

## 4 RESULTADOS

### 4.1 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL IN VIVO

Los resultados obtenidos se han distribuido en diferentes apartados: determinaciones ponderales, bioquímica, hematología y presión arterial sistólica; y análisis histológica.

#### 4.1.1 Evaluación ponderal.

Al iniciar el procedimiento experimental los dos grupos de ratas (*lean* y *obese*) tenían pesos corporales diferentes, aunque no se apreciaron diferencias entre las ratas del mismo grupo. El peso de las ZL oscilaba entre 152 y 182g y el de las ZO entre los 131 y 171g.

En la semana 16 de la experimental, las ratas fueron ganando peso llegándose a estabilizar al final de este periodo. La administración de quinapril y atorvastatina al principio inhibió el aumento de peso, restableciéndolo totalmente cuando las ratas llevaban 2 meses más de tratamiento.

El peso renal parece estar influido por el genotipo de las ratas ZO, los riñones de las cuales pesaban menos que los de las ZL.

**Tabla 9. Evaluación ponderal a las 16 semanas de edad**

GRUPO (16 Semanas)	Peso Corporal (g)	(%)Peso Riñón/Peso Corporal	(%)Peso Hígado/Peso Corporal
ZL1	327.5 ±10.4	0.89±0.06	2.75±0.42
ZO1	<sup>a</sup> 475.78±25.2	0.78±0.06	3.51±0.67

ANOVA, ONEWAY:  $p < 0.05$ : <sup>a</sup>ZL 1vs ZO1.

**Tabla 10. Evaluación ponderal a las 24 semanas de edad.**

GRUPO (24 Semanas)	Peso Corporal (g)	(%) Peso Riñón/ Peso Corporal	(%) Peso Hígado/ Peso Corporal
ZL2	405±17.4	0.88±0.02	3.24±0.09
ZO2	<sup>a</sup> 547.09±17.03	<sup>a</sup> 0.97±0.02	4.83±0.12
ZOQ2	476.28±15.31	0.91±0.05	3.94±0.18
ZOA2	475.16±26.15	1.02±0.09	5.38±0.29

ANOVA, ONEWAY:  $p < 0.05$ : <sup>a</sup>ZL2vsZO2

Datos expresados como media ± error estándar.

Tabla 11. Evaluación ponderal a las 32 semanas de edad.

GRUPO (32Semanas)	Peso Corporal (g)	(%)Peso Riñón/Peso Corporal	(%)Peso Hígado/Peso Corporal
ZL3	393.59±17.24	0.88±0.05	3.32±0.26
ZO3	<sup>a</sup> 558.37±13.64	<sup>a</sup> 0.73±0.07	5.65±0.39
ZOQ3	492.21±11.84	0.52±0.02	4.40±0.17
ZOA3	511.95±19.34	0.50±0.01	6.06±0.34

ANOVA, ONEWAY:  $p < 0.05$ : <sup>a</sup>ZL3vsZO3

#### 4.1.2 Presión arterial sistólica.

Ni en el inicio ni en el final de la experimental no se encontraron diferencias significativas entre los controles y los tratamientos, considerando la media de las presiones de todos los meses de vida de cada uno de los animales. Por el contrario, si se consideraba únicamente la presión sistólica de los dos últimos meses de vida, se detectaron divergencias estadísticamente significativas entre las ratas Zucker obese control y el grupo tratado con quinapril tanto a las 16 como 32 semanas de edad. También existían diferencias significativas entre ambos tratamientos a las 32 semanas de edad.

Tabla 12. Presión arterial sistólica

	ZL1	ZL2	ZL3	ZO1	ZO2	ZO3
Pr Media	139 ± 4	142 ± 3	141 ± 3	135 ± 7	138 ± 4	141 ± 3
Media de las 2 últimas presiones	145 ± 4	141 ± 2	139 ± 7	136 ± 8.6	140 ± 8	142 ± 8

	ZOQ2	ZOQ3	ZOA2	ZOA3
Pr Media	131 ± 10	127 ± 5	137 ± 2	140 ± 2
Media de las 2 últimas presiones	<sup>b</sup> 129 ± 5	<sup>p</sup> 129 ± 8	<sup>d</sup> 139 ± 4	<sup>c, e</sup> 149 ± 4

ANOVA,  $P$  entre grupos  $< 0.05$ ; <sup>c</sup> ZO3 vs ZOA3; <sup>d</sup> ZOQ2 vs ZOA2; <sup>e</sup> ZOQ3 vs ZOA3;

$P < 0.001$ : <sup>b</sup> ZO2 vs ZOQ2

ZLx: Zucker lean; ZOx: Zucker obese; ZOQx: Zucker obese tratadas con quinapril; ZOAx: Zucker obese tratadas con atorvastatina. X=1, 2 y 3, indicando edades de 16, 24 y 32 semanas.

Datos expresados como media ± error estándar. (n=8 por grupo)

#### 4.1.3 Creatinina, albúmina y proteínas en suero.

No se observan diferencias relevantes en lo que respecta a la creatinina, albúmina y proteínas en suero excepto para las proteínas totales donde la rata Zucker obesa a las 32 semanas presenta niveles significativamente superiores al control sano, Zucker lean y el grupo tratado con quinapril.

**Tabla 13. Creatinina, albúmina y proteínas en suero a las 16semanas de edad**

GRUPO 16 semanas	ZL1	ZO1
CREATININA(mg/dl)	0.43±0.02	0.38±0.03
ALBUMINA (g/l)	19.12±0.67	21.24±1.73
PROTEINAS (g/l)	30.90±0.93	38.64±1.76

**Tabla 14. Creatinina, albúmina y proteínas en suero a las 24semanas de edad**

GRUPO 24semanas	ZL2	ZO2	ZOQ2	ZOA2
CREATININA(mg/d)	0.38±0.02	0.35±0.17	0.42±0.03	0.51±0.03 <sup>e,j</sup>
ALBUMINA (g/l)	19.87±0.42	17.8±0.70	23.02±0.70	24.35±1.55
PROTEINAS (g/l)	33.75±0.53	37.32±0.95 <sup>g</sup>	44.03±2.48 <sup>c</sup>	42.3±2.12

**Tabla 15. Creatinina, albúmina y proteínas en suero a las 32semanas de edad**

GRUPO 32 semanas	ZL3	ZO3	ZOQ3	ZOA3
CREATININA(mg/dl)	0.34± 0.01	0.42± 0.05	0.38± 0.02 <sup>b</sup>	0.46± 0.04 <sup>i</sup>
ALBUMINA (g/l)	18.64 ± 0.49	18.15 ± 1.51	21.26 ± 0.69	20.54± 1.25
PROTEINAS (g/l)	31.37± 0.53	51.77± 6.32 <sup>a</sup>	36.76± 1.27 <sup>b,d,h</sup>	42.64± 2.17 <sup>f</sup>

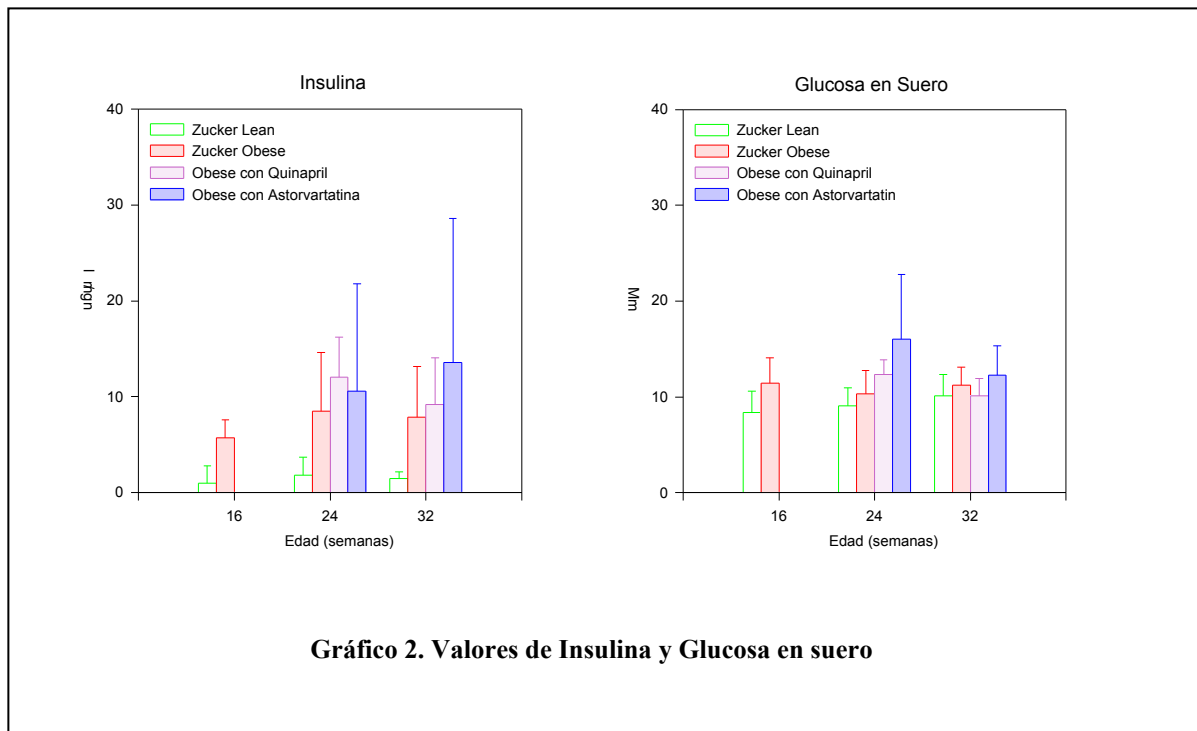
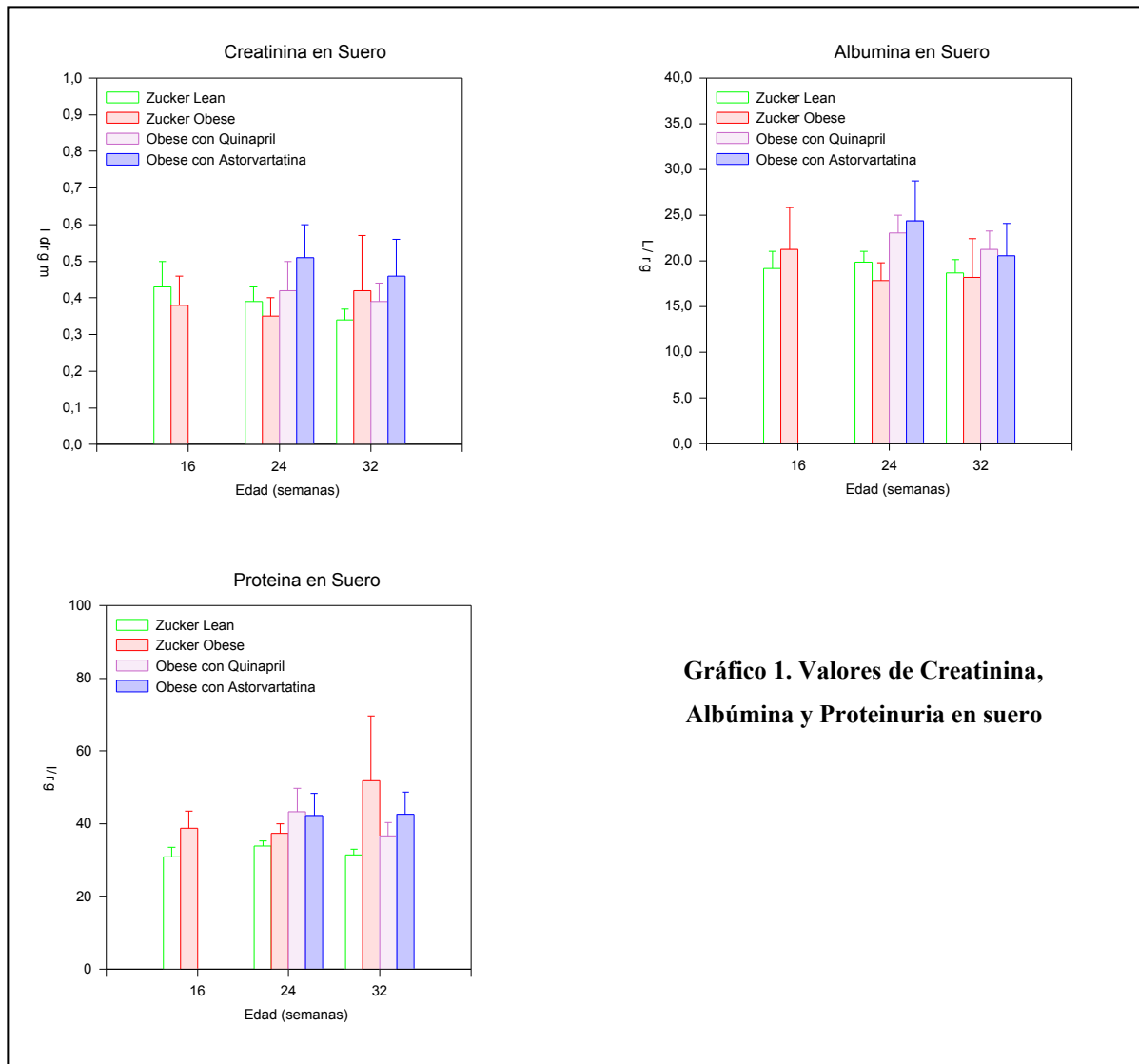
ANOVA,  $P$  entre grupos  $< 0.05$ ; <sup>a</sup>ZL3 vs ZO3; <sup>b</sup>ZL3 vs ZOQ3; <sup>c</sup>ZO2 vs ZOQ2; <sup>d</sup>ZO3 vs ZOQ3; <sup>e</sup>ZOQ2 vs ZOA2; <sup>f</sup>ZOQ3vsZOA3;  $P < 0.01$ ; <sup>g</sup>ZL2 vs ZO2; <sup>h</sup>ZL3 vs ZOQ3; <sup>i</sup>ZL3 vs ZOA3; <sup>j</sup>ZO2 vsZO A2.

