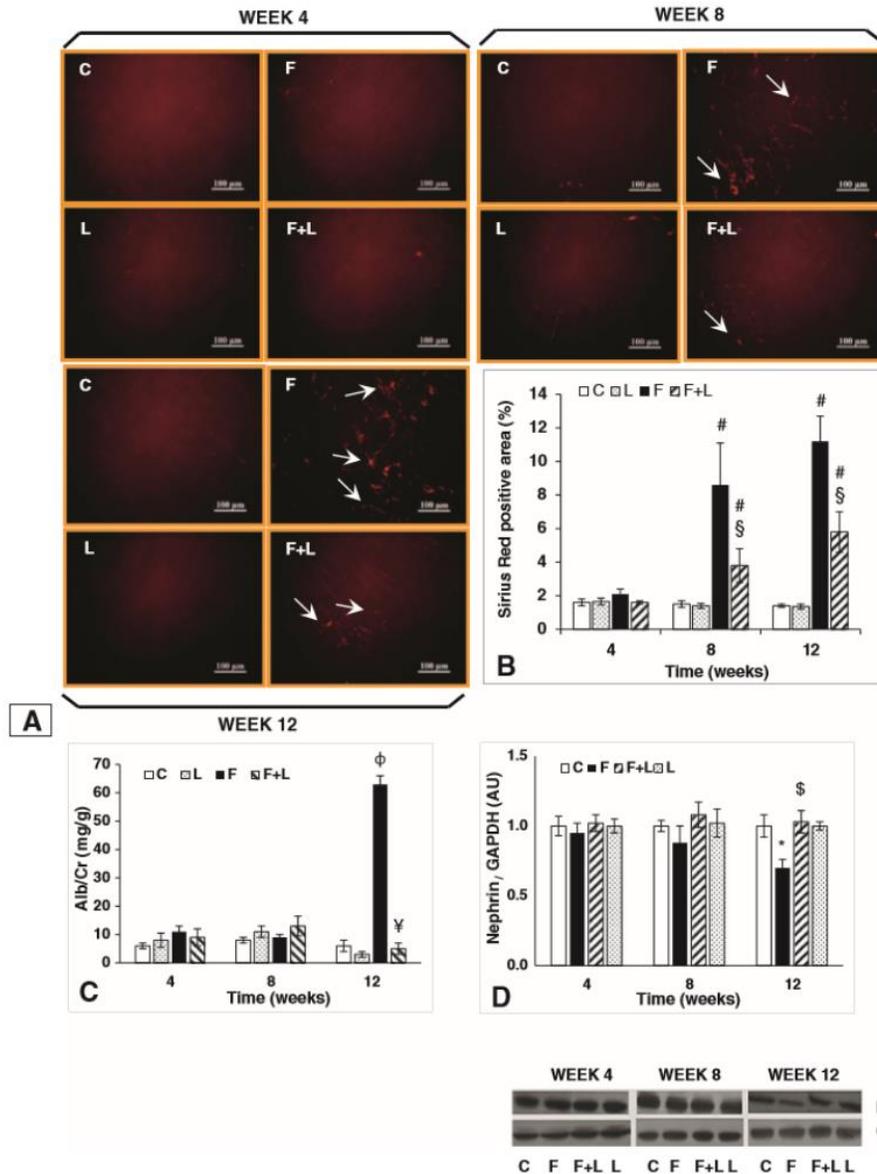


C: Control, L: Losartan; F: Fructosa; F + L: Fructosa y losartan; TGF-β1: Transforming growth factor β1; #p < 0.01 vs C+L; §p < 0.01 vs F.

El área de tinción positiva para Sirius Red aumentó en la corteza renal de ratas F con respecto a C, en las semanas 8 y 12, lo que indica el aumento del contenido de colágeno intersticial y perivascular.

Losartán evitó parcialmente este aumento en ratas F + L en comparación con F en los mismos períodos experimentales (Figura 7).

