

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS</i>	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ</i>	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ</i>	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO</i>	11/12/2016 10:56:17



Universidad
de La Laguna

Departamento de Ciencias Médicas Básicas

Área de Fisiología

TESIS DOCTORAL

**SGK1 como mediador de los efectos
deletéreos del receptor de
mineralocorticoides**

Catalina Sierra Ramos

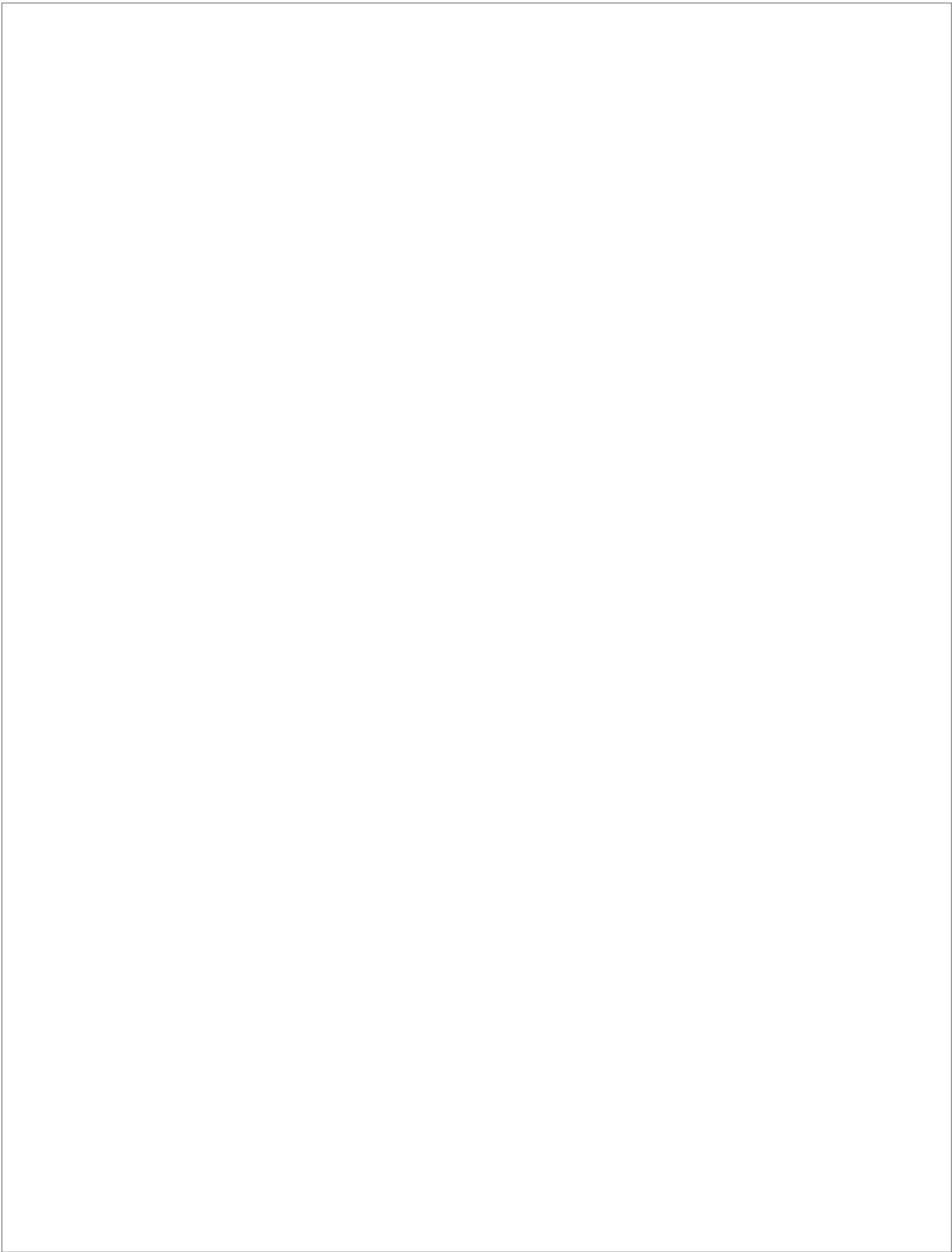
La Laguna, Noviembre 2016

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS</i>	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ</i>	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ</i>	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO</i>	11/12/2016 10:56:17

Los doctores Diego Álvarez de la Rosa Rodríguez y Teresa Giráldez Fernández, directores de la Tesis Doctoral presentada por la Licenciada Catalina Sierra Ramos

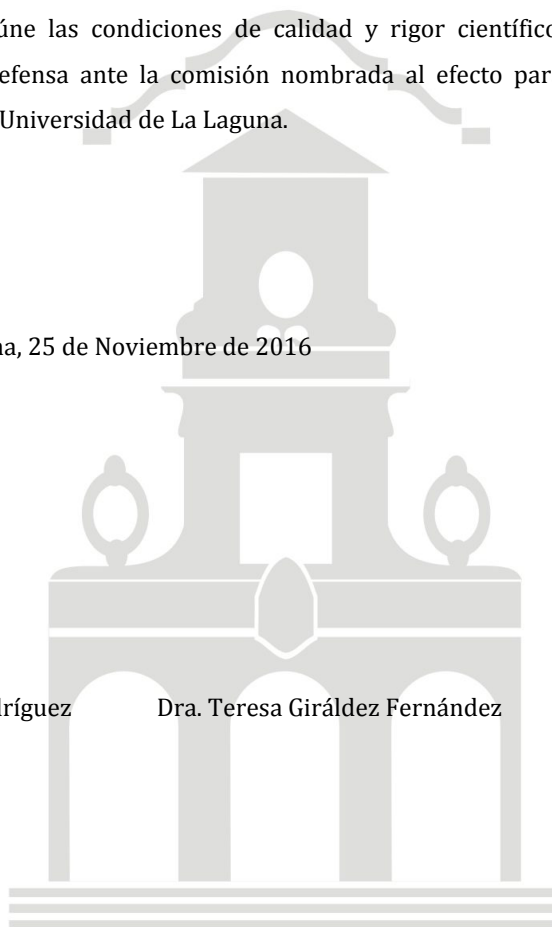
Certifican que:

La memoria presentada por la licenciada Catalina Sierra Ramos titulada “SGK1 como mediador de los efectos deletéreos del receptor de mineralocorticoides” ha sido realizada bajo su dirección en el departamento de Ciencias Médicas Básicas (Área de Fisiología) de la Sección de Medicina de la Facultad de Ciencias de la Salud, y considerando que reúne las condiciones de calidad y rigor científico, autorizan su presentación y defensa ante la comisión nombrada al efecto para optar al Grado de Doctor por la Universidad de La Laguna.

La Laguna, 25 de Noviembre de 2016

Dr. Diego Álvarez de la Rosa Rodríguez

Dra. Teresa Giráldez Fernández



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por:	Fecha:
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS</i>	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ</i>	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ</i>	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO</i>	11/12/2016 10:56:17

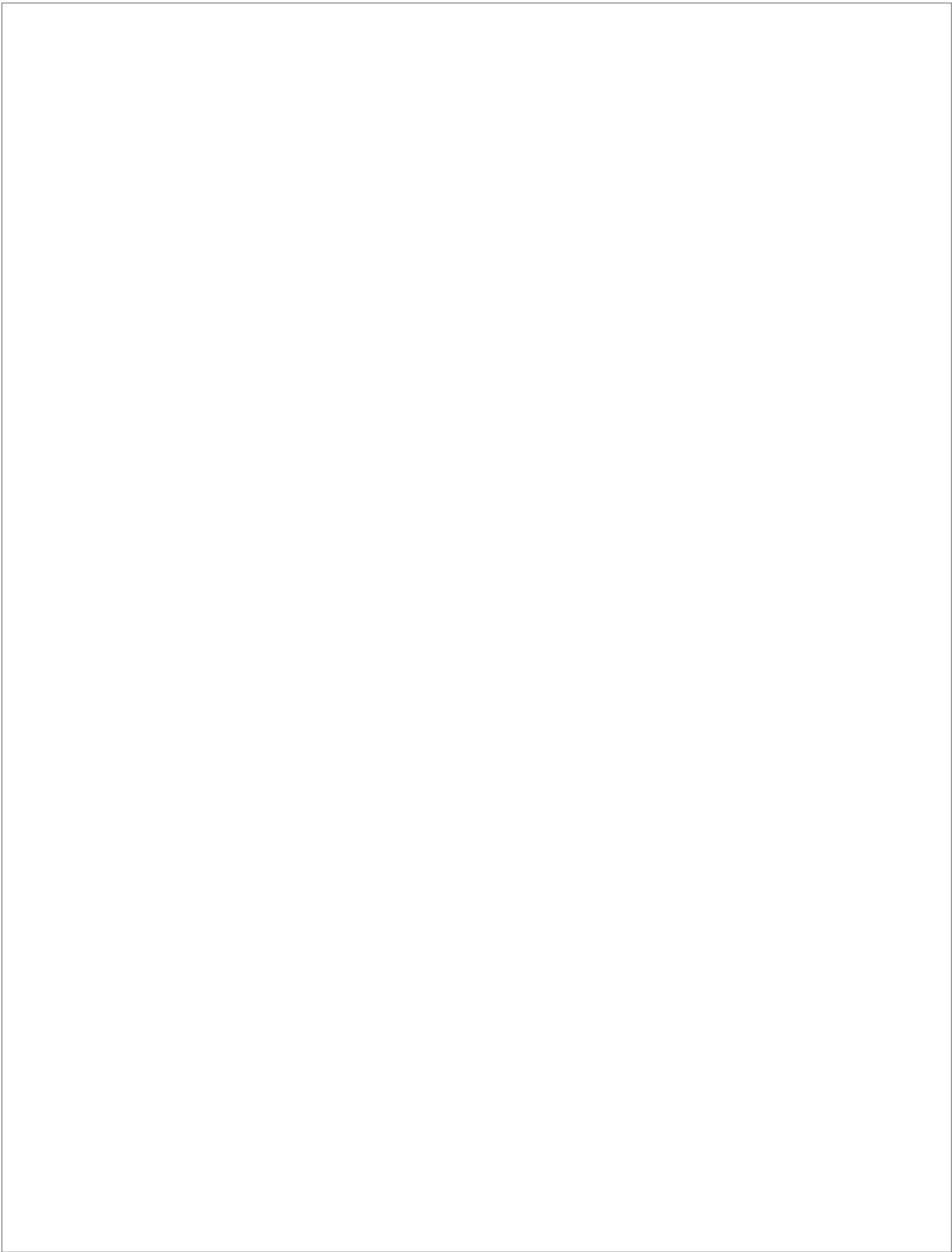
Esta tesis se ha realizado gracias a la financiación de los proyectos de investigación BFU2013-47089R (MINECO) y COST ADMIRE BM1301. Mi financiación durante estos años ha sido a cargo de la contratación como personal investigador de la Universidad de La Laguna, Campus de Excelencia Regional.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS</i>	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ</i>	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ</i>	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO</i>	11/12/2016 10:56:17

Agradecimientos

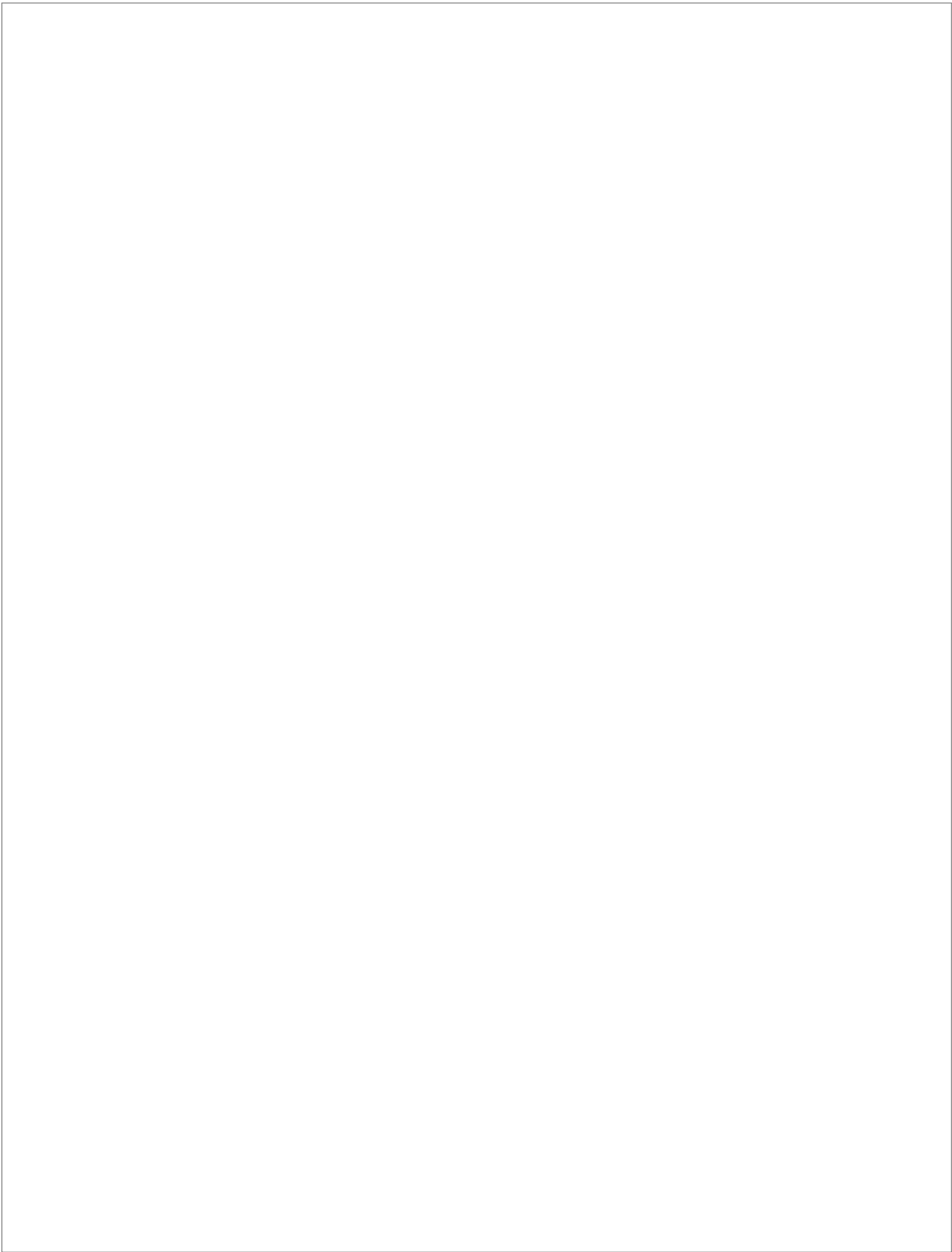
En primer lugar me gustaría agradecer a mis directores de tesis Diego y Teresa por su inestimable ayuda profesional y personal durante estos años de formación. En segundo lugar, a todos los colaboradores y compañeros del laboratorio por su aportación como investigadores y como personas, ha sido fácil crecer en un entorno tan favorable. Por último, agradecer a mis compañeros de vida, mi familia, mis amistades y mi marido. Gracias por existir y formar parte de mi día a día.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS</i>	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ</i>	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ</i>	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO</i>	11/12/2016 10:56:17

Abreviaturas

11-βHSD2	11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa 2
ACE	Enzima convertidora de angiotensina
ACR	Relación albúmina-creatinina
Adamts12	Adamts tipo 2
AF9	Gen fusionado al cromosoma 9
Agt	Angiotensinógeno
HTA	Hipertensión arterial
AKT	Serina/treonina quinasa conocida como proteína quinasa B
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
AR	Receptor de andrógenos
ARBs	Bloqueantes de los receptores de angiotensina
ASDN	Nefrona distal sensible a aldosterona
AT1-R	Receptor de angiotensina tipo 1
AT2-R	Receptor de angiotensina tipo 2
AUC	Área bajo la curva
BAC	Cromosoma artificial bacteriano
BAT	Tejido adiposo pardo
BCA	Ácido bicinconínico
BMC	Composición mineral ósea
BMD	Densidad mineral ósea
BMI	Índice de masa corporal
BMP7	Proteína morfogenética de hueso 7
BSA	Albúmina de suero bovino
BUN	Nitrógeno ureico en sangre
BW	Peso corporal
CBP2	Carboxipeptidasa B2
CCL28	Quimioquina epitelial asociada a mucosa (MEC)
CD68	Clúster de diferenciación 68
cDNA	DNA complementario
CEBP-α	Proteína potenciadora de unión α
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina
CKD	Enfermedad renal crónica
CNK3	Proteína quinasa 3 relativa a NamA
Col27A1	Colágeno 27A1
CsA	Ciclosporina A
C_T	Ciclo umbral
CTGF	Factor de crecimiento de tejido conectivo
CYCA	Ciclofilina A
DCT	Túbulo contorneado distal
DEXA	Absorciometría de rayos X de energía dual
DGAT	Diglicérido aciltransferasa
DIO2	Iodotironina deiodinasa tipo 2
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMEM-CS	Medio Eagle modificado por Dulbecco tratado con carbón activado
DOCA	Acetato de deoxicorticosterona
DOT1a	Disruptor de silenciamiento de telómeros 1
ECM	Matriz extracelular
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS</i>	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ</i>	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ</i>	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO</i>	11/12/2016 10:56:17

ENaC	Canal epitelial de Na ⁺ sensible a amiloride
EP	Endopeptidasas neutras
FAS	Sintasa de ácidos grasos
FBS	Suero fetal bovino
FFAs	Ácidos grasos libres
FXR	Receptor de farnesoides X
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GFR	Índice de filtración glomerular
GILZ1	Proteína 1 cremallera de leucina inducida por glucocorticoides
GLUT4	Transportador de glucosa 4
GR	Receptor de glucocorticoides
GS3K-β	Glicógeno sintasa quinasa 3-β
GTT	Test de tolerancia a la glucosa
h/e	Hematoxilina/eosina
H3K79	Proteína histona H3 metilada en la lisina 79
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
HF	Insuficiencia cardíaca
HFD	Dieta alta en grasa para roedores
HRE	Elemento de respuesta hormonal
HRT	Terapia de sustitución hormonal
IKK-β	Quinasa inhibidora del factor nuclear κβ
IL-1	Interleuquina -1
IL-6	Interleuquina -6
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IRS-1	Sustrato del receptor de insulina
ITT	Test de tolerancia a insulina
KIM-1	Molécula de daño renal 1
KRH-BSA	Tampón Krebs-Ringer-Albúmina de suero bovino
LPL	Lipoproteína lipasa
LVEF	Fracción de eyección ventricular izquierda
Lypla1	Lisofosfolipasa 1
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MCP1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
MCPs	Proteínas quimioatrayentes de monocitos
MEC	Quimiocina epitelial asociada a mucosa
MR	Receptor de mineralocorticoides
MRA	Antagonistas del receptor de mineralocorticoides
mRNA	ARN mensajero
mTORC2	Complejo 2 diana de rapamicina en mamíferos
Na⁺/K⁺-ATPase	Sodio/Potasio adenosina trifosfatasa
Nav 1.5	Canal de Na ⁺ dependiente de voltaje 1.5
NCC	Intercambiador de sodio y cloro
Nedd4-2	Ubiquitin ligasa Nedd 4-2
NFAT 5	Factor nuclear activador de células T
NF-κB	Factor nuclear κB
NGAL	Gelatinasa de neutrófilos asociada a lipocalina
NHE1	Intercambiador de Na ⁺ y H ⁺ 1
NHE3	Intercambiador de Na ⁺ y H ⁺ 3
NKCC2	Cotransportador de Na ⁺ -K ⁺ -2 Cl ⁻
NO	Óxido nítrico
NPR-A	Receptor del péptido natriurético tipo A
NPX	Nefrectomía unilateral
NRF1	Factor nuclear respiratorio 1
p-IRS1	Sustrato del receptor de la insulina 1 fosforilado
PA	Aldosteronismo primario

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS</i>	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ</i>	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ</i>	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO</i>	11/12/2016 10:56:17

PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDK1	Quinasa dependiente de fosfoinositidos 1
PGC1-α,β	Coactivador 1 del activador de proliferación del peroxisoma
PI3K	Fosfatidil-inositol 3-quinasa
PPAR-α,γ	Receptor del activador de proliferación del peroxisoma α, γ
PR	Receptor de progesterona
PTGDS	Prostaglandina D2 sintasa
PVDF	Bifluoruro de polivinilideno
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RAAS	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
ROMK1	Canal de K ⁺ de la médula renal externa
ROS	Especies reactivas del oxígeno
RPL13A	Proteína ribosomal L13A
RXR	Receptor de retinoides X
SBP	Presión arterial sistólica
SCNN1A	Gen que codifica α -ENaC
SCD	Dieta estándar de roedores
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturalizante en gel de acrilamida
SGK1	Quinasa inducida por suero y glucocorticoides
SGLT1	Transportador de glucosa dependiente de sodio
α-SMA	α - actina de músculo liso
SREBP1	Proteína de unión a elementos reguladores de esteroides
TBS-T	Tampón Tris-NaCl-Tween 20
Tg	Transgénico
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
TH17	Linfocitos T17 ayudantes
TNFα	Factor de necrosis tumoral α
TRPV5	Miembro 5 de la subfamilia V de canales catiónicos receptores de potencial transitorio
UCP-1	Proteína desacopladora 1
UZO	Obstrucción uretral unilateral
VDR	Receptor de vitamina D
VSMCs	Células vasculares de músculo liso
WKN4	Serina-treonina proteína quinasa WKN4
Wt	<i>Wild type</i>

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: <i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS</i>	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
<i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ</i>	28/11/2016 11:47:29
<i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ</i>	29/11/2016 14:09:00
<i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO</i>	11/12/2016 10:56:17

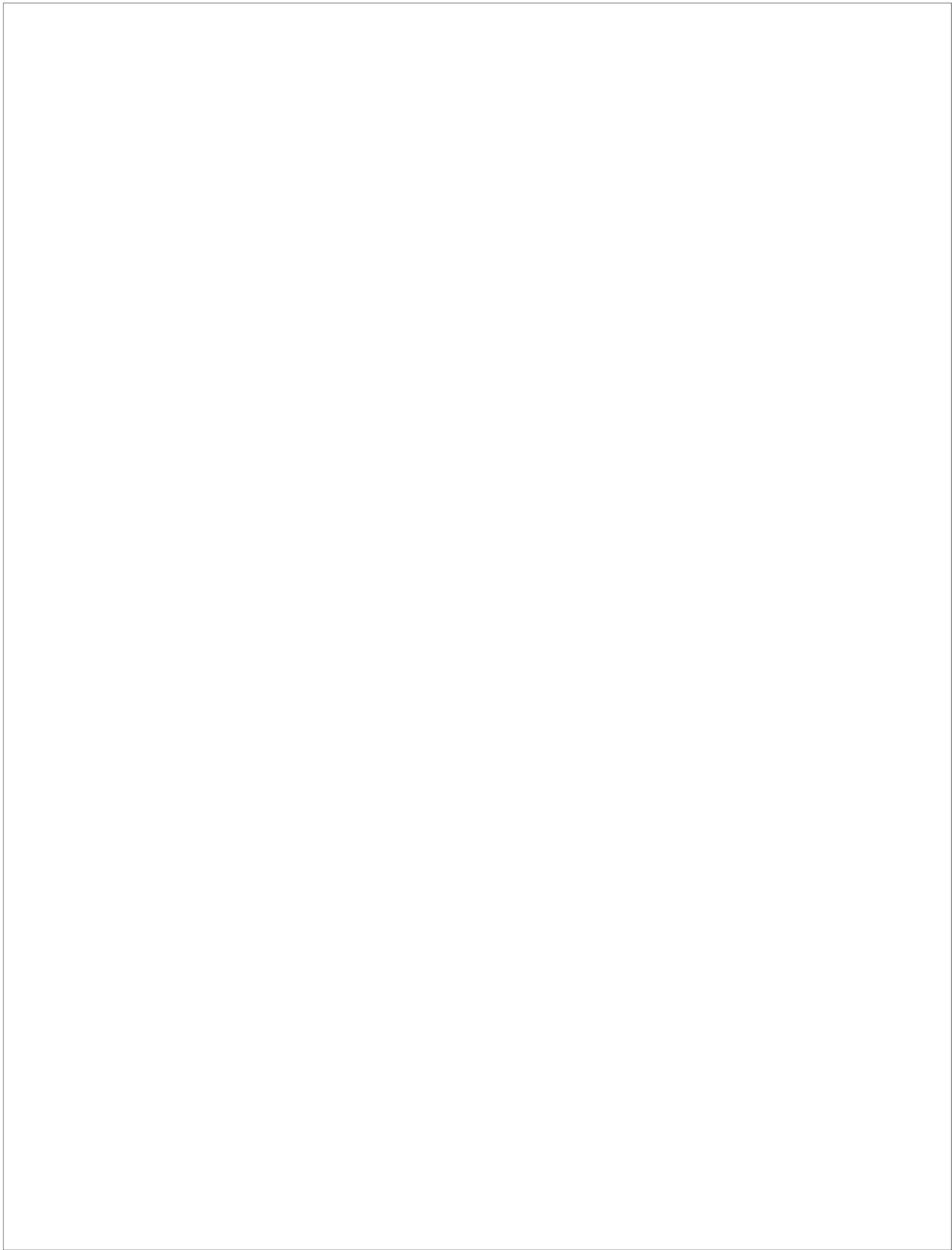
Índice

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: <i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS</i>	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
<i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ</i>	28/11/2016 11:47:29
<i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ</i>	29/11/2016 14:09:00
<i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO</i>	11/12/2016 10:56:17



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

Índice

1	Tabla de contenido	
2	ABSTRACT	23
3	INTRODUCCIÓN	27
3.1	EL RECEPTOR DE MINERALOCORTICOIDES	27
3.1.1	LIGANDOS Y FUNCIONES FISIOLÓGICAS	27
3.1.2	IMPLICACIONES FISIOPATOLÓGICAS	29
3.1.3	EFFECTOS BENEFICIOSOS DEL TRATAMIENTO CON ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR DE MINERALOCORTICOIDES (MRÁS)	38
3.2	LA QUINASA INDUCIDA POR SUERO Y GLUCOCORTICOIDES 1 (SGK1)	41
3.2.1	REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE SGK1	41
3.2.2	FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE SGK1	43
3.2.3	EFFECTOS DELETÉREOS DE SGK1 EN RESPUESTA A LA ACTIVACIÓN DE MR	46
3.2.4	POSIBLES APLICACIONES DE LOS INHIBIDORES DE SGK1	48
4	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	51
4.1	HIPÓTESIS	51
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
		53
5	MATERIAL Y MÉTODOS	55
5.1	EXPRESIÓN TRANSGÉNICA DE SGK1 EN RATONES (B6.Tg.SGK1)	55
5.2	GENOTIPADO DE LOS ANIMALES	55
5.3	TRATAMIENTOS Y PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS	56
5.3.1	MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERALDOSTERONISMO E HIPERTENSIÓN ARTERIAL	56
5.3.2	MODELO DE DESARROLLO DE OBESIDAD Y ALTERACIONES EN LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA	57
5.4	MEDIDAS DE PRESIÓN ARTERIAL	58
5.5	MEDIDA DEL ÍNDICE DE FILTRACIÓN GLOMERULAR	59
5.6	ESTUDIO DE INGESTA DE AGUA Y ALIMENTO Y DETERMINACIONES ANALÍTICAS EN ORINA	59
5.6.1	ALBÚMINA Y CREATININA	59
5.6.2	DETERMINACIÓN DE IONES: NA ⁺ , CL ⁻ , K ⁺	59
5.7	DISECCIÓN DE ÓRGANOS Y TEJIDOS	59
5.8	DETERMINACIONES EN PLASMA	60
5.8.1	DETERMINACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDEAS	60
5.8.2	DETERMINACIÓN DE IONES: NA ⁺ , CL ⁻ , K ⁺	60
5.8.3	PERFIL BIOQUÍMICO	60
5.9	ANÁLISIS HISTOLÓGICO	60
5.9.1	ESTUDIO DEL DESARROLLO DE DAÑO CARDIOVASCULAR Y RENAL	60
5.9.2	ESTUDIO DEL DESARROLLO DE HIPERTROFIA ADIPOCITARIA Y PRESENCIA DE ESTEATOSIS HEPÁTICA	61
5.10	ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	61
5.10.1	EXTRACCIÓN DE RNA Y RETROTRANSCRIPCIÓN	61
5.10.2	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA A TIEMPO REAL (QPCR)	61
5.10.3	GENECHIP AFFIMETRIX MICROARRAY	63
5.11	ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN PROTEICA MEDIANTE WESTERN BLOT	65

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

5.12 DENSITOMETRÍA DE DOBLE ENERGÍA DE RAYOS X	67
5.13 ESTUDIO DE LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA	67
5.14 CULTIVOS PRIMARIOS	68
5.14.1 CUANTIFICACIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS	68
5.14.2 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES MARCADORES DEL PROCESO DE ADIPOGÉNESIS	68
5.14.3 CUANTIFICACIÓN DE LA INCORPORACIÓN DE GLUCOSA Y ÁCIDOS GRASOS LIBRES	68
5.15 LÍNEAS CELULARES	69
5.16 TRANSFECCIÓN Y ENSAYOS DE TRANSACTIVACIÓN CON GENES REPORTEROS	69
5.16.1 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO Y CONSTRUCCIONES DE DNA	69
5.16.2 TRANSFECCIÓN Y TRATAMIENTOS CON AGONISTAS DE MR	70
5.16.3 ENSAYOS DE TRANSACTIVACIÓN	71
5.17 INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA	71
5.18 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	72
5.19 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA TEMPORAL DE LOS ENSAYOS REALIZADOS EN ANIMALES	73
5.19.1 MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERALDOSTERONISMO E HIPERTENSIÓN ARTERIAL	73
5.19.2 MODELO DE DESARROLLO DE OBESIDAD Y ALTERACIONES EN LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA	74
6 RESULTADOS	77
6.1 CAPÍTULO 1: INFLUENCIA DE UN EXCESO DE ACTIVIDAD DE SGK1 SOBRE EL DESARROLLO DE HIPERTENSIÓN ARTERIAL, DAÑO RENAL Y DAÑO CARDIOVASCULAR	77
6.1.1 EXPRESIÓN Y REGULACIÓN DEL TRANSGÉN EN RIÑÓN	77
6.1.2 EL EXCESO DE ACTIVIDAD DE SGK1 POTENCIA LA HIPERTENSIÓN INDUCIDA POR NPX-DOCA/SAL	78
6.1.3 EL INCREMENTO DE ACTIVIDAD DE SGK1 PRODUCE HIPERFILTRACIÓN GLOMERULAR Y ALBUMINURIA EXACERBADA INDUCIDA POR NPX-DOCA/SAL	79
6.1.4 CONSECUENCIAS DEL TRATAMIENTO NPX-DOCA/SAL SOBRE LA HOMEOSTASIS MINERAL	80
6.1.5 LOS ANIMALES B6.Tg. SGK1- NPX MUESTRAN HIPERTROFIA GLOMERULAR INCLUSO EN AUSENCIA DE TRATAMIENTO CON DOCA/SAL	82
6.1.6 MAYOR DESARROLLO DE FIBROSIS GLOMERULAR, INTERSTICIAL Y PERIVASCULAR EN LA CORTEZA RENAL DE RATONES B6.Tg.SGK1 TRATADOS NPX-DOCA/SAL	83
6.1.7 DESARROLLO DE FIBROSIS CARDIACA CON EL TRATAMIENTO NPX-DOCA/SAL SIN DIFERENCIAS ENTRE GENOTIPOS	84
6.1.8 AUMENTO EN LA EXPRESIÓN DE MARCADORES MOLECULARES DE DAÑO RENAL EN Tg.SGK1- NPX TRATADOS CON DOCA/SAL	85
6.1.9 GENES REGULADOS DIFERENCIALMENTE EN RATONES Tg. SGK1 EN REPUESTA A DOCA/SAL	87
6.2 CAPÍTULO 2: EFECTO DE LA ACTIVIDAD AUMENTADA DE SGK1 SOBRE EL DESARROLLO DE OBESIDAD Y ALTERACIONES EN LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA	90
6.2.1 EXPRESIÓN AUMENTADA DE SGK1 EN TEJIDO ADIPOSO BLANCO EPIDIDIMAL E HÍGADO EN ANIMALES B6.Tg.SGK1	90
6.2.2 LA EXPRESIÓN CONSTITUTIVAMENTE ACTIVA DE SGK1 POTENCIA LA OBESIDAD INDUCIDA POR UNA DIETA ALTA EN GRASA	91
6.2.3 LA DIETA ALTA EN GRASA PRODUCE UNA MAYOR ACUMULACIÓN DE TEJIDO ADIPOSO EN RATONES TRANSGÉNICOS	94
6.2.4 EL AUMENTO DE ACTIVIDAD DE SGK1 CAUSA UNA MAYOR HIPERTROFIA ADIPOCITARIA	98
6.2.5 ADIPOGÉNESIS	100
6.2.6 DIFERENCIACIÓN DE ADIPOCITOS <i>IN VITRO</i>	101
6.2.7 TERMOGÉNESIS EN TEJIDO ADIPOSO PARDO	103
6.2.8 MARCADORES DE INFLAMACIÓN	104
6.2.9 LOS RATONES Tg. SGK1 MUESTRAN MAYORES DESAJUSTES EN LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA	106
6.2.10 DISMINUCIÓN EN LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA EN B6.Tg.SGK1 HFD	109

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

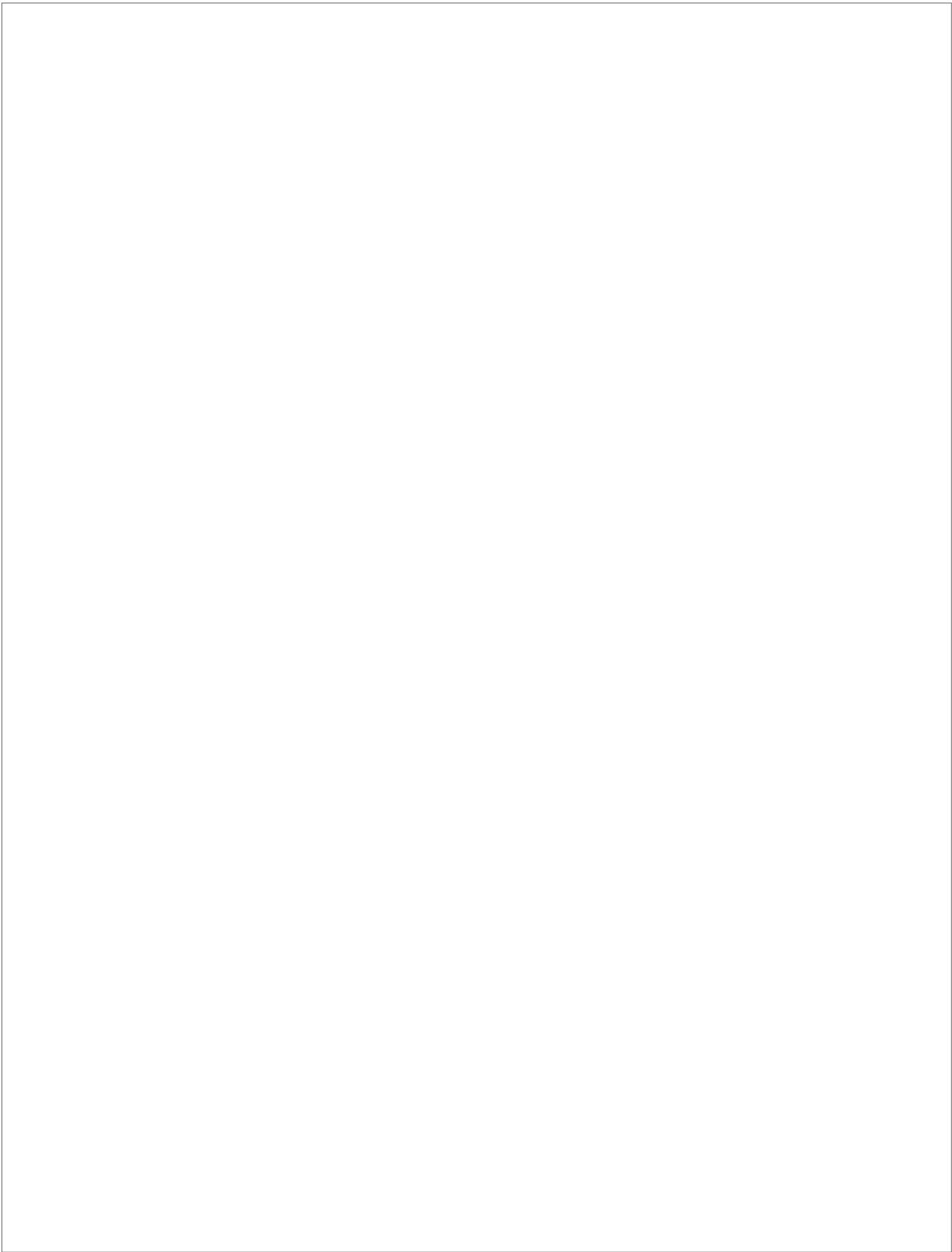
6.2.11	PERFIL BIOQUÍMICO ALTERADO EN ANIMALES B6.Tg.SGK1 BAJO DIETA ALTA EN GRASA (HFD)	109
6.2.12	AUMENTO DE ESTEATOSIS HEPÁTICA EN RATONES B6.Tg.SGK1 CON HFD	110
6.2.13	EL EXCESO DE ACTIVIDAD DE SGK1 PRODUCE HIPERTENSIÓN INDUCIDA POR DIETA ALTA EN GRASA	111
6.2.14	LA DIETA ALTA EN GRASA INDUCE ALBUMINURIA Y DISMINUCIÓN DE GFR EN B6.Tg.SGK1	111
6.3	CAPÍTULO 3: NUEVOS GENES DIANA DE MR IMPLICADOS EN PROCESOS PATOLÓGICOS	113
6.3.1	CTGF COMO DIANA DIRECTA DE MR	113
6.3.2	PTGDS COMO DIANA DIRECTA DE MR EN ADIPOCITOS	114
7	DISCUSIÓN	119
7.1	INFLUENCIA DE UN EXCESO DE ACTIVIDAD DE SGK1 SOBRE EL DESARROLLO DE HIPERTENSIÓN ARTERIAL, DAÑO RENAL Y DAÑO CARDIOVASCULAR	119
7.2	EFECTO DE LA ACTIVIDAD AUMENTADA DE SGK1 SOBRE EL DESARROLLO DE OBESIDAD Y ALTERACIONES EN LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA	127
7.3	NUEVOS GENES DIANA DE MR IMPLICADOS EN PROCESOS PATOLÓGICOS	136
8	CONCLUSIONS	141
	BIBLIOGRAFÍA	145

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

Abstract

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: <i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS</i>	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
<i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ</i>	28/11/2016 11:47:29
<i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ</i>	29/11/2016 14:09:00
<i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO</i>	11/12/2016 10:56:17



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS</i>	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ</i>	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ</i>	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO</i>	11/12/2016 10:56:17