ZLx: Zucker lean; ZOx: Zucker obesa; ZOQx: Zucker obesa tratadas con quinapril;

ZOAx: Zucker obesa tratadas con atorvastatina. X=1, 2 y 3, indicando edades de 16, 24 y 32 semanas.

Datos expresados como media ± error estándar. (n=8 por grupo)

**RESULTADOS**



## 4.1.4 Glucosa e Insulina en suero.

No se constataron diferencias en los niveles de glucemia, aunque es destacable que los niveles eran moderadamente altos. Los niveles de insulina resultaron ser significativamente superiores en las ratas Zucker obese, tal y como era de esperar por el modelo experimental.

Tabla 16. Glucosa e Insulina a las 16 semanas de edad

GRUPO 16 semanas	ZL1	ZO1
GLUCOSA (mol/dl)	8.4 ± 0.77	11.43 ± 0.99
INSULINA (ng/ml)	1.00 ± 0.41	5.70 ± 0.72

Tabla 17. Glucosa e Insulina a las 24 semanas de edad

GRUPO 24 semanas	ZL2	ZO2	ZOQ2	ZOA2
GLUCOSA (mol/dl)	9.06 ± 0.49	10.30 ± 0.87	12.33 ± 0.55	16 ± 2.4
INSULINA (ng/ml)	1.80 ± 0.72	<sup>a</sup> 8.48 ± 2.15	12.05 ± 1.45	10.56 ± 3.9

Tabla 18. Glucosa e Insulina a las 32 semanas de edad

GRUPO 32 semanas	ZL3	ZO3	ZOQ3	ZOA3
GLUCOSA (mol/dl)	10.11 ± 0.75	11.25 ± 0.65	10.13 ± 0.62	12.25 ± 1.1
INSULINA (ng/ml)	1.48 ± 0.22	<sup>b</sup> 7.88 ± 1.85	<sup>c</sup> 9.16 ± 1.73	13.54 ± 5.31

ANOVA, ONEWAY: P<0.05; a = ZL2vs ZO2, b= ZL3 vs ZO3, c=ZO2 vs ZOQ2

ZLx: Zucker lean; ZOx: Zucker obese; ZOQx: Zucker obese tratadas con quinapril;  
ZOAx: Zucker obese tratadas con atorvastatina. X=1, 2 y 3, indicando edades de 16, 24 y 32 semanas.

Datos expresados como media ± error estándar. (n=8 por grupo)

## RESULTADOS

### 4.1.5 Lípidos en suero.

Se encontraron diferencias significativas desde las 8 semanas de edad entre ambos grupos controles: las ratas Zucker obese presentaban un 63.31% en colesterol y un 91% en triglicéridos mayor que el grupo control Fa/fa. La concentración de colesterol fue disminuida por el quinapril en un 27.5 % (16 semanas de edad) y 60.43% (32 semanas de edad) alcanzando diferencias reseñables. Por otro lado, la Atorvastatina mostró únicamente divergencias destacables a las 32 semanas de edad, reduciendo las cifras de colesterol en un 28.11%. Se encontraron niveles reductores de colesterol mejores en el grupo tratado con quinapril.

La concentración de triglicéridos séricos fue disminuida significativamente en un 69 % por el quinapril (32 semanas de edad). El grupo tratado con Atorvastatina alcanzó diferencias significativas a las 16 semanas de edad (disminución de 50.1%) y a las 32 semanas de edad (disminución del 54.65%). Aunque la Atorvastatina redujo previamente los niveles de triglicéridos (16 semanas de edad), no se encontraron diferencias entre ambos fármacos a las 32 semanas de edad, llegando a alcanzar unas niveles de reducción de los triglicéridos muy similares.

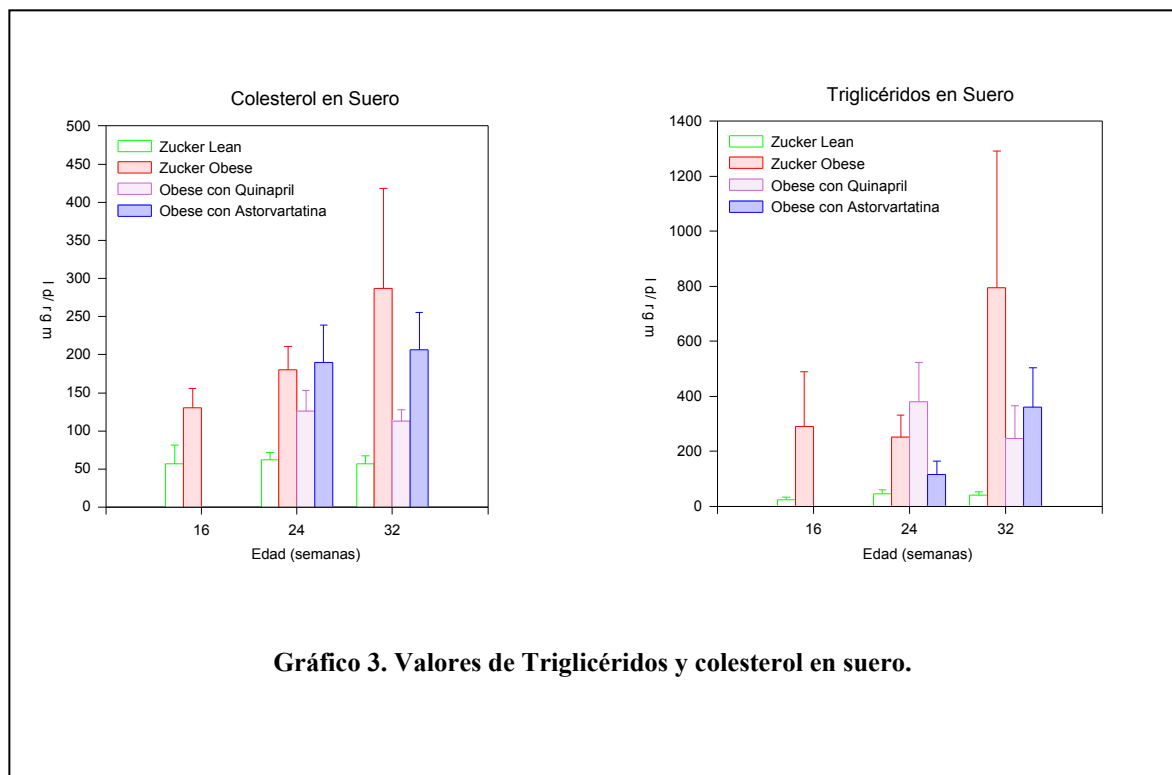


Tabla 19. Colesterol y triglicéridos séricos a las 16 semanas de edad

GRUPO 16 semanas	ZL1	ZO1
COLESTEROL (mg/dl)	57.08±8.67	130.47±9.58
TRIGLICERICIDOS (mg/dl)	24.28±2.88	289.87±75.59

Tabla 20. Colesterol y triglicéridos séricos a las 24 semanas de edad

GRUPO 24semanas	ZL2	ZO2	ZOQ2	ZOA2
COLESTEROL (mg/dl)	62.47±3.42	180.43±10.84 <sup>h</sup>	126.55 ± 9.58 <sup>a</sup>	190.59±17.42 <sup>g</sup>
TRIGLICERICI- DOS (mg/dl)	45.50±5.37	252.44±28.05 <sup>h</sup>	380 ± 50.29 <sup>a</sup>	115.95±17.30 <sup>f,k</sup>

Tabla 21. Colesterol y triglicéridos séricos a las 32 semanas de edad

GRUPO 32 semanas	ZL3	ZO3	ZOQ3	ZOA3
COLESTEROL (mg/dl)	57.19± 3.34	287.35±46.43 <sup>d</sup>	113.68±5.21 <sup>e,i</sup>	206.56±17.46 <sup>j,b</sup>
TRIGLICERICI- DOS (mg/dl)	39.37± 4.48	795.70± 175.4 <sup>d</sup>	246.85± 42.6 <sup>b,c</sup>	360.83± 51.04 <sup>c,j</sup>

ANOVA, *P* entre grupos < 0.05: <sup>a</sup>ZO2 vs ZOQ2; <sup>b</sup>ZO3 vs ZOQ3 *P* < 0.01; <sup>c</sup>ZL3 vs ZOQ3; <sup>d</sup>ZL3 vs ZO3; <sup>e</sup>ZO3 vs ZOQ3; <sup>f</sup>ZO2 vs A2; <sup>g</sup>ZOQ2 vs ZOA2 *P* < 0.001; <sup>h</sup>ZL2 vs ZO2; <sup>i</sup>ZL3 vs ZOQ3; <sup>j</sup>ZL3 vs ZOA3; <sup>k</sup>ZOQ2 vs ZOA2.