Figura 7. Tinción de Sirius Red a nivel renal a las 4,8 y 12 semanas de tratamiento con fructosa en presencia y ausencia de losartán.

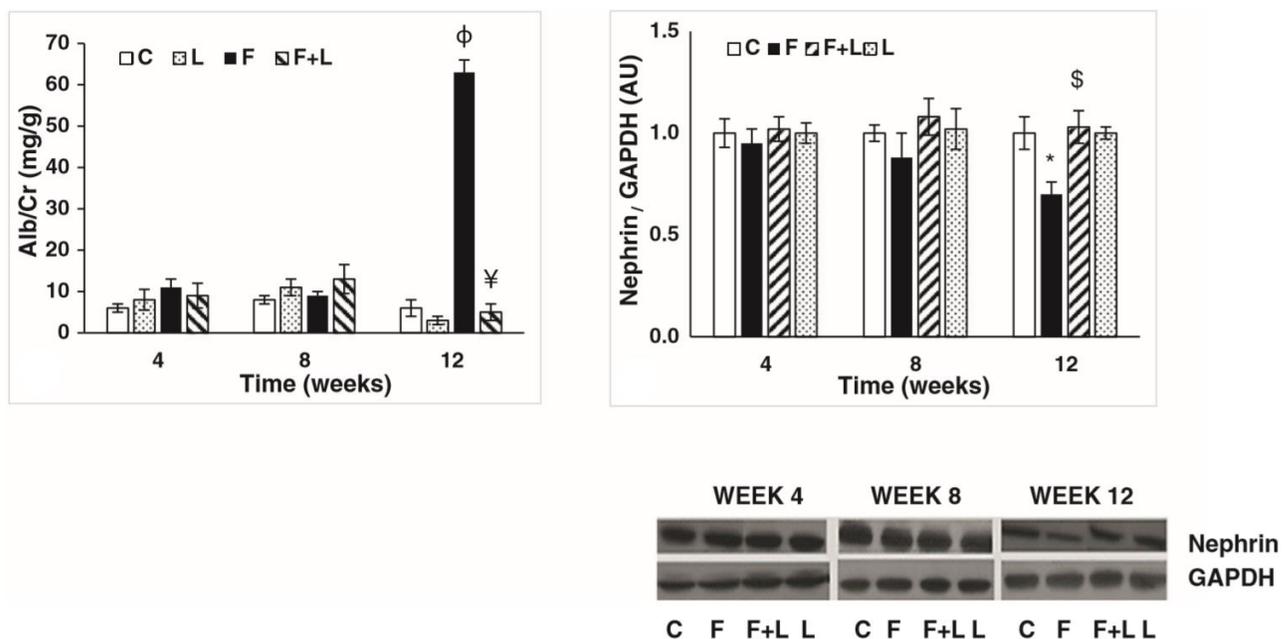


$\phi p < 0.001$ vs C y L; $\#p < 0.01$ vs C y L; $*p < 0.05$ vs C y L; $\$p < 0.01$ vs F; $\$p < 0.05$ vs F; $\yenig p < 0.001$ vs F.

La presencia de microalbuminuria se observó solo en ratas F en la semana 12. Losartán previno la aparición de microalbuminuria en ratas F + L en este período experimental (Figura 8). A nivel cortical,

la expresión proteica del marcador de daño estructural glomerular, nefrina, se redujo significativamente en ratas F en comparación con C, en la semana 12. El tratamiento con losartán evitó esta reducción en ratas F + L en la semana 12 (Figura 8). Losartán no tuvo ningún efecto sobre la expresión de marcadores de daño renal en ratas L con respecto a C en ningún período experimental.

Figura 8. Marcadores de daño renal a las 4,8 y 12 semanas de tratamiento con fructosa en presencia y ausencia de losartán.