2 Abstract

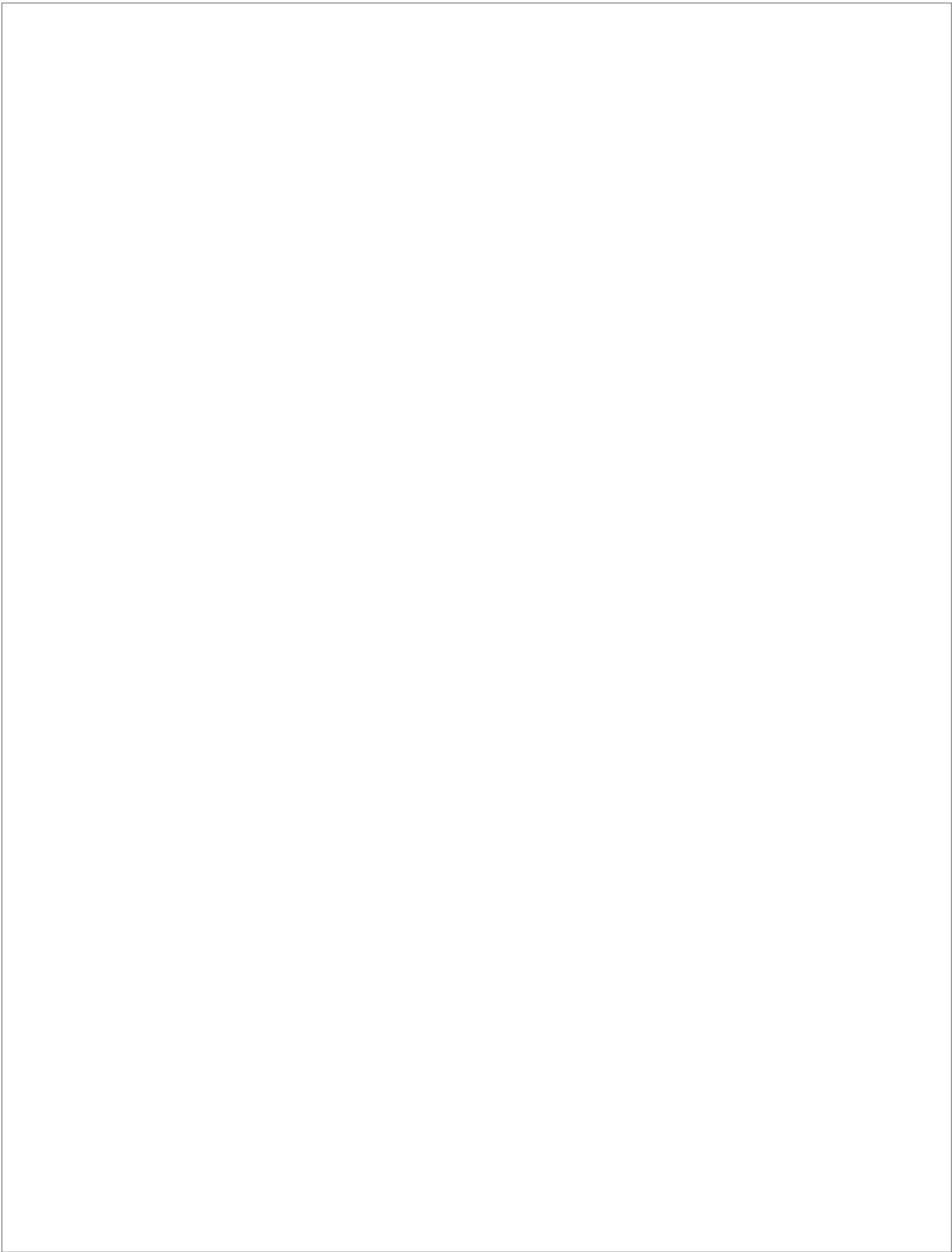
The mineralocorticoid receptor (MR) plays a central role in mineral homeostasis, extracellular volume control and blood pressure regulation. However, MR is expressed in others tissues not directly related with these processes, where it can be activated by both mineralocorticoids and glucocorticoids. Inappropriate MR activation results in pro-fibrotic activity in the cardiovascular and renal systems, independently of effect on blood pressure. More recently, it has been described that MR overactivation leads to the development of obesity and metabolic syndrome. MR antagonists (MRAs) are used in clinical practice as cardiovascular protecting agents, independently of their antihypertensive activity. Moreover it has been shown that MRAs improve glucose tolerance and insulin resistance reducing plasma levels of pro-inflammatory cytokines and triglycerides in preclinical models. However, MRAs may produce several adverse effects, like hyperkalemia, sexual dysfunction and hipovolemia. For this reason it would be important, from a therapeutic point of view, to identify genes that simultaneously mediate several of the various negative effects of MR. In this context we studied SGK1, a transcriptional target of MR that increases tubular Na⁺ reabsorption and salt appetite. SGK1 has been involved in several fibrotic diseases and adipogenesis. This work investigates the role of SGK1 in MR-induced processes that lead to an increase in cardiovascular risk including hypertension, metabolic syndrome and renal injury. To that end we used a mouse model with systemic increase on SGK1 activity. This model represents a closer approximation to physiopathological settings, compared with overexpression models or knockout of the kinase gene. Our results indicate that increased SGK1 activity accelerates mineralocorticoid-induced kidney injury and identified new potential genes involved in the effect. In addition, the data demonstrated that SGK1 alters glucose handling and energy metabolism, leading to the development of many of the disorders characteristics of metabolic syndrome, including hypertension. Finally, we validated two additional genes, CTGF and PTGD, as direct MR targets that are directly or indirectly involved in the development of cardiovascular disease.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por:	Fecha:
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS</i>	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ</i>	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ</i>	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO</i>	11/12/2016 10:56:17

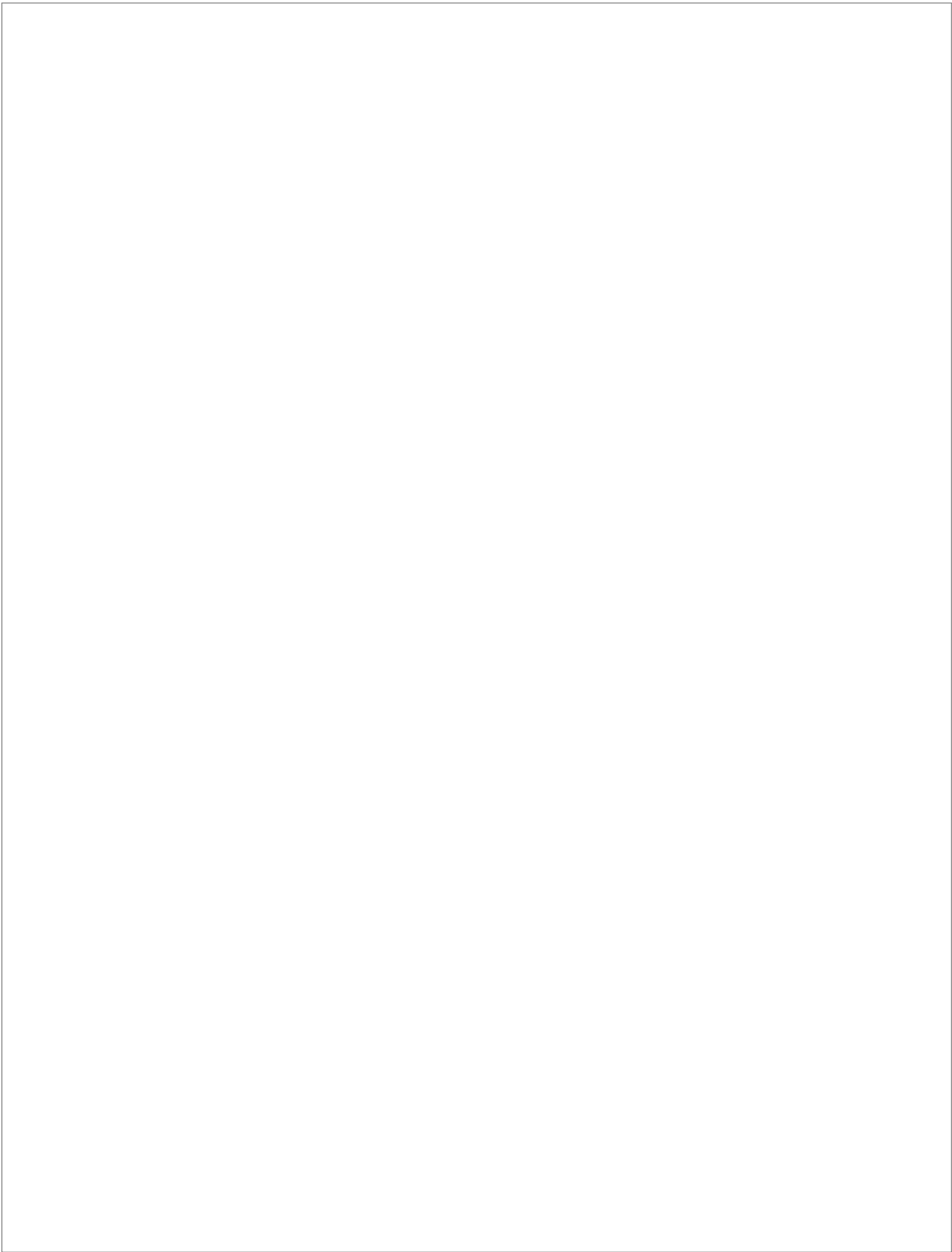
Introducción

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

3 Introducción

3.1 El Receptor de Mineralocorticoides

3.1.1 Ligandos y funciones fisiológicas

El receptor de mineralocorticoides pertenece a la superfamilia de receptores nucleares. Por tanto, funciona como un factor de transcripción dependiente de ligando. La función fisiológica mejor caracterizada para MR es su papel en la transducción de los efectos biológicos de la hormona esteroidea aldosterona en tejidos epiteliales polarizados con alta resistencia eléctrica, donde promueve la reabsorción de Na^+ y la excreción de K^+ y H^+ . De acuerdo con esta función, su expresión ha sido localizada mediante inmunohistoquímica en el riñón, más notablemente en células principales del túbulo contorneado distal, túbulo conector y túbulo colector cortical. La expresión de MR también ha sido detectada en otros epitelios, como el colón distal, glándulas salivares y glándulas sudoríparas. En estas células, el complejo MR-aldosterona estimula la expresión y función de transportadores de iones activos en la membrana celular, principalmente el canal epitelial de Na^+ sensible a amiloride (ENaC) y el intercambiador de Na^+ y Cl^- (NCC), localizados en la membrana apical, y la sodio/potasio adenosina trifosfatasa (Na^+/K^+ -ATPasa) basolateral. Estos transportadores son responsables del transporte unidireccional transepitelial de Na^+ desde el lumen al intersticio y son esenciales para la regulación del balance de sal y homeostasis del volumen extracelular, siendo uno de los determinantes más importantes en el control de la presión arterial (Viengchareun et al., 2007).

La concentración circulante de aldosterona está controlada principalmente por la señalización renina-angiotensina (*Figura 1*), activada por un descenso en el volumen circulante y la presión arterial, o por un aumento en los niveles de K^+ plasmáticos. Tanto Angiotensina II (Ang II) como el K^+ aumentan la síntesis y la secreción de aldosterona en la corteza de la glándula adrenal. A su vez, la aldosterona circulante atraviesa libremente la membrana plasmática de las células diana y se une a MR, produciendo su translocación al núcleo donde se une a secuencias de ADN denominadas elementos de respuesta a hormona (HRE), alterando la expresión de genes diana específicos, como las subunidades de los transportadores y canal iónico mencionados o proteínas reguladoras de los mismos como la proteína quinasa inducida por suero y glucocorticoides (SGK1). Una vez activada a través de la ruta de fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3K), SGK1 actúa, entre otras vías, fosforilando a la ubiquitin-ligasa Nedd4-2; esto impide la interacción entre Nedd4-2 e ENaC, evitando así la degradación del canal vía proteosoma (Debonneville et al., 2001). De esta manera, se permite que una población aumentada de canales de Na^+ permanezca en la membrana apical (Alvarez de la Rosa et al., 1999), aumentando la reabsorción de este ión e indirectamente la excreción de K^+ y H^+ (Wulff et al., 2002).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por:	Fecha:
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

La identificación molecular de MR permitió comprobar que este receptor posee elevada afinidad tanto por aldosterona como por glucocorticoides (Arriza et al., 1987). Dado que la concentración circulante de glucocorticoides es entre dos y tres órdenes de magnitud superior a la de la aldosterona, se podría pensar que MR está permanentemente ocupado y activado por glucocorticoides. Sin embargo, en tejidos epiteliales, la expresión de MR está asociada a la expresión de la enzima 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa 2 (11 β -HSD2), que permite que la aldosterona active selectivamente el receptor de mineralocorticoides, mediante la conversión de glucocorticoides en sus análogos 11-ceto, incapaces de unirse al receptor (Farman and Rafestin-Oblin, 2001).

Posteriormente a su clonaje, la expresión de MR se ha descrito en otros tejidos no epiteliales en los cuales la expresión de 11 β -HSD2 es indetectable o es muy baja. Esto incluye, entre otros, a diversos tipos celulares del sistema cardiovascular (cardiomiocitos, células endoteliales y células de músculo liso vascular) (Lombes et al., 1992), sistema inmune, sistema nervioso y otros tipos celulares y tejidos incluyendo al tejido adiposo (Rondinone et al., 1993). Si bien se podría suponer que en estos tejidos MR ejerce como receptor de glucocorticoides exclusivamente, se ha demostrado que la aldosterona es capaz de acceder al receptor y regular genes de forma específica, aunque el mecanismo de esta selectividad de ligando es aún desconocido (Messaoudi et al., 2013).

En su conjunto, estos datos han llevado a considerar a MR como un receptor de expresión prácticamente ubicua en el organismo, no estando claro en la mayor parte de las ocasiones el ligando (aldosterona o glucocorticoides) responsable de su activación fisiológica o patológica. Si bien la función fisiológica de MR fuera de los epitelios de alta resistencia eléctrica se conoce poco, numerosos resultados apuntan a una gran diversidad de funciones que incluyen, entre otras: a) remodelación morfológica de epitelios como en el riñón y colon; b) modulación directa de función y morfología cardíaca y vascular; c) regulación del sistema nervioso y sus acciones sobre los sistemas renal y circulatorio; d) respuestas inmunes; e) regulación de diferenciación en tejido adiposo (Viengchareun et al., 2007, Messaoudi et al., 2013).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 828672	Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

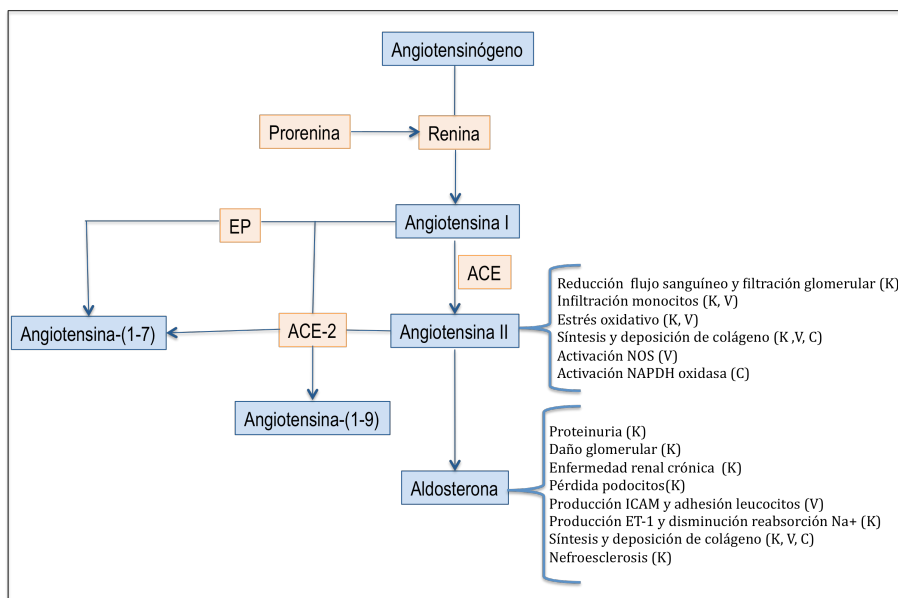


Figura 1. Efectos negativos de niveles elevados de Ang II y aldosterona en condiciones patológicas como hipertensión o síndrome metabólico. K: riñón ; V: tejido vascular; C: tejido cardíaco; EP: endopeptidasas; ACE: enzima convertidora de angiotensina; ACE-2: enzima convertidora de angiotensina-2. ET-1: Endotelina 1. Modificado de (Munoz-Durango et al., 2016).

3.1.2 Implicaciones fisiopatológicas

Si bien las funciones fisiológicas de MR fuera de su papel en la homeostasis mineral son aún poco conocidas, se sabe que la activación de MR, ya sea por un aumento de niveles de corticosteroides (aldosterona y glucocorticoides) o bien por la alteración en mecanismos de control del receptor, resulta generalmente en efectos adversos para la estructura y función de distintos órganos y tejidos (Jaisser and Farman, 2016). Por ejemplo, los mineralocorticoides, como aldosterona y acetato de deoxicorticosterona (DOCA) inducen el desarrollo de fibrosis en los sistemas cardiovascular y renal, disminuyendo la excreción renal de sal, aumentando el apetito por la sal y, en consecuencia, la presión arterial. Además se ha demostrado que el exceso de aldosterona produce fibrosis cardíaca e inflamación de manera independiente al desarrollo de hipertensión, a través de un efecto directo sobre MR en cardiomiocitos, fibroblastos cardíacos y células del sistema inmune (Brilla and Weber, 1992). Los mecanismos subyacentes a los efectos negativos de aldosterona/MR sobre la función cardíaca son aún poco conocidos, no obstante, se han identificado genes diana de MR implicados en el proceso (Latouche et al., 2012, Messaoudi et al., 2013, Jaisser and Farman, 2016).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 828672		Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS		Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ		28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ		29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO		11/12/2016 10:56:17

Recientemente, se ha comprobado que MR es además un factor importante en la modulación del metabolismo; su sobreexpresión conduce al desarrollo de obesidad y síndrome metabólico (Feraco et al., 2013), que junto a la hipertensión, son los principales factores de riesgo para el desarrollo de enfermedad cardiovascular y daño renal. La participación de MR en el metabolismo energético se sustenta en las siguientes observaciones: a) MR es esencial para la adipogénesis (Caprio et al., 2007); b) la sobreexpresión de MR en tejido adiposo conduce al desarrollo de obesidad y síndrome metabólico en ratones transgénicos (Urbanet et al., 2015); c) el antagonismo farmacológico de MR limita el desarrollo de síndrome metabólico en modelos preclínicos (Guo et al., 2008, Armani et al., 2015); d) se ha detectado un aumento de transcrito de MR en ratones y en pacientes obesos; e) los pacientes obesos presentan niveles elevados de aldosterona debido posiblemente a la acción directa de la leptina, producida por adipocitos, sobre la síntesis y secreción de esta hormona esteroidea, que a su vez promueve disfunción endotelial e hipertensión (Huby et al., 2015, Huby et al., 2016).

En síntesis, la activación inapropiada de un receptor prácticamente ubicuo como MR produce simultáneamente diversos efectos negativos que se pueden combinar como factores de riesgo para el desarrollo de enfermedad cardiovascular, primera causa de mortalidad y morbilidad en países desarrollados. La utilización de antagonistas del receptor de mineralocorticoides (MRAs) como la espironolactona o la eplerenona en la práctica clínica ha demostrado su utilidad, a pesar de que su uso se ha visto limitado por la incidencia de varios efectos adversos como la hiperpotasemia, hipotensión, función renal alterada y disfunción sexual. Esto se debe a la amplia distribución tisular de MR y su homología estructural con otros receptores esteroideos (receptores de glucocorticoides, andrógenos y progesterona). El desarrollo de nuevos fármacos que antagonicen los efectos deletéreos de MR de forma más dirigida requiere un mejor conocimiento de los mecanismos que participan en la activación selectiva del receptor y en el control de su actividad y de la identificación de genes diana regulados por el mismo (Gomez-Sanchez, 2016, Jaisser and Farman, 2016).

3.1.2.1 MR en enfermedad cardiovascular

El corazón y sus vasos asociados están compuesto por distintos tipos celulares que incluyen cardiomiocitos, fibroblastos, células vasculares de músculo liso (VSMCs) y células endoteliales. Además células inmunes, principalmente macrófagos, migran desde la circulación cuando existe daño en el tejido cardíaco. Recientemente varios estudios han utilizado el sistema Cre/loxP recombinasa para lograr la delección selectiva del gen de MR en distintos tipos celulares.

Durante la isquemia miocárdica, los cardiomiocitos a menudo se someten a procesos de apoptosis o necrosis, lo cual inicia una respuesta inflamatoria, fibrosis reparativa y formación de cicatriz. A largo plazo, estos cambios conducen a remodelamiento crónico del miocardio, acompañado de hipertrofia, fibrosis intersticial, dilatación del ventrículo izquierdo e

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 828672	Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

insuficiencia cardíaca. En ratones que no expresan MR en cardiomiocitos (MR^{MLCCre}) y que han sido sometidos a una ligación experimental de arteria coronaria, se demuestra una atenuación de la expansión del infarto, del remodelamiento del ventrículo izquierdo y del deterioro funcional (Fraccarollo et al., 2011). Estos animales muestran una mejora en el tejido cicatrizado, con una mejor organización de la matriz de colágeno y menos fibrosis intersticial cardíaca, además muestran un menor índice de cardiomiocitos apoptóticos, atribuible a la reducción en marcadores de estrés oxidativo y a alteraciones en la actividad de las metaloproteinasas de la matriz y de las vías de NF-κB.

El efecto de la delección específica de MR en cardiomiocitos en daño cardíaco no isquémico se ha comprobado en modelos de tratamiento con DOCA/Sal (Rickard et al., 2012), donde la falta de MR hace que los ratones desarrollen menos fibrosis cardíaca en comparación con los individuos *wild type*. Estos hallazgos están asociados con la sobreexpresión de la proteína decorina, que inhibe al factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) y al factor de crecimiento transformante β (TGF-β) y con una represión de la expresión de genes involucrados en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) o en inflamación en el ratón deficiente para MR en cardiomiocitos (*Figura 2*).

Los fibroblastos son la fuente más significativa de la matriz extracelular en el corazón. Permanece en debate el hecho de cómo la aldosterona induce fibrosis cardíaca activando directamente a los fibroblastos y la producción de matriz extracelular. Los resultados de estudios *in vitro* utilizando fibroblastos aislados son contradictorios (Brilla et al., 1994, Fullerton and Funder, 1994, Nagai et al., 2005). La delección de MR en fibroblastos (MR^{col/Cre}) (Lothar et al., 2011) no tiene efecto en el desarrollo de fibrosis cardíaca o en la función ventricular izquierda en el modelo de constricción aórtica transversal. Este resultado sugiere que MR no tiene una función relevante en fibroblastos durante la insuficiencia cardíaca inducida por sobrecarga de presión. Una de las ideas más aceptada es que los fibroblastos representan una población heterogénea que no solo consiste en fibroblastos residentes, sino que también deriva en parte de otros tipos celulares como macrófagos y células endoteliales. MR podría tener un papel en la diferenciación celular y promover la respuesta fibrótica mediando el estrés oxidativo y la inflamación (*Figura 2*).

La delección de MR en macrófagos/monocitos (MR^{LysMCre}) previene el desarrollo de fibrosis cardíaca después de 8 semanas de tratamiento con DOCA/Sal (Rickard et al., 2009). Los niveles tisulares de proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) y el reclutamiento de macrófagos no se ven afectados por la delección de MR tras el tratamiento con DOCA, indicando que otros tipos celulares diferentes a los macrófagos pueden tener un papel crucial en el inicio del daño cardíaco y pueden mediar la subsecuente respuesta inflamatoria y reclutamiento de macrófagos (*Figura 2*).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 828672	Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

La aldosterona tiene efectos directos en el sistema vascular, que incluyen aquellos implicados en la reactividad vascular, el crecimiento o muerte celular, regulando la presión arterial y ejerciendo su influencia sobre el daño en órganos diana directamente vía células vasculares de músculo liso y células endoteliales. Respecto a la reactividad vascular, se han descrito tanto efectos vasodilatadores como vasoconstrictores para la aldosterona. En humanos, los efectos agudos de la aldosterona son vasodilatadores. Esta función es generalmente endotelio-dependiente y relacionada con la activación de la óxido nítrico sintasa (NOS). Sin embargo, los efectos crónicos son vasoconstrictores y son a través de las células vasculares de músculo liso (Figura 2) (Lothar et al., 2015).

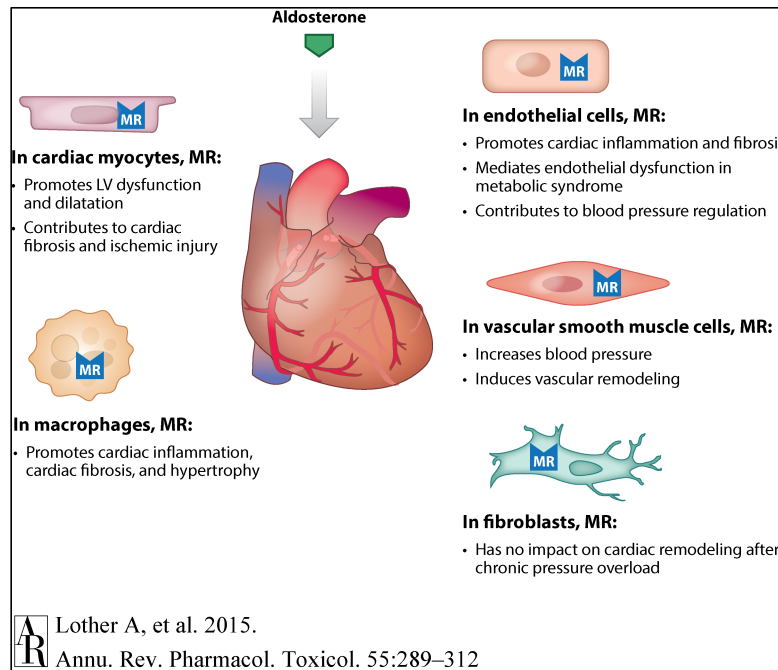


Figura 2. Efectos específicos de MR en células cardíacas. Los distintos efectos de la activación de MR en corazón se han determinado en modelos de delección dirigida del gen de MR en distintos tipos celulares. LV: ventrículo izquierdo (Lothar et al., 2015).

3.1.2.2 MR en enfermedad renal

La expresión de MR fue demostrada inicialmente en la nefrona distal (Figura 3). La inmunolocalización de MR ha sido un desafío, pero la nueva generación de anticuerpos monoclonales generados utilizando péptidos de MR (Gomez-Sanchez et al., 2006) ha permitido la inmuno-detección en tejidos donde la expresión es más baja que en la nefrona distal. MR se

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 828672		Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS		Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ		28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ		29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO		11/12/2016 10:56:17

expresa claramente en células vasculares endoteliales y vasculares de músculo liso o en las arterias interlobulares en el riñón de ratón (Bertocchio et al., 2011). Actualmente, la expresión de MR a nivel de transcrito y proteína ha sido detectada tanto en podocitos cultivados *in vitro* como en podocitos glomerulares *in vivo* (Nagase and Fujita, 2008).

Las consecuencias renales de la activación de MR han sido descritas durante infusión con aldosterona, supresión de la síntesis de aldosterona tras un proceso de adrenalectomía o a través del bloqueo farmacológico con MRAs en distintos modelos de enfermedad renal. El tratamiento con MRAs reduce los cambios vasculares inducidos por bloqueo de la síntesis de óxido nítrico (NO) durante una alta ingesta de sal en distintos modelos de nefropatía hipertensiva. Estos efectos se observan sin reducción en la presión arterial indicando un efecto protector no hemodinámico del bloqueo de MR, que incluye una disminución del estrés oxidativo, inflamación y deposición de matriz extracelular (Bertocchio et al., 2011). En enfermedad renal crónica (CKD) producida mediante nefrectomía subtotal y tratamiento con aldosterona se observa un descenso de filtración glomerular, la glomeruloesclerosis y la proteinuria que se pueden prevenir por adrenalectomía o mediante tratamiento con espironolactona (Aldigier et al., 2005). El bloqueo de MR frena la progresión de lesiones preexistentes y previene la proliferación, la fibrosis intersticial y la proteinuria en distintos modelos de CKD. El papel de la aldosterona y/o MR en nefropatía diabética ha sido demostrado en distintos modelos experimentales de diabetes tipo I (inducción con estreptozotocina) y II (ratones db/db). Se caracteriza por presentar un índice de filtración glomerular (GFR) reducido, presión arterial elevada y albuminuria persistente. El tratamiento de la nefropatía diabética ha tratado principalmente de controlar las alteraciones hemodinámicas y metabólicas mediante el uso de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACEs) y bloqueantes del receptor de angiotensina (ARBs), que resultan en niveles séricos elevados de aldosterona, lo que se traduce en hipertrofia glomerular, glomeruloesclerosis y proteinuria. El tratamiento con MRAs, como la espironolactona o la eplerenona puede proteger contra el daño que produce la aldosterona en los órganos en pacientes con insuficiencia cardíaca (HF) y nefropatía diabética, pero está limitado por los efectos secundarios (hiperpotasemia, reactividad cruzada con el receptor de andrógenos -AR- y el receptor de progesterona -PR-) (Bertocchio et al., 2011).

Por último, la nefrotoxicidad inducida por el tratamiento con ciclosporina A (CsA) en pacientes trasplantados produce efectos vasculares, daño tubular y lesiones glomerulares. Para evitar los daños en la función renal estos pacientes se tratan con ACEs y ARBs. Distintos estudios en modelos preclínicos han demostrado que el tratamiento con espironolactona o eplerenona tienen efectos beneficiosos en esta patología (Perez-Rojas et al., 2005, Perez-Rojas et al., 2007).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 828672		Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS		Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ		28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ		29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO		11/12/2016 10:56:17

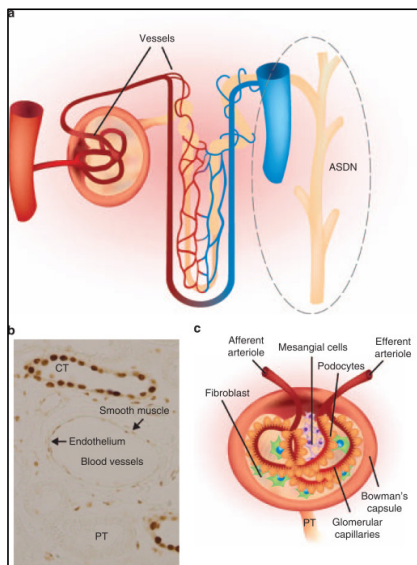


Figura 3. Expresión de MR en riñón. (A) La Diana clásica de aldosterona es la nefrona distal sensible a aldosterona (ASDN) pero los vasos sanguíneos también expresan MR. (B) Immunocalización de MR en el riñón: en túbulo colector (CT), en células endoteliales y vasculares de músculo liso. (C) Dianas propuestas en enfermedades glomerulares : podocitos, células mesangiales y capilares glomerulares. PT: túbulo proximal (Bertocchio et al., 2011).

3.1.2.3 MR en disfunción adipocitaria: resistencia a la insulina y obesidad

En tejido adiposo tanto la aldosterona como los glucocorticoides tienen un papel clave en el control de la adipogénesis, la expansión adiposa y su capacidad proinflamatoria a través de MR (Figura 4). En este contexto, se ha demostrado que una activación excesiva de MR es un factor causal de resistencia a la insulina y obesidad (Marzolla et al., 2012).

Se ha descrito el papel central de MR en adipogénesis inducida por glucocorticoides (Rondinone et al., 1993, Caprio et al., 2007). La aldosterona promueve la adipogénesis (Rondinone et al., 1993) y MR juega un importante papel en la diferenciación de células 3T3-L1 inducido tanto por glucocorticoides como por mineralocorticoides (Caprio et al., 2007). De hecho la exposición crónica de aldosterona en células 3T3-L1 y 3T3-F422A induce importantes cambios morfológicos y bioquímicos en marcadores moleculares del proceso de diferenciación, a través de la activación específica de MR. Es interesante considerar que siendo la expresión de 11β -HSD2 muy baja en adipocitos y teniendo en cuenta la prevalencia de los niveles circulantes de corticosteroides en plasma, es bastante improbable que el efecto proadipogénico de MR mediado por aldosterona *in vivo* sea fisiológicamente relevante. Sin embargo, dada la frecuente ocupación de éste receptor por glucocorticoides *in vivo*, MR podría ser de gran importancia en el proceso de diferenciación inducida por glucocorticoides.

La obesidad es una enfermedad proinflamatoria caracterizada por la expansión del tejido adiposo, el aumento en la secreción de citoquinas proinflamatorias (como $TNF-\alpha$ y MCP-1), o factores protrombóticos como el activador del inhibidor del plasminógeno 1 (PAI-1), y por el descenso en la expresión de adiponectina y el activador de proliferación de peroxisomas

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

(PPAR- γ). La desregulación de adipoquinas relacionadas con la obesidad está directamente vinculada a la activación del eje renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) y al desarrollo de resistencia a la insulina, *diabetes mellitus* tipo 2 y daño cardiovascular. Los adipocitos pardos consumen energía para desarrollar termogénesis sin temblor, contrarrestando la hipotermia, y contrarrestando eficientemente la obesidad y diabetes. El fenómeno conocido como “*browning*” se asocia a la habilidad de células adiposas blancas para transformarse en pardas. Estudios en roedores sustentan que este cambio se puede inducir por diferentes hormonas y citoquinas. Se han realizado trasplantes de tejido adiposo pardo (BAT) en la cavidad visceral de ratones receptores, consiguiendo una mejoría en la homeostasis de glucosa y sensibilidad a la insulina (Stanford et al., 2013). Por tanto, un aumento en BAT representa una herramienta terapéutica potencial para combatir la obesidad y desordenes metabólicos (Ishibashi and Seale, 2010).

Por otra parte cambios en el flujo sanguíneo y en la inervación simpática, así como en la composición celular (en adipocitos blancos o pardos) y la función endocrina en los depósitos de tejido adiposo pueden contribuir al desarrollo de obesidad y, a su vez, a complicaciones cardiometabólicas (Feraco et al., 2013).

Un estudio desarrollado en ratones *db/db* (obesos y diabéticos) que expresan mayores niveles de transcritos de MR que los ratones control, muestra que el tratamiento con antagonistas de este receptor revierte la expresión de marcadores moleculares asociados a la disfunción de los adipocitos, evidenciando que la obesidad está íntimamente relacionada con un aumento en los niveles de aldosterona y de la activación de MR (Guo et al., 2008). De forma más directa, la sobreexpresión de MR en adipocitos, incluso en ausencia de dieta alta en grasa (HFD), contribuye al desarrollo de síndrome metabólico, incluyendo numerosas alteraciones metabólicas, como obesidad visceral, ganancia de peso, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina, así como dislipidemia (Urbanet et al., 2015).

La actividad corticosteroidea, que es diferencialmente mediada por GR y MR, muestra importantes consecuencias en el desarrollo de síndrome metabólico y resistencia a la insulina (Garg and Adler, 2012). Varios estudios demuestran los efectos divergentes de GR y MR en la mediación de la capacidad proinflamatoria del tejido adiposo. En este contexto, estudios *in vitro* aclaran que la estimulación selectiva de GR por dexametasona inhibe fuertemente la expresión de adipoquinas proinflamatorias en adipocitos blancos maduros, mientras que la activación selectiva de MR por aldosterona produce la expresión de adipoquinas proinflamatorias. Sin embargo, incluso en presencia de una concentración normal de aldosterona, la obesidad representa un estado de inflamación crónica (Xu et al., 2003) con alto estrés oxidativo (Furukawa et al., 2004). Se plantea una cuestión interesante sobre el papel de MR y glucocorticoides/mineralocorticoides en obesidad en lo que se refiere a una activación inapropiada de MR por niveles normales de cortisol en lugar de por aldosterona. Se ha formulado la hipótesis de que la activación de MR por glucocorticoides es redox dependiente en

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por:	Fecha:
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

tejidos deficientes de 11 β -HSD2, tal mecanismo de activación de MR se podría producir también en tejido adiposo (Funder, 2004).

Dado que MR posee una afinidad similar por mineralocorticoides que por glucocorticoides, la acción de ambos vía MR representa un factor fundamental para inducir la diferenciación de adipocitos y promover la expresión de un perfil proinflamatorio. Así, el mismo ligando puede producir efectos opuestos en el fenotipo proinflamatorio según su interacción específica con MR o con GR (Feraco et al., 2013).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

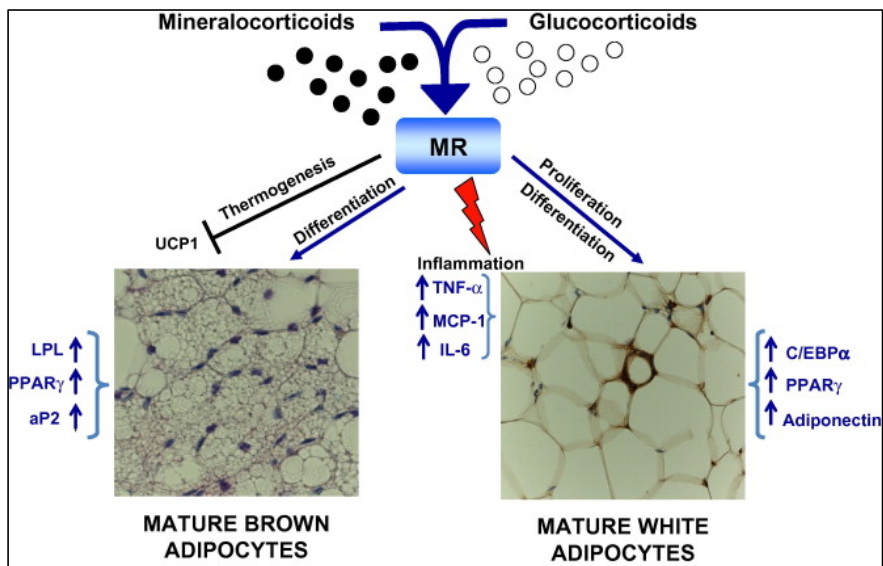


Figura 4. Papel de MR en la función y diferenciación de células adiposas blancas y pardas. En los preadipocitos pardos la activación de MR incrementa la expresión de genes adipogénicos como lipoproteína lipasa (LPL), PPAR γ y proteína de adipocitos 2 (aP2), induciendo la acumulación de gotas lipídicas en el citoplasma y promoviendo la diferenciación celular. La aldosterona inhibe la función de UCP-1 que promueve el proceso de diferenciación adiposa y previene la termogénesis. En preadipocitos blancos, la activación de MR induce la proliferación celular y subsecuentemente la activación de la maquinaria transcripcional adipogénica, sobreexpresando la expresión de la proteína potenciadora de unión (C/EBP α) y PPAR γ , que implica la acumulación intracelular de triglicéridos y la expresión de adipocinas. Además, la activación de MR induce la expresión de genes proinflamatorios, como TNF α , interleucina 6 (IL-6) y MCP-1 favoreciendo la infiltración de macrófagos y proporcionando las condiciones ambientales para la inflamación (Marzolla et al., 2012).