ZLx: Zucker lean; ZOx: Zucker obese; ZOQx: Zucker obese tratadas con quinapril;  
ZOAx: Zucker obese tratadas con atorvastatina. X=1, 2 y 3, indicando edades de 16, 24 y 32 semanas.

Datos expresados como media ± error estándar. (n=8 por grupo)

## RESULTADOS

### 4.1.6 Proteinuria.

Las ratas Zucker obese iniciaron el desarrollo de la proteinuria a partir del tercer mes de edad. El tratamiento con quinapril redujo la proteinuria hasta niveles basales, semejantes a los de los controles, Zucker lean. La atorvastatina disminuyó la proteinuria de manera significativa, en un 37% (6<sup>o</sup>mes) sin llegar a reducir los valores basales.

**Tabla 22. Proteinuria (mg/24horas)**

GRUPO	ZL	ZO	ZOQ	ZOA
1° MES	3.2±0.42	1.18±0.20	1.92±0.19	1.06±0.17
2° MES	4.80±0.48	4.51±0.56	2.78±0.33	3.43±1.08
3° MES	4.32±0.37	55.18±26.15	2.51±0.45	33.20±8.93
4° MES	4.15±0.56	128.85±13.93 <sup>a,b</sup>	2.72±0.45	77.85±16.08 <sup>f</sup>
5° MES	4.83±0.67	186.10±24.36	3.78±1.20	123.56±18.66
6° MES	5.45±0.56	226.38±30.8 <sup>c,d,e</sup>	4.14±1.25	142.7±21.39 <sup>g</sup>

ANOVA, ONEWAY a= ZL(2) vs ZO (4) p: 0.001; b= ZO (4) vs ZQ (4) p: 0.001;  
c= ZL (6) vs ZO (6) p: 0.000; d= ZO (6) vs ZQ (6) p: 0.000; e= ZO (6) vs ZOA (6)  
p: 0.046; f= ZOQ (4) vs ZOA (4) p: 0.027; g= ZOQ (6) vs ZOA (6) p: 0.001

ZLx: Zucker lean; ZOx: Zucker obese; ZOQx: Zucker obese tratadas con quinapril;  
ZOAx: Zucker obese tratadas con atorvastatina. X=1, 2 y 3, indicando edades de 16, 24 y 32 semanas.

Datos expresados como media ± error estándar. (n=8 por grupo)

### 4.1.7 Análisis histológico.

Histológicamente queda patente la aparición de lesiones incipientes, debidas al fenotipo de la rata Zucker Obese, modelo de hiperlipidemia y DMNID (Foto 1). Las diferencias entre los controles se evidencian en la semana 16, aumentándose la diferencias de una manera exponencial entre ambos grupos en la semana 32. El quinapril redujo el número de glomérulos lesionados llegando a la normalización del cuadro histológico, mientras que la atorvastatina disminuyó las lesiones en un 58.7% a las 32 semanas de edad.



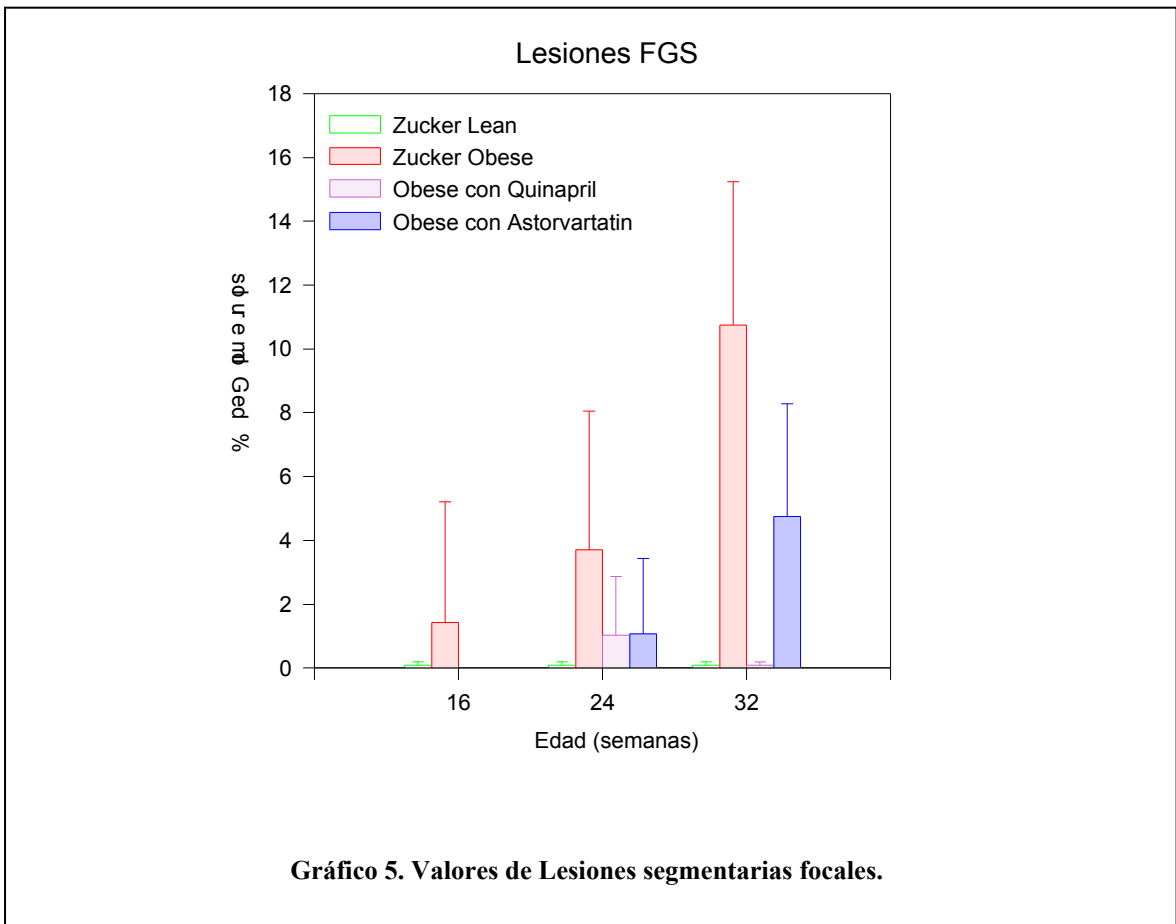
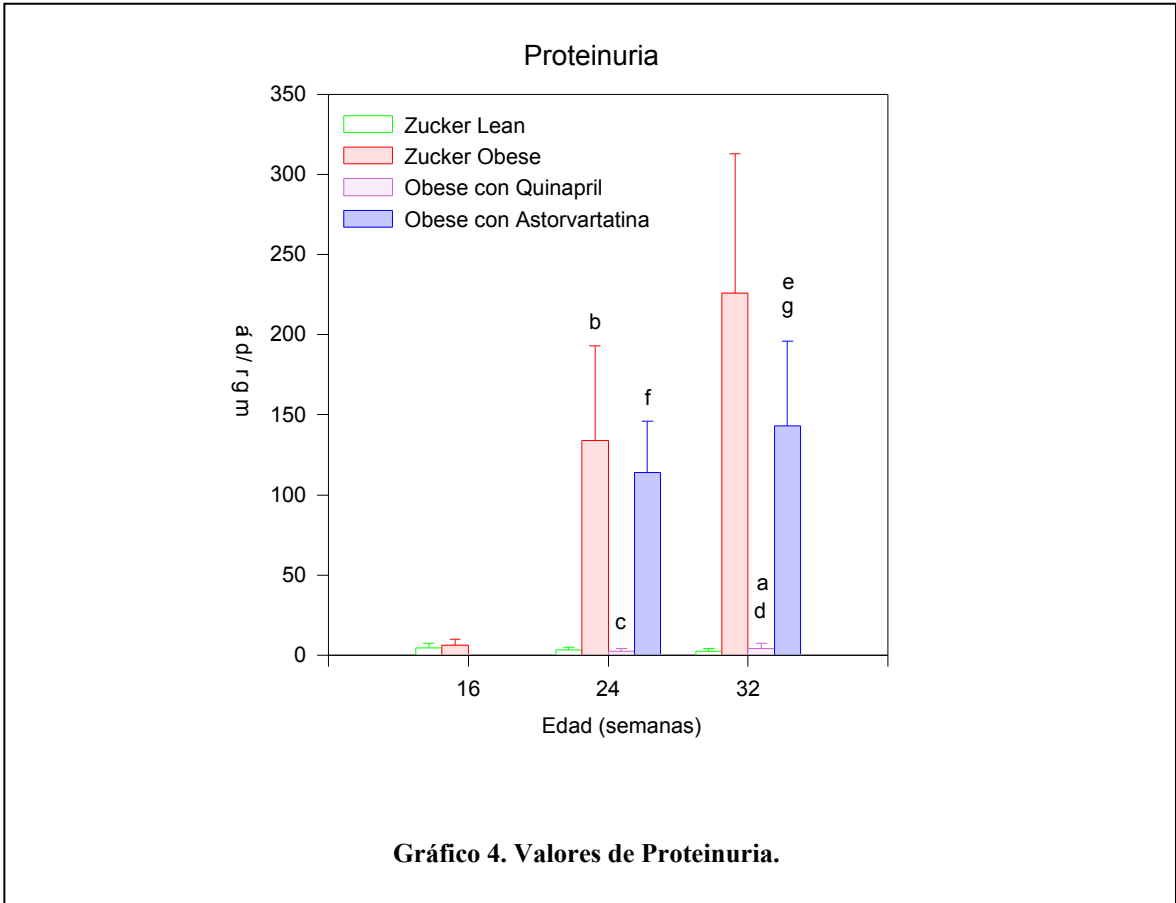


Tabla 23. Porcentaje de glomérulos (%) con lesiones segmentarias focales.

GRUPO 16 semanas	ZL1	ZO1
Lesiones Glomerulares (%)	0	1.43±1.43

Tabla 24. Porcentaje de glomérulos (%) con lesiones segmentarias focales.

GRUPO 24 semanas	ZL2	ZO2	ZOQ2	ZOA2
Lesiones Glomerulares (%)	0	3.70±1.54 <sup>a</sup>	1.18 ±0.73	1.07±0.83

Tabla 25. Porcentaje de glomérulos (%) con lesiones segmentarias focales.