C: Control, L: Losartán; F: Fructose; F + L: Fructose plus losartán; φ $p < 0.001$ vs C and L; # $p < 0.01$ vs C and L; * $p < 0.05$ vs C and L; δ $p < 0.01$ vs F; \$ $p < 0.05$ vs F; ¥ $p < 0.001$ vs F.

V. Discusión y Conclusión

Los resultados del estudio muestran la existencia de un desequilibrio entre SRA renal y SDR, en el contexto de IR e hipertensión por F. La existencia de alteraciones metabólicas y hemodinámicas graves se ha demostrado en modelos animales tratados con una dieta alta en fructosa, con el desarrollo de un perfil metabólico similar al observado en el síndrome metabólico humano [21]. Para determinar la funcionalidad de las células beta-pancreáticas, así como el estado de IR, se utilizó el modelo de evaluación de la homeostasis de la insulina para calcular el índice HOMA-IR. Las ratas F mostraron niveles más altos de HOMA-IR que las ratas C, mayor que el límite para definir IR, lo que indica el desarrollo de IR a partir de la semana 4 de F. Estos resultados coinciden con los obtenidos por varios estudios en los que se utiliza una dieta alta en fructosa como modelo de IR, con niveles elevados de insulinemia [22,23]. Con respecto al metabolismo de los lípidos, las ratas F mostraron un aumento significativo en los triglicéridos plasmáticos en comparación con C, a partir de la semana 8, mientras desarrollaron hipertrigliceridemia (triglicéridos plasmáticos mayores o

iguales a 150 mg / dL) en la semana 12, sin cambios en los valores de colesterol total en cualquier período experimental. Estos resultados coinciden con los obtenidos por diversos estudios experimentales en los que un F en la dieta se asoció a hiperlipidemia en roedores [24]. Por otro lado, las ratas F presentaron mayores niveles de PAS en comparación con C, a partir de la semana 4. En este sentido, se informó que la F en la dieta representa un modelo animal de hipertensión sistólica adquirida [25].

Varios estudios mostraron que la F es capaz de inducir la activación de varios SRA locales, con aumento de la expresión de AT1R, índice de renina / pro-renina y de Ang II localmente [26,27]. En nuestro estudio, la expresión de AT1R aumentó en la corteza renal de ratas F desde la semana 4, mientras que la inmunotinción de Ang II aumentó desde la semana 8 de F. Por otro lado, muchos estudios han establecido la existencia de alteraciones del SDR en estados de IR e HTA, como el inducido por F [28,28]. Teniendo en cuenta la compleja interacción opuesta y contrarreguladora entre el SRA y el SDR a nivel renal, se puede proponer que uno de los efectos de la sobreexpresión de Ang II / AT1R sería una reducción de la producción de dopamina. Apoyando esta hipótesis, las ratas F mostraron un aumento de la proporción de L-dopa / dopamina urinaria desde la semana 4, debido a una reducción en la excreción urinaria de dopamina acompañada de un aumento en la excreción urinaria de L-dopa, como hemos informado previamente [30]. Los estudios *in vitro* de nuestro grupo han demostrado que Ang II es capaz de reducir la absorción tubular dopamina, un proceso mediado por miembros de la familia SLC22A llamados OCT [31]. Presumimos que la reducción de la excreción de dopamina urinaria por F podría estar asociada a alteraciones en la absorción de dopamina renal desde la circulación, así como a una posible reducción en su transporte desde el compartimiento intracelular a la luz tubular, proceso mediado por otros miembros de la familia SLC22A llamados OCTNs. En nuestro estudio, la expresión de OCT-2, OCT-N1 y OCTNs totales se redujo en la corteza renal de ratas F desde la semana 8. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por nosotros y también por otros grupos, que demostraron una reducción del ARNm renal y niveles de proteína de OCT-1, OCT-2 y OCT-N2 en ratas Sprague-Dawley con F durante 8 semanas [32-36]. Por otro lado, el aumento de la expresión de AT1R debido a F puede contribuir a la disminución de la expresión de D1R observada en ratas F a partir de la semana 4. Apoyando esta hipótesis, la existencia de un complejo heterodimérico entre los receptores renales AT1 y D1, con acciones opuestas, ha sido demostrado [31,32]. Además, el hecho de que el SDR no pueda actuar como un mecanismo de contrarregulación de SRA puede, a su vez, contribuir a la sobreexpresión de este último, lo que resulta en un mecanismo de retroalimentación asociado al desarrollo de sodio retención e hipertensión en este modelo.