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

3.1.3 Efectos beneficiosos del tratamiento con antagonistas del receptor de mineralocorticoides (MRAs)

3.1.3.1 Enfermedad Cardíaca

El tratamiento con MRAs en pacientes con insuficiencia cardíaca (HF) y fracción de eyección ventricular izquierda (LVEF) reducida disminuye significativamente la mortalidad y morbilidad en tres estudios aleatorios controlados:

En el *Randomized Aldactone Evaluation Study (RALES)* la espironolactona redujo significativamente el fallecimiento por varias causas, la frecuencia de hospitalización por empeoramiento del HF y la severidad de los síntomas del HF en comparación con los grupos placebo en pacientes con HF grave que reciben terapia estándar. La reducción del 35 % de los casos del riesgo de hospitalización por empeoramiento del HF se atribuye a la capacidad de la espironolactona para reducir la fibrosis cardiovascular (Pitt et al., 1999).

En el estudio *The Eplerenone Post-Myocardial Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHESUS)* se demostró una reducción en el número de fallecimientos por cualquier causa y en el número de fallecimientos y hospitalizaciones por causas cardiovasculares con el tratamiento con eplerenona en comparación con los grupos que reciben placebo en pacientes con HF y LVEF reducido tras un infarto de miocardio.

Más recientemente, el estudio *Eplerenone in Mild Patients Hospitalization and Survival Study in Heart Failure (EMPHASIS-HF)* reporta beneficios significativos de la eplerenona en la mortalidad y morbilidad por causa cardiovascular en comparación con los grupos placebo en pacientes con HF leve y LVEF reducida.

El estudio *The Treatment of Preserved Cardiac Function Heart Failure With an Aldosterone Antagonist (TOPCAT)* investiga la eficacia de la espironolactona reduciendo la mortalidad y morbilidad en pacientes con HF y LVEF \geq 45%. En estos pacientes se reduce significativamente el riesgo de hospitalización en comparación con los grupos placebo.

El reciente estudio: *Role of Eplerenone in Acute Myocardial Infarction Double-Blind, Early Treatment Initiation, Randomized (REMINDER)*, la eplerenona proporciona una reducción significativa en la mortalidad y morbilidad por causa cardiovascular en comparación con los grupos que reciben placebo (Bauersachs et al., 2015).

Por último, la seguridad y tolerancia de un nuevo MRA no esteroideo, la finerenona, cuya actividad cruzada con otros receptores esteroideos es muy baja, ha sido testada en pacientes con HF y LVEF reducida y en CKD leve o moderada en el estudio en fase 2 *Mineralocorticoid Receptor Antagonist Tolerability Study (ARTS)*.

Los mecanismos por los que los MRAs proporcionan protección cardiovascular en pacientes con HF no se conocen con exactitud. Como se ha indicado anteriormente, la activación de MR por aldosterona o cortisol juega un importante papel en la fisiopatología del HF, y MR está

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por:	Fecha:
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

sobreexpresado en corazón dañado. Además se conoce que una activación inapropiada de MR promueve el desarrollo de fibrosis cardíaca en modelos experimentales. De acuerdo con estos datos, en pacientes con HF, así como en pacientes tras un infarto de miocardio el uso de MRAs reduce la deposición de matriz extracelular, disminuyendo los valores séricos de biomarcadores del colágeno (Iraqi et al., 2009). La hiperpotasemia es uno de los efectos adversos más frecuentes asociados al tratamiento con MRAs, con una incidencia entre el 2 y el 11.8 % (Zannad et al., 2000) (Iraqi et al., 2009).

Si bien la eficiencia de los MRAs en algunos pacientes con enfermedad cardíaca, especialmente con HF, ha sido probada en ensayos clínicos, en un futuro han de evaluarse los efectos beneficiosos en la mortalidad y morbilidad de los MRAs en una población más amplia de pacientes con enfermedad cardíaca, incluyendo los pacientes de alto riesgo con enfermedad renal.

3.1.3.2 Enfermedad Renal

Los efectos de MRAs en la progresión de la CKD están poco estudiados en comparación con los efectos de ACEs y ARBs. Si bien los estudios RALES, EPHEsus Y EMPHASIS-HF demuestran claramente los efectos beneficiosos de los MRAs en la patología cardíaca, el conocimiento de los posibles efectos beneficiosos en CKD sigue siendo limitado (Bertocchio et al., 2011). Numerosos estudios clínicos en pequeña escala han demostrado la disminución de la proteinuria o albuminuria con la adición de MRAs a la terapia con ACEs o con ARBs en pacientes con CKD y nefropatía diabética. En la mayoría de estos estudios los efectos beneficiosos son independientes de los cambios en la presión arterial (Bauersachs et al., 2015). Un análisis de 8 estudios describe una reducción entre el 23 y el 61% de la albuminuria en pacientes con nefropatía diabética con la adición de MRAs en comparación con el tratamiento estándar solo (Pitt et al., 2014). Como era de esperar, el tratamiento con MRAs está asociado con un aumento en los niveles medios de K⁺ sérico. En un estudio abierto aleatorizado prospectivo en pacientes con CKD que reciben terapia con inhibidores ACE o ARB, la espironolactona muestra un descenso en la estimación de GFR y en la progresión de CKD. Además reduce la proteinuria en comparación con los controles. En pacientes con nefropatía no diabética, la adición de espironolactona reduce los marcadores de daño tubular y fibrosis en comparación con la terapia con inhibidores de ACE o ARB aislada (Bauersachs et al., 2015).

En el estudio ARTS, que ensaya los efectos de la finerenona en pacientes con HF y LEVF reducido y en pacientes con CKD leve o moderada, el nuevo MRA se ha asociado con reducciones similares en la ratio albúmina-creatinina, una disminución significativamente menor en GFR y una reducción en las incidencias por el empeoramiento de la función renal, insuficiencia renal y disfunción renal en comparación con el tratamiento con espironolactona (Zannad et al., 2011). El estudio ARTS-DN (*Diabetic Nephropathy*) incluye a pacientes con

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 828672	Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

nefropatía diabética que reciben tratamiento con inhibidores de RAAS. En estos pacientes la finerenona contribuye de manera dosis-dependiente a una reducción en la relación albúmina-creatinina (ACR). Por otra parte, los datos muestran que no existe relación entre el ACR urinario y los cambios en la presión arterial sistólica (SBP) (Yang et al., 2016).

La eficacia y seguridad del tratamiento con MRAs en pacientes con enfermedad renal en etapa terminal esta siendo explorado actualmente. Los datos sobre el uso de MRAs en estos pacientes sometidos a hemodiálisis sugieren que el riesgo de hiperpotasemia es inferior a lo que se pensaba cuando se utiliza una dosis baja de MRAs, y que este tratamiento es una opción favorable para estos pacientes (Shavit et al., 2012).

3.1.3.3 Obesidad y resistencia a la insulina

Varios estudios demuestran los efectos beneficiosos de MRAs en disfunción de adipocitos y resistencia a la insulina, tanto *in vitro* como *in vivo*. Se ha observado que el bloqueo de MR con MRAs, como la eplerenona o la espironolactona, es capaz de mejorar la sensibilidad a la insulina en el tejido adiposo y el músculo esquelético, reduciendo el estrés oxidativo y la disregulación de adipocinas (Feraco et al., 2013). Si bien varios estudios en modelos animales tratados con MRAs muestran una marcada mejoría en la función global del tejido adiposo (Guo et al., 2008, Hirata et al., 2009), hasta ahora no se han realizado ensayos clínicos sobre el impacto de MRAs en la masa grasa corporal y la función adipocitaria como criterio principal de valoración (Marzolla et al., 2012). De forma destacable, estudios clínicos con drospirenona, un potente MRA sintético con propiedades progestogénicas y moderadamente anti-androgénicas, que se utiliza en combinación con estrógenos para contracepción y terapia de sustitución hormonal (HRT) (Palacios et al., 2006) indican, de forma indirecta, un impacto positivo en la presión arterial (White et al., 2006, Preston et al., 2007) y el peso corporal (Archer et al., 2005, Foidart and Faustmann, 2007). Basándose en estas observaciones se ha demostrado un potente efecto anti-adipogénico de esta molécula en preadipocitos humanos primarios de diferentes depósitos grasos, proporcionando algunas pistas sobre los mecanismos para los efectos positivos observados en el peso y el tejido adiposo tras el bloqueo de MR (Caprio et al., 2011).

Por otra parte, numerosos estudios apuntan a que el fenómeno de *browning* protege a los ratones de la ganancia de peso, la expansión de masa grasa y las alteraciones del metabolismo de la glucosa y lípidos. De manera importante, datos recientes sugieren la presencia de adipocitos pardos humanos adultos, siendo su abundancia inversamente proporcional al índice de masa corporal, lo que a su vez indica, un papel protector frente a la obesidad (Armani et al., 2015). La inducción del *browning* con un tratamiento farmacológico apropiado podría representar un avance novedoso en el tratamiento de obesidad y síndrome metabólico. En este contexto, un estudio reciente muestra que el tratamiento con MRAs en ratones alimentados con dieta alta en grasa (HFD) induce características típicas de los adipocitos pardos en el tejido adiposo blanco y

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 828672	Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

confiere protección contra la obesidad y los desajustes en la homeostasis de la glucosa (Armani et al., 2014). En este estudio se detectó un incremento en la expresión de genes específicos de adipocitos pardos, cómo la proteína desacoplante 1 (UCP-1) en depósitos de tejido adiposo blanco de ratón y cultivos primarios de adipocitos murinos tratados con MRAs.

3.1.3.4 Búsqueda de nuevos moduladores de MR

Si bien el efecto beneficioso de los MRAs en el tratamiento de la enfermedad cardiovascular está bien establecido y existen muchos indicios de su utilidad para el tratamiento de enfermedad renal y alteraciones metabólicas relacionadas con la obesidad, se ha planteado la búsqueda de nuevos moduladores tejido-específicos de MR debido a la incidencia de varios efectos adversos como la hiperpotasemia, hipotensión, función renal alterada y disfunción sexual. Las dificultades asociadas a los MRAs pueden explicarse por su extensa distribución tisular, la presencia de múltiples efectores diferentes en varios tejidos y su homología estructural con otros receptores esteroideos (AR, PR y el receptor de glucocorticoides -GR-). Con la intención de disminuir estos efectos adversos, se ha propuesto la búsqueda de nuevos moduladores de MR o de la producción de sus ligandos naturales mediante diferentes estrategias, incluyendo el desarrollo de MRAs no esteroideos y la inhibición de la síntesis de aldosterona. Una alternativa adicional será el desarrollo de estrategias dirigidas a bloquear los efectos de los genes diana de MR.

3.2 La quinasa inducida por suero y glucocorticoides 1 (SGK1)

En los últimos años se han identificado distintos genes diana de MR, algunos de los cuales han podido relacionarse con los efectos negativos sobre la función cardiovascular, renal y metabólica antes mencionados (Latouche et al., 2012, Messaoudi et al., 2013, Urbanet et al., 2015). Entre estos genes resulta especialmente interesante la quinasa SGK1, ya que ha sido implicada en la regulación de la presión arterial, el desarrollo de fibrosis cardiaca y daño renal, además de ser un elemento transductor en la ruta de señalización de la insulina (Artunc et al., 2006, Vallon et al., 2006).

3.2.1 Regulación de la expresión y actividad de SGK1

SGK1 fue inicialmente descubierta como una serina/treonina quinasa inducida por suero y glucocorticoides en células de tumor mamario de rata (Webster et al., 1993). La expresión de SGK1 es prácticamente ubicua, pero varía según diferentes tipos celulares, como se observa en cerebro, ojo, oído interno, pulmón, riñón, hígado, intestino, páncreas y ovario. Además, se han encontrado patrones diferenciales de expresión durante el desarrollo embrionario y postnatal. La expresión de SGK1 se encuentra bajo el control de hormonas como glucocorticoides y mineralocorticoides (es una diana directa tanto de MR como de GR) y es regulada a nivel transcripcional por cambios osmóticos y por glucosa (Waldegger et al., 1997) además de por

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 828672	Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

una gran variedad de estimuladores e inhibidores (Lang et al., 2009a). En el promotor del gen de SGK1 de rata se han identificado sitios de unión para factores de transcripción incluyendo GR, MR, PR, el receptor de vitamina D (VDR), el receptor de retinoides X (RXR), el receptor de farnesoides X (FXR), la proteína de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBP), PPAR γ , el factor nuclear $\kappa\beta$ (NF κ B) y TGF- β entre otros (Lang et al., 2009a). La localización subcelular de SGK1 puede depender del estado funcional de la célula y de la isoforma expresada (Arteaga et al., 2007). Se ha sugerido que la activación de SGK1 por exposición a suero desencadena la entrada de SGK1 en el núcleo mediada por la importina- α , mientras que la activación de SGK1 por shock hiperosmótico o glucocorticoides favorece la localización citosólica de la quinasa (Firestone et al., 2003). SGK1 además puede localizarse en la membrana mitocondrial (Engelsberg et al., 2006, Cordas et al., 2007). SGK1 es un miembro de la familia de quinasas AGC, con alta similitud a AKT. La estimulación por insulina o TGF- β produce la activación de SGK1 mediante dos eventos consecutivos de fosforilación. Este proceso está regulado por la vías de señalización de la fosfatidil-inositol 3-quinasa (PI3K), e incluye la activación de la quinasa dependiente de fosfoinositidos (PDK1) (Figura 5) y de la diana de mamíferos del complejo 2 de rapamicina (mTORC2), previamente denominada PDK2. Por el contrario, IL-6 induce la transcripción y activación de SGK1 principalmente a través del transductor de señal *Janus* quinasa y el activador de la cascada de transcripción (JAK/STAT).

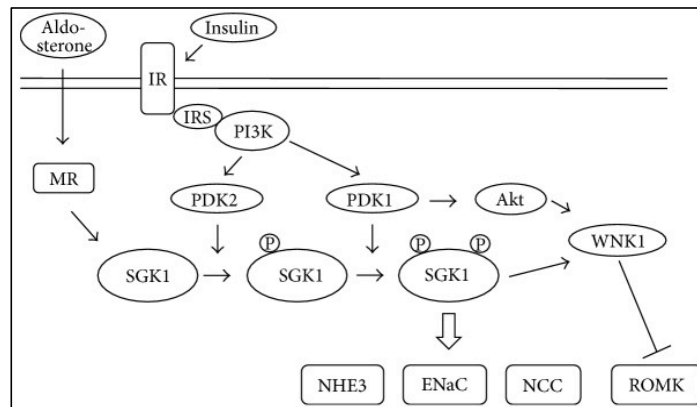


Figura 5 . Ruta de señalización de SGK1. La aldosterona estimula SGK1 vía MR, mientras que la insulina la estimula vía IRS/PI3K. SGK1 es fosforilada dos veces por PDK1 y PDK2. Una vez activada, SGK1 ejerce sus efectos estimulatorios en el transporte de Na⁺ a través de ENaC, NCC y NH3. Además regula la excreción de K⁺ a través de ROMK1 (Satoh et al., 2015).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 828672	Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

3.2.2 Funciones fisiológicas de SGK1

Como se expuso anteriormente, se conoce el papel de SGK1 como uno de los mediadores del efecto de aldosterona sobre la actividad de ENaC y por tanto como un factor que promueve la reabsorción de Na⁺ en el riñón (Lang et al., 2009a). Además se sabe que SGK1 regula el tráfico intracelular de otros canales iónicos y transportadores en distintos tipos celulares (Lou et al., 2016). Por otra parte, SGK1 es capaz de fosforilar y regular la actividad de otras moléculas importantes en la señalización celular, como por ejemplo la glicógeno sintasa quinasa 3β (GSK3β) (Arteaga et al., 2007), y de modular la transcripción génica controlando la actividad de factores de transcripción, como por ejemplo miembros de la familia FOXO, a través de los cuales promueve la supervivencia y proliferación celulares (Di Pietro et al., 2010, Lang and Stournaras, 2013)

3.2.2.1 Regulación del canal de Na⁺ epitelial (ENaC) dependiente de SGK1

SGK1 aumenta el transporte de Na⁺ en varios tipos celulares, en respuesta a estímulos hormonales y no hormonales, alterando la expresión de ENaC, aumentando su actividad, probabilidad de apertura y tráfico hacia la membrana, además de atenuar su degradación y reciclado (Figura 6). El mecanismo mejor entendido por el que SGK1 incrementa la actividad de éste canal es de manera indirecta, fosforilando e inhibiendo a la ubiquitin-ligasa Nedd4-2, lo que resulta en el reclutamiento de la proteína 14-3-3 que a su vez inhibe la interacción entre ENaC y Nedd4-2 (Debonneville et al., 2001, Snyder et al., 2002). Esto resulta en una disminución en la endocitosis de ENaC con la correspondiente acumulación de canales en la membrana plasmática, y, en consecuencia, un aumento de la reabsorción de Na⁺ (Figura 6). Otros estudios en células epiteliales renales han demostrado que SGK1 juega un papel en el tráfico de ENaC hacia la membrana (Alvarez de la Rosa et al., 1999, Alvarez de la Rosa and Canessa, 2003, Alvarez de la Rosa et al., 2004). SGK1 fosforila a AS160 y ésta promueve el tráfico de ENaC hacia la membrana apical, estabilizándolo en el compartimento intracelular (Liang et al., 2010). Por otra parte, se ha visto en células HEK293 que SGK1 también regula ENaC a través de la fosforilación e inhibición de WNK4, una serina-treonina quinasa que inhibe la actividad de ENaC (Hoorn et al., 2011). SGK1 también regula éste canal mediante la fosforilación de la óxido nítrico sintasa (iNOS) (Helms et al., 2005) (Figura 6).

Otras evidencias apuntan a que SGK1 está involucrada en la regulación de la transcripción de SCNN1A (gen que codifica la subunidad α-ENaC) disminuyendo la hipermetilación de la proteína histona H3 en la lisina 79 (H3K79). SGK1 fosforila la proteína de unión al DNA ALL1 gen fusionado al cromosoma 9 (AF9) y promueve la disociación del disruptor de silenciamiento de telómeros 1 (DOT1a) del promotor de SCNN1A, conduciendo a la inhibición de la metilación de H3K79 en el promotor y posteriormente, al alivio de la represión (Figura 6) (Lou et al., 2016).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por:	Fecha:
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

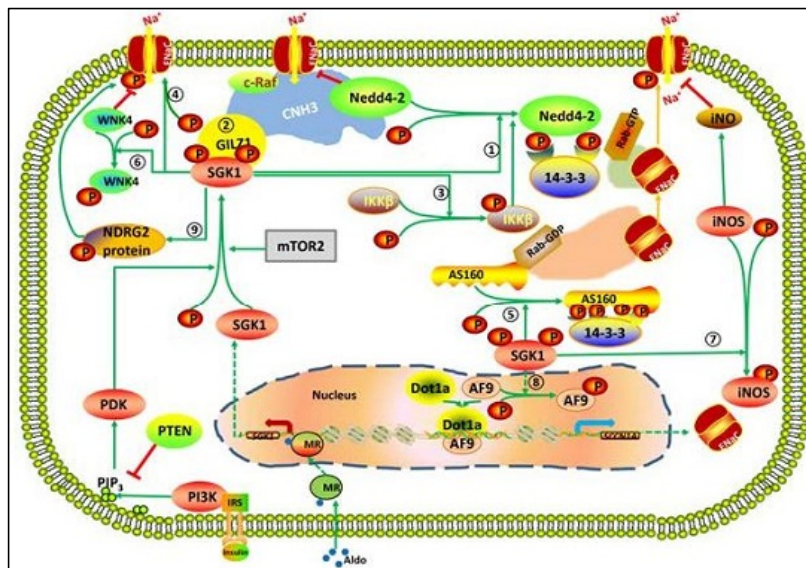


Figura 6. Regulación de ENaC dependiente de SGK1.(1) SGK1 fosforila al regulador negativo Nedd4-2 y recluta a la proteína 14-3-3 para reducir la ubiquitinación y degradación de ENaC. (2) SGK1 interactúa con GILZ1, CNK3, c-Raf, ENaC y Nedd4-2 para formar el complejo regulador de ENaC (ERC) para estimular la función del canal. (3) SGK1 fosforila IKKβ para revertir la inhibición de ENaC mediada por Nedd4-2. (4) SGK1 fosforila directamente la subunidad α de ENaC. (5) SGK1 fosforila AS160 para promover el tráfico de ENaC en la membrana apical. (6) SGK1 activa ENaC via fosforilación de WNK4. (7) SGK1 incrementa la probabilidad de apertura de ENaC disminuyendo NO a través de la fosforilación de iNOs y (8) SGK1 está involucrado en la ruta epigenética regulando la transcripción de SCNN1A (gen que codifica α-ENaC) mediante la fosforilación de AF9 y promoviendo la disociación de Dot1a del promotor de SCCH1A. La translocación se indica en flechas a trazos. Las flechas rojas indican modificaciones inhibitorias. P: fosfato, PTEN: homólogo de fosfatasa y tensina, IRS: receptor de insulina, Aldo: Aldosterona (Lou et al., 2016).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 828672		Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS		Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ		28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ		29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO		11/12/2016 10:56:17

3.2.2.2 Regulación de otros canales y transportadores dependiente de SGK1

3.2.2.2.1 Canales y transportadores de Na⁺

Además de regular la actividad de ENaC de manera dependiente e independiente de Nedd4-2, SGK1 regula a otros canales y transportadores. SGK1 regula el canal de Na⁺ dependiente de voltaje cardíaco **Nav1.5** que es el principal canal de Na⁺ en la iniciación del potencial de acción cardíaco (Erlenkamp et al., 2002). También regula a los intercambiadores de sodio y protones **NHE1** y **NHE3** (Lou et al., 2016). NHE3 participa en la reabsorción de Na⁺ y la secreción de H⁺ en varios epitelios y en la modulación del pH citosólico tanto en células epiteliales como no epiteliales (Vallon and Lang, 2005, Stevens et al., 2008). La activación de NHE1 puede inducir hipertrofia cardíaca y desequilibrio en el pH de cardiomiocitos, lo cual conduce a patologías de remodelado e isquemia cardíaca (Xu et al., 2015). Además SGK1 modula la actividad del cotransportador **NCC** que se expresa en la membrana apical de las células epiteliales del túbulo contorneado distal (DCT) (Moes et al., 2014). La reabsorción mediada por NCC es solo aproximadamente de un 5-10% del Na⁺ filtrado, sin embargo, es crítica para la regulación de la excreción renal de Na⁺ en respuesta a varios estímulos hormonales y no hormonales (Moes et al., 2014). NCC puede ser regulado por cambios en la expresión, tráfico y fosforilación (Dimke, 2011). Asimismo, la actividad del cotransportador Na⁺- K⁺-2 Cl⁻ (**NKCC2**) y de la Na⁺/ K⁺-ATPasa es estimulada por SGK1 (Lang et al., 2000, Alvarez de la Rosa et al., 2006). Por último, SGK1 regula al receptor del péptido natriurético auricular tipo A (**NPR-A**) (Waldegger et al., 1998). Todos estos mecanismos regulados por SGK1 contribuyen a la homeostasis del Na⁺ (Lou et al., 2016).

3.2.2.2.2 Canales de K⁺

SGK1 regula la actividad del canal de K⁺ de la médula externa renal (**ROMK1**), que se expresa en las células principales de la nefrona distal sensible a aldosterona y es el principal responsable de la excreción de K⁺ inducida por esta hormona (Lou et al., 2016).

SGK1 también regula la actividad de los canales de K⁺ cardíacos y epiteliales **KCNE1/KCNQ1** y los canales de K⁺ en oído interno **KCNQ4** y los canales dependientes de voltaje **Kv1.3**, **Kv1.5** y **Kv4.3** (Lang et al., 2006).

3.2.2.2.3 Otros canales y transportadores

Se ha propuesto que SGK1 regula un gran número de canales y transportadores (Lang et al., 2006). Por su importancia para este trabajo, resalta la estimulación de la actividad del transportador de glucosa dependiente de Na⁺ **SGLT1** y del transportador facilitador de glucosa **GLUT1**. La regulación de SGLT1, pero no la de GLUT1 es, al menos parcialmente, mediada por la fosforilación de Nedd4-2.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por:	Fecha:
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

3.2.3 Efectos deletéreos de SGK1 en respuesta a la activación de MR

Existen diversos indicios, detallados a continuación, de que la inducción de SGK1 en respuesta a una actividad inapropiada de MR podría estar implicada en varios de los efectos de este receptor que confluyen en el desarrollo de enfermedad renal crónica, enfermedad cardiovascular y síndrome metabólico.

3.2.3.1 SGK1 en la hipertensión sensible a Sal

La retención excesiva de Na⁺ puede incrementar el volumen circulante efectivo y, por tanto, aumentar la presión arterial. Además de la función ya descrita de SGK1 como factor inductor de la reabsorción renal de Na⁺, se sabe que la quinasa participa también facilitando las acciones hormonales involucradas en la estimulación de la ingesta de sal, lo que influye en el control a largo plazo de la presión arterial, contribuyendo así al desarrollo de hipertensión (Lou et al., 2016). La ingesta de sal parece predisponer a algunos individuos a desarrollar hipertensión sensible a la sal. Se cree que SGK1 contribuye a la preferencia por una dieta alta en sal y que está involucrada en la adaptación a la sal inducida por hormonas (Farjah et al., 2003, Vallon et al., 2005). En animales que reciben dieta alta en grasa (Huang et al., 2006b) o ingesta alta de fructosa (Huang et al., 2006a) además de contenido elevado en sal el incremento de presión arterial es detectado únicamente en los ratones Sgk1^{+/+}, pero no en Sgk1^{-/-} (Lou et al., 2016).

3.2.3.2 SGK1 en disfunción cardíaca

La disregulación de la homeostasis de Na⁺ ha sido implicada en alteraciones de la frecuencia cardíaca así como en un remodelado ventricular adverso. SGK1 juega un papel esencial en la angiogénesis cardíaca temprana y el remodelado vascular (Catela et al., 2010, Zarrinpashneh et al., 2013, Marionneau and Abriel, 2015). La activación crónica de SGK1 en corazón incrementa la mortalidad causada por arritmias cardíacas (Das et al., 2012). Este efecto es paralelo a la estimulación dependiente de SGK1 del canal Nav1.5. Datos recientes, sugieren que la activación por SGK1 de NHE1 está involucrada en la fisiopatología cardíaca y contribuye al remodelado miocárdico, hipertrofia y progresión de la insuficiencia cardíaca (Lou et al., 2016).

3.2.3.3 SGK1 en inflamación y fibrosis

La actividad aumentada de SGK1 se ha relacionado con el desarrollo de fibrosis e inflamación (Artunc and Lang, 2014, Martin-Fernandez et al., 2014). Los niveles de transcrito de SGK1 están elevados en varias enfermedades fibróticas, cómo nefropatía diabética, glomerulonefritis, enfermedad de Crohn, fibrosis pulmonar, cirrosis hepática y fibrosis pancreática (Lang et al., 2009a). SGK1 está implicada en los efectos inflamatorios de los mineralocorticoides que como se ha expuesto, son potentes estimuladores de la expresión de esta quinasa (Lang and Stournaras, 2013). SGK1 parece ser esencial para el desarrollo de fibrosis inducida por exceso de sal y mineralocorticoides (Artunc et al., 2006, Vallon et al., 2006), ya que los ratones Sgk1^{-/-}

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por:	Fecha:
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

presentan protección ante el desarrollo de fibrosis cardíaca y renal tras ser tratados con exceso de mineralocorticoides. La expresión de SGK1 está aumentada por TGF- β , un potente estimulador de la fibrosis tisular. El efecto fibrótico de TGF- β es mediado parcialmente por la estimulación de factores de transcripción Smad2/3 (Lang and Stournaras, 2013); estos son degradados por Nedd4L (Lang and Stournaras, 2013), y SGK1 fosforila a esta ubiquitina ligasa inactivándola y amplificando así los efectos de TGF- β (Lang and Stournaras, 2013). SGK1 es además un activador del factor nuclear- κ B (NF- κ B), un factor de transcripción que fomenta el desarrollo de fibrosis e inflamación. SGK1 fosforila a la quinasa IKK que a su vez fosforila a la proteína inhibidora de NF- κ B (I κ B), lo cual lleva a la degradación de I κ B y, por tanto, a la desinhibición de la translocación nuclear de NF- κ B. Los genes sensibles a NF- κ B incluyen a CTGF que está involucrado en el desarrollo de fibrosis. La expresión de CTGF dependiente de SGK1 contribuye a la fibrosis cardíaca y envejecimiento de la piel. SGK1 también está involucrada en la formación de CTGF y fibrosis cardíaca inducida por Ang II (Artunc and Lang, 2014).

Además, SGK1 potencia el efecto de una alta concentración de glucosa en la formación renal de fibronectina en nefropatía diabética, desempeñando un papel fundamental en la estimulación de la formación de la matriz proteica (Feng et al., 2005).

3.2.3.4 SGK1 en síndrome metabólico

Existen variantes del gen de SGK1 (la presencia combinada de polimorfismos en el intrón 6 -I6CC- y en el exón 8 -E8CC/CT-) asociadas con un aumento moderado de la presión arterial. Esta variante genética está presente en un 3-5% de la población caucásica. Un estudio en más de cuatro mil individuos confirma la asociación de esta variante genética con el incremento de presión arterial (von Wowern et al., 2005). Este estudio revela una fuerte correlación entre insulinemia y presión arterial en individuos con la variante genética de SGK1, apoyado en el papel de SGK1 en la hipertensión paralela a la hiperinsulinemia. La hiperinsulinemia por pretratamiento con dieta alta en fructosa (Huang et al., 2006a) o dieta alta en grasa (Huang et al., 2006b) sensibiliza el aumento de la presión arterial por la ingesta elevada de sal en ratones Sgk1^{+/+}, pero no en Sgk1^{-/-}. Esta observación resalta el papel de SGK1 en la antinatriuresis inducida por insulina y el control de la presión arterial. Como SGK1 es un potente estimulador del transportador de glucosa SGLT1 acoplado a Na⁺, la variante genética de SGK1 podría acelerar la absorción intestinal de glucosa conduciendo a un exceso de liberación de insulina, deposición de grasa y una subsecuente disminución de la concentración de glucosa plasmática, desencadenando la absorción repetida de glucosa y, por tanto, obesidad (Lang et al., 2006). Además, esta variante genética de SGK1 está asociado con aumento en índice de masa corporal (BMI) y presenta una mayor prevalencia en pacientes con diabetes tipo 2 en comparación con individuos sin antecedentes familiares de diabetes. La hipertensión, obesidad y susceptibilidad a

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por:	Fecha:
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

desarrollar diabetes tipo 2 son rasgos distintivos del síndrome metabólico, que a su vez está asociado con el incremento de morbilidad y mortalidad por causas cardiovasculares. Debido a que SGK1 media los efectos de los glucocorticoides en la presión arterial y el peso corporal, una variante genética de SGK1 que conduce a un aumento de su actividad podría desencadenar acciones tipo glucocorticoide sin que sea necesario un aumento de la concentración de estas hormonas (Lang et al., 2009a). El síndrome metabólico está típicamente asociado con el aumento de la coagulación, que también es estimulada por SGK1 (Lang et al., 2006). Por último, es importante resaltar que se ha demostrado que SGK1 se expresa en tejido adiposo blanco y promueve la adipogénesis (Di Pietro et al., 2010). Estas evidencias sugieren la participación de SGK1 en la fisiopatología del síndrome metabólico (Lang et al., 2009a).

3.2.4 Posibles aplicaciones de los inhibidores de SGK1

Como se comenta en el apartado anterior, SGK1 ha sido implicada en el desarrollo de síndrome metabólico. Se han desarrollado algunos inhibidores específicos de SGK1, demostrando un efecto de disminución en la presión arterial en ratones hiperinsulinémicos pero no en ratones *Sgk1^{-/-}* (Ackermann et al., 2011). En este estudio, la administración del inhibidor EMD638683 en animales pretratados con fructosa y alta sal fue a través de la dieta (600 mg/Kg/día), durante cuatro días. Un reciente estudio comparó en ratones *db/db* tratados con el inhibidor EMD638683 en la dieta (4.46mg/g pienso) durante 8 días con ratones *db/db* sin tratamiento y con animales heterocigotos *db/m*. En ausencia de inhibidor los ratones *db/db* alcanzan un peso superior, presentan una mayor concentración de glucosa en ayunas y de niveles circulantes de hemoglobina glicosilada (HbA1c). Todos estos parámetros disminuyen con el tratamiento con el inhibidor de SGK1. También se observa una mejoría en los test de tolerancia a la glucosa (GTT) y a la insulina (ITT) en los animales *db/db* tratados con inhibidor, así como una disminución en la presión arterial y en los niveles plasmáticos de triglicéridos y colesterol en comparación con los individuos *db/db* control. Los animales *db/db* muestran un aumento en la expresión de mRNA y proteína de SGK1 y de SGLT1 en intestino en comparación con *db/m*. Tras 8 semanas de tratamiento con el inhibidor, la expresión de mRNA y proteína de SGLT1 se ve reducida en *db/db*. En líneas celulares intestinales de rata (IEC-6) el tratamiento con dexametasona resulta en un aumento tiempo-dependiente de la expresión de mRNA y proteína de SGK1 y SGLT1, además promueve la absorción de glucosa en estas células. La co-administración de dexametasona junto con el inhibidor de SGK1 disminuye la expresión de SGLT1 promoviendo la absorción de glucosa inducida por dexametasona (Li et al., 2016). Este estudio nos muestra que la inhibición de SGK1 contrarresta la hiperglicemia y la obesidad *in vivo*.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 828672	Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

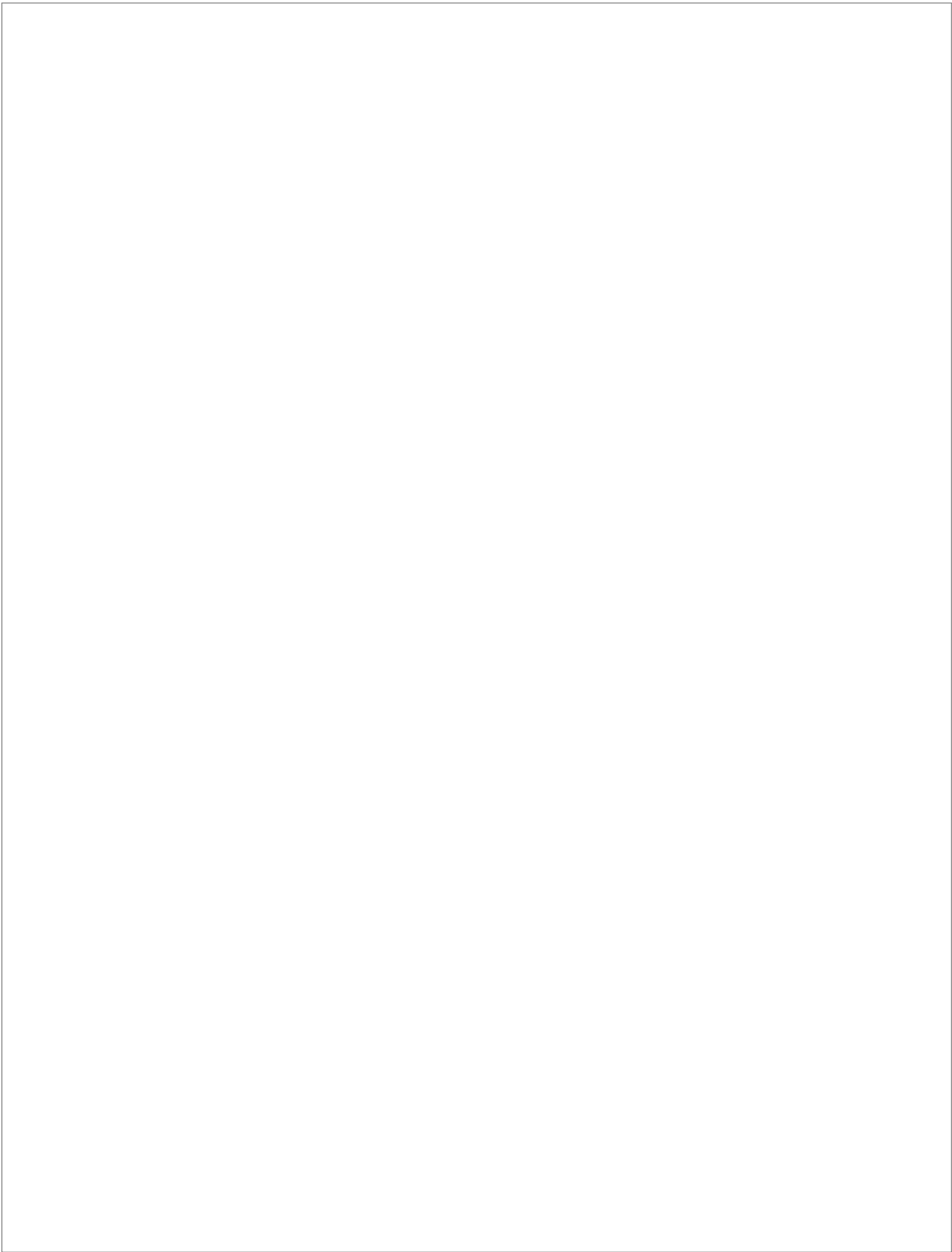
Hipótesis y objetivos

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS</i>	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ</i>	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ</i>	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO</i>	11/12/2016 10:56:17



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS</i>	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ</i>	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ</i>	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO</i>	11/12/2016 10:56:17

4 Hipótesis y objetivos

4.1 Hipótesis

MR participa en una gran diversidad de procesos fisiológicos y patológicos, sin que en muchos casos estén claras las dianas génicas implicadas. Hasta ahora se ha asumido que la mayor parte de los efectos de MR implican a genes diana con alta especificidad de tejido. Sin embargo, la identificación de genes que simultáneamente puedan ser mediadores de varios de los efectos negativos de MR tendría un gran interés desde el punto de vista terapéutico. Nuestra hipótesis es que SGK1 podría mediar, al menos en parte, procesos inducidos por MR que aumentan el riesgo cardiovascular, como pueden ser la hipertensión, el desarrollo de síndrome metabólico y el daño renal.