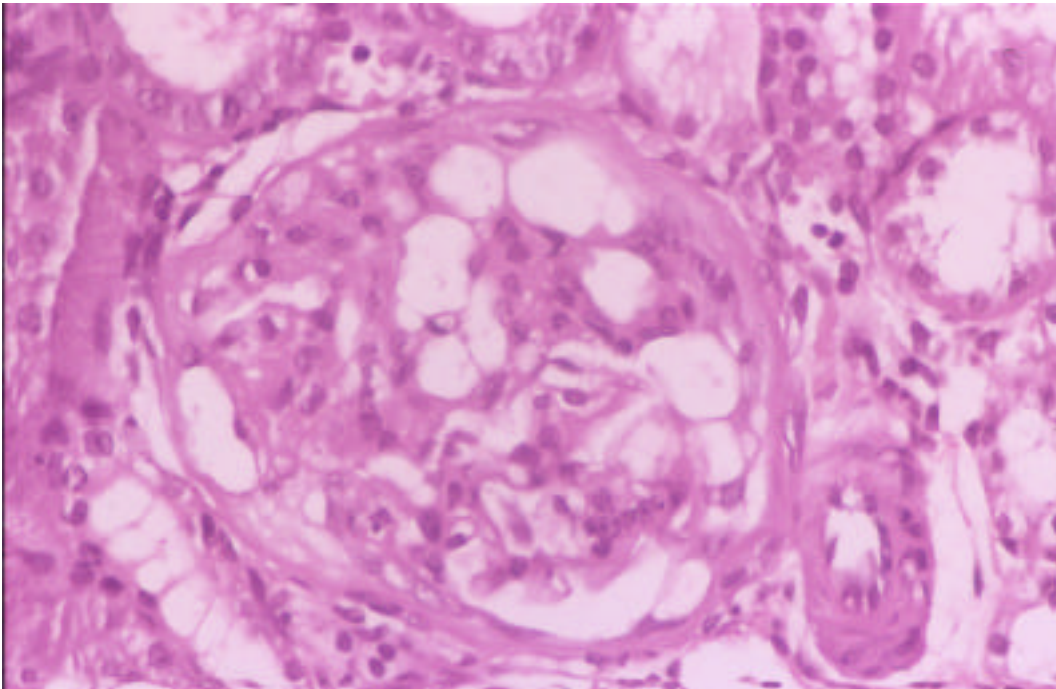
GRUPO 32 semanas	ZL3	ZO3	ZOQ3	ZOA3
Lesiones Glomerulares (%)	0	10.73 ±1.6 <sup>c</sup>	0 <sup>d,f</sup>	4.75±1.24 <sup>b,e</sup>

Lesiones Glomerulares (%): número de glomérulos con lesiones, en un total de 100 glomérulos observados (Apartado 3.1.1.2.1)

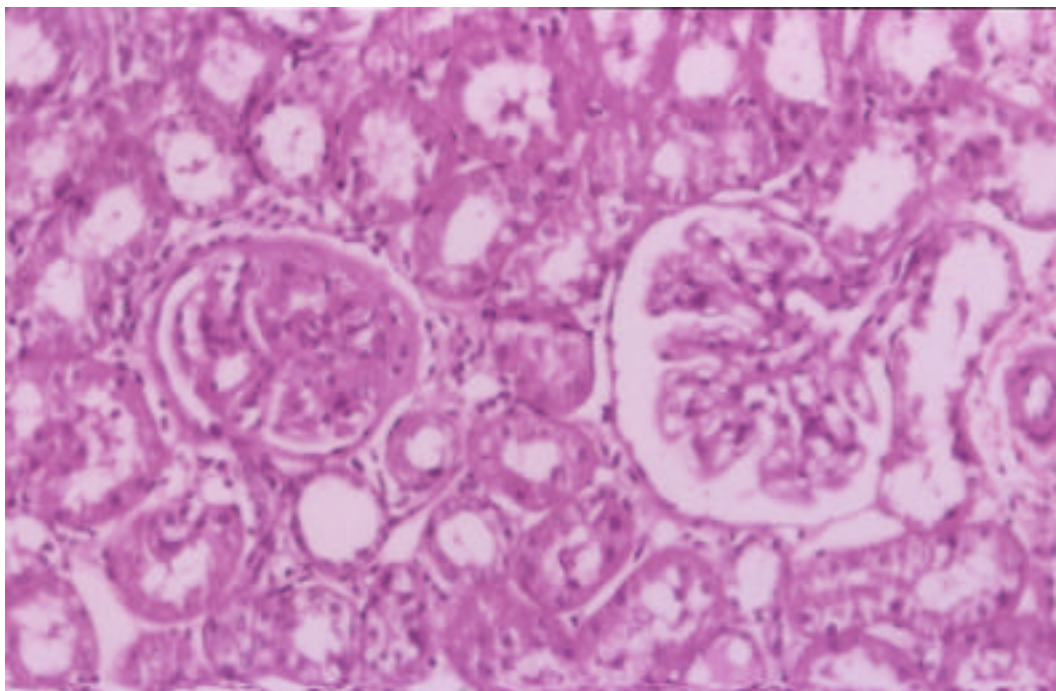
ANOVA, *P* entre grupos < 0.05: <sup>a</sup>ZL2 vs ZO2; <sup>b</sup>ZO3 vs ZOA3, *P* < 0.01: <sup>c</sup>ZL3 vs ZO3; <sup>d</sup> ZO3 vs ZOQ3; <sup>e</sup>ZL3 vs ZOA3; <sup>f</sup>ZOQ3 vs ZOA3.

ZLx: Zucker lean; ZOx: Zucker obese; ZOQx: Zucker obese tratadas con quinapril;  
ZOAx: Zucker obese tratadas con atorvastatina. X=1, 2 y 3, indicando edades de 16, 24 y 32 semanas.  
Datos expresados como media ± error estándar. (n=8 por grupo)

Se observa la aparición de lesiones glomerulares focales acompañadas de lesiones intersticiales (foto 2), caracterizadas por inflamación crónica alrededor de los vasos con obliteración de la luz capilar. Éstas eran tan severas como las mismas lesiones glomerulares. Se puede apreciar la existencia de algunas células espumosas, aunque no en el número que se detecta en ratas alimentadas con dietas de alto contenido graso.



**Foto 1. Tinción hematoxilina-eosina 40X. Presencia de histiocitos espumosos en el glomérulo con inicio de lesión segmentaria.**



**Foto 2. Tinción hematoxilina-eosina 20X. Foco de inflamación crónica en intersticio.**

## 4.2 EXPERIMENTAL IN VITRO

### 4.2.1 Análisis morfométrico.

La área glomerular mostró discordancias reseñables entre ambos grupos controles a las 24 semanas de edad. El tratamiento con quinapril redujo el área un 21% (24-semanas) y un 45% (32-semanas) respectivamente. En cambio, la atorvastatina alcanzó valores únicamente significativos a las 24-semanas (32% de reducción).

**Tabla 26. Área glomerular séricos a las 16 semanas de edad**

GRUPO 16 semanas	ZL1	ZO1
Glomerular area (GA) ( $\mu\text{m}^2$ )	7437 $\pm$ 788	9224 $\pm$ 788

**Tabla 27. Área glomerular a las 24 semanas de edad**

GRUPO 24semanas	ZL2	ZO2	ZOQ2	ZOA2
Glomerular area (GA) ( $\mu\text{m}^2$ )	10173 $\pm$ 842	13243 $\pm$ 788 <sup>a</sup>	10478 $\pm$ 788 <sup>d</sup>	9027 $\pm$ 842 <sup>i</sup>

**Tabla 28. Área glomerular a las 32 semanas de edad**

GRUPO 32 semanas	ZL3	ZO3	ZOQ3	ZOA3
Glomerular area (GA) ( $\mu\text{m}^2$ ) (mg/dl)	11915 $\pm$ 743 <sup>h</sup>	14212 $\pm$ 788 <sup>c</sup>	7840 $\pm$ 842 <sup>b,f</sup>	13402 $\pm$ 910 <sup>g</sup>

ANOVA, *P* entre grupos < 0.05: <sup>a</sup>ZL2 vs ZO2, <sup>b</sup>ZL3 vs ZOQ3, <sup>c</sup>ZL3vsZO3, <sup>d</sup>ZO2 vs ZOQ2.  
*P* < 0.01: <sup>h</sup>ZL3 vs ZOA3, <sup>i</sup>ZO2 vs ZOA2 *P* < 0.001: <sup>f</sup>ZO3 vs ZOQ3, <sup>g</sup>ZOQ3 vs ZOA3.

ZLx: Zucker lean; ZOx: Zucker obese; ZOQx: Zucker obese tratadas con quinapril;  
 ZOAx: Zucker obese tratadas con atorvastatina. X=1, 2 y 3, indicando edades de 16, 24 y 32 semanas.

Datos expresados como media  $\pm$  error estándar. (n=8 por grupo)

4.2.2 Estudio inmunohistoquímico.

4.2.2.1 Marcadores de proliferación celular: Ki-67

No se encontró expresión de este marcador en ningún grupo. Como control positivo se utilizó un ganglio linfático.

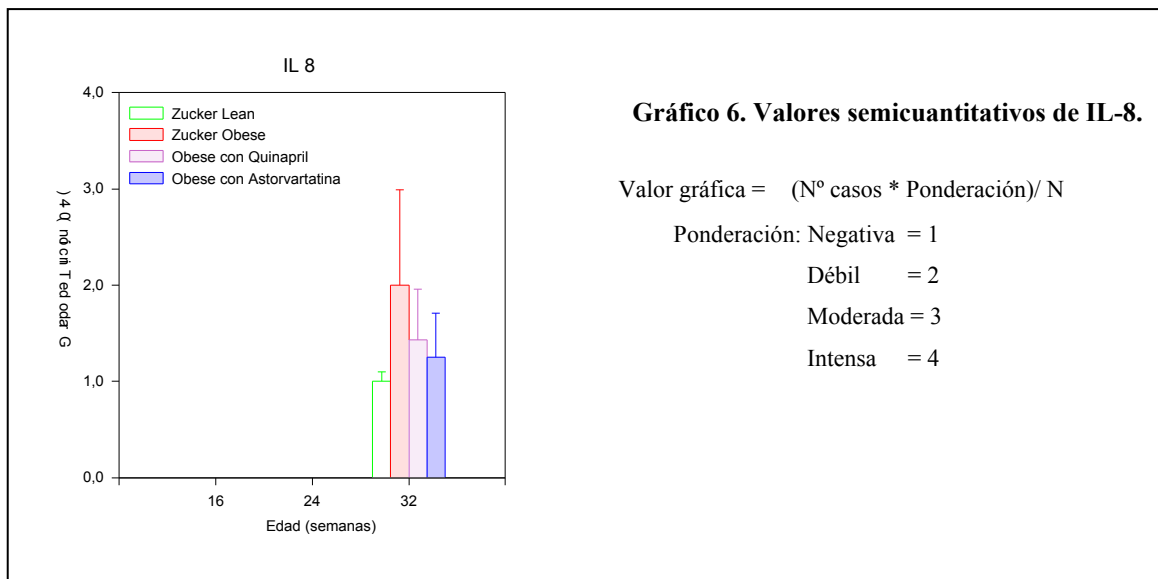
4.2.2.2 Marcadores de actividad quimiotáctica: IL-8 e IP-10

La expresión de IL-8 fue claramente negativa en el grupo de las ratas Zucker lean (foto3) mientras que las Zucker obese se teñían significativamente para este marcador (foto 3)(100% de tinción moderada en intensa). El tratamiento con quinapril redujo el grado de tinción (14% intensa, 28% moderada y 57% débil y negativa) sin llegar a alcanzar significación. La atorvastatina tampoco alcanzó cambios significativos. La quemoquina IL-8 encontró principalmente en el epitelio tubular.

Tabla 29. Tinción de IL-8. Número de casos por grupo de rata y tipo de tinción.