La F también se asoció a un aumento de la expresión de marcadores proinflamatorios en la corteza renal de ratas F a partir de la semana 4. La expresión de NF- κ B aumentó a partir de la semana 4, mientras que la expresión de TNF- α e IL-6 aumentó a partir de la semana 8. Varios estudios experimentales demostraron la existencia de una respuesta inflamatoria en los riñones de los roedores tratados con una dieta alta en fructosa [30,37]. También se ha demostrado que el aumento de las citocinas proinflamatorias se asocia con la aparición de fibrosis renal [38]. De esta manera, las ratas F mostraron marcadores de fibrosis aumentados (TGF- β 1 y colágeno al teñir con rojo de Sirius) a partir de la semana 8. En este contexto, el desequilibrio dado por la sobreexpresión de Ang II / AT1R, con acciones proinflamatorias y por la inhibición de SDR, con acciones antiinflamatorias

que se oponen a las de Ang II, puede proponerse como uno de los mecanismos implicados en el desarrollo de un entorno proinflamatorio a nivel renal [39, 40]. Como resultado de los procesos proinflamatorios y pro-fibróticos asociados con F, la existencia de daño renal estructural se evidenció por la aparición de microalbuminuria y la reducción en la expresión de nefrina en la semana 12. Estos resultados revelan la existencia de alteraciones estructurales a nivel de la barrera de filtración glomerular. La microalbuminuria es un indicador temprano de enfermedad renal y un predictor de cardiopatía isquémica en la hipertensión esencial [41,42]. La nefrina es una proteína transmembrana ubicada en la unión celular especializada de los podocitos, que constituye una parte fundamental del diafragma de filtración y mantiene la integridad de la barrera de filtración glomerular [43]. Para respaldar nuestros resultados, varios estudios han demostrado la existencia de daño renal en ratas con F [44-45]. Por otro lado, el tratamiento con losartán mostró un efecto renoprotector en ratas con F, al prevenir la aparición de microalbuminuria y la reducción de la expresión de nefrina observada en la semana 12. Los efectos renoprotectores de losartán han sido evidenciados por varios estudios clínicos y experimentales [46,47] En nuestro modelo, estos efectos se asociaron a una prevención del aumento de la expresión de marcadores proinflamatorios y pro fibróticos, que también se ha documentado [48,49]. A este respecto, debe tenerse en cuenta que la prevención del aumento de la expresión de marcadores proinflamatorios y pro-fibróticos por losartán no fue completa. Teniendo en cuenta que el tratamiento con losartán previno completamente el desarrollo de IR, hipertensión e hipertrigliceridemia, es importante resaltar que el aumento de la expresión de marcadores proinflamatorios y pro-fibróticos en ratas F + L con respecto a C probablemente se deba a los efectos del metabolismo renal de la fructosa per se, que están asociados con el estrés oxidativo y la inflamación y han sido ampliamente reportados en la literatura [50,51]. Para investigar si losartán era capaz de producir efectos por sí solo en animales de control, el fármaco se administró a ratas alimentadas con una dieta equilibrada estándar, utilizando la misma dosis que la utilizada en animales con una dieta alta en fructosa. Los resultados obtenidos muestran que losartán per se no alteró ninguno de los parámetros nutricionales, metabólicos, hemodinámicos y de función renal, ni el SDR y SRA renal, Na⁺, K⁺-ATPasa renal y biomarcadores de inflamación, fibrosis y daño renal en animales de control.