4.2 Objetivos específicos

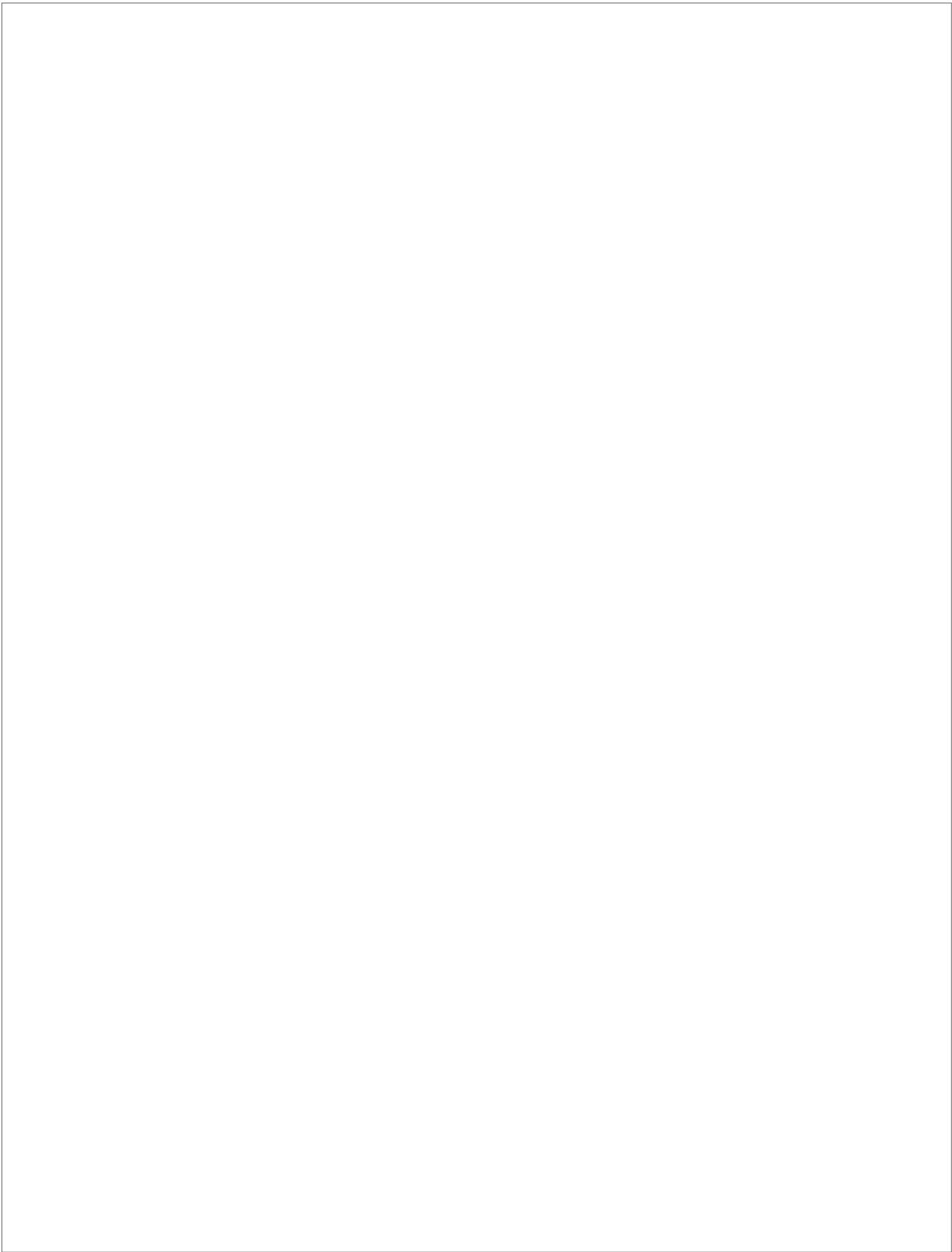
1. Determinar la influencia de un exceso de actividad de SGK1 sobre el desarrollo de hipertensión, daño renal y cardiovascular.
2. Estudiar el efecto de la actividad excesiva de SGK1 sobre el desarrollo de obesidad y alteraciones en el metabolismo de la glucosa.
3. Identificar de nuevos genes diana de MR que puedan estar implicados en procesos patológicos.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS</i>	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ</i>	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ</i>	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO</i>	11/12/2016 10:56:17

Material y métodos

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

5 Material y Métodos

Los protocolos de los procedimientos realizados con animales que se describen a continuación fueron previamente aprobados por el Comité de Ética de investigación y bienestar animal de la Universidad de La Laguna. Asimismo han sido desarrollados en concordancia con las directrices de la Comunidad Europea sobre la utilización de animales de experimentación y la Ley española de protección animal (RD 53/2013).

5.1 Expresión transgénica de SGK1 en ratones (B6.Tg.sgk1)

Para estudiar la relevancia de la proteína SGK1 se utilizó un modelo de ratón transgénico previamente desarrollado en nuestro laboratorio con actividad aumentada de SGK1 (Andres-Mateos et al., 2013, Miranda et al., 2013). Este modelo ha sido creado mediante un cromosoma artificial bacteriano (BAC) que contiene 180kb de DNA genómico de ratón que incluye el gen completo de SGK1 y ningún otro gen conocido. El BAC fue obtenido de BACPAC Resources Center (*Children's Hospital Oakland Reserche Institute, Oakland, CA*) y modificado por recombinación homologa en *Escherichia coli* (Laloti and Heath, 2001) para añadir tres copias del epítipo HA en el extremo C-terminal de SGK1 y una mutación puntual (S422D) que permite que la quinasa sea constitutivamente activa (Kobayashi and Cohen, 1999, Arteaga et al., 2008). El ratón transgénico se generó mediante inyección pronuclear en embriones F2 (C57BL6/J x SJL/J). Los ratones fundadores se cruzaron con ratones *wild type* C57BL6/J durante nueve generaciones para obtener un fondo genético B6.Tg.sgk1. Posteriormente se obtuvieron ratones homocigóticos para el transgén mediante cruzamiento entre heterocigotos. Este ratón transgénico constituye un modelo de activación inapropiada de SGK1 (debido a la presencia de la mutación S422D) sin sobreexpresión del gen, ya que el transgén sigue el patrón de expresión tisular y de isoformas del gen endógeno, produciendo únicamente un aumento en la dosis génica.

5.2 Genotipado de los animales

Los animales utilizados en todos los ensayos se genotiparon una vez establecidos los grupos de trabajo. Para el genotipado se cogió un trozo de la cola inferior a 1mm y se realizó hidrólisis con 60 µl de NaOH 20mM a 95°C durante 30 minutos. Luego se neutralizó la solución mediante la adición de 60 µl de Tris-HCl 40 mM/EDTA 0,2 mM pH 8. El hidrolizado se centrifugó a máxima velocidad y con 1 µl de sobrenadante se realizó PCR convencional utilizando *Red Taq Polymerase master mix* (VWR) y oligos para SGK1 que flanquean el epítipo 3HA. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 2% utilizando como referencia el marcador de peso molecular de 1kb (MWM1, Real). En los animales *wild type* se observa una banda de 186 pb correspondiente al amplicón proveniente de la secuencia de SGK1 endógena,

Firmado por:	Fecha:
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

en los animales transgénicos se observa además una segunda banda de 267 pb correspondiente a la expresión del transgén (SGK1-3HA)(Figura 7).

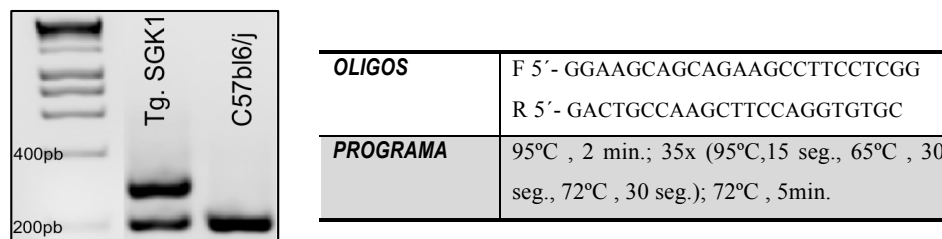


Figura 7. Genotipado en gel de Agarosa al 2% y Oligos y programa utilizado para la amplificación de SGK1 en el genotipado.

5.3 Tratamientos y procedimientos quirúrgicos

Para garantizar el bienestar animal durante la duración de los experimentos se realizó un seguimiento semanal del peso e ingesta de alimentos de los animales en sus jaulas habituales. Asimismo se tuvieron en cuenta el aspecto físico (acicalamiento, pelo brillante, color y firmeza de las heces), comportamiento (carácter exploratorio, *foraging*, *huddling*) y valoración del dolor (código facial de dolor en ratón de Langford) basado en el cierre de la órbita ocular, abultamiento de nariz y carrillos y posición de orejas y bigotes.

5.3.1 Modelo experimental de hiperaldosteronismo e hipertensión arterial

Se ha descrito que los niveles de transcrito de SGK1 están elevados en varias enfermedades fibróticas. Como los mineralocorticoides pueden producir sobreexpresión de SGK1, investigamos el papel que desempeña SGK1 en el daño cardíaco y renal mediado por mineralocorticoides mediante el estudio de grupos animales con distintos tratamientos. En el primer ensayo realizado se utilizó un modelo de hiperaldosteronismo consistente en la administración de DOCA en el contexto de una ingesta elevada de NaCl. Para ello se establecieron 4 grupos de estudio, todos ellos con animales macho de 6 semanas de edad:

- *Ratones wild-type C57BL6/j: (1) control, (2) DOCA/Sal*
- *Ratones transgénicos B6.Tg.sgk1: (3) control, (4) DOCA/Sal*

Los animales se alimentaron con dieta normal y agua *ad libitum*, los grupos control fueron sometidos a tres inyecciones subcutáneas semanales de aceite de girasol (vehículo). Los ratones pertenecientes a los grupos DOCA/Sal, fueron tratados tres veces en semana con DOCA resuspendida en aceite de girasol administrada en inyecciones subcutáneas en una dosis de 75mg/kg y con un 1% de NaCl disuelto en el agua de bebida (Nakano et al., 2006). La duración de este ensayo fue de tres semanas.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 828672	Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

Previendo la posible dificultad, ya descrita por otros grupos, de que los ratones desarrollaran hipertensión arterial mediante un simple aumento de mineralocorticoides e ingesta de sal, se realizaron tres ensayos en los que los grupos de experimentación con 4-6 semanas de edad fueron sometidos a un proceso quirúrgico de nefrectomía unilateral (NPX) previo al tratamiento con DOCA/Sal. La duración de este ensayo fue de seis semanas. Para el proceso de NPX los ratones se anestesiaron en cámara con isoflurano al 5% para inducir la anestesia y al 2,5% para asegurar la anestesia durante la operación. Una vez anestesiados se les administró como analgésico buprenorfina (0,0074 mg/kg) por vía subcutánea. Mediante una incisión en el lateral izquierdo se procedió a la extracción del riñón izquierdo y a la sutura de los vasos renales y uréter con hilo de sutura 6/0 no absorbible. Tras este proceso se utilizó hilo de sutura 3/0 absorbible para cerrar la pared abdominal. Finalmente se cerro la piel con grapas. Tras el proceso quirúrgico los animales permanecieron en periodo de recuperación durante dos semanas tras las que se comenzó la adaptación para las medidas de presión arterial basales (ver apartado 5.4) previas a la aplicación o no de tratamiento DOCA/Sal que siguió el procedimiento ya descrito.

5.3.2 Modelo de desarrollo de obesidad y alteraciones en la homeostasis de la glucosa

Estudios recientes demuestran que en condiciones patológicas inducidas por una dieta rica en grasa aumentan los niveles de SGK1 en tejido adiposo y, en consecuencia se promueve la adipogénesis. Mediante el uso de animales *wild type* C57BL/6J y B6.Tg.sgk1 evaluamos la importancia del aumento de actividad de SGK1 en el desarrollo de obesidad y resistencia a la insulina en ratones de ambos sexos. Para ello definimos 4 grupos experimentales de 12-14 semanas de edad para cada sexo (Ensayo 1 HFD):

- *Ratones wild-type C57BL/6J: (1) dieta normal, (2) dieta rica en grasa*
- *Ratones transgénicos B6.Tg.sgk1: (3) dieta normal, (4) dieta rica en grasa*

El agua y la dieta se suministraron *ad libitum*, considerando dos tipos de dieta: la dieta normal (*Global rodent diet, Harlan®*) y la dieta alta en grasa (*rodent diet with 60% kcal %Fat with blue dye, Open Source Diet*) ambas en pellets irradiados. La duración de este ensayo fue de 6 semanas.

En un segundo ensayo realizado únicamente en ratones macho de 8-10 semanas de edad (ensayo 2HFD), se establecieron dos grupos de trabajo (1) *Ratones wild type C57BL/6J* y (2) *Ratones transgénicos SGK1*. Durante cuatro semanas se alimentaron con dieta normal y se monitorizó la presión arterial como se describe a continuación (apartado 5.4). Tras este periodo, se comenzó con la dieta alta en grasa (ratones de 12-14 semanas de edad) durante 6 semanas, en las que también se realizaron medidas de presión arterial.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 828672	Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

5.4 Medidas de presión arterial

Se realizaron medidas de presión arterial por pletismografía utilizando un manguito en la vena de la cola (*tail cuff*) mediante un sistema no invasivo de medición LE5007 de Panlab con el software SEDACOM 2.0, que permite registrar presión sistólica, presión diastólica y frecuencia cardíaca (Figura 8). Los animales de estudio se sometieron a un proceso de adaptación progresiva en este dispositivo durante una semana. El primer día se introducen los cepos en el interior de las jaulas habituales de los ratones durante 20 minutos para que se familiaricen con ellos. Tras este tiempo, se introducen los ratones dentro de los cepos (5 ratones por tanda) y permanecen sobre la placa calefactora durante una hora sin colocarles el manguito en la cola. El segundo y tercer día permanecen una hora sobre la placa calefactora con el manguito en la cola sin realizar mediciones. El cuarto día se comienza con las mediciones, la primera medida se realiza tras permanecer 20 minutos en la placa calefactora, y luego se realizan medidas en intervalos de 10 minutos, estos datos son descartados. El quinto día ya se pueden realizar mediciones reales. Tras esta semana se procedió a realizar durante tres días consecutivos las medidas de presión arterial basal previas a los tratamientos y se continuó midiendo dos veces en semana hasta finalizar el tratamiento. Las medidas se realizaron durante una hora cada 20 minutos la primera medición y luego en intervalos de 10 minutos, para hacer un promedio de la presión arterial diaria de cada individuo y luego una media de la presión diaria del grupo de tratamiento.

Para la adaptación y posteriores medidas de presión arterial se tuvo en cuenta el ritmo circadiano de los animales y la posibilidad de que existieran cambios en los efectos del tratamiento o del transgén durante el mismo. Por ello en el segundo ensayo con los ratones NPX se invirtió el ciclo de luz-oscuridad (07:30-17:30: Noche/17:30-07:30:día), de manera que pudimos tomar medidas correspondientes a la noche, cuándo los animales están más activos. Las medidas de presión arterial se realizaron dentro de las cuatro primeras horas de la noche.

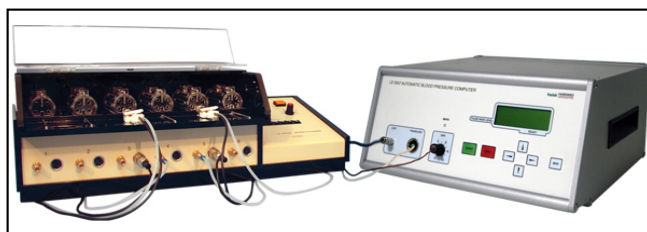


Figura 8. Sistema de medición no invasivo de presión arterial LE5007 (PanLab)

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 828672	Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

5.5 Medida del índice de filtración glomerular

El GFR se calculó mediante seguimiento del aclaramiento plasmático de iohexol utilizando el método, adaptado para ratones, desarrollado por el laboratorio del Dr. Porrini (Dpto. Medicina Interna, ULL) en colaboración con nuestro laboratorio (Luis-Lima et al., 2016). Brevemente, se sedaron ligeramente a los animales con isoflurano al 2.5% para realizar una inyección de 64.7 mg/ml de iohexol diluido en suero salino. Una única dosis de 100 µl de iohexol se inyectó a través de la vena de la cola. Se recogieron muestras de sangre basal y tras 15, 35, 55 y 75 minutos de la inyección utilizando un capilar heparinizado. La concentración plasmática de iohexol se analizó mediante HPLC-UV. El aclaramiento se estimó mediante un modelo farmacocinético simplificado de un compartimento

5.6 Estudio de ingesta de agua y alimento y determinaciones analíticas en orina

Para obtener valores individuales de ingesta de agua y comida, además de para recoger muestras de orina de 24h, los animales se estudiaron en jaulas metabólicas para ratones (Tecniplast). Los sujetos de estudio permanecieron dos días en periodo de aclimatación, para posteriormente medir ingesta de agua y alimento, así como recoger muestras de orina durante dos días consecutivos. Las muestras de orina se recogieron en presencia de cristales de timol para impedir el crecimiento bacteriano. Una vez recogida la orina se centrifugó 10 minutos a 13.000x g y se almacenó en alícuotas de 500 µl a -80° C hasta su procesamiento.

5.6.1 Albúmina y creatinina

Se estableció el ratio albúmina/creatinina en muestras de orina. La concentración de albúmina en orina se determinó mediante el uso del Kit *Albumin Mouse ELISA* (abcam) y la de creatina mediante el kit comercial *Creatinine Assay* (Abcam).

5.6.2 Determinación de iones: Na⁺, Cl⁻, K⁺

Se determinaron iones en muestras de orina mediante potenciometría indirecta utilizando un autoanalizador *Cobas c 501* (Roche Diagnostics).

5.7 Disección de órganos y tejidos

Una vez finalizó el periodo de tratamiento los animales se sacrificaron en cámara de dióxido de carbono. Tras este proceso, se pesaron y se extrajo sangre de la aorta torácica (ver apartado 5.8). Seguidamente se realizó la disección de tejidos y órganos y se pesaron en balanza de precisión.

Para abordar el *objetivo 1* se disecaron: arteria aorta, corazón, riñón y tibia derecha.

Para el *objetivo 2*: tejido adiposo blanco (inguinal, epididimal, mesentérico y peri-renal), hígado, tejido adiposo pardo (espacio interescapular). Para estudios posteriores en el laboratorio, que no se presentan en este trabajo, también se procedió a la extracción de cerebro, páncreas, riñón y glándulas adrenales.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por:	Fecha:
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

5.8 Determinaciones en plasma

La sangre se recolectó en tubos de 1.5 ml con 150 µl de EDTA 5 mM. Para la obtención de plasma, se centrifugó 10 minutos a 1,500 rpm, las muestras se conservaron a -80°C hasta su procesamiento.

5.8.1 Determinación de hormonas esteroideas

Las concentraciones de aldosterona y corticosterona se determinaron en plasma mediante ELISA utilizando Kits comerciales (DRG Diagnostics, Marburg, Germany).

5.8.2 Determinación de iones: Na⁺, Cl⁻, K⁺

Se determinaron iones en muestras de plasma utilizando la misma técnica que se señala en la determinación de iones en orina (apartado 5.6.2).

5.8.3 Perfil Bioquímico

Las muestras de plasma provenientes de ratones macho *wild type* y transgénicos alimentados con dieta normal o dieta alta en grasa se procesaron para determinar la concentración de glucosa, creatinina y proteína C reactiva en el Hospital Universitario de Canarias. Asimismo, se determinó la concentración de ácidos grasos libres (*Free Fatty acid quantification Kit*, Abcam), insulina (*Ultrasensitive Mouse insulin ELISA Kit*, Mercodia), colesterol y triglicéridos (*Triglyceride quantification kit*, Abcam). Los triglicéridos también fueron cuantificados en muestras de hígado de los animales tratados con dieta alta en grasa utilizando el mismo kit.

5.9 Análisis histológico

Para los estudios histológicos y de inmunohistoquímica los órganos y tejidos se fijaron durante 24 horas mediante inmersión en paraformaldehído al 4% en tampón fosfato salino. Tras la fijación las muestras se incluyeron en parafina mediante un proceso automatizado (*Citadel 1000*, Thermo Scientific) y se realizaron secciones con microtomo de los siguientes grosores: 3µm para riñón, corazón y aorta; de 5 µm en hígado y de 10 µm en tejido adiposo blanco.

5.9.1 Estudio del desarrollo de daño cardiovascular y renal

Todos los estudios de morfometría se realizaron en preparaciones codificadas, de forma que el observador no tenía información previa sobre el grupo de estudio del que provenía cada muestra. Para el estudio y cuantificación del grado de fibrosis en aorta, corazón y riñón, los cortes se desparafinaron y se tiñeron con el colorante específico para fibras de colágeno Rojo Sirio (0.1% en ácido pícrico saturado). Se tomaron 5 fotos de cada uno de los cortes (5 fotos por individuo) utilizando el objetivo de 40x. El área de fibrosis se cuantificó mediante el uso del software ImageJ (V 1.43; *National Institute of Health*), obteniéndose un porcentaje de área fibrótica para cada individuo y un valor medio para cada grupo de estudio. Las tinciones de corteza renal se utilizaron además para realizar una medida del área glomerular. El análisis de

Firmado por:	Fecha:
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

los datos se realizó mediante histogramas de frecuencia para evitar el sesgo debido al plano de corte del tejido.

5.9.2 Estudio del desarrollo de hipertrofia adipocitaria y presencia de esteatosis hepática

Para el estudio de los cambios inducidos con una dieta rica en grasa, el tejido adiposo blanco epididimal se tiñó con hematoxilina/eosina (h/e) con la finalidad de realizar un análisis comparativo del tamaño de los adipocitos. La fracción de volumen ocupada por los adipocitos se estimó mediante el sistema *Area Fraction Fractionator* (Reed et al., 2010). El volumen de los adipocitos se calculó utilizando el sistema *Nucleator* (Gundersen, 1988), un diseño basado en el método estereológico que proporciona estimaciones no sesgadas de los volúmenes celulares. También proporciona el área celular, valor comúnmente utilizado en investigación para adipocitos. El núcleo de los adipocitos se utilizó como punto único de referencia en el interior celular. El número de adipocitos/mm³ de tejido se calculó dividiendo el volumen ocupado por los adipocitos entre el volumen medio de los adipocitos.

Se utilizó la tinción de h/e para valorar cualitativamente la esteatosis hepática en animales *wild type* y transgénicos alimentados con dieta alta en grasa.

5.10 Estudio de la expresión génica

Para la cuantificación de la expresión génica las muestras de tejidos se congelaron con *RNA later* (Sigma) en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C hasta su procesamiento.

5.10.1 Extracción de RNA y retrotranscripción

El RNA de los tejidos se extrajo mediante el kit comercial *Real Total RNA spin plus* y se cuantificó y valoró su calidad mediante espectrofotometría utilizando un equipo *Nanodrop 1000* (Thermo Scientific). Las muestras de RNA se retrotranscribieron a su DNA complementario (cDNA) mediante el kit comercial *iScript™ cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.10.2 Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qPCR)

Para este estudio se utilizó un termociclador *C1000 Touch™* con un módulo óptico CFX96 Touch acoplado. Como método de detección de la amplificación del DNA utilizamos *kit iQ™ SYBR Green® Supermix* (BioRad) o sondas *TaqMan® MGB Probes* (FAM™ dye-labeled), en el caso de TGF-β. El protocolo utilizado para la amplificación fue el siguiente: 95°C, 3min; 40x (95°C, 10min.; Tm, 20 seg.; 72°C, 15 seg.); curva de desnaturalización (65°C, 5 min.; rampa de temperatura de 95°C a 0.5°C). El valor de ciclo de amplificación umbral (C_T) se utilizó como parámetro de medida de la expresión de un gen, pues es inversamente proporcional a la cantidad de DNA molde. Para poder determinar el nivel de expresión de los genes de interés para este estudio, se diseñaron oligonucleótidos específicos para estos y para el gen de referencia (*housekeeper*). Para todos estos oligonucleótidos (y sondas *Taqman*) se determinó la

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por:	Fecha:
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

temperatura óptima de uso y eficiencia de amplificación utilizando una mezcla de cDNAs de las muestras a ensayar y diluciones seriadas de la misma, eligiendo así el *housekeeper* adecuado para cada órgano o tejido. Se admitieron eficiencias de los oligonucleótidos entre un 90-110% para poder utilizar el método comparativo de doble delta C_T en el análisis de la expresión génica.

GEN	OLIGOS	PROCESO
GAPDH	F 5'- ATGGGAAGCTGGTCATCAAC R 5'- GTGGTTCACACCCATCACA	Housekeeper
RPL13A	F 5'- TATCTGCACTGCCAAGACTGAGTG R 5'- CTGGTACTTCCACCCGACCTC	
CYCA	F 5'- TATCTGCACTGCCAAGACTGAGTG R 5'- CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCC	
SGK1	F 5'- CGGTTTCACTGCTCCCCTCAG R 5'- GCGATGAGAATCGCTACCATT	Varios
CTGF	F 5'- CTGCCTACCGACTGGAAGACACATT R 5'- TCTCCAGTCTGCAGAAGGTATTGTC	Fibrosis
TGF-β	Sonda TaqMan® Mn 01178820_m1 (Life Technologies)	
Colágeno I	F 5'- TGCCGTGACCTCAAGATGTG R 5'- CACAAGCGTGCTGTAGGTGA	
Colágeno III	F 5'- GCGGAATTCCTGGACCAAAAAGGTGATGCTG R 5'- GCGGGATCCGAGGACCACGTTCCCCATTATG	
Colágeno IV	F 5'- CAAGCATAGTGGTCCGAGTC R 5'- AGCAGGTCAAGTTCTAGCG	
Fibronectina	F 5'- ACGATGGAAGACCTACGGATGTA R 5'- TCAGCTTGCACATCTAACGGCAT	
α-SMA	F 5'- TGCTATGTCGCTCTGGACTT TGA R 5'- ATGAAAGATGGCTGGAAGAGG GTC	
KIM1	F 5'- ATGAATCAGATTCAAGTCTTC R 5'- TCTGGTTTGTGAGTCCATGTG	Daño renal
NGAL	F 5'- GGACCAGGGCTGTCGCTACT R 5'- GGTGGCCACTTGACATTGT	Daño tubular
MCP1	F 5'- GTCACCAAGCTCAAGAGAGA R 5'- GTGAAAAGGTAGTGGATGC	Inflamación
IL-1	F 5'- TGGACAAACACTATCTCAGCA R 5'- GAGTTTTGGTGTCTTGCA	
IL-6	F 5'- TCTCTGGGAAATCGTGGAAA R 5'- CCAGGTAGCTATGGTACTCC	
TNFα	F 5'- CCCCAAAGGGATGAGAAGTT	

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

CD68	R 5'- TCTTTGAGATCCATGCCGTT		
	F 5'- AAAGGCCGTTACTCTCCTG		
	R 5'- TGTGGCATGAGAAATTGTGG		
PPAR γ	F 5'- TTCACAAGAGCTGACCCAAT	Adipogénesis	
	R 5'- AAGCCTGATGCTTTATCCCC		
CEBP α	F 5'- GACAAGAACAGCAACGAGTA		
	R 5'- AGCTGGCGGAAGATGC		
Glut4	F 5'- AACTGGTCCTAGCTGTATTCT		
	R 5'- CCAGCCACGTTGCATTGTA		
LPL	F 5'- GGAGGTGGACATCGGAGAAC		
	R 5'- AACTGCTGAGTCCTTTCCC		
DGAT	F 5'- TACCTAGTGAGCGTTCCCCT		
	R 5'- GCATCGTAGTTGAGCACGTAG		
SREBP1	F 5'- AGCCACACTTCATCAAGGCA		
	R 5'- GTGGATGGGCAGTTTGTCTG		
FAS	F 5'- AAGCGGTCTGGAAAGCTGAA		
	R 5'- TCTGAACCACTCACCCAC		
UCP1	F 5'- TTCATCAACTCTCTGCCAGG		Termogénesis
	R 5'- GTACAATCCACTGTCTGTCTG		
DIO2	F 5'- GGAAGAGTTCTCCTCGGTGG		
	R 5'- GGTCAGCCACAACCTGACAC		
PPAR α	F 5'- AGAGAATCCACGAAGCCTAC		
	R 5'- GTGGAAGAATCGGACCTCTG		
PGC1 α	F 5'- CGAGGACACGAGGAAAGGAA		
	R 5'- CACTGGCCTGAATCTGTGGA		
PGC1 β	F 5'- CACGGTTTTATCACCTCCG		
	R 5'- ATGGCTTCGTAATTGCTTTT		
NRF1	F 5'- TGTAGCCACGTACACTGAGC		
	R 5'- GAGGCCGTTTCCGTTTCTTC		

Tabla 1. Genes de estudio y oligonucleótidos utilizados

5.10.3 GeneChip affimetrix microarray

Por otra parte, con el objetivo de identificar posibles nuevos genes diana implicados en los procesos patológicos mediados por SGK1, se realizó un análisis completo de expresión génica diferencial utilizando el sistema GeneChip de Affymetrix. Para este estudio se utilizaron únicamente las muestras de RNA de riñón de los grupos NPX tratados con DOCA/Sal. Con este fin, seis muestras de ambos grupos se sometieron a un análisis de calidad mediante el sistema *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Figura 9). A partir de este análisis se eligieron las cuatro mejores

muestras de cada grupo, tras lo que se realizó la síntesis de cDNA con *WT Plus Reagent Kit*. Una vez obtenido el cDNA se realizó la hibridación a un *Mouse Gene 2.0 ST Array*. Estos experimentos se realizaron en el Servicio de Genómica del Centro de Investigación del Cáncer (CSIC-Universidad de Salamanca). Con los resultados obtenidos se procedió al análisis bioinformático, realizando un análisis de expresión génica diferencial entre los dos grupos mediante el algoritmo SAM, estableciendo en 0.1 el umbral para la tasa de descubrimientos de falsos positivos (*False Discovery Rate*, FDR), lo que equivale a un 10 % de falsos positivos. Entre los genes con variación estadísticamente significativa entre grupos (*Anexo 1*), se seleccionaron 5 genes sobreexpresados en los animales transgénicos (carboxipeptidasa b2 - cpb2-, quimioquina epitelial asociada a mucosa -CCL28-, Serpina a3b y colágeno 27a1 - col27a1-) y uno cuya expresión se ve disminuida (Adamtsl2) (*Tabla 2*) con objeto de validar los datos del *microarray*. Esta selección se basó en que estos genes presentaban una variación considerable entre ambos grupos, además de que por sus características biológicas podrían resultar importantes en los procesos de fibrosis o de daño renal en general. La validación incluyó también la extensión del análisis a los grupos NPX vehículo y se realizó mediante qPCR con sondas *TaqMan* utilizando *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Life Technologies), siguiendo el protocolo de amplificación señalado por la casa comercial. Los resultados de expresión génica se analizaron con el método del doble delta Ct.

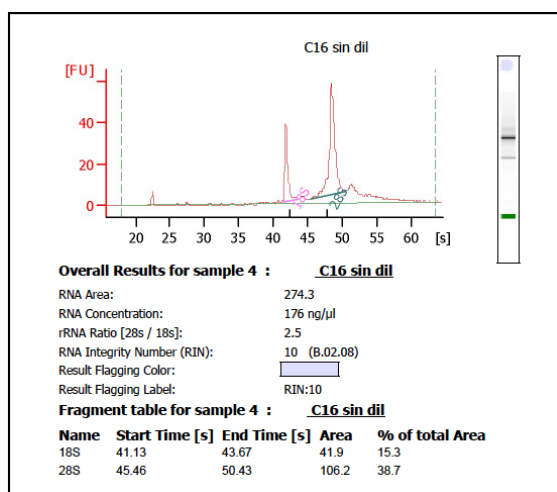


Figura 9. Análisis de calidad de RNA de una de las muestras (WT DOCA/Sal).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 828672		Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS		Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ		28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ		29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO		11/12/2016 10:56:17

GEN	D Value	P Value	Q Value	R Fold	TaqMan (Life Technologies)
Cpb2	16,22041547	6,91049E-07	0,02217692	10,42804381	Mm00490698_m1
CCL28	5,249076945	6,01213E-05	0,047058342	4,494557678	Hs00219797_m1
Serpin a3b	6,719599396	1,58941E-05	0,031047688	1,647474905	Mm00557205_m1
Lyplal1	7,065924056	1,31299E-05	0,029569227	1,906662276	Mm00525055_m1
Col27A1	3,953404812	0,000373167	0,089488558	1,450109959	Mm01267526_m1
Adamts12	-5,973894128	2,55688E-05	0,039073621	0,641236364	Mm01326794_m1
GAPDH	HOUSEKEEPER				Mm99999915_g1

Tabla 2. Genes seleccionados para validar pos Sondas. Análisis de expresión diferencial (B6.Tg.sgk1 vs Wt DOCA/Sal) y sondas Taqman. **D value:** diferencia esperada entre las medias del grupo experimental y el grupo control, dividido por la desviación estándar esperada. **P value:** probabilidad de obtener un valor del test tanto o más extremo que el valor que se ha obtenido sobre la muestra, suponiendo cierta la hipótesis nula. **Q value:** pvalue con corrección para test múltiple por FDR (false Discovery rate). **R Fold:** ratio de diferencia del nivel de expresión de un gen entre la muestra experimental y la muestra control.

5.11 Estudio de la expresión proteica mediante Western Blot

Para la cuantificación de la expresión proteica, las muestras de tejidos se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C hasta su procesamiento. Para la obtención de extractos proteicos se lisaron aproximadamente 100 mg de tejido en 500 μL de tampón de lisis (Tabla 3). Los extractos se mantuvieron en hielo 5-10 minutos y se centrifugaron a 4°C durante 10 minutos a 14,000 rpm. Posteriormente se estimó la concentración de proteínas en el sobrenadante mediante el método colorimétrico del ácido bicinonínico (BCA). Las muestras de proteínas se prepararon a una concentración de $1\mu\text{g}/\text{ml}$ en tampón *Laemmli* (concentración final 2X), se calentaron a 95°C durante 5 minutos y posteriormente se enfriaron en hielo durante 3 minutos. Las proteínas se resolvieron según su tamaño mediante electroforesis denaturalizante en gel de acrilamida (SDS-PAGE). Para ello se cargaron 20 μl de muestra por pocillo en geles *Mini-Protean® TGX Precast* (Biorad) y la electroforesis se realizó a voltaje constante (150 V para el empaquetamiento de las muestras, 180 V para la separación). Posteriormente se transfirieron las proteínas a membranas de bifluoruro de polivinilideno (PVDF) utilizando un sistema de electrotransferencia semiseco *Trans-Blot turbo™* (Bio-Rad) con el programa *Standard* para geles TGX (1.3 A, 25 V, 10 minutos). Tras la transferencia las membranas se

bloquearon con TBS-T (Tabla 3) 5% de leche desnatada, albúmina de suero bovino o *PhosphoBLOCKER™ Bloking Reagent* (Cell Biolabs), según el anticuerpo utilizado, durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. A continuación se realizaron 3 lavados de 5 minutos con TBS-T en agitación y se incubaron las membranas con el anticuerpo primario a ensayar en TBS-T 0,5% de leche desnatada a 4°C durante toda la noche en agitación. Tras esta incubación, las membranas se lavaron 3 veces en TBS-T y se incubaron con el anticuerpo secundario (1:10000-1:20000) que corresponda (anticuerpos anti-conejo o anti-ratón desarrollados en cabra y conjugados con peroxidada, GE healthcare) en TBS-T 0,5 % de leche desnatada durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación. Finalmente las membranas se revelaron utilizando *Immun-Star Western-C Chemiluminescent Kit* (Bio-Rad) y la quimioluminiscencia se registró y cuantificó utilizando el sistema de imagen Chemidoc y el software Image Lab™ (Bio-Rad). Los anticuerpos y soluciones empleadas se muestran a continuación:

ANTICUERPO	PROVEEDOR	CONCENTRACIÓN	PROCESO
GSK3β	Cell Signaling	1:1000	Actividad SGK1
P-GSK3β(Ser21/9)	Cell Signaling	1:1000	
Insulin Receptor	Abcam	1:500	Señalización
P-IRS-1	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	Insulina
IRS	Abcam	1:500	
P-AKT T308	Cell Signaling	1:1000	
P-AKT S473	Cell Signaling	1:1000	
AKT	Cell Signaling	1:1000	
P-AS160	Cell Signaling	1:1000	
AS160	Prof. Loffing's Lab	1:2000	
CD36	Novus Biologicals	1:1000	
Glut4	Milipore	1:2000	
β-actin	Cell Signaling	1:10000	Housekeeper
MR H-300	Santa Cruz Biotechnology	2 µg	ChIP

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

SOLUCIÓN	COMPOSICIÓN
Tampón de lisis	Tris-base 0.5M pH7.4, SDS 10%, Phosphostop, CompleteMini, agua destilada
Tampón de carga (Laemmli 6X)	Tris HCl 125 mM, SDS 10%, Glicerol 30%, DTT 9,3%, Azul de Bromofenol 0,1%
SDS-PAGE	Tris 25 mM, Glicina 250 mM, SDS 0,1%
TBS-T	Tris 40mM, NaCl 0,8 %, Tween-20 0,05%
Solución stripping	Tris HCl 62,5 mM pH 6,7, SDS 4%, β -Mercaptoetanol 0,1 M

Tabla 3. Anticuerpos utilizados y soluciones utilizadas para Western Blot

5.12 Densitometría de doble energía de rayos X

La composición corporal de los animales se estudió mediante absorciometría de rayos X de energía dual (DEXA) utilizando el equipo para animales pequeños *Lunar PIXImus* (GE Medical system). Este equipo permite obtener medidas precisas de densidad ósea y composición tisular (proporción de tejido magro y tejido graso) en toda la región subcraneal de un ratón en un tiempo extremadamente corto (Nagy and Clair, 2000). Para este procedimiento los animales se mantuvieron en ayunas durante tres horas. A continuación se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal con Ketamina (*Imalgene*): Medetomidina clorhidrato (*Domtor*) 75:1 mg/kg y se les aplicó crema oftalmológica para evitar la sequedad ocular. Una vez finalizado el proceso la anestesia se revirtió con clorhidrato de atipamezol (*Antisedam*) 2mg/kg y los animales fueron devueltos a sus jaulas habituales. El análisis de los datos se realizó con el software proporcionado por el fabricante.

5.13 Estudio de la homeostasis de la glucosa

Para el estudio de la homeostasis de la glucosa se realizaron dos tests, el test de tolerancia a la glucosa (GTT) y el test de tolerancia a la insulina (ITT). Para el GTT los animales fueron mantenidos en ayuno durante las 18 horas previas a la inyección de una sobrecarga de glucosa de 2g glucosa/Kg de peso corporal. El ITT se realizó sin previo ayuno y se inició inyectando una sobrecarga de insulina de 0.75 U insulina/kg de peso corporal (Actrapid human INSULIN Novo Nordisk 100U/ml). Para ambos tests, los animales fueron pesados y colocados en jaulas separadas para facilitar el proceso. Para la obtención de muestras de sangre, se realizó un corte inferior a 1mm en la cola y aplicando un masaje suave se recogió la gota para la medida. El fragmento de cola cortada se utilizó para genotipar a los individuos, pudiendo diferenciar entre genotipo *wild type* y transgénico. Se tomaron medidas de la glucosa basal con un glucómetro (*Onetouch ultra, Lifescan, Johnson&Johnson*). Para ello se utilizaron unas lancetas que nos

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 828672	Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

permiten obtener una medida fiable de la concentración de glucosa (mg/dl) utilizando una gota de sangre. Tras la inyección intraperitoneal de glucosa o insulina con agujas de insulina (30G) se tomaron medidas de la glucemia en distintos tiempos: 5, 15,30, 45, 60, 90 y 120 minutos.