GRUPO	ZL3	ZO3 <sup>a</sup>	ZOQ3	ZOA3
Negativa	8	2	4	6
Débil	0	1	0	0
Moderada	0	2	3	2
Intensa	0	3	0	0

CHI-SQUARE, P entre grupos < 0.05: aZL3 vs ZO3



**RESULTADOS**

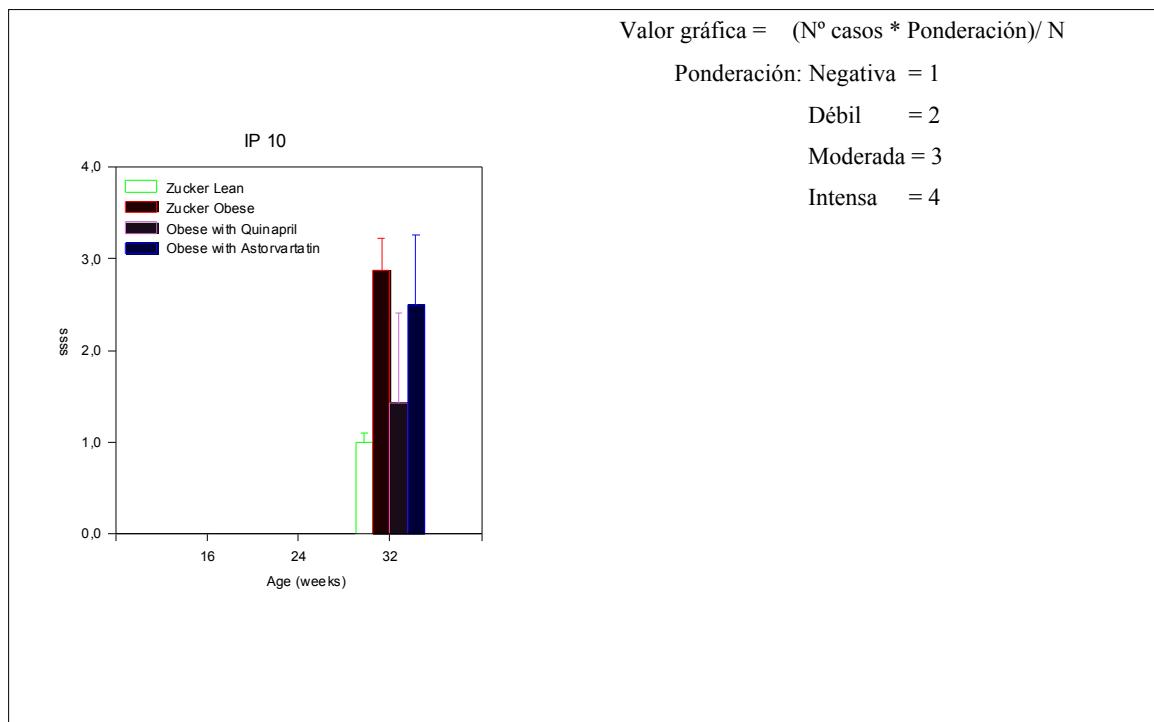
La inmunohistoquímica del IP-10 resultó ser significativamente diferente entre las ratas control, Zucker lean y Zucker obese (foto 4). El tratamiento con quinapril alcanzó diferencias significativas en la reducción del IP-10 respecto al grupo control de las ratas Zucker obese.

**Tabla 30. Tinción de IP-10. Número de casos por grupo de rata y tipo de tinción.**

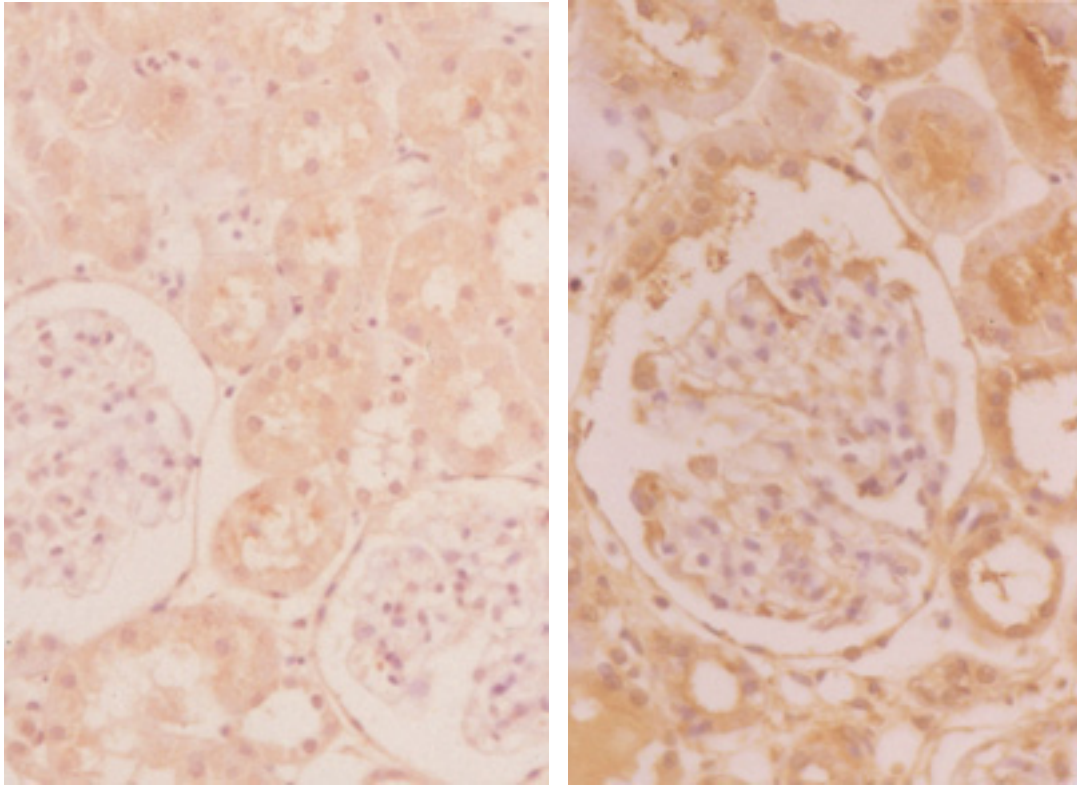
GRUPO	ZL	ZO <sup>b</sup>	ZOQ <sup>a</sup>	ZOA
<b>Negativa</b>	7	0	1	0
<b>Débil</b>	0	0	3	1
<b>Moderada</b>	0	1	2	2
<b>Intensa</b>	0	7	1	5

**CHI-SQUARE, P entre grupos < 0.05: aZ3 vs Q3; P<0.001: bL3 vs Z3.**

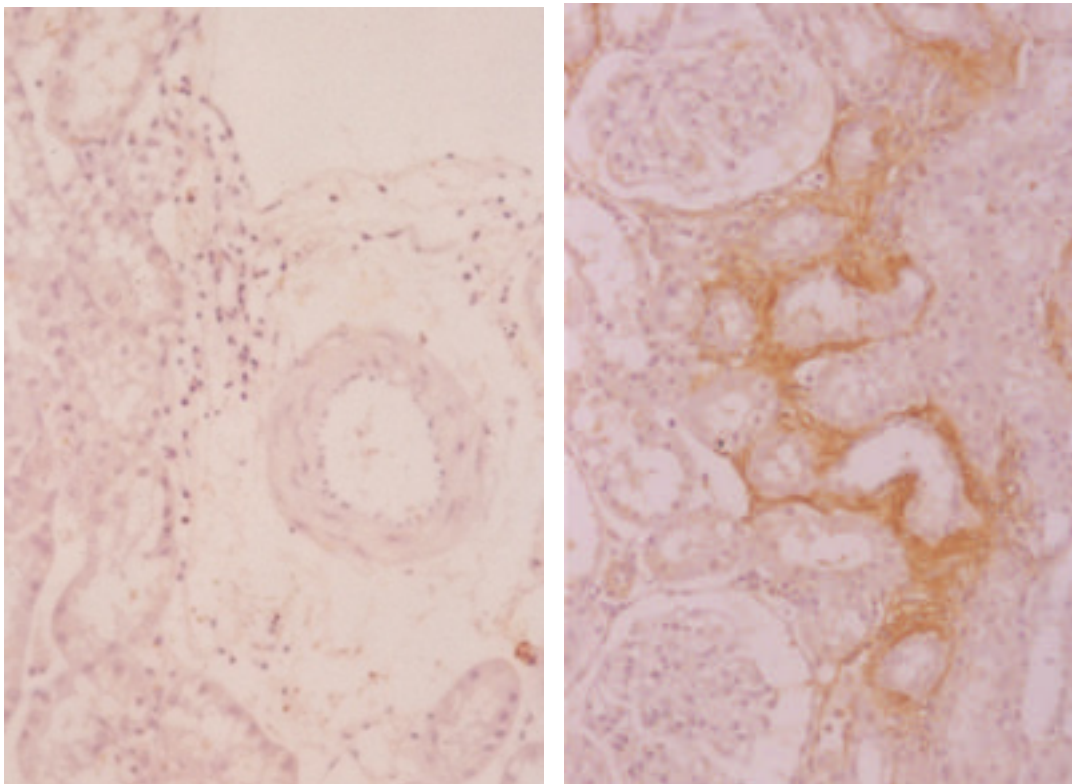
La quimocina IP-10 se encontró principalmente en el intersticio.



**Gráfico 7. Valores semicuantitativos de IP-10.**



**Foto 3. Inmunohistoquímica del IL-8. A la izquierda, foto de RZL, la cual presenta tinción negativa. A la derecha, RZO la cual presenta tinción en los túbulos, cápsula de Bowman y en los podocitos.**



**Foto 4. Inmunohistoquímica del IP10. A la izquierda RZL. A la derecha, RZO con tinción intersticial.**

## RESULTADOS

### 4.2.2.3 Marcadores de las células monocitos/macrófagos: ED<sup>+</sup> 1

Las células positivas para ED1, macrófagos, se encontraron únicamente en el intersticio y vasos de las ratas Zucker obese (foto5). El tratamiento con quinapril y atorvastina resultó ser significativamente diferente, alcanzando una reducción menor en el número de ED1 el grupo tratado con atorvastatina, que consiguió normalizar por completo el número de macrófagos infiltrados.

**Tabla 31. Media del número de células-ED1 positivas en 50 glomérulos por animal en los grupos de 32-semanas de edad.**

Localización	ZL3	ZO3	ZOQ3	ZOA3
Glomérulo	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Células tubulares	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Intersticio	5 ± 3.57	2.62 ± 11.96	0.5 ± 0.83 <sup>a, c</sup>	0 ± 0 <sup>b, d</sup>
Capilares	6.4 ± 6.82	17 ± 16.63	1.33 ± 2.42 <sup>a</sup>	0 ± 0 <sup>b, d</sup>
Total	11.42 ± 9.72	29.62 ± 29.62	1.83 ± 3.25 <sup>a, c</sup>	0 ± 0 <sup>b, d</sup>

WILCONSON, *P* entre grupos < 0.05: <sup>a</sup>ZO3 vs ZOQ3, <sup>b</sup>Z3 vs ZOA3, <sup>c</sup>ZL3 vs ZOQ3, <sup>d</sup>ZL3 vs ZOA3.

### 4.2.2.4 Marcadores de lesión podocitaria: Desmina

Las ratas Zucker obese mostraron un incremento de la área glomerular desde las 16-semanas de vida, alcanzando un aumento significativo del 86% (24-semanas) y del 98% (32-semanas) respectivamente (foto 6). El tratamiento con quinapril alcanzó diferencias significativas del 90.2% (24-semanas) y 98.5% (32-semanas). Por lo que concierne a la atorvastatina, redujo la área aunque en menor proporción 27.3% (24-semanas). y 23% (32-semanas), siendo reseñable únicamente el primer caso.