Teniendo en cuenta que se observaron alteraciones en la proporción de L-dopa / dopamina urinaria a partir de la semana 4 de F, podemos proponer el índice L-dopa / dopamina como un marcador de disfunción renal en estados caracterizados por retención de sodio, resistencia a la insulina y / o hipertensión , que precede temporalmente al aumento de la expresión de marcadores de fibrosis y citoquinas proinflamatorias en la semana 8, así como del daño estructural renal evidenciado por microalbuminuria y expresión de nefrina reducida en la semana 12. Estos resultados completarían los estudios iniciados por nuestro grupo, en el que demostramos la existencia de una alteración de la relación L-dopa / dopamina asociada a F en la dieta [52]. Además, se demostró que la proporción de L-dopa / dopamina en orina responde al losartán, teniendo en cuenta la prevención del aumento de esta proporción en ratas F + L. La prevención del aumento de la relación L-dopa / dopamina fue total en la semana 4 de tratamiento, mientras que fue parcial en las semanas 8 y 12. De esta manera, el índice urinario de L-dopa / dopamina mostró un comportamiento similar al realizado por proinflamatorio y marcadores pro-fibróticos. La reversión parcial de este parámetro puede explicarse considerando la evidencia experimental que muestra que la producción de dopamina, así

como la regulación de la expresión y señalización de D1R, son altamente sensibles al desarrollo de estrés oxidativo e inflamación a nivel renal [53-55]. De esta manera, el desarrollo del estrés oxidativo y el aumento de las citocinas proinflamatorias debido al metabolismo renal de la fructosa afectarían el SDR, independientemente del bloqueo del SRA con losartán.

Conclusiones: En resumen, los resultados de este estudio aportan nueva evidencia sobre los mecanismos por los cuales un sistema prohipertensivo y proinflamatorio como el SRA puede regular negativamente a otro sistema antihipertensivo y antiinflamatorio como el SDR, estableciendo un circuito de retroalimentación positiva para el desarrollo de hipertensión e inflamación renal en el contexto del síndrome metabólico inducido por F. Finalmente, los resultados de este trabajo nos permiten postular el índice urinario de L-Dopa / dopamina como posible biomarcador de diagnóstico de hipertensión y daño inflamatorio renal, así como un predictor de respuesta al tratamiento y seguimiento.

Los resultados de este estudio pueden contribuir a una mejor comprensión de la relación fisiológica entre SDR y SRA y su influencia en el transporte renal de sodio y la regulación de la natriuresis y la diuresis. Además, los nuevos conceptos sobre el desequilibrio entre el SDR y el SRA en el modelo experimental de síndrome metabólico pueden proporcionar nuevas ideas para el tratamiento clínico de la enfermedad. Los resultados también muestran nuevas pruebas que respaldan el papel de la dopamina como agente nefroprotector y su posible uso en futuras estrategias terapéuticas para el tratamiento de la hipertensión.

VI. Bibliografía

[1] Guzman NJ. Epidemiology and management of hypertension in the Hispanic population: a review of the available literature. *Am J Cardiovasc Drugs* 2012;12(3):165-78.

[2] Aperia AC. Intrarenal dopamine: a key signal in the interactive regulation of sodium metabolism. *Annu Rev Physiol* 2000;62:621-47.

[3] Zeng C, Jose PA. Dopamine receptors: important antihypertensive counterbalance against hypertensive factors. *Hypertension* 2011;57(1):11-7.

[4] Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev* 2007;59:251-87.

[5] Armando I, Villar VA, Jose PA. Dopamine and renal function and blood pressure regulation. *Compr Physiol* 2011;1(3):1075-117.