5.14 Cultivos primarios

Para el estudio del proceso de adipogénesis *in vitro*, se extrajo el tejido adiposo blanco (inguinal, axilar, epididimal y perirenal) de ratones transgénicos (B6.Tg.sgk1) y *wild type* (C57BL6/j). El tejido adiposo fue sometido a un proceso de digestión mecánica seguido de digestión química con colagenasa tipo I (1mg/ml; 1h ,37°C, 230 rpm). Las células vasculares estromales se obtuvieron tras filtraciones sucesivas (100 µm, 40-70 µm) seguidas de centrifugación y se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% FBS, 1% penicilina-estreptomicina y 1% agente antifúngico. La diferenciación de las células fue inducida mediante cultivo en DMEM, suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) suplementado con 500 µM 3-isobutil-1-metilxantino, 1 µg/ml de insulina, 250 nM de dexametasona y 2 µM de rosiglitazona durante dos días.

5.14.1 Cuantificación de la acumulación de triglicéridos

Para la determinación del contenido lipídico las células se fijaron con 4% de paraformaldehído en PBS, luego se lavaron dos veces con agua y una vez con 60% de isopropanol. Posteriormente se tiñeron con el colorante de lípidos neutro Oil-Red-O. Una vez desechado el Oil-Red-O y tras lavar con agua, las células fueron permeabilizadas con 10% de SDS en isopropanol. La concentración de Oil-Red-O en el eluido fue medida usando un espectrofotómetro a 520 nm.

5.14.2 Estudio de la expresión de genes marcadores del proceso de adipogénesis

Se extrajo RNA de las células provenientes de ratones de ambos genotipos y se realizó la retrotranscripción y estudio cuantitativo como se explica más arriba (apartado 5.10) para determinar la expresión de genes involucrados en el proceso de adipogénesis.

5.14.3 Cuantificación de la incorporación de glucosa y ácidos grasos libres

Tras su diferenciación, los adipocitos se cultivaron durante 24 horas en medio sin FBS. Posteriormente se lavaron en tampón Krebs-Ringer buffer con 12mM de HEPES y 0,1% de BSA (KRH-BSA) y luego se trataron con insulina (100 nM) durante 30 minutos. Para el ensayo de incorporación de glucosa se añadió 1µCi/pocillo de (³H)-Deoxi-D-glucosa. Para el ensayo de incorporación de ácidos grasos libres (FFAs) se añadió 1µCi/pocillo de (1-¹⁴C)-ácido palmítico. Tras una incubación de 5 minutos el proceso se detuvo mediante 3 lavados con KRH-BSA frío. Las células se lisaron con 0,1 M NaOH y la radiactividad se midió por recuento de centelleo líquido. En paralelo se evaluó la concentración de proteínas por el método de Bradford.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

5.15 Líneas celulares

En este trabajo se utilizó la línea COS-7 derivada de riñón de Mono Verde Africano, *Cercopithecus aethiops*. Estas células presentan una morfología similar a la de los fibroblastos humanos y se desarrollaron a partir de la línea CV-1 a través de una transformación con el Simian Vacuolating Virus 40 (SV40), virus que codifica el antígeno T del virus *wild type*. Una de las características importantes de esta línea celular es que no expresa de manera endógena receptores de mineralocorticoides o glucocorticoides, proporcionando un modelo ideal para ensayos de actividad transcripcional o unión a DNA de estos receptores. Las células COS-7 se cultivaron en DMEM suplementado con suero fetal bovino (10%) y antibióticos (penicilina-estreptomicina 1%). Las células crecen a 37°C con 5% de dióxido de carbono. Periódicamente se realizaron controles para detectar la posible contaminación con micoplasma, utilizando para ello un kit comercial basado en un ensayo ELISA (*MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit* y *MycoAlert® Assay Control Set*, Lonza).

5.16 Transfección y ensayos de transactivación con genes reporteros

La identificación de posibles nuevos genes diana directa de MR se realizó en colaboración con el Dr. F. Jaisser (Centre de Recherche des Cordeliers, París) utilizando como punto de partida datos obtenidos mediante análisis global del transcriptoma (Affymetrix) de ratones transgénicos con expresión elevada de MR en tejido cardíaco o adiposo (Messaoudi et al., 2013, Urbanet et al., 2015). Los genes candidato más interesantes por sus posibles implicaciones fisiopatológicas (CTGF y PTGDS) se analizaron como posibles dianas directas de MR mediante ensayos de transactivación y de unión directa a DNA, como se describe a continuación.

5.16.1 Análisis bioinformático y construcciones de DNA

Los promotores de los genes candidatos se analizaron para detectar la presencia de secuencias HRE mediante herramientas bioinformáticas (*Transcription Element Search System-TESS-* y *MatInspector*). En el caso del promotor del gen humano de PTGDS se identificó una secuencia (AGGACCAAATGTTCA) con alta similitud al HRE canónico (Polman et al., 2013) situada 425 pb cadena arriba del sitio de inicio de la transcripción. Para el análisis de esta zona del genoma decidimos clonar la región del gen de PTGDS entre -794 pb y +39 pb respecto al inicio de la transcripción, que incluye la secuencia HRE de interés, el primer exón (no codificante), el primer intrón y parte del segundo exón, hasta el inicio del codón de iniciación.

El análisis de CTGF no reveló ninguna secuencia consenso HRE, si bien se encontraron numerosas secuencias similares. Inicialmente se decidió clonar dos fragmentos de DNA genómico de 2 kpb o 1kpb corriente arriba del sitio de traducción (-2432/+284 y -671/+284 respectivamente).

Las zonas de interés se amplificaron a partir de DNA genómico de ratón mediante PCR con una polimerasa de alta fidelidad de copia (*pfuUltra II polymerase*, Agilent Technologies) utilizando

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 828672	Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

oligonucleótidos que incluyeron sitios diana para enzimas de restricción (Tabla 4). El producto de amplificación fue purificado utilizando el kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE healthcare). A continuación se cuantificaron los productos en *Nanodrop 1000*. Los promotores se clonaron en el vector pGL4.10-luc2 (Promega), que contiene la secuencia codificante de la luciferasa de luciérnaga sin promotor que dirige su expresión y permite estudiar la actividad de los fragmentos de DNA de interés como activadores transcripcionales.

El cDNA completo de MR de ratón (Aguilar-Sanchez et al., 2012) se obtuvo mediante RT-PCR y se clonó en pcDNA 3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) como se describió previamente (Hernandez-Diaz et al., 2010).

Todas las construcciones se confirmaron mediante secuenciación de DNA (*Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit*, Applied Biosystems y secuenciador automático ABI Prism modelo 3700 de la misma casa comercial).

PROMOTOR	OLIGOS	ENZIMAS DE RESTRICCIÓN
CTGF	F1 5'-GGGGTACCCATGCCAGTCATTCCTTGCCT-3'	KpnI HindIII
	F2 5'-GGGGTACCGATGAGCCTCACCTTCCCTCCC-3'	
	F3 5'-GGGGTACCGAGAGGCAAGGGAAGGAAGAAGAG-3'	
	R 5'-CCCAAGCTTGATCGGGACGCGGTAGGAGGATGCAC-3'	
PTGDS	F 5'-GGGGTACCTATTCCTTGCAACTGCTGGAATTGTC-3'	KpnI HindIII
	R 5'-GGGAAGCTTGCCATTTGCTCAGAGCAGAGCAGGTG-3'	

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los promotores CTGF y PTGDS.

5.16.2 Transfección y tratamientos con agonistas de MR

La transfección de DNA en células en cultivo se realizó con el reactivo *Jetprime* (Polyplus Transfection, Illkirch, Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células COS-7 fueron cultivadas en placas de 96 pocillos. Un día antes de la transfección se sustituyó el medio de cultivo convencional por medio DMEM suplementado con suero tratado con carbón activado (*charcoal-stripped serum*, Lonza: medio DMEM-CS). Las células se co-transfectaron con una mezcla de pcDNA3.1-mMR, la construcción del fragmento genómico de interés clonado en pGL4.10-luc2 y pSG5-Ren (Promega) que contiene la secuencia codificante del gen de la luciferasa de *Renilla* bajo el control de un promotor constitutivo (SV40). A las 24h las células fueron tratadas con aldosterona 10 nM, aldosterona 10 nM + espironolactona 1 µM o vehículo (etanol absoluto 1:1000). En algunos casos se realizó una curva dosis respuesta con

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 828672	Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

concentraciones crecientes de aldosterona (0.01-100 nM) o corticosterona (0.1nM-10 µM). Se realizaron triplicados técnicos y biológicos para cada ensayo.

5.16.3 Ensayos de transactivación

Según el diseño de estos experimentos, la actividad del reportero primario (luciferasa de luciérnaga) está correlacionado con el efecto del estímulo específico (en este caso MR/aldosterona o MR/cortisol) y la actividad del reportero control (*Renilla*) co-transfectado proporciona un control interno para normalizar los resultados. La determinación del nivel de expresión de luciferasa de luciérnaga y de *Renilla* se realizó mediante ensayos de actividad enzimática de estas dos enzimas utilizando un kit comercial *Dual Glo Luciferase Assay System*, (Promega). Se trata de un sistema que permite una cuantificación rápida y consecutiva de ambas señales estabilizadas en el tampón de lisis mediante la adición de un primer reactivo que proporciona un sustrato específico de la luciferasa de luciérnaga cuya transformación produce un producto quimioluminiscente y de un segundo reactivo que inactiva dicha luciferasa y la luminiscencia de su producto a la vez que activa la luciferasa de *Renilla* y proporciona un segundo sustrato cuyo producto también es luminiscente. El registro de las señales de luminiscencia se realizó con un lector de placa multipocillo *Viktor X5* (Pekin Elmer).

5.17 Inmunoprecipitación de cromatina

Dado que no se encontraron secuencias HRE canónicas en el promotor de CTGF, se realizó un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) con el objeto de detectar si existe unión directa de MR a esta zona del genoma. Se trata de una técnica extremadamente útil para el estudio de la regulación transcripcional, ya que permite la localización de la unión de proteínas de la cromatina, histonas modificadas y factores de transcripción a *loci* específicos en el DNA en un contexto endógeno, reflejando la influencia de la topología de la cromatina y de los efectos celulares de regulación proteica.

Para el ensayo ChIP las células COS-7 se cultivaron en placas de 60mm y se co-transfectaron con pGL4.10-CTGF(671/+284) y pcDNA 3.1-mMR como se describe en el apartado 5.16.2. Veinticuatro horas después de la transfección las células se transfirieron a medio *DMEM-CS* y se trataron con aldosterona 10 nM o vehículo (etanol Absoluto 1:1000) durante dos horas. Tras esta incubación, se realizó el ensayo de ChIP utilizando el kit comercial *ChIP-IT Express* (Active Motif, Carlsbad CA) siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, las células se fijaron con formaldehído al 1% durante 5 minutos. La fijación se detuvo mediante la incubación con una solución de 0,125 M glicina –PBS y tras un lavado con PBS las células se recolectaron en solución de lisis. Posteriormente, se homogenizaron con un homogenizador de tipo *Dounce* y se fragmentó el DNA con un sonicador *Labsonic M* (Satorius AG) obteniéndose fragmentos de 200-1000 pb. Para cuantificar el DNA y analizar el tamaño de los fragmentos se tomó una parte del extracto obtenido y se desnaturalizó y trató con RNAasa A y proteinasa K,

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 828672	Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

luego se purificó el DNA con *GFX™ PCR DNA Purification Kit* (GE Healthcare) y se cuantificó en *Nanodrop 1000*, el tamaño de los fragmentos se analizó en electroforesis con gel de Agarosa al 2%. Para la inmunoprecipitación se utilizaron 8-10 µg de DNA, 2 µg anticuerpo anti- MR (Tabla 3, apartado 5.11) y 25 µl de partículas magnéticas recubiertas de proteína G. Los complejos DNA-proteína-anticuerpo se aislaron con soporte magnético. Tras la inmunoprecipitación se revirtieron los puentes cruzados mediante calor y se trataron los complejos con proteinasa K para eliminar las proteínas y recuperar el DNA. Los fragmentos de DNA diana del receptor de mineralocorticoides se analizaron mediante PCR cuantitativa (qPCR), utilizando oligos específicos para distintos fragmentos del promotor de CTGF:

OLIGOS	
P1	F 5'- CCATGCCAGTCATTCCCCTTG R 5'- GAAAGCCAAGGATGTAGGTTCCC
P2	F 5'- CTCAGTAGAAGAACACCAAGAGAC R 5'- TCAAGAGGCAAATACCATGGGCC
P3	F 5'- GGTGAGAAGATGATATGGAGAAAG R 5'- ACACTCCACATTCTCCGTCTG
P4	F 5'- TCACACAGCTTCTCTCCAAGAAG R 5'- GAGGTTGGTGTCTGGACGCTC

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para el ensayo ChIP.

5.18 Análisis estadístico

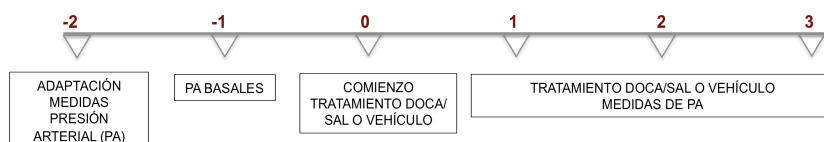
El análisis estadístico se realizó utilizando el software *Prism 6 (Graph Pad)*. Los test estadísticos utilizados se indican en los pies de figura de los gráficos representados en el apartado resultados. Las comparaciones entre pares se realizaron utilizando *t de student*, aplicando la corrección de *Welch* en aquellos casos en que las variancias sean significativamente diferentes. Para las comparaciones múltiples entre más de dos grupos se aplicó ANOVA de una vía aplicando post-test de Bonferroni. En aquellos casos en que las comparaciones múltiples han de realizarse a distintos tiempos o días de tratamiento se aplicó ANOVA de dos vías y post-test de Bonferroni.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 828672	Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

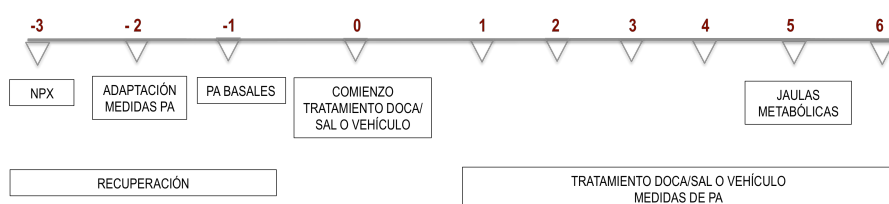
5.19 Representación esquemática temporal de los ensayos realizados en animales

5.19.1 Modelo experimental de hiperaldosteronismo e hipertensión arterial

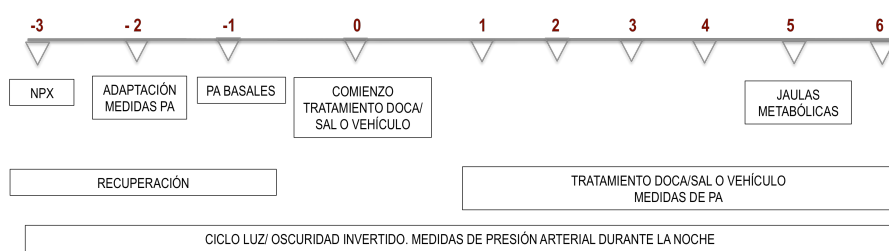
Ensayo DOCA/Sal: Semanas



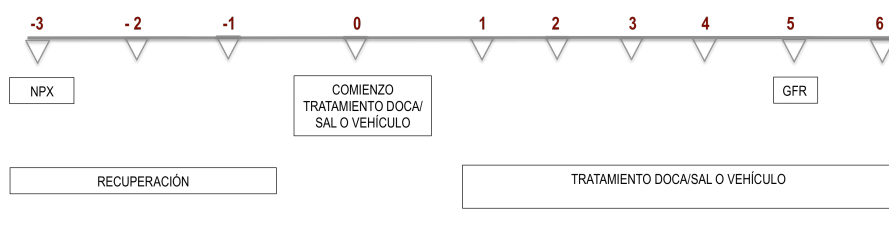
Ensayo NPX 1- DOCA/Sal: Semanas



Ensayo NPX 2- DOCA/Sal: Semanas



Ensayo NPX 3- DOCA/Sal: Semanas



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

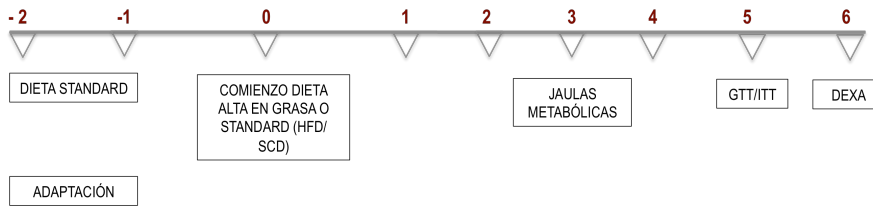
Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

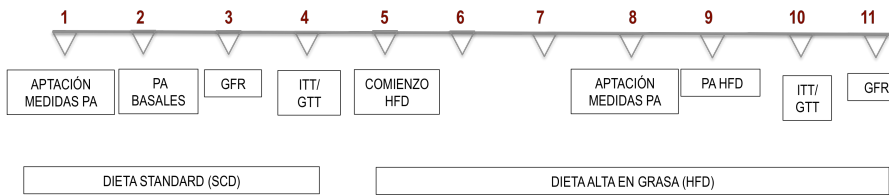
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

5.19.2 Modelo de desarrollo de obesidad y alteraciones en la homeostasis de la glucosa

Ensayo HFD 1 (ratones machos y hembras): Semanas



Ensayo HFD 2 (ratones macho): Semanas



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

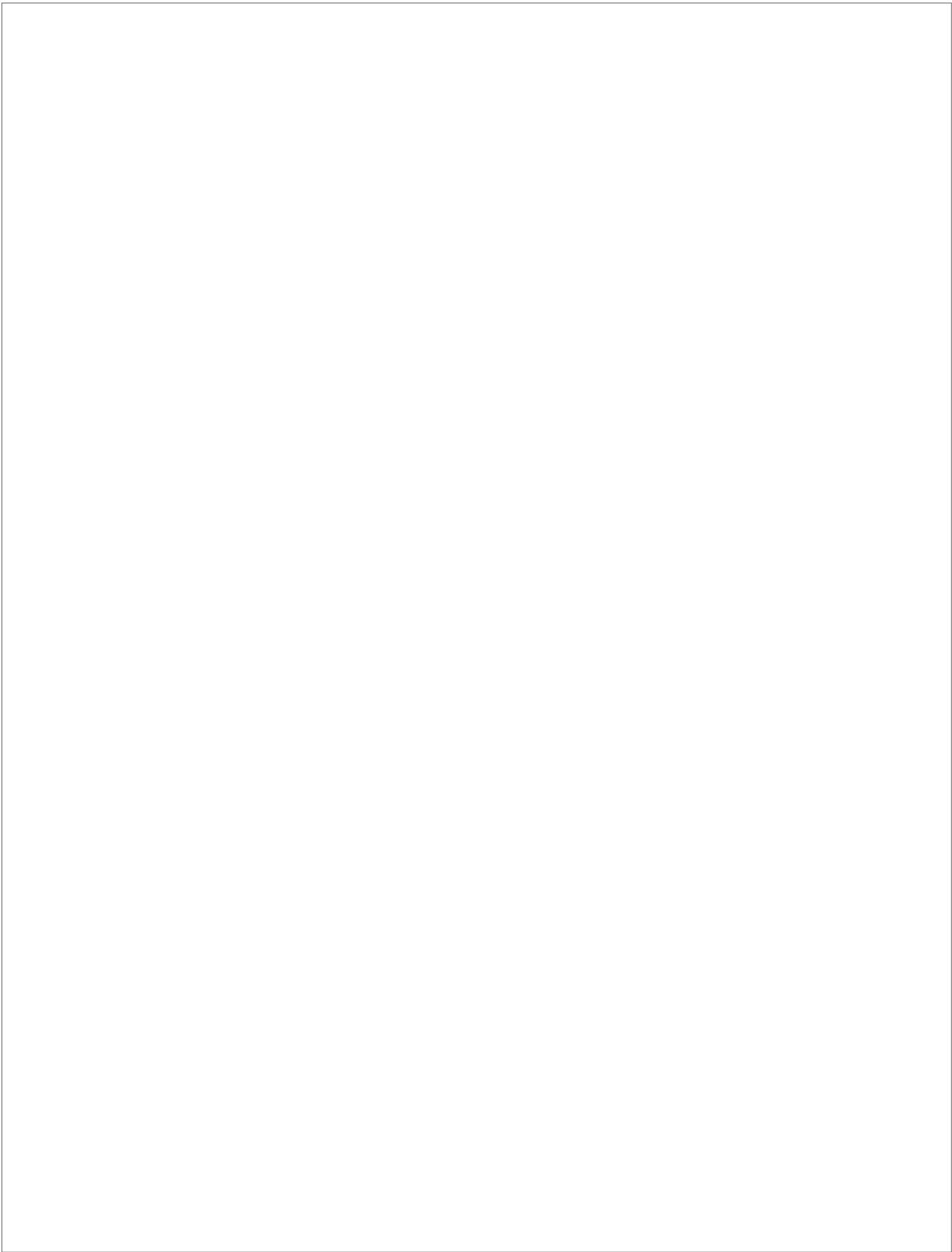
Resultados

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: <i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS</i>	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
<i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ</i>	28/11/2016 11:47:29
<i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ</i>	29/11/2016 14:09:00
<i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO</i>	11/12/2016 10:56:17



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS</i>	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ</i>	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ</i>	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO</i>	11/12/2016 10:56:17

6 Resultados

6.1 Capítulo 1: Influencia de un exceso de actividad de SGK1 sobre el desarrollo de hipertensión arterial, daño renal y daño cardiovascular

6.1.1 Expresión y regulación del transgén en riñón

Los niveles de expresión de SGK1 fueron analizados por qPCR en corteza renal de individuos *wild type* y B6.Tg.sgk1 sin tratamiento y tratados con DOCA/Sal (Figura 10A). Los niveles de expresión no son significativamente diferentes entre animales *wild type* y transgénicos sin o con tratamiento (1.00 ± 0.429 vs 1.830 ± 0.560 ; 1.420 ± 0.463 vs 4.540 ± 1.573), aunque se ve una tendencia de aumento en los animales transgénicos.

Para comprobar el incremento de actividad de SGK1 en los animales transgénicos, testamos la fosforilación de GSK3 β , una diana conocida de SGK1 (Arteaga et al., 2007), en extractos de riñón de animales no tratados *wild type* y B6.Tg.sgk1. El análisis por *western blot* revela un aumento de aproximadamente un 40% de GSK3 β fosforilada en los animales transgénicos (0.995 ± 0.072 vs 1.348 ± 0.106) (Figura 10B y C).

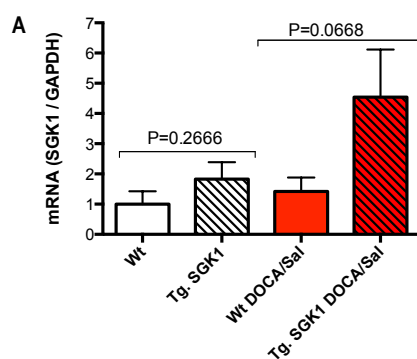
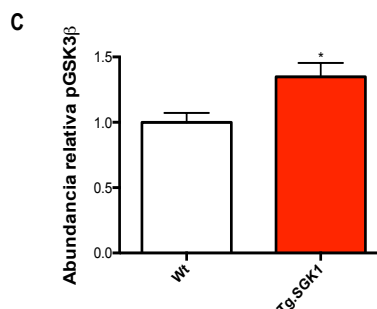
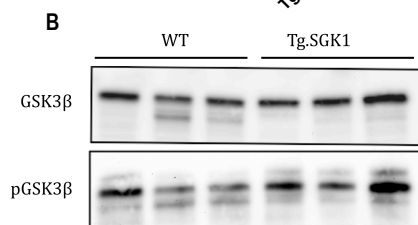


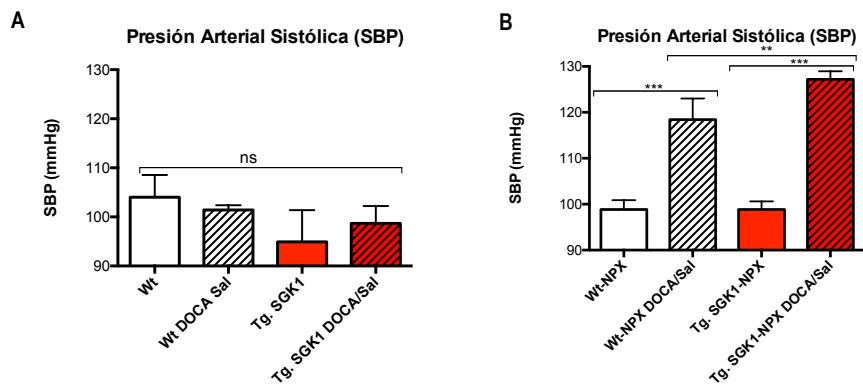
Figura 10. (A) Expresión de mRNA de SGK1 en animales Wt y B6.Tg.sgk1 sin tratamiento o con DOCA/Sal. Las cantidades relativas de mRNA de SGK1 se estimaron por el método doble delta Ct utilizando GAPDH como housekeeper. ANOVA de una vía seguido de test de comparación múltiple de Bonferroni (ns). **(B) Western Blot** y **(C) cuantificación del ratio GSK3 β /pGSK3 β** como medida de la actividad de SGK1. t test (* $p < 0.05$) Los valores se representan como la MEDIA \pm SEM



6.1.2 El exceso de actividad de SGK1 potencia la hipertensión inducida por NPX-DOCA/Sal

En ausencia de nefrectomía unilateral no se observaron cambios en la presión arterial entre animales *wild type* y transgénicos (mmHg : 104 ± 4.561 vs 95 ± 6.467), incluso al ser tratados con DOCA/Sal durante tres semanas (101 ± 0.966 vs 99 ± 3.530) (Figura 11A). El proceso quirúrgico NPX *per se* no produce cambios en la presión arterial (99 ± 1.015 vs 99 ± 0.888). Sin embargo, los individuos NPX desarrollan hipertensión a las dos semanas del tratamiento con DOCA/Sal. Es interesante señalar que este aumento es significativamente superior en los animales transgénicos en la cuarta semana de tratamiento (118 ± 2.297 vs 127 ± 0.876) (Figura 11B). Este dato se comprobó en dos ensayos diferentes separados en el tiempo y utilizando animales distintos. En el segundo ensayo se tomaron las medidas de presión arterial invirtiendo el ciclo de luz/oscuridad para realizarlas durante la noche, obteniéndose los mismos resultados en ambos experimentos. Por otra parte, las estimaciones de la ingesta de agua realizadas en jaulas metabólicas muestran una tendencia de aumento en los animales B6.Tg.sgk1 con el tratamiento NPX-DOCA/Sal con respecto a los individuos *wild type* con el mismo tratamiento (13.51 ± 2.013 ml/día , n=5 ; 11.39 ± 0.5056 , n=5 respectivamente), lo cual podría estar relacionado con la estimulación del apetito por la sal dependiente de SGK1.

La inducción de hipertensión en animales NPX-DOCA/Sal está acompañada por un descenso en los niveles circulantes de aldosterona en animales *wild type*, más pronunciado en los ratones B6.Tg.sgk1. En ausencia de tratamiento parece haber una tendencia de disminución no significativa en los animales transgénicos (Figura 11C). No se muestran cambios significativos en los niveles plasmáticos de corticosterona con el tratamiento en animales *wild type* o B6.Tg.sgk1 (Figura 11D).



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS

Fecha: 28/11/2016 10:59:05

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ

28/11/2016 11:47:29

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ

29/11/2016 14:09:00

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO

11/12/2016 10:56:17

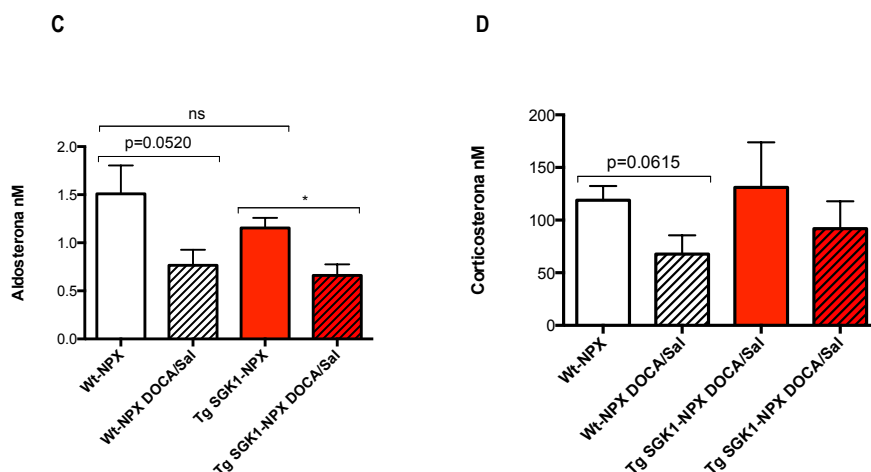


Figura 11. (A) En ausencia de NPX no se produce cambio en la presión arterial sistólica (SBP) con el tratamiento DOCA/Sal. Medidas de SBP obtenidas por el método tail-cuff en individuos Wt y B6.Tg.sgk1 a la tercera semana del tratamiento con vehículo o DOCA/Sal (n=4). **(B) El exceso de actividad de SGK1 conduce a hipertensión inducida por NPX-DOCA/Sal.** Medidas de SBP obtenidas por el método tail-cuff en individuos NPX- wild type y transgénicos a la cuarta semana del tratamiento con vehículo o DOCA/Sal (n=4). **(C) Reducción de los niveles de Aldosterona plasmáticos con NPX-DOCA/Sal.** Niveles circulantes de aldosterona medidos por ELISA en plasma obtenido a la seis semanas de tratamiento en individuos NPX vehículo y DOCA/Sal (n=4 en grupos vehículo y n=5 en grupos DOCA/Sal) **(D) Los niveles circulantes de corticosterona no muestran cambios significativos con el tratamiento NPX-DOCA/Sal.** Niveles circulantes de corticosterona medidos por ELISA en plasma obtenido a la seis semanas de tratamiento en individuos NPX vehículo y DOCA/Sal (n=4 en grupos vehículo y n=5 en grupos DOCA/Sal). Los valores se representan como la MEDIA \pm SEM .ANOVA de una vía seguido de test de comparación múltiple de Bonferroni (*p<0.05;**p<0.001 ***p<0.0001).

6.1.3 EL incremento de actividad de SGK1 produce hiperfiltración glomerular y albuminuria exacerbada inducida por NPX- DOCA/Sal

El aumento de presión arterial podría producir hiperfiltración glomerular. Es por ello que mediante el método de aclaramiento de iohexol en plasma evaluamos GFR en individuos NPX *wild type* y B6.Tg.sgk1 tratados con vehículo y tratados con DOCA/Sal (Figura 12A). En los animales tratados con vehículo no existen diferencias en el GFR entre genotipos. En los animales tratados con DOCA/Sal existe una tendencia de aumento de GFR en B6.Tg.sgk1. Además se cuantificó la ratio albúmina/creatinina (Figura 12B) para estimar el posible daño producido en la barrera de filtración glomerular inducido por el tratamiento con DOCA/Sal. La ratio se encuentra aumentada en los individuos con el tratamiento DOCA/Sal, y este aumento es

Firmado por:	Fecha:
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

significativamente superior en los animales B6.Tg.sgk1, obteniéndose el mismo resultado en dos experimentos separados en el tiempo.

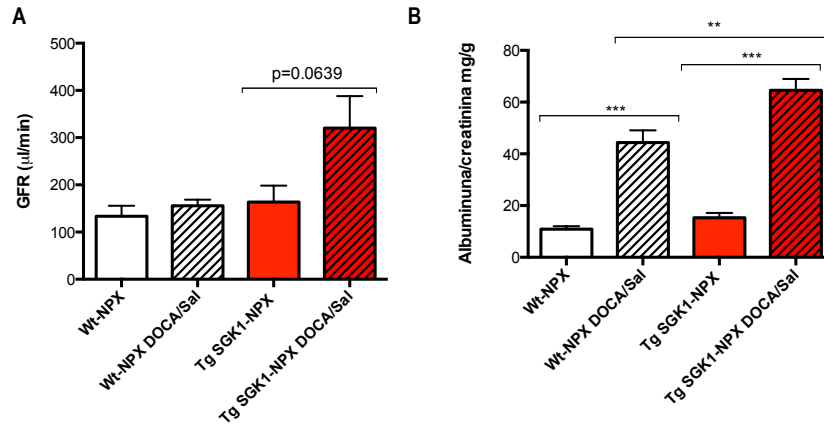


Figura 12. (A) GFR aumentada en B6.Tg.sgk1 NPX-DOCA/Sal. GFR estimada por aclaramiento de iohexol aplicando un modelo farmacocinético simplificado de un compartimento. La medidas se realizaron a las cinco semanas del tratamiento con vehículo o DOCA/Sal en animales NPX (n=5 en los animales vehículo y n=4 en los tratados). **(B) Albuminuria exacerbada en B6.Tg.sgk1 NPX-DOCA/Sal.** La concentración de albúmina y creatinina se cuantificó en muestras de orina obtenidas en jaulas metabólicas a la quinta semana del tratamiento con vehículo o DOCA/Sal en individuos NPX. Los datos corresponden a dos experimentos separados en el tiempo. (n=9 en animales vehículo y n=11 en los tratados). Los valores se representan como la MEDIA ±SEM. ANOVA de una vía seguido de test de comparación múltiple de Bonferroni (*p<0.05; **p<0.001***p<0.0001).

6.1.4 Consecuencias del tratamiento NPX-DOCA/Sal sobre la homeostasis mineral

La función biológica mejor caracterizada de MR es su papel en la homeostasis mineral modulando el transporte iónico en tejidos epiteliales de alta resistencia eléctrica. Por ello, investigamos el efecto de un exceso de mineralocorticoides (DOCA) y sal en los niveles plasmáticos y excreción urinaria de Cl^- , Na^+ y K^+ . Observamos que en plasma los niveles de los tres iones no varían con el tratamiento NPX-DOCA/Sal (Figura 13A y Tabla 6). Sin embargo el exceso de sal y mineralocorticoides conducen a una aumento en la excreción de Cl^- y Na^+ y a una disminución en la excreción de K^+ en orina en ambos genotipos, sin diferencias significativas entre ellos (Figura 13B y Tabla 6).

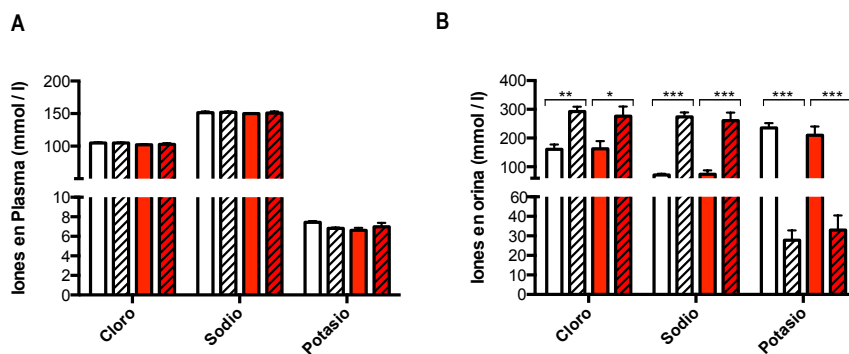


Figura 13. (A) No hay variación en iones Cl⁻, Na⁺ y K⁺ en plasma con NPX-DOCA/Sal. Cuantificación de iones en plasma obtenido a las seis semanas del tratamiento con vehículo o DOCA/Sal en animales NPX (n=4 en los animales vehículo y n=5 en los tratados). **(B) El tratamiento NPX-DOCA/Sal produce un aumento en la excreción de Cl⁻ y Na⁺ y una disminución en la excreción de K⁺ independientemente del genotipo.** La concentración de iones se cuantificó en muestras de orina obtenidas en jaulas metabólicas a la quinta semana del tratamiento con vehículo o DOCA/Sal en individuos NPX (n=5 en animales vehículo y n=6 en los tratados). Los valores se representan como la MEDIA ±SEM. ANOVA de una vía seguido de test de comparación múltiple de Bonferroni (*p<0.05; **p<0.001***p<0.0001)

IONES (mmol/l)	<i>Wt-NPX</i>	<i>Wt-NPX</i> <i>DOCA/Sal</i>	<i>Tg. SGK1 NPX</i>	<i>Tg. SGK1-NPX</i> <i>DOCA/Sal</i>
COLORO Plasma	105.00± 1.08	105.00 ± 0.84	102.30 ± 0.63	102.80± 1.74
COLORO Orina	160.60± 17.16	292.30 ± 17.04	162.60 ± 26.69	276.3 0± 33.30
SODIO Plasma	151.50 ± 1.94	152.00± 1.34	150.0 0± 0.86	150.8 0± 2.42
SODIO Orina	71.20 ± 4.40	273.80 ± 15.72	74.00 ± 13.32	260.80 ± 27.71
POTASIO Plasma	7.44 ± 0.12	6.82 ± 0.26	6.61 ± 0.27	6.97 ± 0.41
POTASIO Orina	235.10 ± 17.21	27.77 ± 4.99	209.70 ± 30.66	32.97 ± 7.49

Tabla 6. Valores en mmol/l de iones Cl⁻, Na⁺ y K⁺ en plasma y orina.

6.1.5 Los animales B6.Tg. SGK1- NPX muestran hipertrofia glomerular incluso en ausencia de tratamiento con DOCA/Sal

La albuminuria aumentada en los animales sometidos al proceso quirúrgico de nefrectomía y tratados con DOCA/Sal apunta al desarrollo de daño renal aparentemente más acentuado en ratones B6.Tg.sgk1. Por ello estudiamos las características estructurales de los riñones. Los datos de peso de riñón indican hipertrofia en los animales tratados (Figura 14A). El estudio de secciones de riñón teñidas con Rojo sirio revela hipertrofia glomerular exacerbada en B6.Tg.sgk1 con nefrectomía unilateral incluso en ausencia de tratamiento. (Figura 14B, C y D).