**Tabla 32. Porcentaje de área positiva para la desmina respecto al área del oville glomerular.**

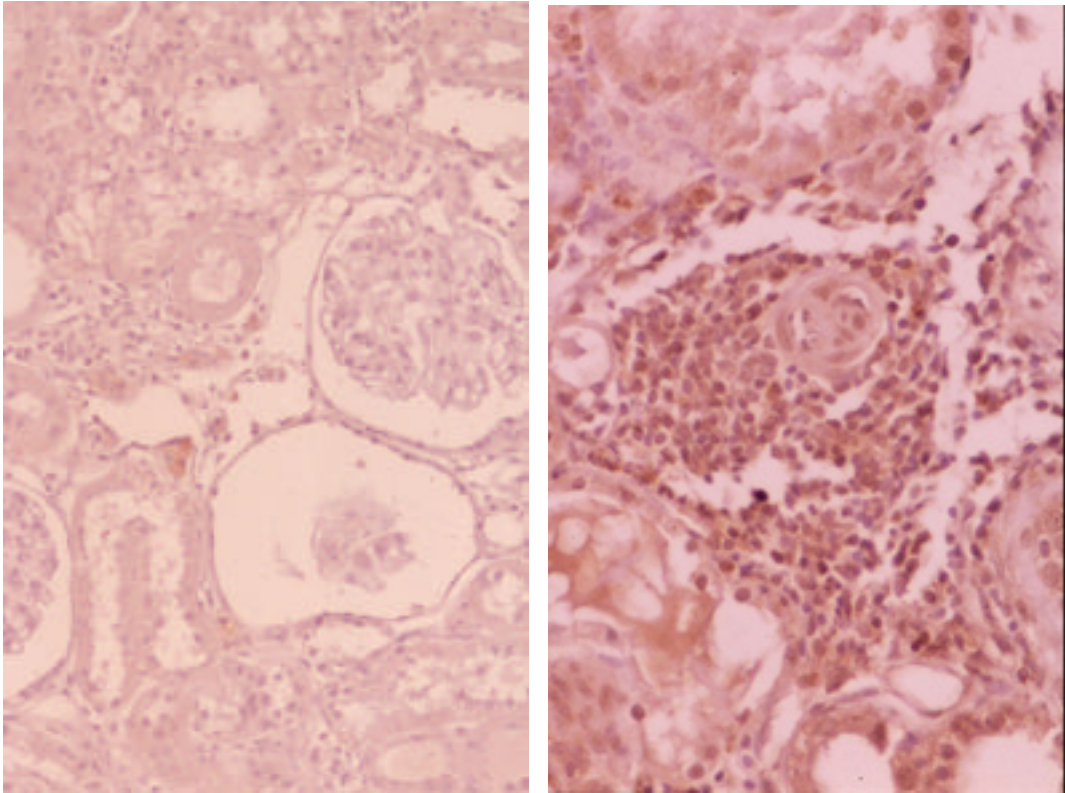
	ZL1	ZL2	ZL3	ZO1	ZO2	ZO3
Área positiva para desmina (% del área)	0.37 ± 0.95	1.36 ± 1.02	0.12 ± 0.90	5.63 ± 0.95	10.01 ± 0.95 <sup>a</sup>	6.14 ± 0.95 <sup>b</sup>

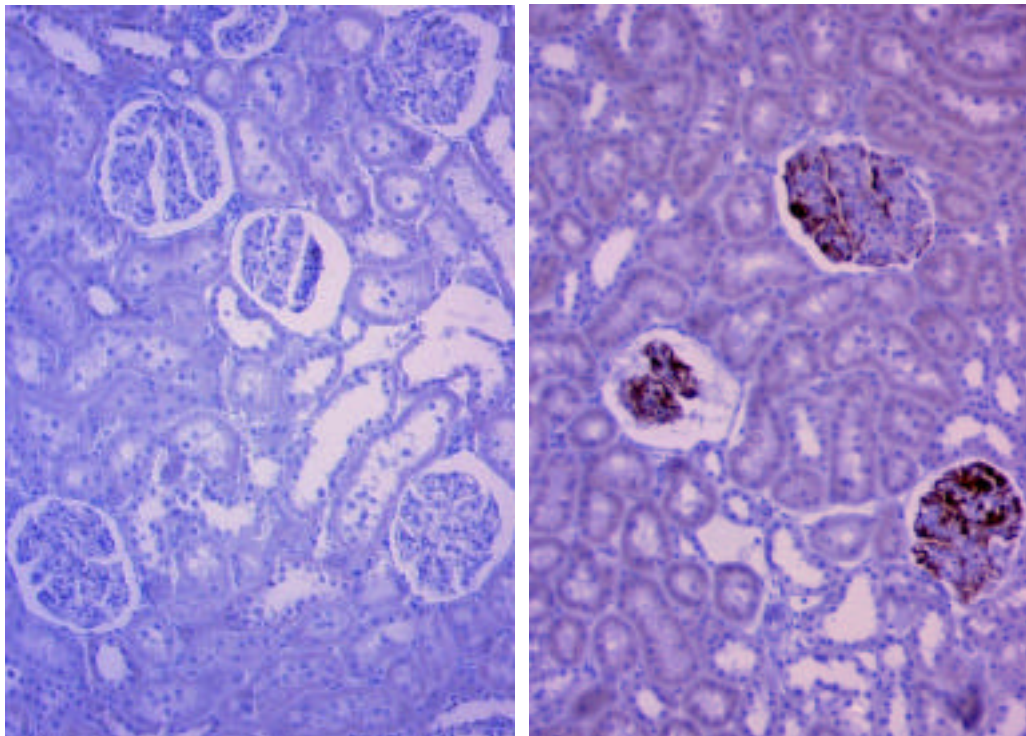
	ZQ2	ZQ3	ZA2	ZA3
Área positiva para desmina (% del área)	0.92 ± 0.95 <sup>c</sup>	0.09 ± 1.02 <sup>d</sup>	7.27 ± 1.02 <sup>f</sup>	4.73 ± 1.02 <sup>e, g</sup>

ANOVA, *P* entre grupos < 0.001: <sup>a</sup>L2 vs ZO2; <sup>b</sup>L3 vs ZO3, <sup>c</sup>ZO2 vs ZOQ2, <sup>d</sup>ZO3 vs ZOQ3, <sup>f</sup>ZOQ2vsZOA2, *P*<0.005; <sup>e</sup>ZL3 vs ZA3, <sup>g</sup>ZOQ3vs ZOA3.





**Foto 5. Inmunohistoquímica de ED1. A la izquierda RZL. A la derecha RZO con presencia de filtrado inflamatorio intersticial rodeando un vaso.**



**Foto 6. Tinción desmina. Izquierda RZL. Derecha RZO con tinción positiva en podocitos.**

**4.2.2.5 Marcadores de proliferación de matriz extracelular: TGF- $\beta_1$**

No se encontró expresión de esta proteína en el intersticio de las zonas con lesión, como cabría esperar. Únicamente se pudo apreciar una inmunoreactividad basal sutil en los endotelios de las ratas de los cuatro grupos.

**Tabla 33. Inmunohistoquímica del TGF- $\beta$  Número de casos por grupo de rata y tipo de tinción.**

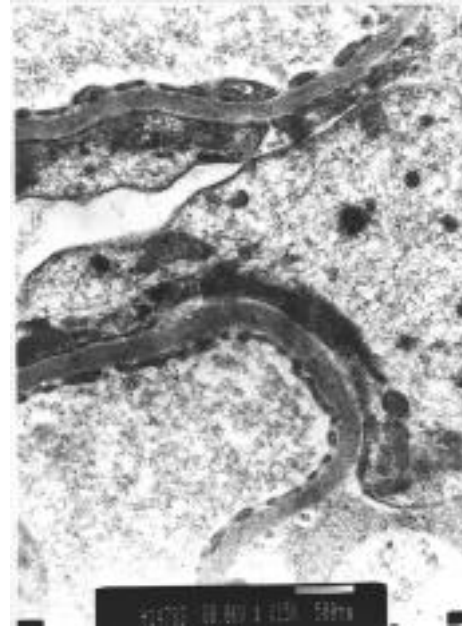
<b>grupo</b>	<b>ZL</b>	<b>ZO</b>	<b>ZOQ</b>	<b>ZOA</b>
<b>Negativo</b>	0	0	0	0
<b>Débil</b>	9	10	7	6
<b>Moderado</b>	0	0	0	0
<b>Intenso</b>	0	0	0	0

**4.2.3 Microscopía electrónica.**

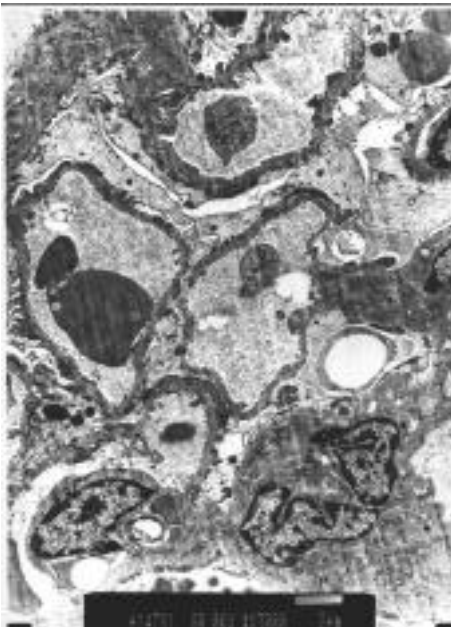
Mediante microscopía electrónica, se constató que las ratas Zucker lean presentaban una morfología podocitaria y ultraestructura glomerular totalmente normales (Foto 7A). A diferencia de las ratas Zucker obese que mostraban proteinuria, lesiones segmentarias focales y tinción positiva para la desmina, así como gotas lipídicas intracitoplasmáticas y fusión de los pedicelos de los podocitos (foto 7, D). Además, se apreció una acumulación de filamentos intermedios en la zona podocitaria que las ratas control no presentaban (foto 7B).



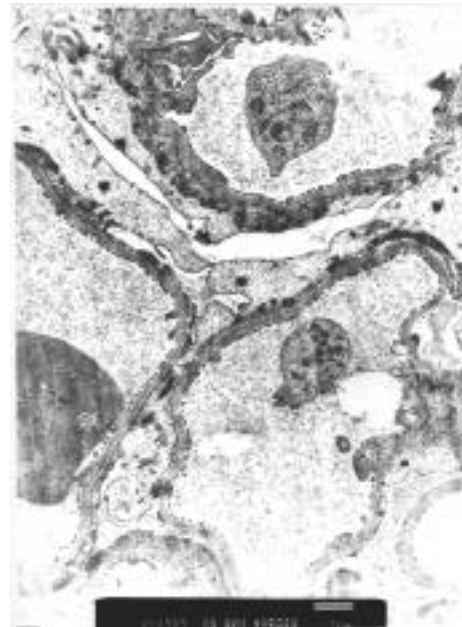
**(A) Rata Zucker Lean (x6.000).**  
Ultraestructura de una célula epitelial y sus prolongaciones primarias y secundarias con la membrana basal del capilar glomerular



**(B) Rata Zucker Obese (x15.000).** Detalle ultraestructural de glomérulo con acumulación de filamentos intermedios a nivel podocitario y fusión podocitaria



**(C) Rata Zucker Obese (x3.000).** Asas capilares tapizados por una delgada capa de citoplasma endotelial fenestrado.



**(D) Rata Zucker Obese (x5.000).** Detalle del lisosoma de la foto anterior lleno de lípidos.

**Foto 7. Fotografías al microscopio electrónico.**

4.2.4 Análisis de la expresión de ARN de factores de crecimiento

4.2.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

No se encontraron diferencias significativas en la expresión del TGF- $\beta_1$  entre las ratas Zucker obese y las ratas Zucker lean a pesar de que el nivel basal (inicial) de TGF- $\beta_1$  de las ratas Zucker obese fue superior al de sus homólogas lean. Tampoco se encontraron diferencias cuando se comparaban con los tratamientos con quinapril y atorvastatina. Existe una gran variabilidad interindividual dentro de los grupos que podría explicara que no se encuentren diferencias estadísticamente significativas. A pesar de ello, el TGF- $\beta_1$  presenta el mismo patrón de expresión tanto en los grupos controles como en los tratados.