[6] Pedemonte CH, Efendiev R, Bertorello AM. Inhibition of Na, K-ATPase by dopamine in proximal tubule epithelial cells. *Semin Nephrol* 2005;25:322-327.

- [7] Zhang Y, Cuevas S, Asico LD, Escano C, Yang Y, Pascua AM, et al. Deficient Dopamine D2 Receptor Function Causes Renal Inflammation Independently of High Blood Pressure. *PLoS One* 2012;7:e38745.
- [8] Liu GX, Li YQ, Huang XR, Wei L, Chen HY, Shi YJ, et al. Disruption of Smad7 promotes ANG II-mediated renal inflammation and fibrosis via Sp1-TGF- β /Smad3-NF. κ B-dependent mechanisms in mice. *PLoS One* 2013;8(1):e53573.
- [9] Yang S, Yao B, Zhou Y, Yin H, Zhang MZ, Harris RC. Intrarenal dopamine modulates progressive angiotensin II mediated renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012;302:742-49.
- [10] Rukavina Mikusic NL, Kravetz MC, Kouyoumdzian NM, Della Penna SL, Rosón MI, Fernández BE, et al. Signaling pathways involved in renal oxidative injury: role of the vasoactive peptides and the renal dopaminergic system. *J Signal Transduct* 2014;2014:731350.
- [11] Ryou JH, Park SK, Jung JY. Elevated fasting insulin level significantly increases the risk of microalbuminuria. *Circ J* 2015;79(1):210-15.
- [12] Huh JH, Yadav D, Kim JS, Son JW, Choi E, Kim SH, et al. An association of metabolic syndrome and chronic kidney disease from a 10-year prospective cohort study. *Metabolism - Clin Experim* 2017;67:54-61.
- [13] Deer J, Koska J, Ozias M, Reaven P. Dietary models of insulin resistance. *Metabolism - Clin Experim* 2014;64(2):163-71.
- [14] Xu C, Lu A, Lu X, Zhang L, Fang H, Zhou L, et al. Activation of Renal (Pro) Renin Receptor Contributes to High Fructose-Induced Salt Sensitivity. *Hypertension* 2017;69:339-48.
- [15] Chou CL, Lin H, Chen JS, Fang TC. Renin inhibition improves metabolic syndrome, and reduces angiotensin II levels and oxidative stress in visceral fat tissues in fructose-fed rats. *PLoS One* 2017;12(7):e0180712.
- [16] Tesch GH. Review: Serum and urine biomarkers of kidney disease: A pathophysiological perspective. *Nephrol* 2010;15:609-16.
- [17] Matthews DR, Hosker JR, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28: 412-41.
- [18] Fernandes-Cerqueira C, Sampaio-Maia B, Quelhas-Santos J, Moreira-Rodrigues M, Simões-Silva L, Blazquez-Medela AM, et al. Concerted action of ANP and dopamine D1-receptor to regulate sodium homeostasis in nephrotic syndrome. *Biomed Res Int.* 2013; 397391.
- [19] Lowry OH, López JA. Determination of inorganic phosphate in presence of labile P esters. *J Biol Chem* 1946; 162:421-28.