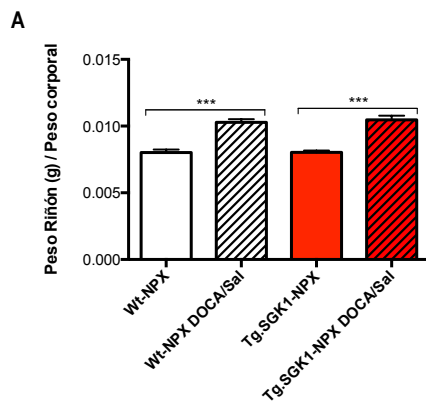
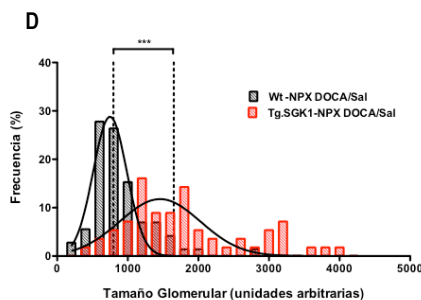
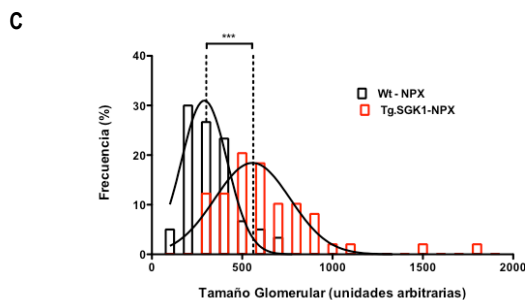
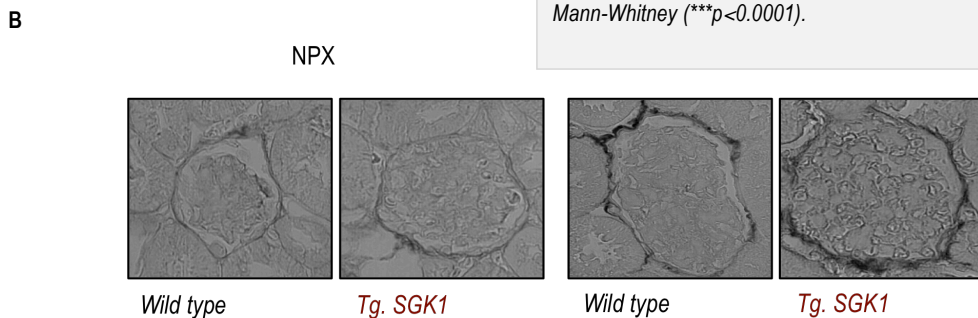
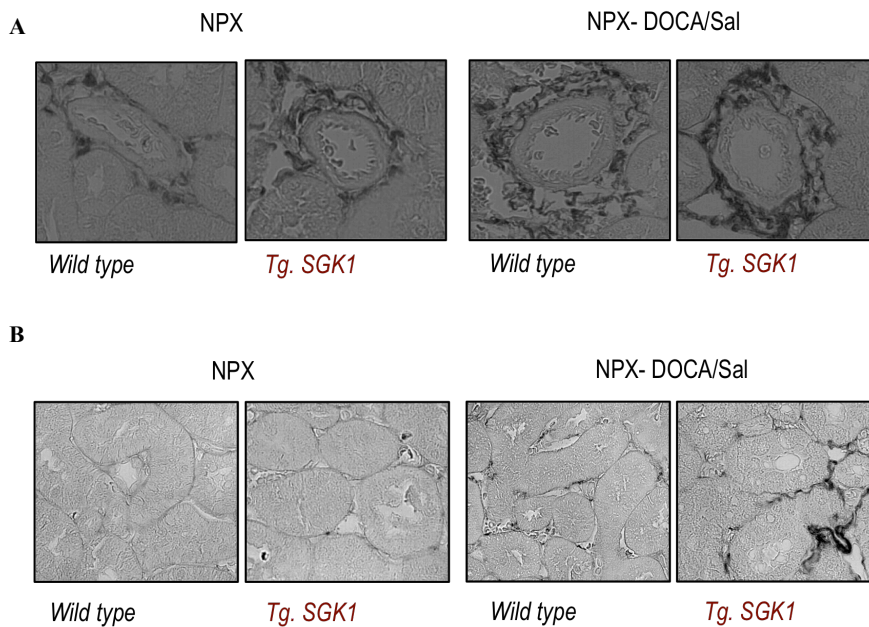


Figura 14. (A) DOCA/Sal produce un aumento en el peso del riñón. Peso del riñón normalizado con el peso corporal a las seis semanas de tratamiento con vehículo o DOCA/Sal (n=10). ANOVA de una vía seguido de test de comparación múltiple de Bonferroni (***) $p < 0.0001$. **(B) Hipertrofia glomerular exacerbada en B6.Tg.sgk1-NPX, incluso en ausencia de tratamiento con DOCA/Sal.** Tinciones de rojo sirio en secciones de riñón de 3 μ m obtenidas a las seis semanas del tratamiento con vehículo o DOCA/Sal en animales NPX. **(C) y (D) Análisis de distribución de frecuencias del diámetro glomerular.** Las barras representan el número de glomérulos correspondiente a cada intervalo de tamaño glomerular. Las curvas representan un ajuste Gaussiano de los datos. **(C) Animales NPX sin tratamiento** (n=60 en Wt, n=49 en Tg. SGK1) **(D) Animales NPX DOCA/Sal** (n=72 en Wt y n=56 en Tg. SGK1) los tratados). Los valores se representan como la MEDIA \pm SEM. Test de Mann-Whitney (***) $p < 0.0001$.



6.1.6 Mayor desarrollo de fibrosis glomerular, intersticial y perivascular en la corteza renal de ratones B6.Tg.sgk1 tratados NPX-DOCA/Sal

Puesto que los niveles de transcrito de SGK1 están elevados en varias enfermedades fibróticas y los datos de albuminuria exacerbada en animales B6.Tg.sgk1 podrían estar relacionados con un aumento de fibrosis renal en estos animales, realizamos un estudio detallado de la fibrosis en la corteza renal, utilizando para ello tinciones con Rojo Sirio que posee afinidad por el colágeno. Observamos que el tratamiento con DOCA/Sal produce un aumento del área fibrótica en los animales de ambos genotipos. Es importante resaltar que este aumento es significativamente mayor en los transgénicos, tanto a nivel de fibrosis glomerular (*Figura 14B y Figura 15C*) como de fibrosis perivascular (*Figura 15A y C*) y de fibrosis tubulointersticial (*Figura 15B y C*). Los datos se obtuvieron en dos experimentos separados en el tiempo con resultados consistentes entre sí.



Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

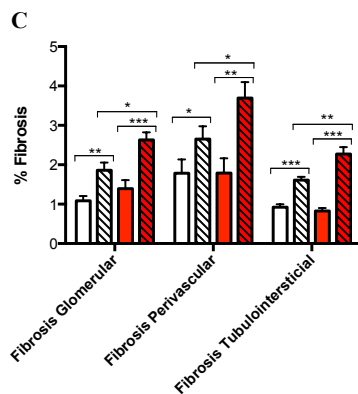
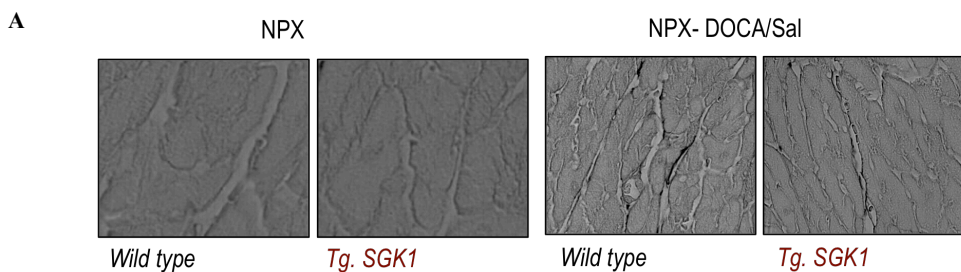


Figura 15. El exceso de actividad de SGK1 produce un mayor desarrollo de fibrosis inducido por DOCA/Sal en la corteza renal. Tinciones de rojo sirio en secciones de riñón de 3 μ m obtenidos a las seis semanas del tratamiento con vehículo o DOCA/Sal en animales NPX (n=9 en Wt y Tg. SGK1-NPX, n=12 en Wt-NPX DOCA/Sal y n=10 en Tg. SGK1-NPX DOCA/Sal). (A) Imágenes representativas de fibrosis perivascular y (B) fibrosis tubulointersticial (C) Representación y (D) Cuantificación detallada del área fibrótica (glomerular, perivascular y tubulointersticial). Los valores se representan como la MEDIA \pm SEM. ANOVA de una vía seguido de test de comparación múltiple de Bonferroni (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

6.1.7 Desarrollo de fibrosis cardíaca con el tratamiento NPX-DOCA/Sal sin diferencias entre genotipos

Además estudiamos el desarrollo de fibrosis e hipertrofia en el sistema cardiovascular. El peso del corazón no sufrió modificaciones con el tratamiento NPX-DOCA/Sal (Figura 16B). Sin embargo, se produce un aumento en el área fibrótica en ambos genotipos con el tratamiento como se ha descrito anteriormente (Vallon et al., 2006), sin que existan diferencias significativas entre ellos tanto en el porcentaje de fibrosis cardíaca como en el de fibrosis perivascular en vasos coronarios (Figura 16A y C).



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por:	Fecha:
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

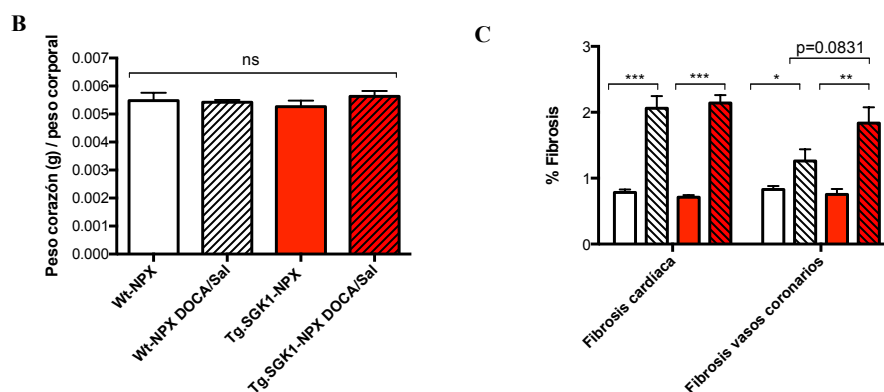


Figura 16. El tratamiento DOCA/Sal produce fibrosis cardíaca sin diferencias entre genotipos. (A) Imágenes representativas de tinciones de rojo sirio de secciones de corazón de 3µm. **(B)** Peso del corazón normalizado con el peso corporal a las seis semanas de tratamiento con vehículo o DOCA/Sal (n=9 en Wt-NPX y Tg. SGK1-NPX DOCA/Sal, n=12 en Wt-NPX DOCA/Sal y n=10 en Tg. SGK1-NPX) **(C)** Cuantificación del porcentaje de área de fibrosis cardíaca y en vasos coronarios (n=6). Los valores se representan como la MEDIA ± SEM. ANOVA de una vía seguido de test de comparación múltiple de Bonferroni (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

6.1.8 Aumento en la expresión de marcadores moleculares de daño renal en Tg.SGK1-NPX tratados con DOCA/Sal

Puesto que no encontramos diferencias en el daño producido en corazón entre ratones *wild type* y B6.Tg.sgk1 con el tratamiento NPX-DOCA/Sal, decidimos no realizar un estudio de marcadores moleculares implicados en el proceso patológico. Sin embargo, los datos obtenidos en riñón nos indican un daño más acentuado en los animales transgénicos. Por ello, resulta interesante el estudio de marcadores genéticos de fibrosis y daño en riñón y el estudio de genes regulados diferencialmente debido al aumento de actividad de la quinasa en animales transgénicos. En este contexto, estudiamos genes previamente involucrados en el desarrollo de fibrosis en riñón (Figura 17A). Se ha descrito que SGK1 promueve la expresión de CTGF en riñón (Artunc et al., 2006) (Kok et al., 2014), y éste a su vez promueve la deposición de matriz extracelular contribuyendo al desarrollo de fibrosis. Los resultados de expresión en corteza renal nos muestran un incremento de 1.41 veces en el mRNA de CTGF en ratones Wt-NPX-DOCA. Sin embargo, en animales Tg. SGK1-NPX DOCA/Sal la expresión de CTGF aumenta 2.61 veces, produciéndose una inducción significativa. Estudiamos otros genes relacionados con el proceso fibrótico en riñón como el colágeno I, III y IV (Lopez-Andres et al., 2012). El colágeno I aumenta con el tratamiento con DOCA/Sal en ambos genotipos, produciéndose un incremento de 2.47 veces en individuos *wild type* y de 1.52 en B6.Tg. SGK1. La expresión de colágeno III no se ve afectada por el tratamiento con DOCA/Sal. El colágeno IV nos resulta especialmente interesante puesto que tanto en individuos transgénicos tratados con vehículo como tratados con DOCA/Sal el aumento en la expresión de este gen es superior en comparación a la expresión

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

detectada en individuos *wild type* (Figura 17A). Otro gen cuya expresión se incrementa en el proceso de fibrosis renal es la actina de músculo liso, α -SMA (Boor and Floege, 2012). El tratamiento con DOCA/Sal produce un aumento en la expresión de este gen en ambos genotipos sin diferencias entre ellos. Estudios en nefropatía diabética relacionan la expresión de SGK1 con la formación de fibronectina (Feng et al., 2005), componente de la matriz extracelular. En nuestro caso los animales Tg.SGK1-NPX tratados con vehículo muestran una inducción de 1.48 veces, mientras que el tratamiento con DOCA/Sal produce un aumento de la expresión de fibronectina en ambos genotipos (3.08 en *wild type* y 3.61 en B6.Tg.sgk1) siendo significativamente mayor en los animales transgénicos. Por último, en relación con el desarrollo de fibrosis, estudiamos la expresión de TGF- β , que se sabe media la deposición de proteínas en la matriz e induce la transcripción de SGK1 (Artunc et al., 2006), encontramos un incremento de 1.32 veces en wt-NPX DOCA/Sal y de 1.28 veces en Tg. SGK1-NPX DOCA/Sal (Figura 17A).

Por otra parte estudiamos la expresión de marcadores de daño renal e inflamación (figura 17B). Encontramos que el tratamiento DOCA/Sal no produce cambios significativos en la expresión de la molécula de daño renal 1 (KIM1), marcador de daño renal agudo (Humphreys et al., 2013, Panduru et al., 2015). Sin embargo existe una inducción de 4.31 en la expresión de NGAL en los animales transgénicos tratados con DOCA/Sal, mientras que en animales *wild type* su expresión no se encuentra alterada. Este gen está relacionado con el daño tubular (Latouche et al., 2012). Por último testamos la expresión de MCPI mediador de respuestas inflamatorias involucradas en la progresión de enfermedades renales inducidas por hipertensión (Wang et al., 2015), y encontramos un aumento de expresión de 4.61 veces en Wt-NPX DOCA/Sal y de 3.04 veces en Tg. SGK1-NPX DOCA/Sal.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 828672	Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

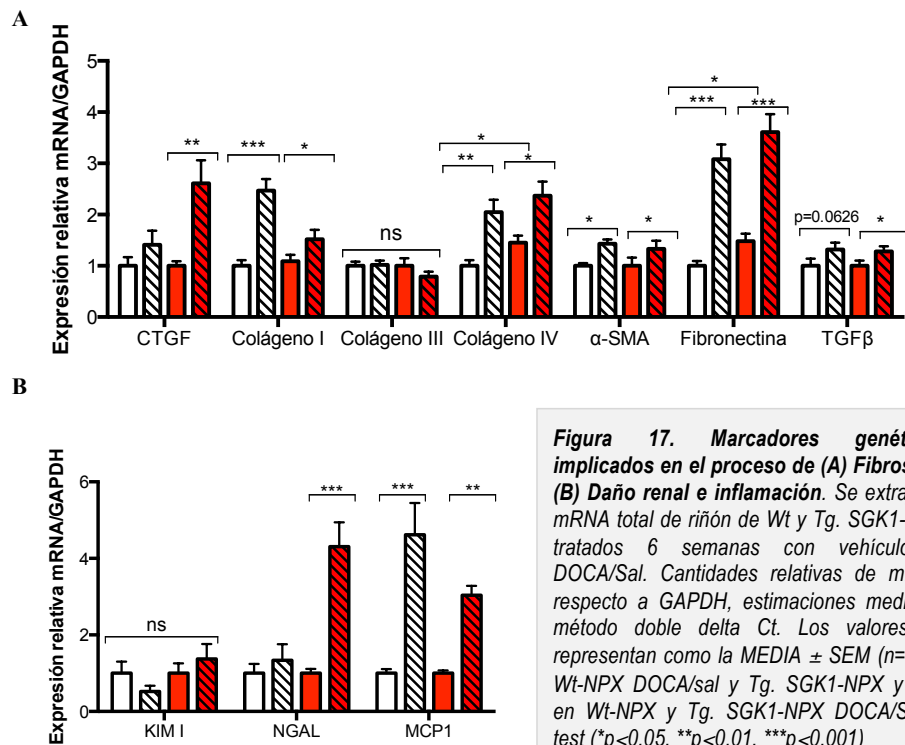
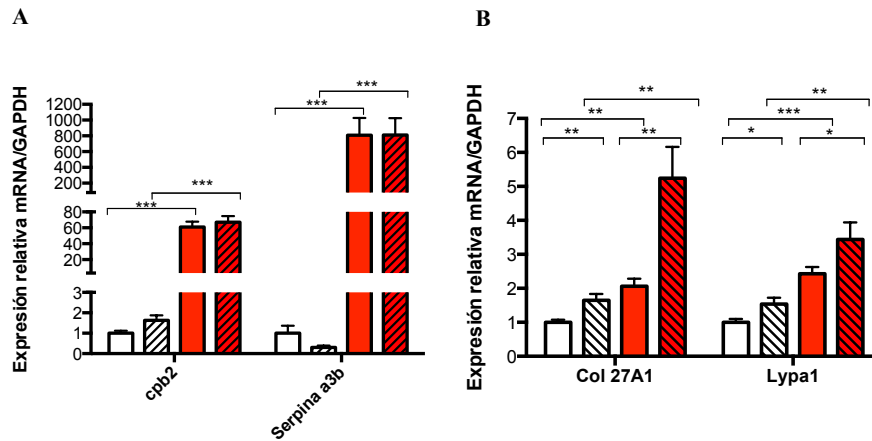


Figura 17. Marcadores genéticos implicados en el proceso de (A) Fibrosis y (B) Daño renal e inflamación. Se extrajo el mRNA total de riñón de Wt y Tg. SGK1-NPX tratados 6 semanas con vehículo o DOCA/Sal. Cantidades relativas de mRNA respecto a GAPDH, estimaciones mediante método doble delta Ct. Los valores se representan como la MEDIA ± SEM (n=5 en Wt-NPX DOCA/sal y Tg. SGK1-NPX y n=6 en Wt-NPX y Tg. SGK1-NPX DOCA/Sal. t test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

6.1.9 Genes regulados diferencialmente en ratones Tg. SGK1 en respuesta a DOCA/Sal

Para identificar genes potencialmente implicados en el daño renal agravado observado en ratones B6.Tg.sgk1 en respuesta al tratamiento NPX-DOCA/Sal, se realizó un análisis completo del transcriptoma utilizando *microarrays* de *Affimetrix*. Nuestro análisis se realizó únicamente con muestras de individuos *wild type* y transgénicos NPX-DOCA/Sal (n=4). Se realizó un análisis bioinformático para seleccionar genes que se expresaran de manera diferencial entre grupos y por igual en todos los individuos de cada grupo (variaciones intra-grupo pequeñas). De esta manera encontramos 77 genes sobrerregulados y 24 que disminuyen su expresión en Tg. SGK1-NPX DOCA/Sal en comparación con Wt NPX-DOCA/Sal (*Anexo 1*). De estos genes seleccionamos cinco que están sobrerregulados (Cbp2, serpina a3b, ccl28 y Lypa1) y uno que disminuye su expresión (Adamt12). La selección se basó en la magnitud de las diferencias entre grupos y el interés potencial de estos nuevos marcadores en el proceso de daño renal. La expresión de estos genes se validó por qPCR con sondas *Taqman* extendiendo el análisis a los grupos NPX-vehículo y aumentando el número de muestras (n=6). De esta manera,

encontramos genes cuya regulación se produce de manera dependiente del transgén y no se ve afectada con el tratamiento DOCA/Sal, como es el caso de *cpb2* y de la *serpina3b* (Figura 18A). La expresión de *col27 A1* y de *Lypa1* aumentan con el tratamiento DOCA /Sal pero su expresión es aún mayor en los individuos B6.Tg.sgk1 (Figura 18B). La expresión de *ccl28* está aumentada en animales transgénicos y parece tener una tendencia no significativa a disminuir su expresión con el tratamiento DOCA/Sal (Figura 18C). Por último, la expresión de *Adamtsl2* está disminuida en los animales B6.Tg.sgk1 independientemente del tratamiento (Figura 18D).



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

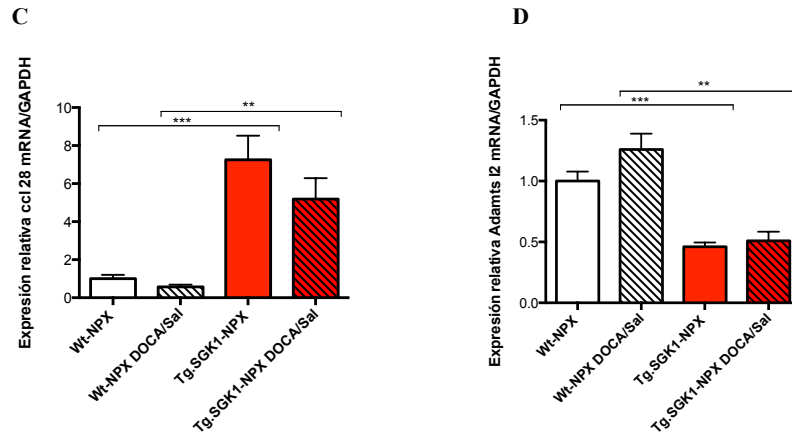


Figura 18. Validación de transcritos regulados diferencialmente en Wt-NPX DOCA/Sal y Tg. SGK1-NPX DOCA/Sal, obtenidos por análisis de microarray. Se extrajo el mRNA total de riñón de Wt y Tg. SGK1-NPX tratados 6 semanas con vehículo o DOCA/Sal. Las barras indican cantidades relativas de mRNA respecto a GAPDH, estimadas mediante método doble delta Ct. Los valores se representan como la MEDIA ± SEM (n=6). t test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001). (A) La expresión de *cpb2* y *Serpina3b* es dependiente de la expresión del transgén. (B) El *col27A1* y la *Lypa1* tienen expresión aumentada en animales B6.Tg.sgk1 y además aumentan con el tratamiento DOCA/Sal. (C) La expresión de *ccl28* está aumentada en animales B6.Tg.sgk1, y parece tener una tendencia no significativa a disminuir con el tratamiento DOCA/Sal. (D) Disminución en animales B6.Tg.sgk1 de la expresión de *Adamts 12*.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS

Fecha: 28/11/2016 10:59:05

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ

28/11/2016 11:47:29

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ

29/11/2016 14:09:00

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO

11/12/2016 10:56:17

6.2 Capítulo 2: Efecto de la actividad aumentada de SGK1 sobre el desarrollo de obesidad y alteraciones en la homeostasis de la glucosa

6.2.1 Expresión aumentada de SGK1 en tejido adiposo blanco epididimal e hígado en animales B6.Tg.sgk1

Los niveles de expresión de SGK1 fueron analizados por qPCR en tejido adiposo blanco epididimal de individuos *wild type* y B6.Tg.sgk1 macho después de seis semanas con dieta estándar (*standard chow diet*, SCD). Los niveles de expresión son significativamente diferentes entre animales *wild type* y transgénicos en SCD (1.00 ± 0.134 vs 1.786 ± 0.164) (Figura 19A). Los niveles de expresión de SGK1 también se analizaron en tejido epididimal de individuos *wild type* y B6.Tg.sgk1 después de 6 semanas con dieta alta en grasa (*high fat diet*, HFD) obteniéndose valores similares (1.00 ± 0.204 vs 1.813 ± 0.315). La dieta alta en grasa no produce inducción en la expresión de SGK1 en comparación con los valores de expresión obtenidos con SCD (datos no mostrados). Por otra parte, se analizaron los niveles de expresión de SGK1 en muestras de hígado de individuos *wild type* y B6.Tg.sgk1 después de 6 semanas con HFD (1.00 ± 0.162 vs 2.784 ± 0.531), la expresión está significativamente aumentada en individuos transgénicos (Figura 19B).

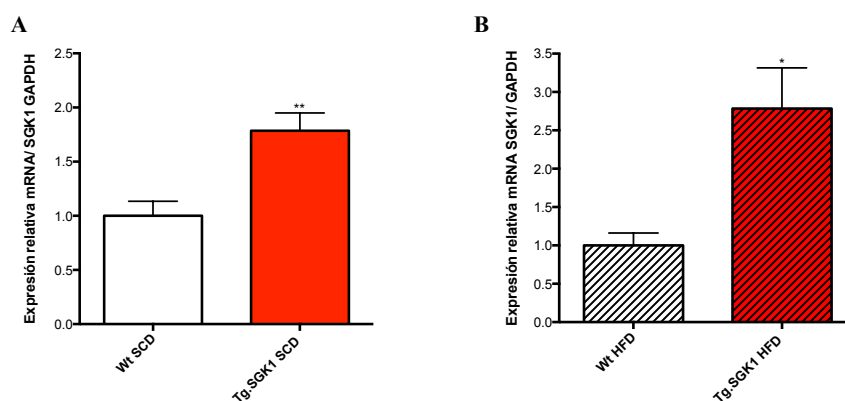
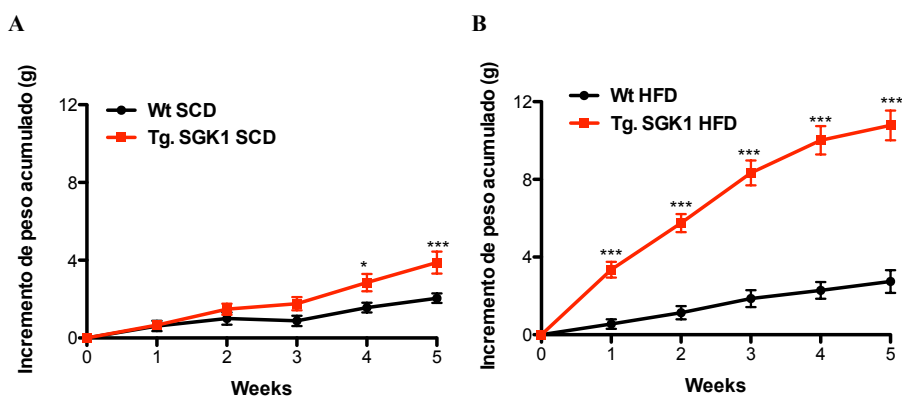


Figura 19. Expresión de SGK1 aumentada en animales B6.Tg.sgk1 Las cantidades relativas de mRNA de SGK1 se estimaron por el método doble delta Ct utilizando GAPDH como housekeeper. (A) Tejido adiposo blanco epididimal (B) Hígado. Los valores se representan como la MEDIA \pm SEM ($n=5$). t test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 828672		Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS		Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ		28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ		29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO		11/12/2016 10:56:17

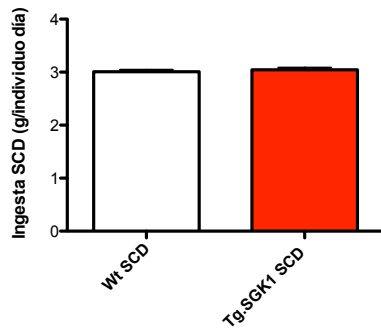
6.2.2 La expresión constitutivamente activa de SGK1 potencia la obesidad inducida por una dieta alta en grasa

A lo largo del proceso experimental se realizó un seguimiento semanal del peso y de la ingesta de alimento de individuos machos y hembras de 14 semanas de edad en SCD y en HFD para determinar el efecto metabólico de un incremento de actividad de SGK1. En ratones macho alimentado con SCD encontramos que las diferencias entre genotipos en relación al incremento de peso acumulado se acentúan a lo largo de las semanas, siendo significativamente diferentes a partir de la semana cuatro (*Figura 20A*). La dieta alta en grasa incrementa las diferencias de peso entre genotipos, siendo significativamente distintas desde la primera semana con HFD (0.550 ± 0.246 en *wild type* vs 3.350 ± 0.409 en B6.Tg.sgk1) y aumentando de manera progresiva a lo largo del tiempo (en la quinta semana: 2.743 ± 0.587 vs 10.783 ± 0.765) (*Figura 20B*). La ingesta de los individuos macho en SCD se monitorizó en las jaulas habituales haciendo un cálculo aproximado de consumo total de comida/individuo/día y no presenta diferencias entre genotipos (g/individuo/día : 3.010 ± 0.036 en *wild type* vs 3.045 ± 0.041 en B6.Tg.sgk1) (*Figura 20C*). En el caso de los individuos macho bajo HFD la ingesta se monitorizó tanto en las jaulas habituales (*Figura 20D*) como en jaulas metabólicas (*Figura 20E*). En ambos casos los animales transgénicos presentan una ingesta de alimento significativamente menor que los animales *wild type*. Asimismo, la ingesta en las jaulas metabólicas en comparación con las jaulas habituales disminuye en ambos grupos, lo que podría deberse al estrés que suponen las primeras para los animales. El resto de parámetros obtenidos en jaulas metabólicas se muestran en la *Tabla 7*.

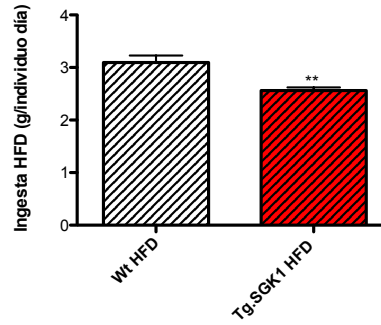


Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 828672		Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05	
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29	
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00	
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17	

C



D



E

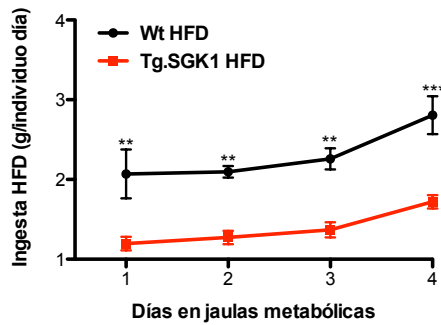


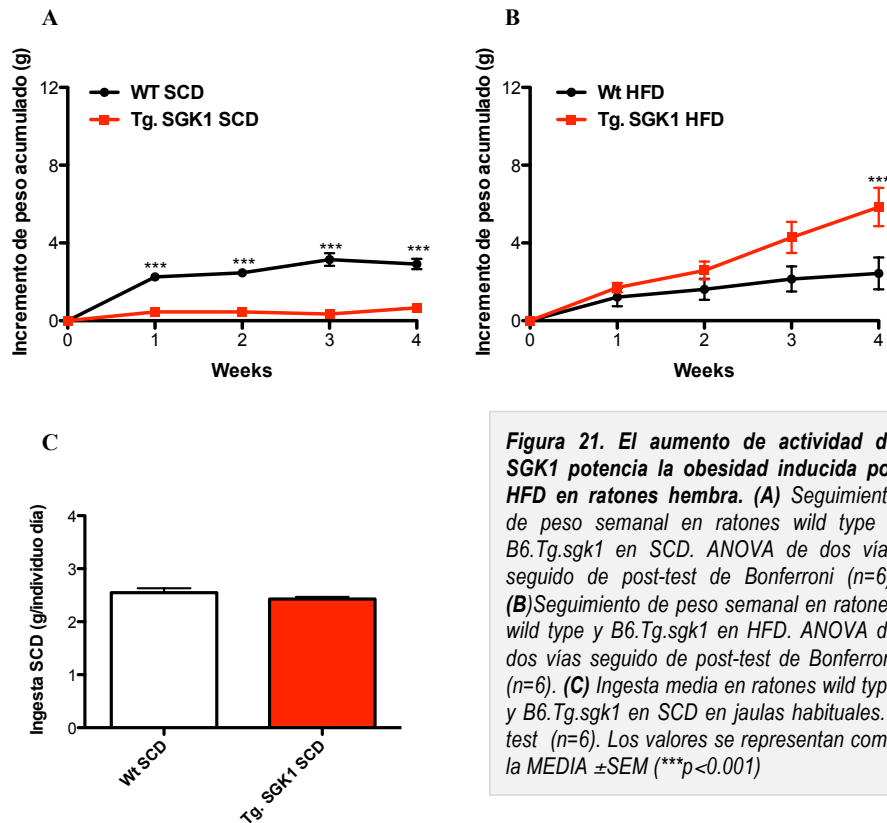
Figura 20. El aumento de actividad de SGK1 incrementa el aumento de peso inducido por HFD en ratones macho. (A) Seguimiento de peso semanal en ratones wild type y B6 Tg. SGK1 en SCD. ANOVA de dos vías seguido de post-test de Bonferroni (n=6). **(B)** Seguimiento de peso semanal en ratones wild type y B6.Tg.sgk1 en HFD. ANOVA de dos vías seguido de post-test de Bonferroni (n=8 en Wt y n=6 en Tg.SGK1). **(C)** Ingesta media en ratones wild type y B6.Tg.sgk1 en SCD en jaulas habituales. t test (n=6). **(D)** Ingesta media en ratones wild type y B6.Tg.sgk1 en HFD en jaulas habituales. t test (n=8 en Wt y n=6 en Tg.SGK1). **(E)** Seguimiento de la ingesta de ratones wild type y B6.Tg.sgk1 en HFD en jaulas metabólicas. ANOVA de dos vías seguido de post-test de Bonferroni (n=8 en Wt y n=6 en Tg.SGK1). Los valores se representan como la MEDIA ±SEM. (*p<0.05; **p<0.01, ***p<0.001).

PARÁMETRO	Wt HFD	Tg. SGK1 HFD
Ingesta de agua (ml)	3.949 ± 0.4892 (n=8)	2.287 ± 0.1486 (n=6) *
Diuresis (ml)	1.223 ± 0.2468 (n=6)	1.00 ± 0.09102 (n=6)
Ingesta HFD (g)	2.308 ± 0.1715 (n=8)	1.390 ± 0.1159 (n=6)***
Heces (g)	0.3098 ± 0.2686 (n=8)	0.2508 ± 0.02714 (n=6)

Tabla 7. Datos adicionales de ratones wild type y B6.Tg.sgk1 en HFD en jaulas metabólicas. . t test (n=8 en Wt y n=6 en Tg.SGK1), en la ingesta de agua y diuresis se aplicó corrección de Welch.). Los valores se representan como la MEDIA ±SEM. (*p<0.05; **p<0.01, *p<0.001).**

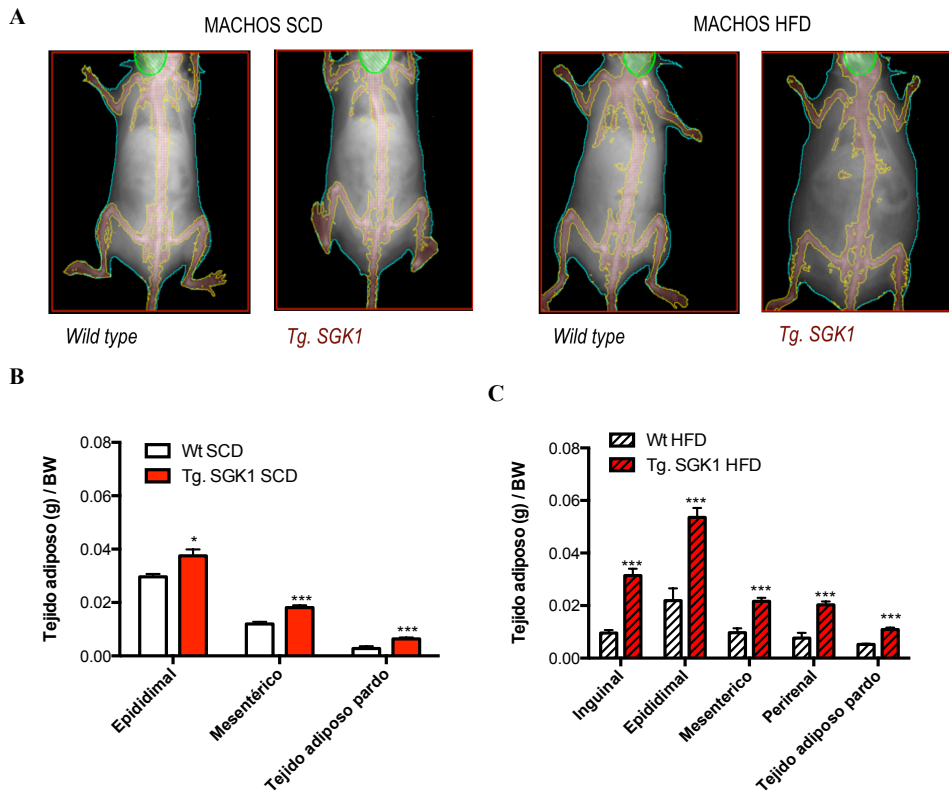
Identificador del documento: 828672	Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

Este mismo seguimiento se realizó en hembras, donde los datos de incremento de peso con SCD nos muestran un perfil contrario al que observamos en machos. En este caso, los valores de peso de los individuos *wild type* son superiores a los de los transgénicos desde el comienzo ($g: 2.250 \pm 0.229$ en *wild type* vs 0.450 ± 0.106 en B6.Tg.sgk1) hasta el final del experimento (2.917 ± 0.265 en *wild type* vs 0.667 ± 0.191 en B6.Tg.sgk1) (Figura 21A). La dieta alta en grasa produce un mayor aumento de peso en los individuos B6.Tg.sgk1, siendo significativamente mayor al final del experimento (2.433 ± 0.823 en *wild type* vs 5.850 ± 0.981 en B6.Tg.sgk1) (Figura 21B). Asimismo, se monitorizó la ingesta de alimento en las jaulas habituales. En SCD no existen diferencias de ingesta entre genotipos (2.547 ± 0.083 en *wild type* vs 2.430 ± 0.037 en B6.Tg.sgk1) (Figura 21C). No se pudo estimar la ingesta con HFD en el caso de las hembras, puesto que se encontraban grandes cantidades de comida en el interior de las jaulas, impidiendo realizar una estimación apropiada de la ingesta.



6.2.3 La dieta alta en grasa produce una mayor acumulación de tejido adiposo en ratones transgénicos

Para conocer el origen de las diferencias de peso observadas entre genotipos tanto en machos como en hembras se realizó un análisis de la composición corporal mediante DEXA a las 6 semanas de SCD o HFD. Todos los valores se normalizaron con el peso corporal (*body weight*, BW) de cada individuo. En ratones macho, es interesante señalar las diferencias en densidad mineral ósea (BMD) y composición mineral ósea (BMC) observadas entre individuos *wild type* y B6.Tg.sgk1 en HFD, con una disminución significativa en estos dos parámetros en estos últimos. Asimismo existe una disminución en el tejido magro de los animales transgénicos en comparación con los *wild type* para ambos tipos de dieta. El tejido graso total está aumentado en los animales transgénicos en comparación con los *wild type* en ambos tipos de dieta (Figura 22A y tabla 8). En la disección de los distintos paquetes grasos pudimos comprobar que este aumento en el tejido graso de los animales B6.Tg.sgk1 con respecto a los animales *wild type* (tanto en SCD como en HFD) se produce en distintos paquetes grasos a lo largo del cuerpo (Figura 22B, C y D).