Tabla 34. Expresión de ARN en el glomérulo del Factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta_1$ ) y Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-B).

	ZL1	ZL2	ZL3	ZO1	ZO2	ZO3
PDGF-B 10 <sup>-4</sup> amol/ amol ciclofilina	1188 ± 197	1122 ± 102	1443 ± 256	1576 ± 259	502 ± 76 <sup>a</sup>	787 ± 102 <sup>c</sup>
TGF- $\beta_1$ 10 <sup>-5</sup> amol / amol ciclofilina	2204 ± 301	2070 ± 262	3427 ± 752	3383 ± 865	1434 ± 389	2377 ± 388

	ZOQ2	ZOQ3	ZOA2	ZOA3
PDGF-B 10 <sup>-4</sup> amo/ amol ciclofilina	507 ± 126	1200 ± 323	1127 ± 60 <sup>b</sup>	1176 ± 272
TGF- $\beta_1$ 10 <sup>-5</sup> amol/ amol ciclofilina	1766 ± 281	3662 ± 682	1604 ± 174	2386 ± 611

La expresión de ambas citocinas fue normalizada con el gen constitutivo de la ciclofilina.

Las muestras se realizaron por triplicado.

ANOVA, *P* entre grupos < 0.01: <sup>a</sup>ZL2 vs ZO2; <sup>b</sup>ZOQ2 vs ZOA2. *P* < 0.05: <sup>c</sup>ZL3 vs ZO3

ZLx: Zucker lean; ZOx: Zucker obese; ZOQx: Zucker obese tratadas con quinapril;

ZOAx: Zucker obese tratadas con atorvastatina. X=1, 2 y 3, indicando edades de 16, 24 y 32 semanas.

Datos expresados como media ± error estándar. (n=8 por grupo)

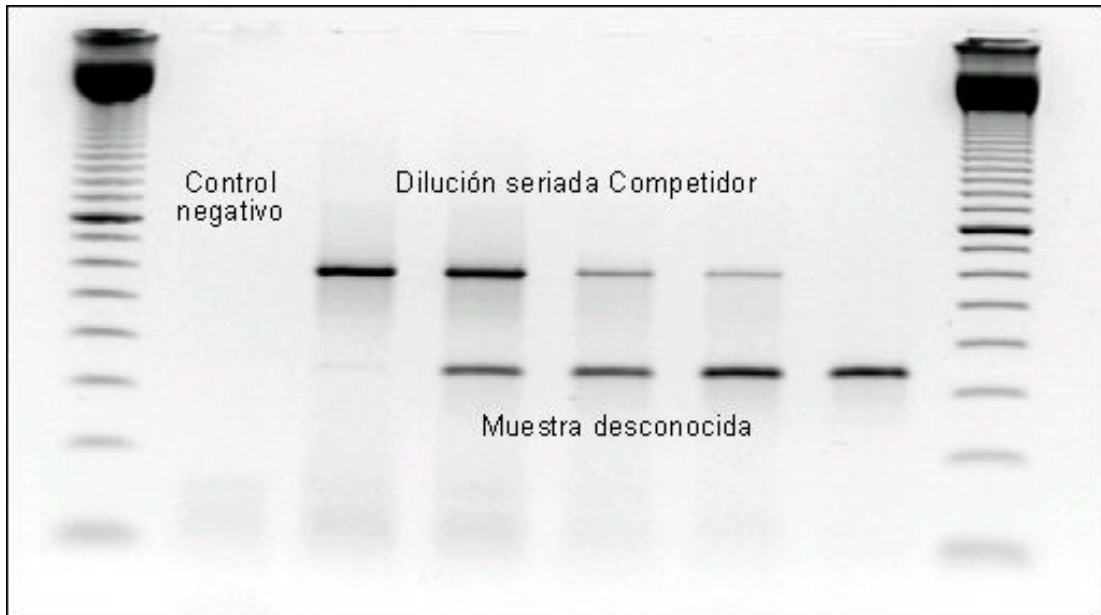


Foto 8. RT-PCR competitiva para PDGF-B

Se muestra la imagen invertida de un gel teñido con Bromuro de Etidio. PCR realizada con 1µl de cADN procedente de 5µg de ARN de dilución 1/33 de cada animal que fueron coamplificados con una dilución seriada de un competidor de concentración conocida.

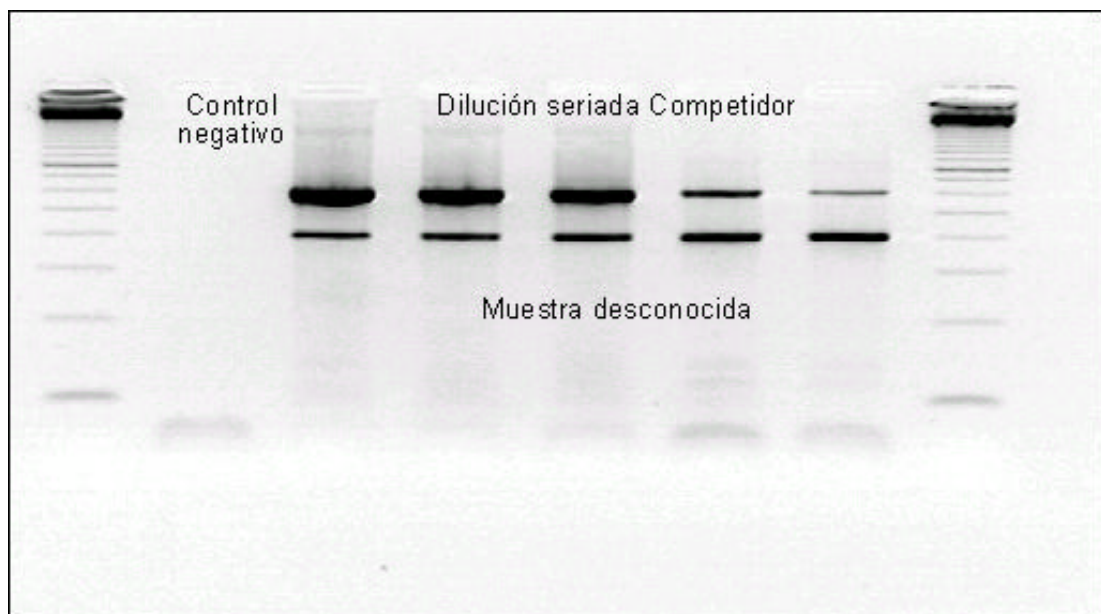
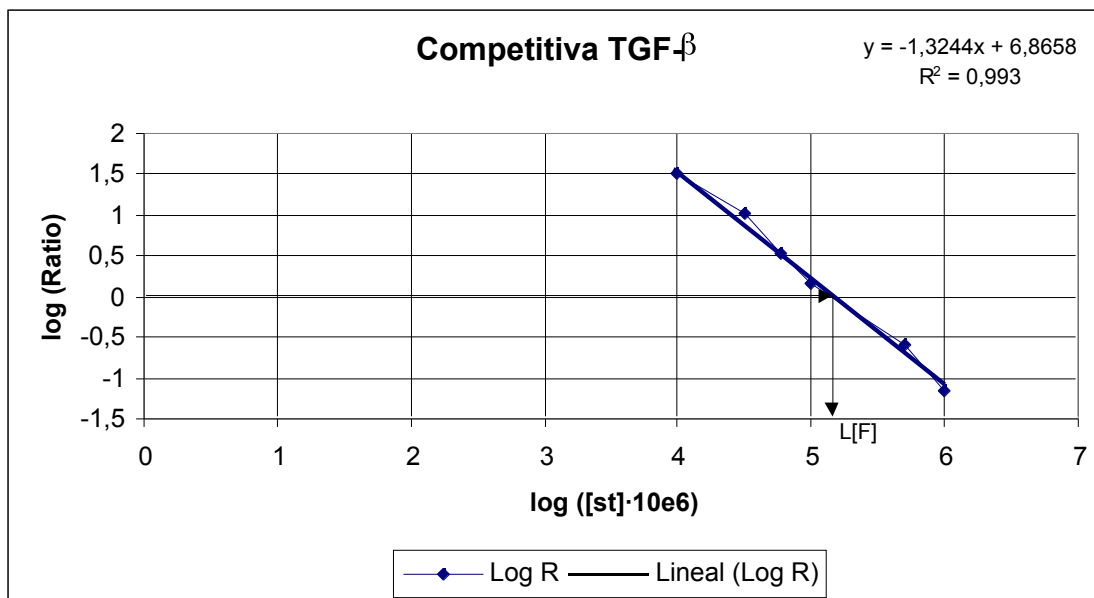


Foto 9. RT-PCR competitiva para TGF-β

Se muestra la imagen invertida de un gel teñido con Bromuro de Etidio. PCR realizada con 1µl de cADN procedente de 5µg de ARN de dilución 1/33 de cada animal que fueron coamplificados con una dilución seriada de un competidor de concentración conocida.

Foto 10. Ejemplo del análisis numerico para el TGF-β (Foto 9), realizado para el cálculo de la concentración de cada una de las citocinas presentes en cada muestra de ARN. Se realizaron análisis similares para la determinación del PDGF.



	M2	2M2	M3	5M2	6M2	M4
[ST]	1	0,5	0,1	0,06	0,032	0,01
Area ST	16122	15620	2731	645	754	281
Area RT	1141	4065	4083	2148	7707	9206
Ratio	0,0708	0,2602	1,4951	3,3302	10,2215	32,7616
Ratio·[st]	0,0708	0,1301	0,1495	0,1998	0,3271	0,3276
						39ciclos
Log[st]	6,0000	5,6990	5,0000	4,7782	4,5051	4,0000
Log R	-1,1501	-0,5846	0,1747	0,5225	1,0095	1,5154
Tem. Indep:	6,8658	Ratio=1: L[F] = 5,1842			<b>F:</b>	<b>0,1528</b>
Pendiente:	-1,3244					

Áreas de las bandas amplificadas calculadas mediante densitometria. Se realizó el cálculo de una recta de regresión en la que el eje de ordenadas era el logaritmo del cociente del área del estándar respecto al producto de la retrotranscripción (RT) y el eje de abcisas representa el logaritmo de la concentración del estándar. El cociente 1 ( $\log [ST]/[RT] = 0$ ) muestra la concentración en la que se encuentra la RT (citocina en la muestra).

En lo que respecta al PDGF-B, se observaron diferencias significativas entre el grupo ZO cuando se comparaba con el grupo ZL a las 24 y 32 semanas de edad. Parece que existe una relación en el patrón de expresión del TGF- $\beta_1$  del PDGF-B. En lo referente al grupo de ratas tratadas, se observaron diferencias significativas cuando se comparaba el quinapril y la atorvastatina a las 24 semanas de edad, llegando a recuperar los niveles de citocina del quinapril a las 32 semanas.