- [20] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193(1):265-75.
- [21] Abdulla MH, Sattar MA, Johns EJ. The Relation between Fructose-Induced Metabolic Syndrome and Altered Renal Haemodynamic and Excretory Function in the Rat. *Int J Nephrol* 2011;2011:934659.
- [22] Wong SK, Chin KY, Suhaimi FH, Ahmad F, Soelaiman I-N. Animal models of metabolic syndrome: a review. *Nutr Metab (Lond)* 2016;13:65.
- [23] Herman MA, Samuel VT. The Sweet Path to Metabolic Demise: Fructose and Lipid Synthesis. *Trends Endocrinol Metab* 2016;27(10):719-30.
- [24] Dai S, McNeill JH. Fructose-induced hypertension in rats is concentration- and duration-dependent. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1995;33(2):101-07.
- [25] Hasegawa K, Yoshida H, Ura N, Murakami H, Hagiwara M, Shimamoto K. The role of renal natriuretic and depressor systems in insulin-resistant hypertensive rats. *Hypertens Res* 2004;27(7):501-08.
- [26] Carey RM. Theodore Cooper Lecture: Renal dopamine system: paracrine regulator of sodium homeostasis and blood pressure. *Hypertens* 2001;38(3):297-02.
- [27] Rukavina Mikusic NL, Kouyoumdzian NM, Del Mauro JS, Cao G, Trida V, Gironacci MM, et al. Effects of chronic fructose overload on renal dopaminergic system: alteration of urinary L-dopa/dopamine index correlates to hypertension and precedes kidney structural damage. *J Nutr Biochem* 2018; 51:47-55.
- [28] Choi MR, Medici C, Gironacci MM, Correa AH, Fernández BE. Angiotensin II regulation of renal dopamine uptake and Na(+),K(+)-ATPase activity. *Nephron Physiol* 2009;111(4):53-8.
- [29] Grover B, Buckley D, Buckley AR, Cacini W. Reduced expression of organic cation transporters rOCT1 and rOCT2 in experimental diabetes. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;308:949-56.
- [30] Fan CY, Wang MX, Ge CX, Wang X, Li JM, Kong LD. Betaine supplementation protects against highfructose induced renal injury in rats. *J Nutr Biochem* 2014;25(3):353-62.
- [31] Khan F, Spicarová Z, Zelenin S, Holtbäck U, Scott L, Aperia A. Negative reciprocity between angiotensin II type 1 and dopamine D1 receptors in rat renal proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;295:F1110-6.
- [32] Yang S, Yao B, Zhou Y, Yin H, Zhang MZ, Harris RC. Intrarenal dopamine modulates progressive angiotensin II mediated renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012;302:742-49.
- [33] Zhang L, Guo F, Guo H, Wang H, Zhang Z, Liu X, et al. The Paradox of Dopamine and Angiotensin II-Mediated Na⁺, K⁺-ATPase Regulation in Renal Proximal Tubules. *Clin Experim Hypertens* 2010;32(7):464-68.