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS

Fecha: 28/11/2016 10:59:05

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ

28/11/2016 11:47:29

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ

29/11/2016 14:09:00

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO

11/12/2016 10:56:17

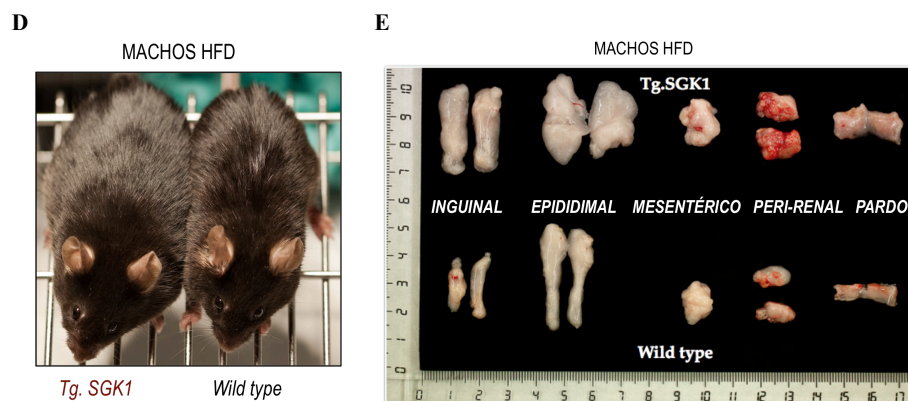


Figura 22. El aumento de actividad de SGK1 produce una mayor acumulación de tejido grasa inducida por HFD en ratones machos. Análisis de la composición corporal mediante DEXA. (A) Imágenes representativas DEXA (B) Peso de paquetes grasos normalizado por BW de ratones wild type y B6.Tg.sgk1 en SCD. (C) Peso de paquetes grasos normalizado por BW de ratones wild type y B6.Tg.sgk1 en HFD. (D) Imágenes representativas de animales wild type y B6.Tg.sgk1 en HFD y (E) de los paquetes grasos extraídos en los mismos animales. ANOVA de una vía seguido de comparación múltiple de Bonferroni ($n=6$ en todos los grupos menos en los machos Wt HFD $n=8$). Los valores se representan como la MEDIA \pm SEM ($*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$).

PARÁMETRO/GRUPO		Wt SCD	Tg. SGK1 SCD	Wt HFD	Tg. SGK1 HFD
HUESO	BMD(g/cm ²)/BW	0.001721 \pm 5.198x10 ⁻⁵	0.001622 \pm 9.355x10 ⁻⁵	0.001912 \pm 4.570x10 ⁻⁵	0.001602 \pm 7.954x10 ⁻⁵ **
	BMC(g)/BW	0.01456 \pm 0.0006967	0.01279 \pm 0.0004647	0.01783 \pm 0.0005652	0.01390 \pm 0.0005400 ***
TEJIDO	MAGRO(g)/BW	0.7216 \pm 0.01496	0.6740 \pm 0.01347 ***	0.8291 \pm 0.01143 ###	0.6031 \pm 0.01864 *** #
	GRASA(g)/BW	0.2341 \pm 0.003292	0.3041 \pm 0.01379 **	0.1955 \pm 0.008569	0.4392 \pm 0.02024 *** ###
	%GRASA(g)/BW	0.8454 \pm 0.01770	0.9360 \pm 0.03016	0.6296 \pm 0.02598 ###	1.186 \pm 0.02007 *** ###
PESO(g)		29.05 \pm 0.1945	33.18 \pm 0.6804 **	30.30 \pm 0.5895	34.63 \pm 1.205 **
	LONGITUD(cm)	8.617 \pm 0.04773	8.550 \pm 0.03416	8.963 \pm 0.1487	8.500 \pm 0.1653

Tabla 8. Parámetros obtenidos en ratones macho *wild type* y *B6.Tg.sgk1* tras 6 semanas con SCD o HFD. * Diferencias entre individuos de distinto genotipo con la misma dieta (*Wt vs Tg. SGK1 - SCD* y *Wt vs Tg. SGK1 - HFD*) # Diferencias entre individuos del mismo genotipo con distinta dieta (*Wt SCD vs Wt HFD* y *Tg. SGK1 SCD vs Tg. SGK1 HFD*).

El estudio de composición corporal en hembras mediante DEXA revela una disminución significativa en BMD y tejido magro en animales transgénicos en HFD en comparación con transgénicos SCD. El tejido magro también es significativamente inferior en animales *B6.Tg.sgk1* HFD en comparación con *wild type* HFD. El tejido graso total, el peso y la longitud están aumentados en *B6.Tg.sgk1* HFD con respecto a individuos de este genotipo con SCD y en comparación con individuos *Wt* HFD (Figura 23A y tabla 9).

A

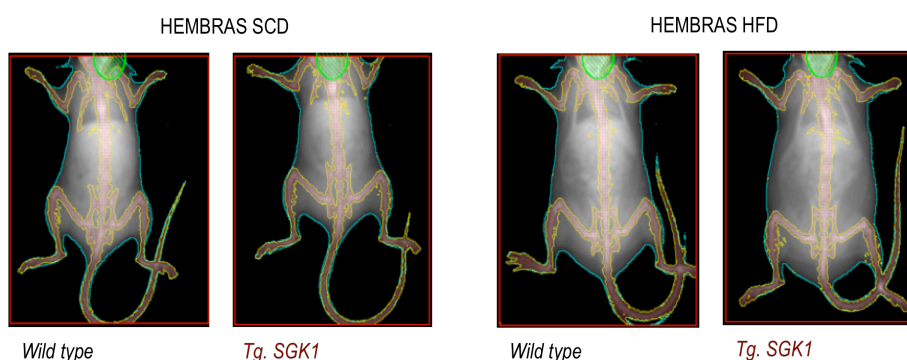


Figura 23. Imágenes representativas DEXA ratones hembra *wild type* y *B6.Tg.sgk1* tras 6 semanas con SCD o HFD.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 828672	Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

PARÁMETRO/GRUPO		Wt SCD	Tg. SGK1 SCD	Wt HFD	Tg. SGK1 HFD
HUESO	BMD(g/cm ²)/BW	0.002274 ± 3.548x10 ⁻⁵	0.002391± 3.041x10 ⁻⁵	0.002249±	0.002029± #
	BMC(g)/BW	0.01980 ± 0.0003589	0.02091± 0.0004993	0.02114 ±	0.01810±
TEJIDO	MAGRO(g)/BW	0.7880 ± 0.004831	0.7589 ± 0.01570	0.7578 ±	0.6595 ± * 0.0279 ###
	GRASA(g)/BW	0.1831 ± 0.005016	0.1856 ± 0.003829	0.2391 ±	0.3428 ± ** 0.03511 ###
	%GRASA(g)/BW	0.8974 ± 0.02225	0.9235 ± 0.02504	1.021 ±	1.213 ± ** 0.03511 ###
PESO(g)		21.05 ±	21.28 ±	23.25 ±	27.90 ± *
		0.2717	0.2868	0.9215	1.782 ##
LONGITUD(cm)		8.450 ±	8.383 ±	8.467 ±	8.717 ± **
		0.0500	0.04014	0.03333	0.06009 ###

Tabla 9. Parámetros obtenidos en ratones hembra wild type y B6.Tg.sgk1 tras 6 semanas con SCD o HFD. * Diferencias entre individuos de distinto genotipo con la misma dieta (Wt vs Tg. SGK1 - SCD y Wt vs Tg. SGK1 - HFD) # Diferencias entre individuos del mismo genotipo con distinta dieta (Wt SCD vs Wt HFD y Tg. SGK1 SCD vs Tg. SGK1 HFD).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

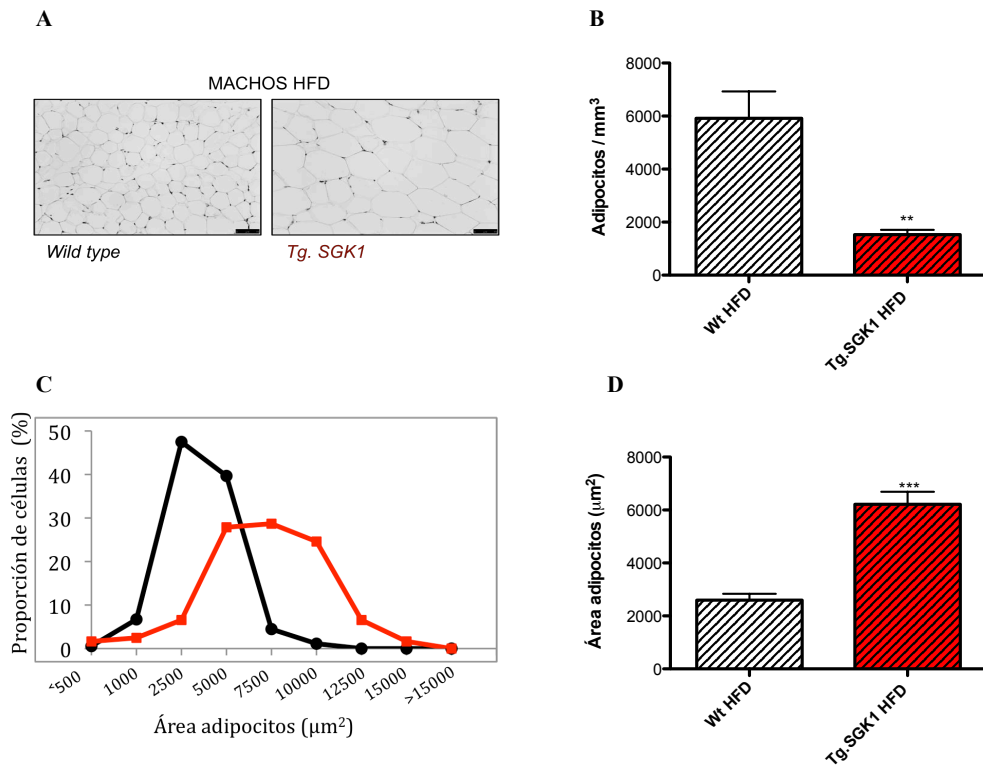
Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

6.2.4 El aumento de actividad de SGK1 causa una mayor hipertrofia adipocitaria

Puesto que las diferencias de contenido de tejido graso entre genotipos encontradas en ratones machos son mayores que en ratones hembra, decidimos centrar el resto de estudios en individuos machos.

El incremento en los depósitos grasos de machos B6.Tg.sgk1 bajo HFD nos plantea determinar si se trata de un aumento en el número de adipocitos o de un aumento en el tamaño de los mismos. Con el fin de responder a esta pregunta, realizamos una caracterización del área y volumen ocupado por los adipocitos en cortes de tejido adiposo blanco epididimal procedente de ratones *wild type* y B6.Tg.sgk1 tras 6 semanas de dieta alta en grasa. Los animales transgénicos desarrollan una clara hipertrofia adipocitaria, encontrándonos con una disminución en el número de adipocitos por mm³ (Figura 24A y B). Estos adipocitos tienen un mayor tamaño (Figura 24A, C y D) y, por tanto, ocupan un mayor volumen (Figura 24E y F).



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS

Fecha: 28/11/2016 10:59:05

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ

28/11/2016 11:47:29

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ

29/11/2016 14:09:00

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO

11/12/2016 10:56:17

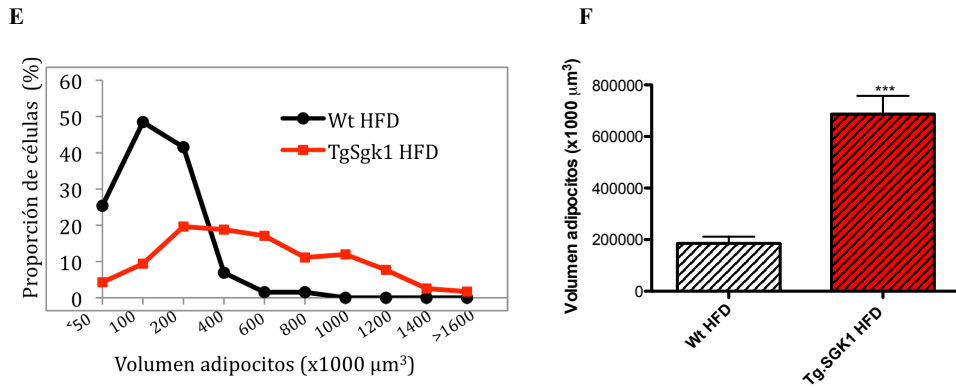


Figura 24. El exceso de actividad de SGK1 produce hipertrofia adipocitaria inducida por HFD. Se analizaron cortes de 10 μm teñidos con h/e de tejido adiposo epididimal de animales wild type y transgénicos tras 6 semanas con HFD (n=6). (A) Imagen representativa de los cortes. (B) Fracción de volumen ocupada por adipocitos. (C) Histograma porcentaje de células en cada categoría de área. (D) Área media de los adipocitos. (E) Histograma porcentaje de células en cada categoría de volumen. (F) Volumen medio ocupado por los adipocitos. Se analizaron 179 adipocitos en animales Wt y 122 en Tg. SGK1. Los valores representados son MEDIA ± SEM. t test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS

Fecha: 28/11/2016 10:59:05

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ

28/11/2016 11:47:29

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ

29/11/2016 14:09:00

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO

11/12/2016 10:56:17

6.2.5 Adipogénesis

6.2.5.1 Marcadores del proceso de adipogénesis

Con la intención de determinar si el aumento en tejido adiposo observado en los animales B6.Tg.sgk1 se deben a alteraciones en el proceso de adipogénesis, se analizó mediante qPCR la expresión de distintos marcadores de este proceso en muestras de tejido adiposo blanco epididimal de individuos *wild type* y B6.Tg.sgk1 tras 6 semanas con SCD o HFD. Existe un aumento en la expresión de PPAR γ , CEBP α , diglicérido aciltransferasa (DGAT) y la proteína de unión a elementos reguladores de esteroides 1 (SREBP1) con la dieta alta en grasa en ambos genotipos. Sin embargo no existen diferencias en los marcadores de adipogénesis entre genotipos en SCD o HFD (Figura 25).

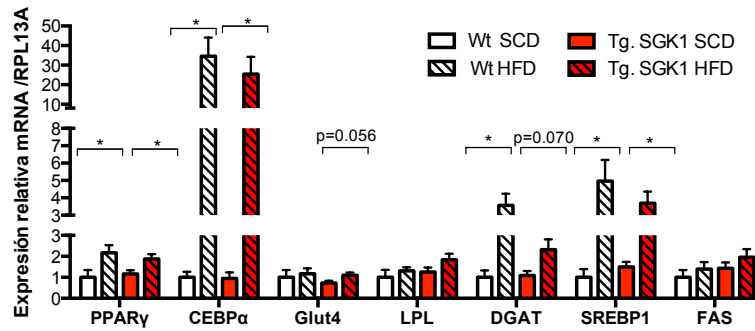
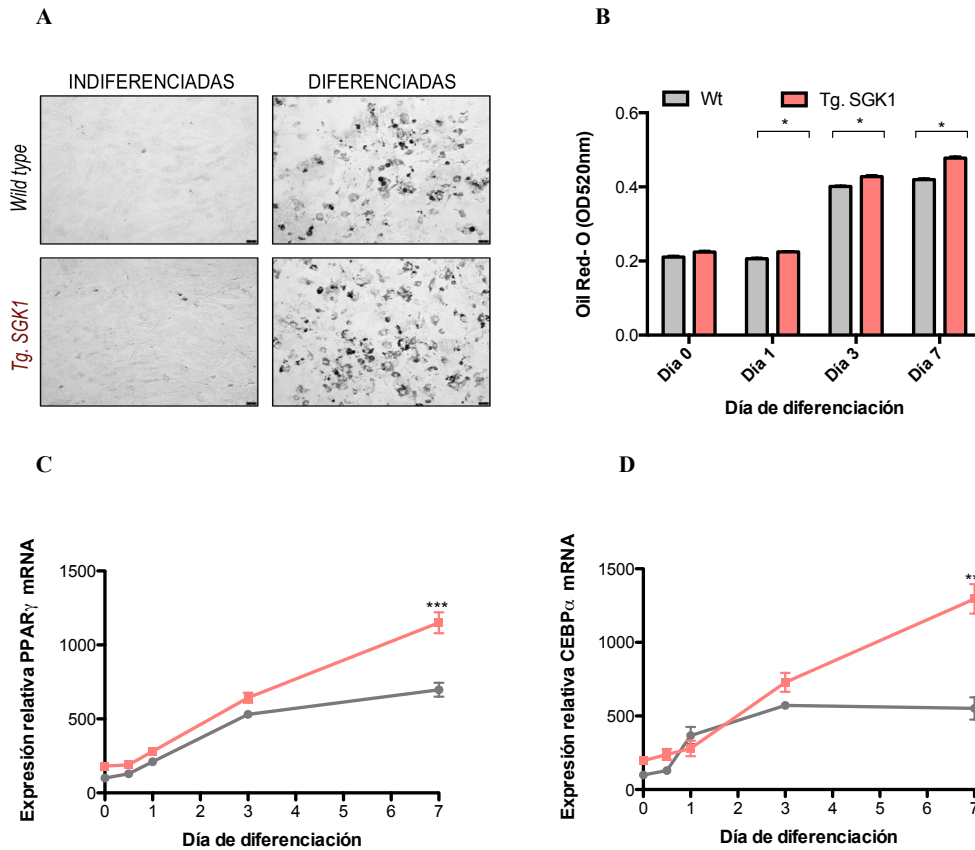


Figura 25. HFD causa un aumento en la expresión de marcadores de adipogénesis. Se extrajo el mRNA total de tejido adiposo epididimal de animales Wild type y B6.Tg.sgk1 tras 6 semanas con SCD o HFD. Cantidades relativas de mRNA respecto a RPL13A, estimaciones mediante método doble delta Ct. Los valores se representan como la MEDIA \pm SEM (n=6).t test (* $p < 0.05$)

6.2.6 Diferenciación de adipocitos *in vitro*

6.2.6.1 Adipogénesis aumentada en células derivadas de los ratones B6.Tg.sgk1

Con objeto de estudiar en detalle si SGK1 afecta a la diferenciación adipocitaria, se realizaron diferentes experimentos en células estromales vasculares derivadas del tejido adiposo blanco de ratones *wild type* y B6.Tg.sgk1 indiferenciadas y diferenciadas hacia adipocitos *in vitro* como se explica en el apartado 5.14 de la metodología. En primera instancia se cuantificó el contenido lipídico en las células indiferenciadas y diferenciadas derivadas de ratones de ambos genotipos mediante tinción Oil Red-O. Encontramos un aumento en el contenido lipídico en ambos tipos celulares durante el proceso de diferenciación, siendo este aumento significativamente mayor en células derivadas de ratones B6.Tg.sgk1 (Figura 26A y B). Asimismo, se cuantificó la expresión de distintos marcadores del proceso de adipogénesis durante la diferenciación (PPAR γ , CEBP α , LPL y adiponectina), aumentando todos ellos en células derivadas de ratones de ambos genotipos durante el proceso de diferenciación hacia células grasas. Sin embargo, este aumento es mayor en células derivadas de ratones B6.Tg.sgk1 (Figura 26C, D, E y F).



Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

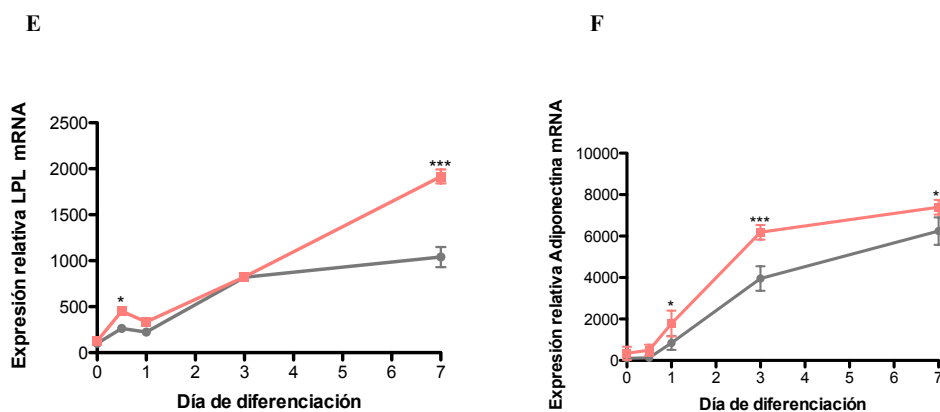


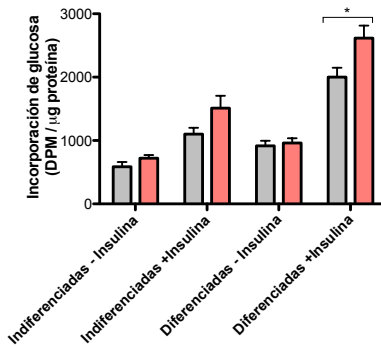
Figura 26. Adipogénesis aumentada en células derivadas de B6.Tg.sgk1. (A) Imágenes representativas de células vasculares estromales derivadas de ratones wild type y B6.Tg.sgk1 indiferenciadas y diferenciadas. (B) Cuantificación de tinción Red Oil-O , lecturas a 570nm. (C)-(F) Expresión relativa de marcadores del proceso de adipogénesis durante la diferenciación a células grasas in Vitro. Los valores se representan como la MEDIA \pm SEM (n=4) . t test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

6.2.6.2 Aumento en la incorporación de glucosa y lípidos en células derivadas de los ratones B6.Tg.sgk1

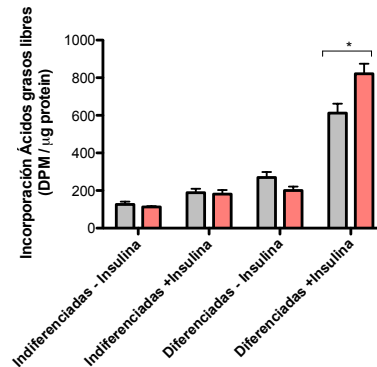
Mediante ensayos utilizando trazadores radioactivos se cuantificó la incorporación de glucosa (Figura 27A) y ácidos grasos libres (Figura 27B) en células derivadas de ratones wild type y B6.Tg.sgk1 indiferenciadas y diferenciadas en estado basal o tras la adición de insulina. En ambos casos existe un aumento en la incorporación de glucosa o ácidos grasos en células diferenciadas tratadas con insulina, siendo éste aumento significativamente mayor en células derivadas de los animales transgénicos. Asimismo, se cuantificó la expresión del transportador de glucosa Glut 4 en estas células durante el proceso de diferenciación, aumentando sus niveles de expresión en ambos genotipos a lo largo del proceso, siendo este aumento superior en células derivadas de los animales transgénicos (Figura 27C).

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

A



B



C

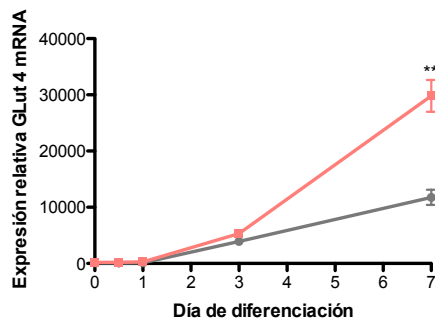


Figura 27. Aumento en la incorporación de glucosa y ácidos grasos libres en células derivadas de B6.Tg.sgk1. (A) Incorporación de glucosa o (B) de ácidos grasos libres basal o estimulada por insulina en células estromales vasculares indiferenciadas o diferenciadas derivadas de ratones wild type o B6.Tg.sgk1. Se representan los valores de radiactividad incorporados normalizados con la cantidad de proteína (μg). (C) Expresión relativa del transportador de glucosa Glut 4 durante el proceso de diferenciación. Los valores se representan como la MEDIA \pm SEM ($n=4$). t test (* $p<0.05$, ** $p<0.01$).

6.2.7 Termogénesis en tejido adiposo pardo

El tejido adiposo pardo tiene la capacidad de modular el balance energético a través de la disipación de energía en respuesta al frío y al exceso de alimento. Se sabe que en respuesta al frío aumenta el número de adipocitos pardos en depósitos de tejido adiposo blanco (“*Browning*”). Aunque los mecanismos de diferenciación no se conocen en detalle se sabe que los adipocitos blancos y pardos pueden interconvertirse bidireccionalmente. En roedores el tejido adiposo pardo se encuentra localizado en el espacio interescapular lo que facilita su disección y análisis. Nosotros encontramos un aumento en el peso de estos depósitos en animales B6.Tg.sgk1 tanto en SCD como en HFD con respecto a los animales *wild type* (Figura 22B y C). Con la finalidad de determinar, si este aumento es debido a un mayor número de células adiposas pardas, o tal vez, a un proceso de desdiferenciación hacia células blancas, se cuantificó la expresión de marcadores del proceso de termogénesis en muestras de tejido

adiposo pardo de animales *wild type* y B6.Tg.sgk1 tras 6 semanas de SCD o HFD. La expresión de estos marcadores disminuyen con la dieta alta en grasa. Asimismo existen diferencias entre genotipos en SCD, donde la expresión de UCP1, la iodotropina deiodinasa tipo 2 (DIO2), PPAR α , el coactivador del activador de proliferación del peroxisoma α y β (PGC1 α y β) es significativamente menor en los animales B6.Tg.sgk1. En HFD también disminuye la expresión de DIO2 en los animales transgénicos (Figura 28).

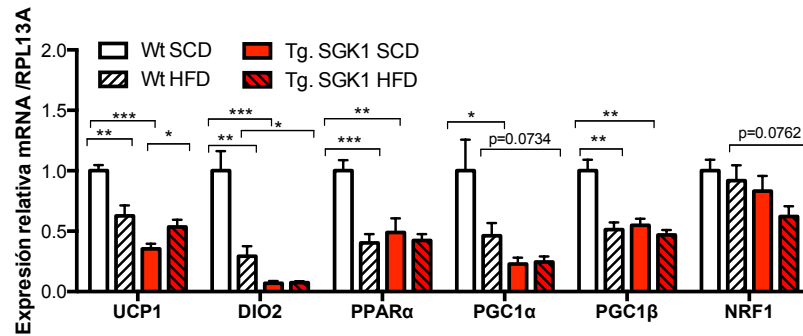


Figura 28. La expresión de los marcadores de termogénesis disminuye con HFD. Se extrajo el mRNA total de tejido adiposo pardo de animales Wild type y B6.Tg.sgk1 tras 6 semanas con SCD o HFD. Cantidades relativas de mRNA respecto a RPL13A, estimaciones mediante método doble delta Ct. Los valores se representan como la MEDIA \pm SEM (n=6).t test (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001).

6.2.8 Marcadores de inflamación

La obesidad es considerada como un estado crónico de inflamación de bajo grado, en el cual el tejido adiposo parece ser un sitio diana de los procesos inflamatorios. Para estudiar los cambios producidos por la hipertrofia de los adipocitos y entender mejor los mecanismos de inflamación que podrían acompañar estos cambios, se analizó la expresión de marcadores de inflamación en muestras de tejido adiposo epididimal de individuos *wild type* y B6.Tg.sgk1 en SCD (exceptuando IL-1, cuya expresión es muy baja y por ello no se tuvo en cuenta para el análisis) o HFD. Los marcadores de inflamación aumentan en ambos genotipos con la dieta alta en grasa. Además los animales transgénicos alimentados con HFD presentan una mayor abundancia de IL-6 (2.23 en Wt vs 4.76 en B6.Tg.sgk1), TNF α (5.90 en Wt vs 13.73 en B6.Tg.sgk1) y MCP1 (1.91 en Wt vs 21.01 en B6.Tg.sgk1) en comparación con los Wt HFD (Figura 29).

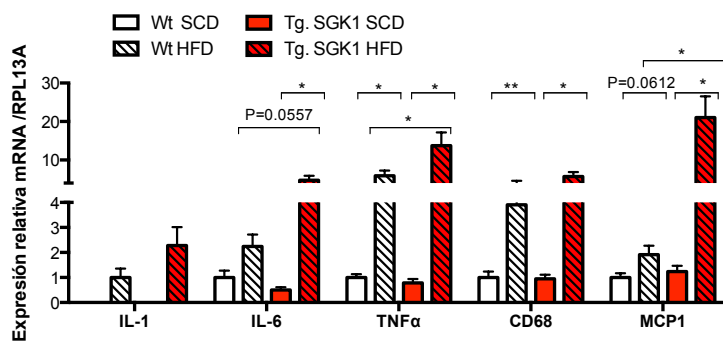


Figura 29. Expresión de marcadores de inflamación exacerbada Tg. SGK1 inducida por HFD. Se extrajo el mRNA total de tejido adiposo epididimal de animales Wild type y B6.Tg.sgk1 tras 6 semanas con SCD o HFD. Cantidades relativas de mRNA respecto a RPL13A, estimaciones mediante método doble delta Ct. Los valores se representan como la MEDIA \pm SEM (n=6). t test (* p <0.05, ** p <0.01)

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

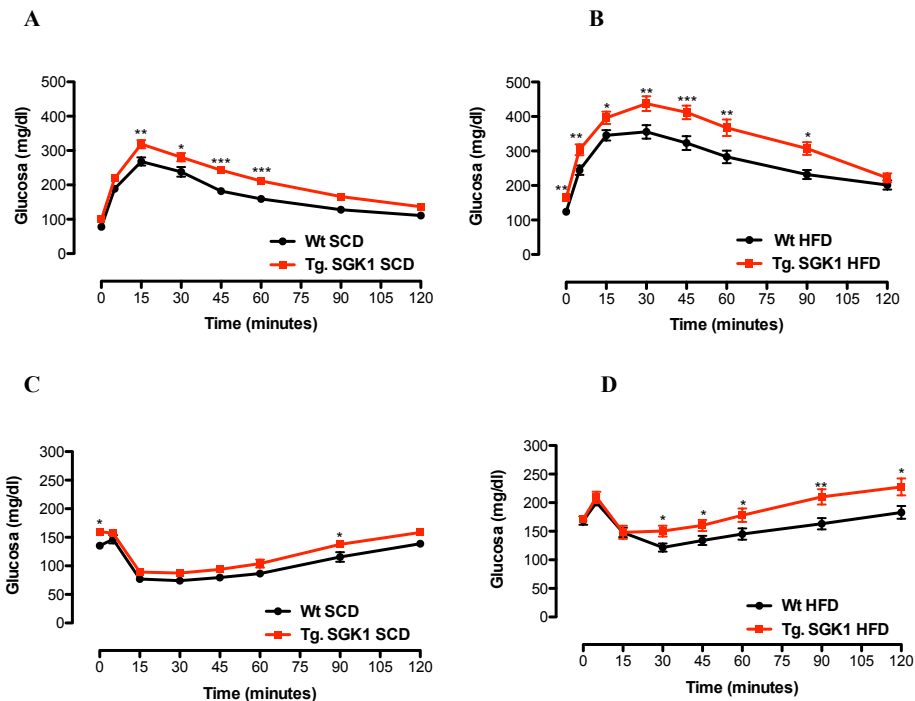
Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

6.2.9 Los ratones Tg. SGK1 muestran mayores desajustes en la homeostasis de la glucosa

Para profundizar en el estudio de los cambios metabólicos producidos en los animales transgénicos con dieta alta en grasa, realizamos un análisis de la homeostasis de la glucosa a través de los test de tolerancia a la insulina (ITT) y tolerancia a la glucosa (GTT). Estos tests se realizaron en individuos *wild type* y B6.Tg.sgk1 a la quinta semana con SCD o HFD en ratones machos y hembras. En ratones machos se realizaron dos experimentos separados en el tiempo con individuos en SCD y HFD, los valores representados corresponden a la media de ambos experimentos. Observamos, a través de los tests GTT (Figura 30A) e ITT (Figura 30C) que los animales B6.Tg.sgk1 en SCD ya presentan dificultades en la regulación de la concentración de glucosa en comparación con los animales *wild type*. Estas diferencias se acentúan con la dieta alta en grasa, donde observamos tanto en GTT (Figura 30B), como en ITT (Figura 30D) un mayor desajuste en los mecanismos de homeostasis de la glucosa en los animales B6.Tg.sgk1. Asimismo, podemos observar en la representación del área bajo la curva (AUC) de los test GTT (Figura 30E) e ITT (Figura 30F) como los animales transgénicos tanto en SCD como en HFD presentan alteraciones en la homeostasis de la glucosa.



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

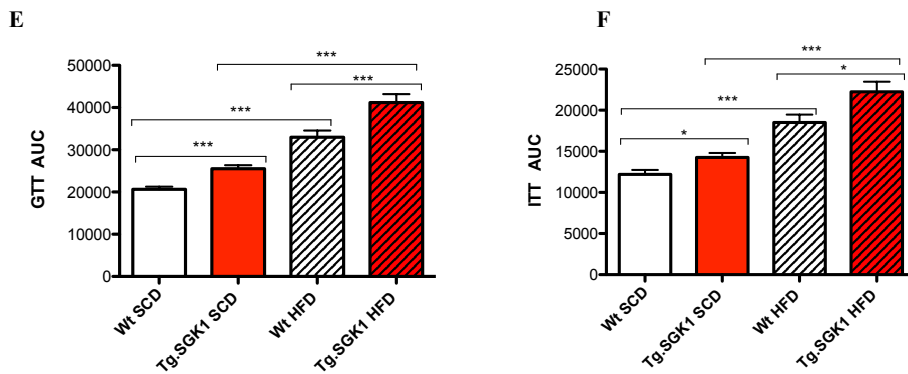
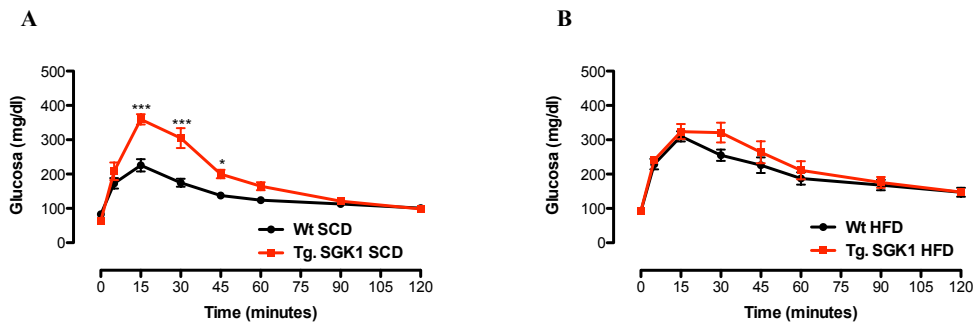


Figura 30. Los animales B6.Tg.SGK1 presentan dificultades en la homeostasis de la glucosa. GTT e ITT en ratones macho wild type y B6.Tg.sgk1 a la quinta semana de tratamiento con SCD o HFD (n=16). (A) y (B) GTT. (C) y (D) ITT. ANOVA de dos vías seguido de comparación múltiple de Bonferroni. (E) GTT AUC. (F) ITT AUC. ANOVA de una vía seguido de comparación múltiple de Bonferroni. Los valores representados son MEDIA ± SEM (*p<0.05, **p<0.01, *p<0.001).**

En ratones hembras observamos que los valores de glucosa para los individuos B6.Tg.sgk1 en SCD están por encima de los valores para los individuos *wild type*, en GTT (Figura 31A), sin diferencias significativas en ITT (Figura 31B). Con HFD las hembras no presentan diferencias entre genotipos en GTT (Figura 31C), sin embargo en ITT los animales transgénicos presentan valores más elevados de glucosa (Figura 31D). Asimismo, podemos observar que el valor AUC de los test GTT (Figura 31E) e ITT (Figura 31F) indica que las diferencias producidas entre genotipos y tipos de dieta son más sutiles que en el caso de los machos.



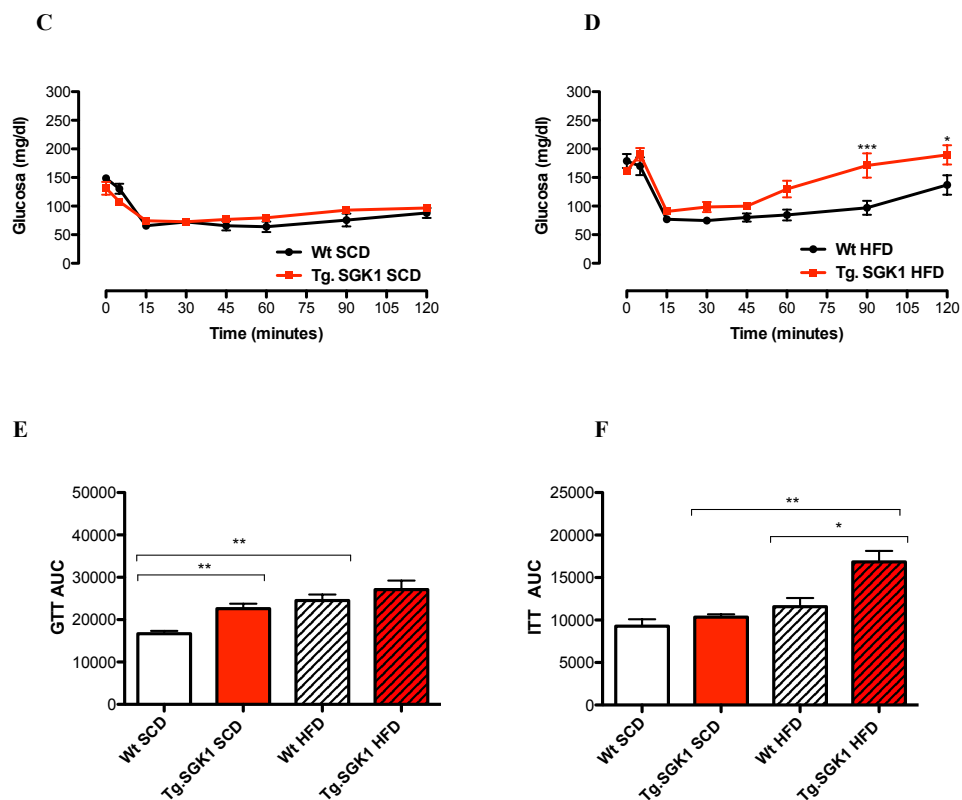


Figura 31. Los animales B6.Tg.sgk1 presentan dificultades en la homeostasis de la glucosa. GTT e ITT en ratones hembra wild type y B6.Tg.sgk1 a la quinta semana de tratamiento con SCD o HFD (n=6). (A) y (B) GTT. (C) y (D) ITT. ANOVA de dos vías seguido de comparación múltiple de Bonferroni. (E) GTT AUC. (F) ITT AUC. ANOVA de una vía seguido de comparación múltiple de Bonferroni. Los valores representados son MEDIA ± SEM (*p<0.05, **p<0.01, *p<0.001).**

6.2.10 Disminución en la expresión de proteínas de la vía de señalización de la insulina en

B6.Tg.sgk1 HFD

Debido a que la dieta alta en grasa induce resistencia a la insulina más acentuada en los animales B6.Tg.sgk1 (Figura 30), decidimos cuantificar la expresión de proteínas de la ruta de señalización de la insulina en muestras de tejido adiposo epididimal de ratones *wild type* y transgénicos tras 6 semanas con HFD. En los animales B6.Tg.sgk1 la expresión del receptor de insulina está aumentada (InsR), sin embargo hay una disminución en la activación de IRS1, AKT y Glut 4 (Figura 32).