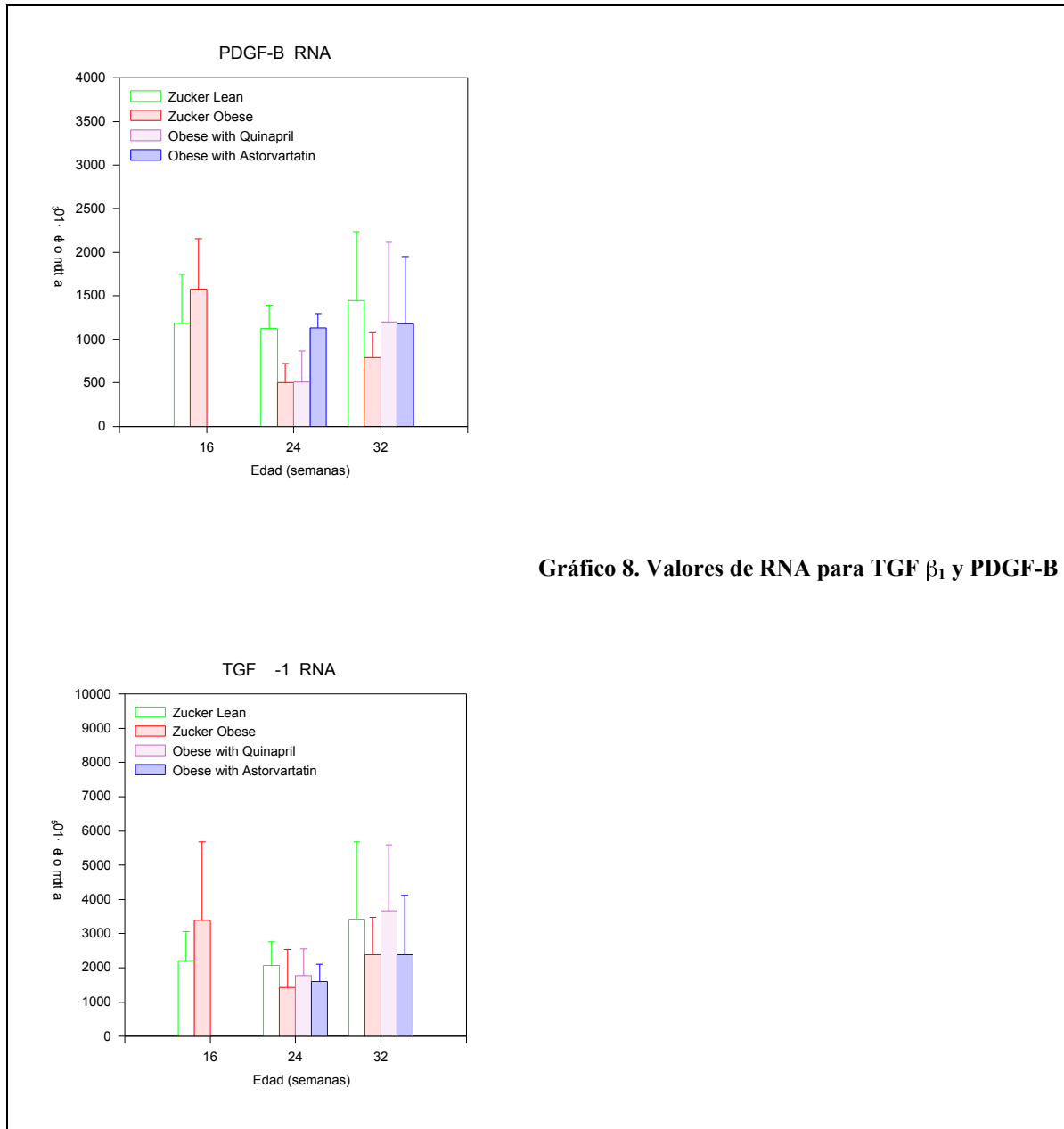


Gráfico 8. Valores de RNA para TGF  $\beta_1$  y PDGF-B

#### 4.2.4.2 Hibridación in situ del TGF-β<sub>1</sub>

Hallamos expresión de esta citocina tanto en las células glomerulares como no-glomerulares de las ratas Zucker obese y Lean, aunque no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos. Los tratamientos tampoco mostraron diferencias estadísticas remarcables.

**Tabla 35. Hibridación in situ del TGF-β<sub>1</sub>**

	L3		Z3		ZQ3		ZA3	
	—	+	—	+	—	+	—	+
Células glomerulares	44,4	55,6	37,5	62,5	28,6	71,4	37,5	62,5
Células no-glomerulares	22,2	77,8	37,5	62,5	0	100	37,5	62,5
Intersticio	100	0	100	0	57,1	42,8	75,0	25,0

**WILCONSON. Los resultados están expresados en tanto por ciento. Se analizaron al menos siete animales de cada grupo.**

#### 4.2.5 Análisis por Southwestern del factor de transcripción NF- B

Se localizó una mayor actividad de este factor de transcripción en el intersticio de todos los grupos. Las ratas Zucker obese (foto 11b) presentaron una mayor expresión del NF- B que sus homólogas Zucker lean (foto 11a) en las células glomerulares, aunque no se llegó a alcanzar significación estadística. Únicamente se encontraron diferencias en la expresión de NF- B entre ambos controles en las células tubulares donde las ratas ZO presentaban un incremento del 50% respecto a las ratas ZL (foto 11c). En lo que respecta a la expresión de NF- B en las células tubulares en los grupos tratados, se vio que disminuían la expresión un 14% (quinapril) y 12% (atorvastatina), sin llegar a ser estadísticamente significativos.

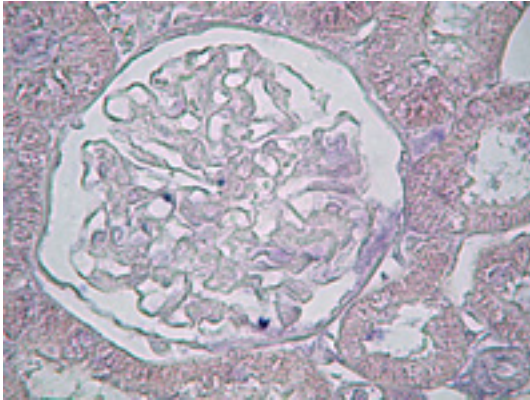
**Tabla 36. Inmunohistoquímica del NF-κB**

Localization	L3		Z3		ZQ3		ZA3	
	—	+	—	+	—	+	—	+
Células glomerulares	67	33	22	78	29	71	25	75
Células tubulares	50	50	0	100 <sup>a</sup>	14	86	13	88
Intersticio	0	100	0	100	29	71	13	88

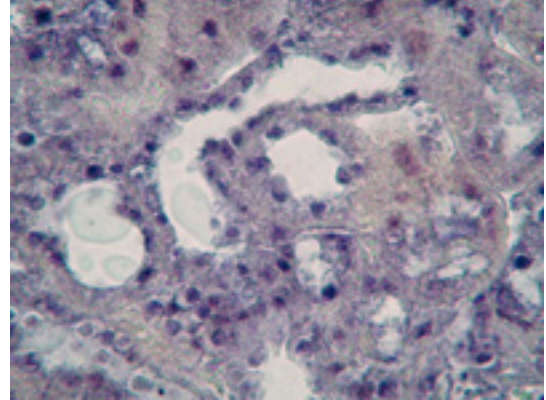
**WILCONSON, P entre grupos < 0.05: <sup>a</sup>L3 vs Z3**

Los resultados están expresados en tanto por ciento. Se analizaron al menos siete animales de cada grupo.

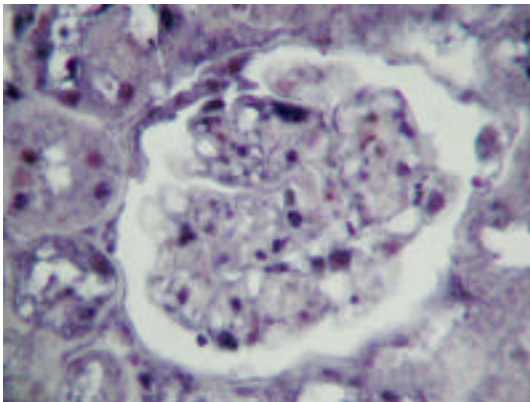




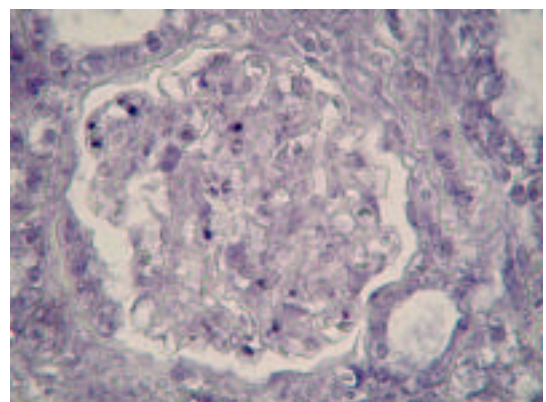
**a) Tinción negativa en una rata control Zucker Lean**



**c) Tinción positiva en el túbulo-intersticio de una rata Zucker Obese, sin tratamiento.**



**b) Positividad nuclear intensa para el NF-κB en el glomérulo de una rata Zucker Obese, sin tratamiento.**



**d) Tinción negativa de un glomérulo de una rata Zucker Obese bajo tratamiento con Atorvastatina.**

**Foto 11. Foto NF-κB1**

### 4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

#### 4.3.1 Análisis de Regresión lineal multivariante.

En el primer modelo, la variable dependiente fue la lesión focal. Los predictores de este modelo fueron el colesterol ( $R^2$  0.666), el colesterol y la atorvastatina ( $R^2$  0.709) y el colesterol, la atorvastatina y la proteinuria ( $R^2$  0.737). Estos resultados muestran que el incremento de las lesiones focales está relacionado con el colesterol (60%) y con la proteinuria (3.7 %) mientras que la reducción de las lesiones está correlacionada con la atorvastatina (3.9%). Cabe destacar que el quinapril no aparece en el modelo, ya que a diferencia de la atorvastatina su mecanismo de acción no es independiente.

En el segundo modelo estudiado, la variable dependiente es la proteinuria. Los predictores de este modelo fueron el colesterol ( $R^2$  0.750), el colesterol y el quinapril ( $R^2$  0.815) y el colesterol, quinapril y edad ( $R^2$  0.841).

El último modelo estudiado tuvo como variable dependiente la desmina. Los predictores de dicha variable fueron la proteinuria ( $R^2$  0.210) y la proteinuria y la edad ( $R^2$  0.284).

**Tabla 37. Análisis de Regresión lineal multivariante**

Variables Dependientes	Predictores	Coficiente	R cuadrado	Significación
<b>Lesiones focales</b>	Constante	-2.012		0.002
	Colesterol	0.026	0.661	0.000
	Atorvastatina	-3.028	0.700	0.001
	Proteinuria	0.019	0.737	0.003
<b>Proteinuria</b>	Constante	-78.467		0.000
	Colesterol	0.781	0.750	0.000
	Quinapril	-62.669	0.815	0.000
	Edad	9.909	0.841	0.002
<b>Desmina</b>	Constante	5.074		0.000
	Proteinuria	0.0256	0.210	0.000
	Edad	-0.752	0.284	0.013