- [34] Efendiev R, Bertorello AM, Pressley TA, Rousselot M, Féraïlle E, Pedemonte CH. Simultaneous phosphorylation of Ser-11 and Ser18 in the alpha-subunit promotes the recruitment of Na⁺, K⁺-ATPase molecules to the plasma membrane. *Biochem* 2000;39:9884-92.
- [35] Iannello S, Milazzo P, Belfiore F. Animal and human tissue Na,K-ATPase in normal and insulinresistant states: regulation, behaviour and interpretative hypothesis on NEFA effects. *Obes Rev* 2007;8(3):231-51.
- [36] Mamikutty N, Thent ZC, Sapri SR, Sahrudin NN,2 Mohd Yusof MR, Suhaimi FH. The establishment of metabolic syndrome model by induction of fructose drinking water in male wistar rats. *Biomed Res Int* 2014;263897.
- [37] Aoyama M, Isshiki K, Kume S, Chin-Kanasaki M, Araki H, Araki S, et al. Fructose induces tubulointerstitial injury in the kidney of mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;419:244-49.
- [38] Segerer S, Schlöndorff D. Role of chemokines for the localization of leukocyte subsets in the kidney. *Semin Nephrol* 2007;27(3):260-74.
- [39] Patrakka J, Tryggvason K. Molecular make-up of the glomerular filtration barrier. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;396(1):164-69.
- [40] Gersch MS, Mu W, Cirillo P, Reungjui S, Zhang L, Roncal C, et al. Fructose, but not dextrose, accelerates the progression of chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;293(4):F1256-61.
- [41] Prince PD, Lanzi CR, Toblli JE, Elesgaray R, Oteiza PI, Fraga CG, et al. Dietary (-)-epicatechin mitigates oxidative stress, NO metabolism alterations, and inflammation in renal cortex from fructose-fed rats. *Free Radic Biol Med* 2016;90:35-46.
- [42] Kizhner T, Werman MJ. Long-term fructose intake: Biochemical consequences and altered renal histology in the male rat. *Metabolism - Clin Experim* 2002;51(12):1538-47.
- [43] Ismail H, Mitchell R, McFarlane SI, Makaryus AN. Pleiotropic Effects of Inhibitors of the RAAS in the Diabetic Population: Above and Beyond Blood Pressure Lowering. *Curr Diab Rep* 2010;10(1):32-6.
- [44] Abdulla MH, Sattar MA, Abdullah NA, Johns EJ. The effect of losartan and carvedilol on renal haemodynamics and altered metabolism in fructose-fed Sprague–Dawley rats. *J Physiol Biochem* 2012;68:353-63.
- [45] Hsieh PS, Tai YH, Loh CH, Shih KC, Cheng WT, Chu CH. Functional interaction of AT1 and AT2 receptors in fructose induced insulin resistance and hypertension in rats. *Metabolism - Clinical and Experimental* 2005;54(2):157-64.
- [46] Peredo H, Mayer MA, Carranza A, Puyó AM. Pioglitazone and Losartan Modify Hemodynamic and Metabolic Parameters and Vascular Prostanoids in FructoseOverloaded Rats. *Clin Experim Hypertens* 2008;30:159-69.
- [47] Kong X, Zhang DY, Wu HB, Li FX. Losartan and Pioglitazone Ameliorate Nephropathy in Experimental Metabolic Syndrome Rats. *Biol Pharm Bull* 2011;34(5):693-9.

- [48] Xu ZG, Lanting L, Vaziri ND, Li Z, Sepassi L, Rodriguez-Iturbe B, et al. Upregulation of angiotensin II type 1 receptor, inflammatory mediators, and enzymes of arachidonate metabolism in obese Zucker rat kidney: reversal by angiotensin II type 1 receptor blockade. *Circulation* 2005;111(15):1962-9.
- [49] Li D, Scott L, Crambert S, Zelenin S, Eklöf AC, Di Ciano L, et al. Binding of losartan to angiotensin AT1 receptors increases dopamine D1 receptor activation. *J Am Soc Nephrol* 2012;23(3):421-8.
- [50] Queiroz-Madeira EP, Lara LS, Wengert M, Landgraf SS, Líbano-Soares JD, Zapata-Sudo G, et al. Na(+)-ATPase in spontaneous hypertensive rats: possible AT(1) receptor target in the development of hypertension. *Biochim Biophys Acta* 2010;1789(3):360-6.
- [51] Perico N, Ruggenenti P, Remuzzi G. Losartan in diabetic nephropathy. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2004;2(4):473-83.
- [52] Kim JM, Heo HS, Choi YJ, Ye BH, Mi Ha Y, Seo AY, et al. Inhibition of NF- κ B-induced inflammatory responses by angiotensin II antagonists in aged rat kidney. *Exp Gerontol* 2011;46(7):542-8.
- [53] Yu S, Ren Q, Wu W. Effects of losartan on expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in hyperuricemic nephropathy rats. *J Recept Signal Transduct Res* 2015;35(5):458-61.
- [54] Cirillo P, Gersch MS, Mu W, Scherer PM, Kim KM, Gesualdo L, et al. Ketohexokinase-Dependent Metabolism of Fructose Induces Proinflammatory Mediators in Proximal Tubular Cells. *J Am Soc Nephrol* 2009;20(3):545-53.
- [55] Cuevas S, Villar VA, Jose PA, Armando I. Renal dopamine receptors, oxidative stress, and hypertension. *Int J Mol Sci* 2013;14:17553-72.

VII. Anexos
Ninguno.