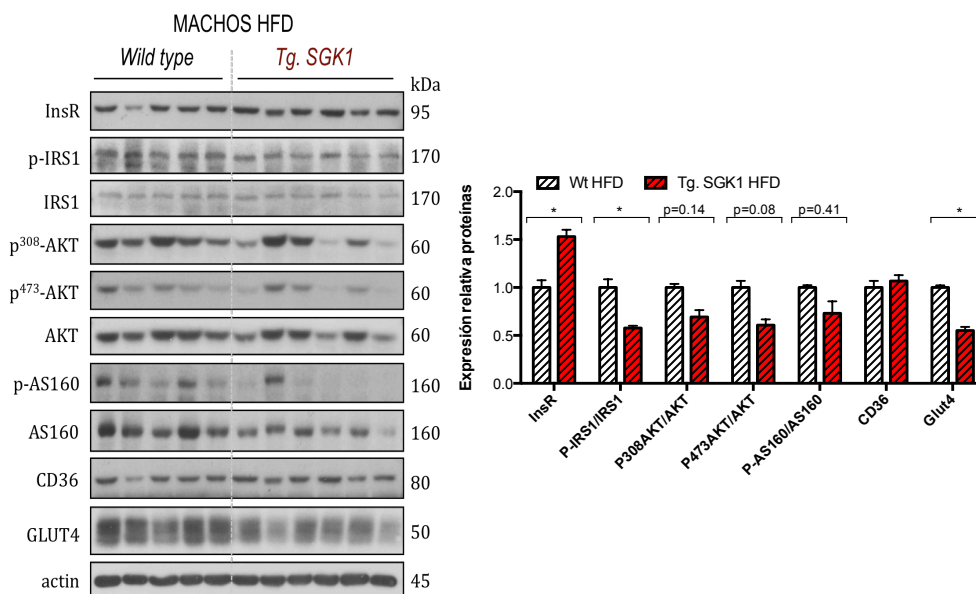


Figura 32. Efecto del aumento de actividad de SGK1 en la vía de señalización de la insulina. Western blot en muestras de tejido epididimal de animales *wild type* y B6.Tg.sgk1 tras 6 semanas en HFD (n=5) con diferentes anticuerpos (tabla X apartado 5.11) para proteínas de la ruta de señalización de la insulina. Los valores se representan como la MEDIA ± SEM. t test (*p < 0.05).

6.2.11 Perfil bioquímico alterado en animales B6.Tg.sgk1 bajo dieta alta en grasa (HFD)

Para determinar los parámetros que pudiesen estar alterados por la dieta alta en grasa en los animales B6.Tg.sgk1, se analizaron muestras de plasma de animales *wild type* y B6.Tg.sgk1 tras 6 semanas de HFD, encontrándose en estos últimos un aumento significativo en la concentración de insulina y en la de triglicéridos, sin encontrar alteraciones significativas en el resto de los analitos examinados (Tabla 10).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 828672		Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS		Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ		28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ		29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO		11/12/2016 10:56:17

PARÁMETRO	Wt HFD	Tg. SGK1 HFD
INSULINA (ng/ml)	1.66572 ± 0.153202	5.514062 ± 0.884034 **
COLESTEROL (mg/ml)	99.45 ± 6.363	96.20 ± 4.528
TRIGLICÉRIDOS (mg/dl)	82.83 ± 9.830	123.7 ± 11.65 *
GLUCOSA (mg/dl)	123.8 ± 6.750	133.2 ± 8.142
CREATININA (mg/dl)	0.0950 ± 0.009916	0.09333 ± 0.009545
ÁCIDOS GRASOS LIBRES (mmol/dl)	6.989889 ± 0.791123	8.025253 ± 0.525121
PROTEÍNA C REACTIVA (mg/l)	0.0050 ± 0.002236	0.001667 ± 0.001667

Tabla 10. Aumento en los niveles de insulina y triglicéridos plasmáticos en los animales B6.Tg.sgk1. Valores obtenidos en plasma de animales wild type y B6.Tg.sgk1 tras 6 semanas en HFD (n=6). Los valores se representan como la MEDIA ± SEM. t test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

6.2.12 Aumento de esteatosis hepática en ratones B6.Tg.sgk1 con HFD

Además del incremento de triglicéridos en sangre, se observó en secciones de hígado de 5 µm teñidas con h/e una clara acumulación de grasa en muestras de los animales B6.Tg.sgk1 (Figura 33A). Por ello, se decidió obtener una cuantificación de la esteatosis hepática analizando el contenido en triglicéridos en muestras de hígado de estos animales, donde se observa una tendencia al aumento en este parámetro (Figura 33B).

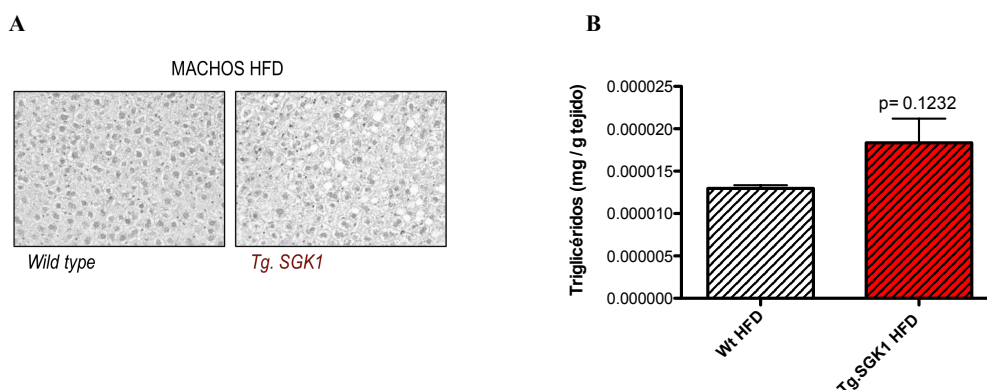


Figura 33. Los animales B6.Tg.sgk1 presentan esteatosis inducida por HFD. (A) Imágenes representativas secciones de hígado de animales wild type y B6.Tg.sgk1 tras 6 semanas en HFD. **(B)** Cuantificación del contenido en triglicéridos en muestras de hígado. Los valores se representan como MEDIA ±SEM. t test.

6.2.13 El exceso de actividad de SGK1 produce hipertensión inducida por dieta alta en grasa

Se realizaron medidas de presión arterial en individuos *wild type* y B6.Tg.sgk1 macho alimentados con dieta estándar y en los mismos individuos tras cuatro semanas con dieta alta en grasa. En dieta normal no se observan diferencias en la presión sistólica (SBP) entre genotipos (mmHg : 106 ± 6.144 en *wild type* vs 109 ± 5.798 en B6.Tg.sgk1) como ya habíamos visto en otros grupos de ratones (ver *Figura 11A*). Sin embargo, se produce un aumento significativamente superior en la SBP de los individuos transgénicos tras cuatro semanas de dieta alta en grasa (117 ± 3.724 en *wild type* vs 134 ± 6.275 en B6.Tg.sgk1)(*Figura 34*).

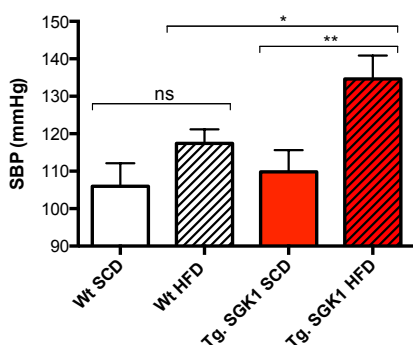


Figura 34. El exceso de actividad de SGK1 produce hipertensión inducida por una dieta alta en grasa (HFD). Medidas de SBP obtenidas por el método tail-cuff en individuos Wt y B6.Tg.sgk1 con dieta estándar (SCD) o tras cuatro semanas con dieta alta en grasa (HFD). (n=9 en *wild type* y n=10 en B6 Tg. SGK1). Los valores se representan como la MEDIA \pm SEM (n=5). t test (*p < 0.05, **p < 0.01).

6.2.14 La dieta alta en grasa induce albuminuria y disminución de GFR en B6.Tg.sgk1

Puesto que encontramos cambios en la presión arterial sistólica inducidos por una dieta alta en grasa en los individuos transgénicos, nos planteamos si podrían existir alteraciones en la función renal. Para ello, en un primer experimento analizamos muestras de orina de individuos *wild type* y B6.Tg.sgk1 macho tras tres semanas de dieta alta en grasa (HFD) para determinar la relación albúmina/creatinina. Nos encontramos que esta proporción tiene una tendencia de aumento en animales transgénicos en comparación con animales *wild type* (mg/g : 2.982 ± 1.018 en *wild type* vs 12.840 ± 4.059 en B6.Tg.sgk1) (*Figura 35A*).

Por otra parte, en un segundo experimento, calculamos el índice de filtración glomerular (GFR) a través del método de aclaramiento de iohexol, en individuos *wild type* y B6.Tg.sgk1 macho en dieta estándar (SCD) y tras seis semanas de dieta alta en grasa (HFD). Los individuos *wild type* muestran un incremento en GFR con HFD ($\mu\text{l}/\text{min}$: 213.9 ± 21.16 vs 339.0 ± 51.66). Sin embargo los animales transgénicos tienen un GFR superior a los *wild type* en SCD y no sufren cambios con HFD (298.8 ± 26.63 vs 318.8 ± 42.33) (*Figura 35B*).

Firmado por:	Fecha:
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

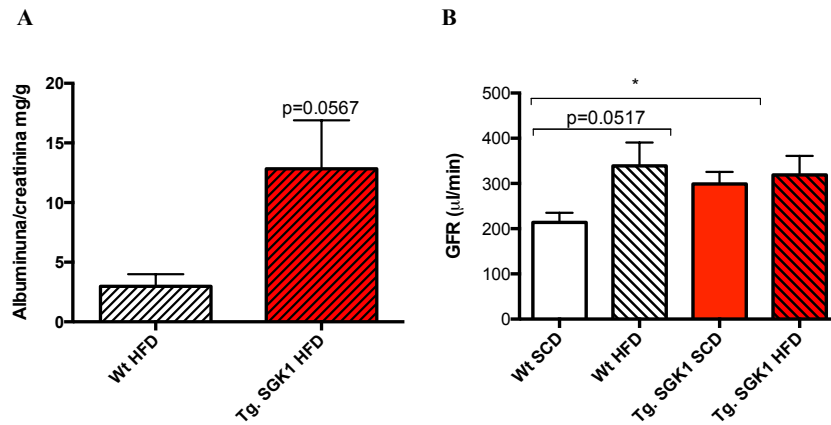


Figura 35. (A) Albuminuria exacerbada en B6.Tg.sgk1 HFD. La concentración de albúmina y creatinina se cuantificó en muestras de orina obtenidas en jaulas metabólicas a la tercera semana del tratamiento con dieta alta en grasa (HFD) en animales wild type y B6 tg. SGK1.t test con corrección de Welch (n=7). **(B) Tasa de filtración glomerular (GFR) disminuida en B6.Tg.sgk1 HFD.** GFR estimada por aclaramiento de iohexol aplicando un modelo farmacocinético simplificado de un compartimento. La medidas se realizaron con animales wild type y B6 Tg. SGK1 con dieta estándar (SCD) o tras seis semanas de tratamiento con dieta alta en grasa (HFD),paired t test (n=10 en Wild type SCD, n=8 en Wt HFD y n=7 en Tg. SGK1 SCD y HFD). Los valores se representan como la MEDIA±SEM. (*p<0.05; **p<0.01).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS

Fecha: 28/11/2016 10:59:05

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ

28/11/2016 11:47:29

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ

29/11/2016 14:09:00

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO

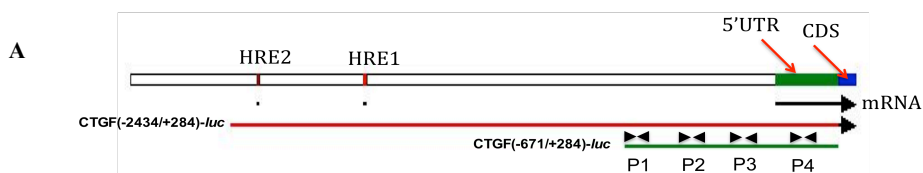
11/12/2016 10:56:17

6.3 Capítulo 3: Nuevos genes diana de MR implicados en procesos patológicos

6.3.1 CTGF como diana directa de MR

Mediante análisis del transcriptoma completo del ventrículo de corazón de ratones *wild type* y de ratones con sobreexpresión de MR en cardiomiocitos tratados o no con aldosterona, el laboratorio del Dr. F. Jaisser identificó una lista de 43 genes candidatos a ser dianas específicas de MR/aldosterona en el miocardio (Messaudi et al., 2013). De esta lista se eligió CTGF para un estudio más detallado dado su papel conocido en el desarrollo de fibrosis cardíaca (Vallon et al., 2006) y a su posible mediación de la fibrosis inducida por aldosterona. Con objeto de comprobar si este gen es realmente una diana directa de MR/aldosterona, se decidió clonar dos fragmentos de DNA genómico de 2 kpb o 1kpb corriente arriba del sitio de traducción (-2432/+284 y -671/+284 respectivamente) en un vector que contiene luciferasa de luciérnaga (Figura 36A). La cotransfección de MR con el vector de luciferasa sin promotor, así como la transfección de construcciones con el promotor de CTGF en ausencia de MR, no alteró la actividad luciferasa (datos no mostrados). En el ensayo de transactivación incluyendo las construcciones CTGF-luciferasa y expresión de MR, comprobamos que la aldosterona incrementa la actividad luciferasa. Este proceso depende de MR, ya que se inhibe con el antagonista de MR espironolactona (Figura 36B). Ambas construcciones con fragmentos del promotor de CTGF demostraron la misma inducción, indicando que la zona de respuesta a MR/aldosterona se encuentra en la zona -671/+284 respecto al origen de transcripción.

El análisis bioinformático de la región -2432/+284 del gen de CTGF no reveló ninguna secuencia consenso HRE, si bien se encontraron numerosas secuencias similares, particularmente dos situadas en la zona más proximal no esencial para la inducción de la actividad luciferasa (Figura 36A). Debido a ello, se realizó un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) con el objeto de detectar si existe unión directa de MR a la región -671/+284 del gen de CTGF. La unión de MR se evaluó con cuatro parejas de primers diferentes (Figura 36A). La aldosterona produjo un enriquecimiento de MR (≤ 10 veces) en el área del promotor de CTGF cubierta por la pareja de primers 3 (P3: ≈ 100 pb cadena arriba del sitio de inicio de la transcripción del promotor de CTGF), indicando un incremento de la unión de MR al promotor de CTGF cuando la aldosterona activa el receptor (Figura 36C). Estos resultados indican que el promotor de CTGF es una diana directa de MR/aldosterona y que la unión del receptor al DNA se produce en una región sin secuencias consenso canónicas para la unión del mismo.



Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

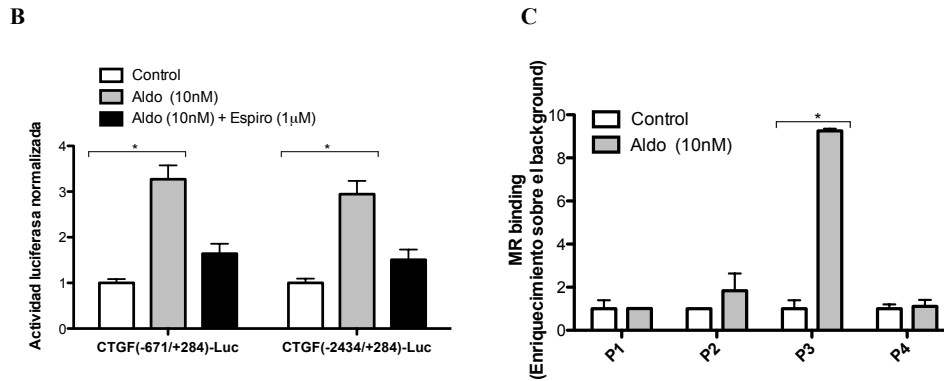


Figura 36. CTGF es una diana directa de MR/Aldosterona. (A) Representación esquemática del fragmento de genoma de ratón de CTGF utilizado para el constructo, las cabezas de flecha indican la ubicación de los primers utilizados para ChIP (B) Ensayo de actividad luciferasa (n=11). (C) Análisis por qPCR de la unión de MR al promotor de CTGF (n=3). Los valores se representan como la MEDIA ± SEM. T test

6.3.2 PTGDS como diana directa de MR en adipocitos

El análisis del transcriptoma de tejido adiposo visceral de ratones con sobreexpresión de MR en adipocitos, trabajo realizado en el laboratorio del Dr. F. Jaisser, reveló una amplia lista de genes cuya expresión está aumentada y que tienen relación con rutas de señalización del metabolismo. De entre estos genes se seleccionó a la prostaglandina D2 sintasa (PTGDS) por su conocido papel en la fisiopatología del tejido adiposo (Urbanet et al., 2015). Con objeto de comprobar si PTGDS es una diana directa de MR se realizó un análisis bioinformático de la secuencia genómica situada a 5' del inicio de la transcripción del gen. De esta manera, se identificó una secuencia (AGGACCAAATGTTCA) con alta similitud al HRE canónico (Polman et al., 2013) situada 425 pb cadena arriba del sitio de inicio de la transcripción. Para el análisis de esta zona del genoma decidimos clonar la región del gen de PTGDS entre -794 pb y +39 pb respecto al inicio de la transcripción, que incluye la secuencia HRE de interés, el primer exón (no codificante), el primer intrón y parte del segundo exón, hasta el codón de iniciación de la transcripción (Figura 37A). En este ensayo vemos que la aldosterona incrementa la actividad luciferasa de forma dependiente de MR, ya que este efecto se inhibe con el antagonista de MR espironolactona (Figura 37B). Asimismo, se realizaron curvas dosis respuestas con concentraciones crecientes de aldosterona (Figura 37C) o corticosterona (Figura 37D). En ambas la actividad luciferasa se incrementa con la concentración de corticoides con una afinidad aparente (EC50) consistente con las descritas anteriormente para la activación del receptor por estas hormonas. Estos datos indican que PTGDS es una diana de MR sin selectividad respecto

al ligando activador y sugieren que el receptor ejerce su función a través de una secuencia canónica HRE.

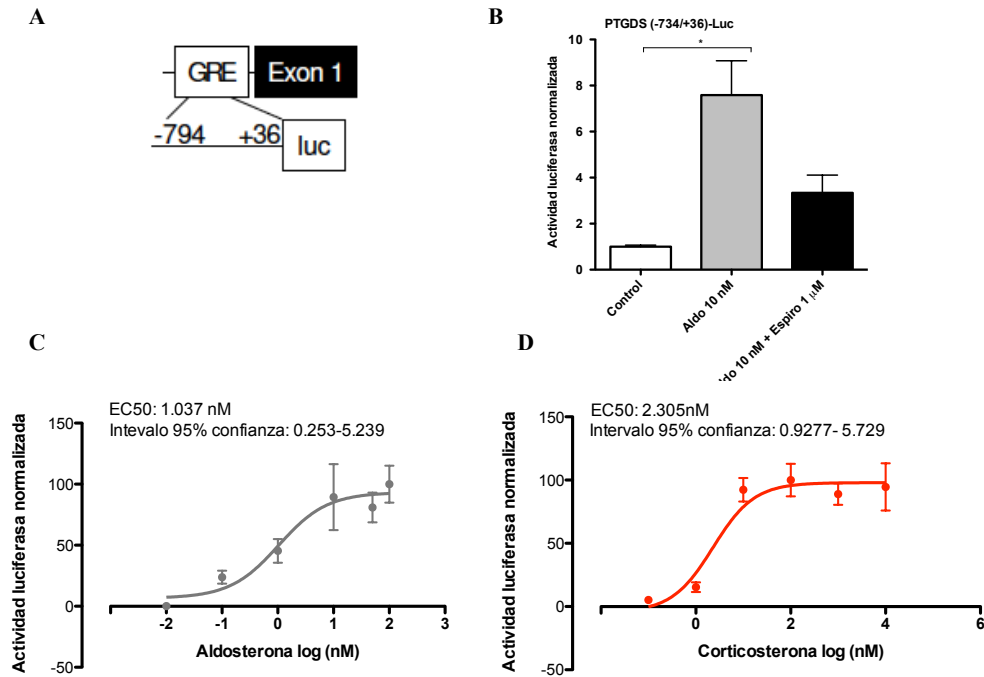
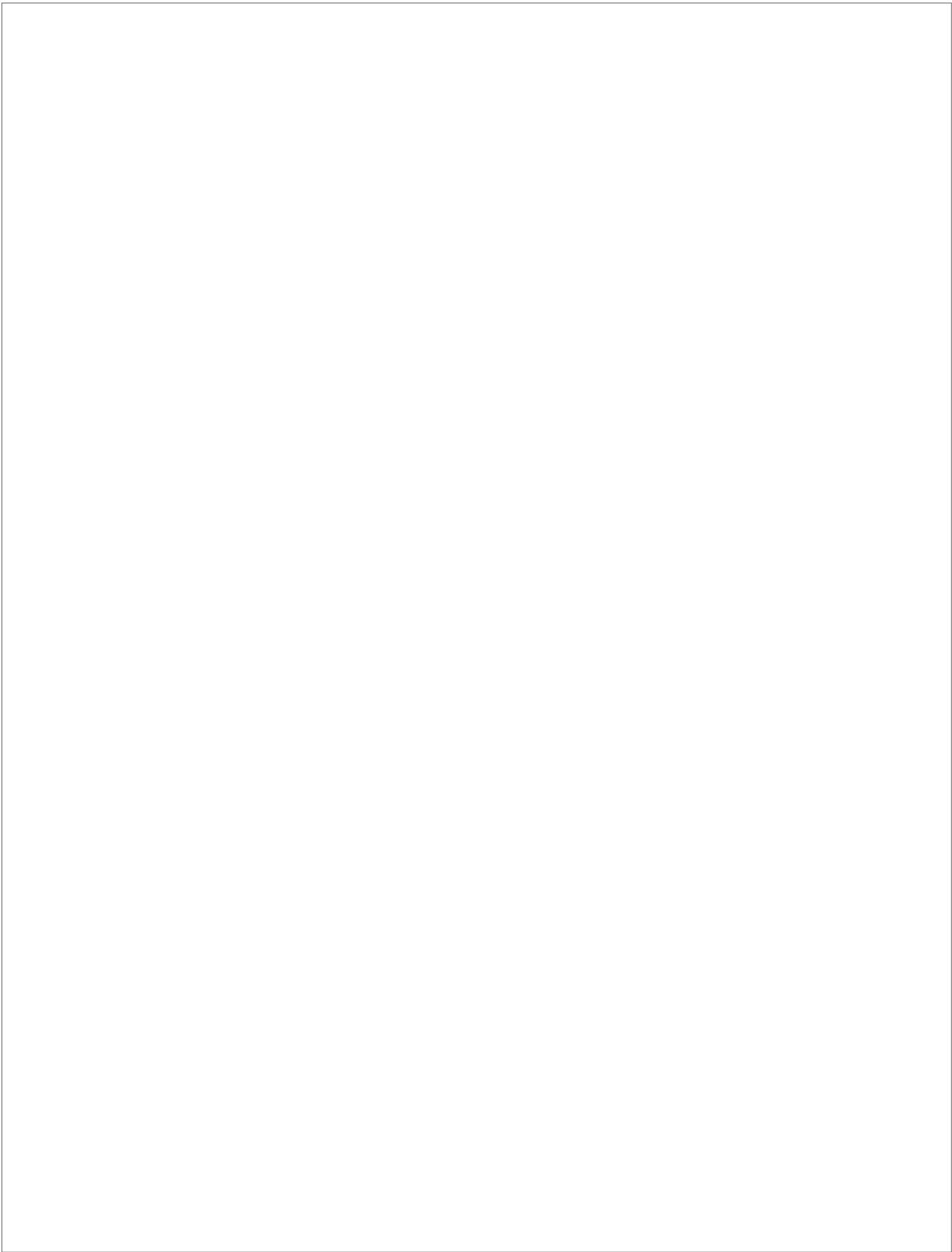


Figura 37. PTGDS en una diana directa de MR. (A) Representación esquemática del fragmento de genoma de ratón de PTGDS utilizado para el constructo (B) Ensayo de actividad luciferasa (n=3). (C) Ensayo de actividad luciferasa con concentraciones crecientes de aldosterona o (D) corticosterona (n=3). Los valores se representan como la MEDIA ± SEM. T test



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

Discusión

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS</i>	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ</i>	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ</i>	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO</i>	11/12/2016 10:56:17



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS</i>	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ</i>	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ</i>	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO</i>	11/12/2016 10:56:17

7 Discusión

El receptor de mineralocorticoides transduce los efectos de la aldosterona sobre la homeostasis mineral, el control del volumen extracelular y la regulación de la presión arterial. Sin embargo, MR se expresa en otros tejidos no relacionados directamente con estos procesos, donde puede ser activado tanto por mineralocorticoides como por glucocorticoides. Una activación inapropiada de MR resulta en actividad pro-fibrótica y pro-inflamatoria en los sistemas cardiovascular y renal, independientemente de sus efectos sobre la presión arterial. Más recientemente, se ha descrito que la sobreactivación de MR conduce al desarrollo de obesidad y síndrome metabólico. Los antagonistas de MR se utilizan en clínica como agentes protectores cardiovasculares, independientemente de su actividad como antihipertensivos. Además se ha visto que mejoran la tolerancia a la glucosa, la resistencia a la insulina y los niveles plasmáticos de triglicéridos y citoquinas pro-inflamatorias en modelos preclínicos. Sin embargo, el antagonismo farmacológico de MR puede producir efectos adversos que incluyen la hiperpotasemia, disfunción sexual e hipovolemia. Por ello, la identificación de genes que simultáneamente puedan ser mediadores de varios de los efectos negativos de MR tendría un gran interés desde el punto de vista terapéutico. En este contexto estudiamos SGK1, diana transcripcional de MR que aumenta la reabsorción tubular de Na⁺ y el apetito por la sal y que ha sido implicada en el desarrollo de distintas enfermedades fibróticas y está involucrada en el proceso de adipogénesis. Este trabajo investiga el papel de SGK1 en procesos inducidos por MR que aumentan el riesgo cardiovascular, como la hipertensión, el desarrollo de síndrome metabólico y el daño renal. Por primera vez se utiliza un modelo con un aumento sistémico de actividad de SGK1, que representa una aproximación más lógica a la realidad fisiopatológica en contraposición con modelos de sobreexpresión de la misma o *knockout* del gen de esta quinasa. Por otra parte, en este trabajo se identificaron nuevos genes diana de MR que pueden estar implicados en el desarrollo de enfermedad cardiovascular directa o indirectamente.

7.1 Influencia de un exceso de actividad de SGK1 sobre el desarrollo de hipertensión arterial, daño renal y daño cardiovascular

En nuestro modelo de estudio, se observa que el aumento de la presión arterial inducido por el tratamiento NPX-DOCA/Sal es superior en los animales con exceso de actividad de SGK1. Esto sugiere que la quinasa podría constituir un factor de riesgo para el desarrollo de hipertensión arterial en casos en los que su actividad sea inapropiada o bien cuando su expresión esté aumentada por un exceso de señalización por mineralocorticoides. Esto es consistente con datos obtenidos en poblaciones humanas que relacionan la presencia de polimorfismos en el gen de SGK1 con un aumento en la presión arterial (von Wöhrn et al., 2005). Desde el punto de vista mecanístico, el efecto de SGK1 sobre la presión arterial podría explicarse debido a la influencia, previamente descrita, que ejerce esta quinasa sobre el apetito por la sal y la reabsorción tubular

Firmado por:	Fecha:
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

de Na⁺ (Vallon et al., 2005). Nuestros datos indican que la ingesta de sal en los individuos transgénicos tiene una tendencia a ser superior a la de los *wild type* lo cuál podría ser responsable, al menos en parte, del aumento exacerbado en la presión arterial. Por otra parte, el exceso de actividad de SGK1 estimularía una mayor reabsorción de Na⁺ en el riñón, circunstancia que también contribuye al desarrollo de hipertensión. Estudios previos en ratones *Sgk1*^{-/-} muestran que 14 días de tratamiento con DOCA/Sal en ausencia de nefrectomía unilateral, producen una elevación de la presión arterial en estos individuos, así como en individuos *wild type* (Artunc et al., 2006). Nuestros experimentos no lograron reproducir la observación de estos autores en individuos *wild type*, ya que en ausencia de nefrectomía unilateral no se observaron cambios en la presión arterial con el tratamiento DOCA/Sal. De hecho, el modelo habitual de desarrollo de hipertensión en ratones por exceso de mineralocorticoides, incluye, además del uso de DOCA/Sal, el procedimiento de nefrectomía unilateral (Rickard et al., 2009, Rickard et al., 2014, Lothar et al., 2016). Por otra parte, los animales *knockout Sgk1*^{-/-} en dieta normal y sin tratamiento, presentan una presión arterial normal a expensas de una elevación de los niveles plasmáticos de aldosterona (Wulff et al., 2002). Sin embargo, en una dieta pobre en Na⁺ estos animales no pueden activar de forma máxima la reabsorción renal de Na⁺ y, por tanto, se produce una disminución en la presión arterial (Wulff et al., 2002). Estos datos indican que la regulación de la presión arterial por mineralocorticoides a través de MR depende de varios genes y si bien SGK1 no es imprescindible en condiciones normales, es necesario para una reabsorción máxima de Na⁺. Esta idea es consistente con nuestros datos que muestran que un exceso de actividad de SGK1 conduce a un aumento agravado de la presión arterial, pudiéndose explicar este efecto, al menos en parte, por una reabsorción renal de Na⁺ aumentada. Este aumento en la reabsorción de Na⁺ y, en consecuencia, en la presión arterial con el tratamiento NPX-DOCA/Sal disminuiría la secreción renal de renina, lo que produciría una disminución en la concentración sérica de aldosterona. De hecho, este fenómeno se observa en ambos genotipos, siendo más notable en los animales transgénicos incluso en ausencia de tratamiento DOCA/Sal.

Por otra parte, se sabe que MR tiene capacidad de controlar la presión arterial a través de su función en otros tejidos, como por ejemplo a través de su función central aumentando la actividad del sistema nervioso simpático (Gomez-Sanchez and Gomez-Sanchez, 2012) o a través de su activación en VMSCs (McCurley et al., 2012) o células endoteliales (Lothar et al., 2016). La delección de MR en células endoteliales de ratón no evita la hipertensión inducida por DOCA/Sal, sugiriendo que el exceso de SGK1 en este tipo celular no sería relevante para el proceso (Rickard et al., 2014). MR en VMSCs es importante para la reactividad vascular y puede contribuir a la elevación de la presión arterial (McCurley et al., 2012), si bien no se conocen los genes mediadores de este efecto, pudiendo ser uno de los ellos SGK1.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 828672	Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

Los efectos del exceso de sal y mineralocorticoides sobre el sistema cardíaco y renal pueden ser directos o consecuencia del desarrollo de hipertensión arterial. Se sabe que la hipertensión induce albuminuria y fibrosis renal (Kang et al., 2002, Shindo et al., 2002, Fiebeler et al., 2005). En estudios previos comparando ratones *Sgk1^{-/-}* con *wild type*, tratados con DOCA/Sal, a pesar de presentar presiones arteriales similares, solo en los *wild type* aparece albuminuria severa y mayor desarrollo de fibrosis renal (Artunc et al., 2006). Esto sugiere que el efecto del exceso de mineralocorticoides sobre la albuminuria podría ser, al menos en parte, directo. En nuestras observaciones, el incremento de actividad de SGK1 produce hiperfiltración glomerular con el tratamiento NPX-DOCA/Sal. En nefropatía diabética los pacientes suelen comenzar con un aumento de GFR seguido de proteinuria. En etapas avanzadas GFR disminuye debido al engrosamiento de la lámina basal glomerular y cambios en los podocitos y células mesangiales. El crecimiento anormal de estas últimas comprime los capilares glomerulares e impide el flujo de la sangre lo que contribuye a una disminución de GFR (Kimura, 2005). Esto nos sugiere un daño incipiente en nuestro modelo de estudio, y que en etapas avanzadas de la enfermedad los animales transgénicos podrían acabar sufriendo consecuencias en la función renal, y por tanto, una disminución en GFR. Asimismo, el incremento de actividad de SGK1 produce albuminuria exacerbada con el tratamiento NPX-DOCA/Sal. La albuminuria, a su vez favorece el desarrollo de fibrosis renal. De acuerdo con esta idea, observamos que el tratamiento NPX-DOCA/Sal conduce a un mayor desarrollo de fibrosis glomerular, tubulointersticial y perivascular en la corteza renal de los individuos B6.Tg.sgk1. El desarrollo de fibrosis implica un aumento en la deposición de colágeno en la matriz extracelular. Por ello medimos la expresión de distintos tipos de colágeno en corteza renal, produciéndose un aumento en la expresión de colágenos I y IV en ambos genotipos con el tratamiento NPX-DOCA/Sal. Es importante resaltar que existe una pequeña inducción en la expresión de colágeno IV en animales transgénicos tratados con vehículo en comparación con los individuos *wild type*, acentuándose estas diferencias entre genotipos con el tratamiento. El colágeno III no sufre cambios en la expresión con el tratamiento NPX-DOCA/Sal en corteza renal. Este tipo de colágeno suele asociarse con el desarrollo de fibrosis cardíaca y vascular (Lopez-Andres et al., 2011, Lopez-Andres et al., 2012). El desarrollo de fibrosis en la corteza renal implica la regulación de distintos factores, en parte podría ser debido a la sobreexpresión de TGF- β (Wolf et al., 2004). SGK1 es una diana transcripcional de éste factor (Waldegger et al., 1999) y contribuye a la estimulación de la deposición de la matriz proteica durante la enfermedad fibrótica (Friedrich et al., 2002, Feng et al., 2005, Vallon et al., 2006, Terada et al., 2008). En nuestro modelo, la expresión de TGF- β sufre un pequeño aumento en ambos genotipos con el tratamiento con NPX-DOCA/Sal. Además, se sabe que SGK1 estimula al factor NF κ B (Zhang et al., 2005), que a su vez estimula la expresión de CTGF (Blom et al., 2002) que promueve la formación de la matriz proteica. La inducción de CTGF por SGK1 se ha demostrado tanto en tejido cardíaco (Vallon et al., 2006)

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por:	Fecha:
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

como en tejido renal (Artunc et al., 2006). En nuestro caso, únicamente testamos la expresión de CTGF en corteza renal, donde vemos una inducción de su expresión en animales B6.Tg.sgk1 con el tratamiento NPX-DOCA/Sal. Por otra parte, SGK1 también es inducido por concentraciones excesivas de glucosa participando en ese contexto en la formación de fibronectina (Feng et al., 2005). Es interesante resaltar que la sobreexpresión de SGK1 por si sola no estimula la formación de fibronectina a concentraciones normales de glucosa, pero si a concentraciones altas. Aparentemente, la formación de matriz proteica no ocurre solo por un aumento en la expresión de SGK1, requiriendo otros mecanismos dependientes de glucosa o mineralocorticoides. En nuestro modelo, el tratamiento con NPX-DOCA/Sal produce un aumento en la expresión de fibronectina, siendo mayor en los animales con aumento de actividad de SGK1. Resalta el hecho de que en ausencia de tratamiento también existe una pequeña inducción de la expresión de fibronectina en los animales transgénicos en comparación con los *wild type*.

La importancia de la fibrosis en la progresión de CKD radica en la producción de glomeruloesclerosis y en la fibrosis tubulointersticial, íntimamente relacionadas con la pérdida de función renal. Las características clave de la fibrosis renal son la extensa deposición de matriz extracelular y la expansión de la población de fibroblastos. La fibrosis renal también está relacionada con la infiltración de monocitos y alteraciones fenotípicas o pérdida de células residentes renales. Las respuestas inflamatorias mediadas por monocitos/macrófagos están involucradas en la progresión de las enfermedades renales inducidas por hipertensión. El reclutamiento de monocitos/macrófagos y la sobreexpresión de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas contribuye al desarrollo de inflamación. Mecánicamente, la infiltración de monocitos está regulada por proteínas quimioatrayentes de monocitos (MCPs) (Wang et al., 2015). Por ello, testamos la expresión de MCP1 en corteza renal, comprobando que su expresión aumenta en ambos genotipos con el tratamiento NPX-DOCA/Sal. Por otra parte, los fibroblastos son células residentes mesenquimales incluidas en la matriz extracelular o el estroma de tejidos conectivos. El término miofibroblastos se otorga a aquellos fibroblastos que han desarrollado alguna de las características estructurales y funcionales de células de músculo liso. En riñones sanos virtualmente no hay expresión de α -SMA aparte de en las VSMCs de los vasos renales. En la fibrosis renal se observa una sobreexpresión de este marcador, que parece ser lo suficientemente específico para distinguir miofibroblastos de otras células mesenquimales si se analiza estrictamente en el espacio peritubular. Sin embargo, α -SMA no se expresa en todos los miofibroblastos (Boor and Floege, 2012). Nuestros resultados demuestran que el tratamiento con NPX-DOCA/Sal conduce a un pequeño aumento en la expresión de α -SMA en corteza renal de ambos genotipos.

Por último en relación con los marcadores de daño renal, el tratamiento NPX-DOCA/Sal conduce a un mayor daño tubular en los animales B6.Tg.sgk1 según indican los niveles de

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 828672	Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

expresión de NGAL, un marcador que es rápida y potentemente regulado tras una lesión tubular (Waring and Moonie, 2011, Fiseha and Tamir, 2016).

Nuestro estudio indica que un aumento sistémico de actividad de SGK1 agrava las consecuencias de una exposición crónica a mineralocorticoides y sal. Como resultado, los animales transgénicos muestran una mayor presión arterial sistólica y albuminuria exacerbada, así como un mayor desarrollo de fibrosis renal e hipertrofia glomerular. Estos cambios se traducen en una regulación diferenciada de marcadores genéticos de fibrosis y daño renal. Con el fin de localizar nuevos genes que pudiesen estar potencialmente implicados en el proceso patológico inducido por NPX-DOCA/Sal y agrabado en los animales transgénicos realizamos un análisis completo del transcriptoma, comparando entre animales *wild type* y transgénicos sometidos a este tratamiento. El resultado de este experimento proporcionó una lista de 77 genes con aumento significativo de expresión y 24 con disminución significativa de expresión en B6.Tg.sgk1. Esta es una lista relativamente corta de posibles genes regulados por SGK1 si se compara con los resultados normalmente obtenidos en análisis globales de regulación del transcriptoma. Este hecho puede tener dos explicaciones posibles no excluyentes mutuamente. Por una parte, el análisis de los resultados se realizó utilizando un algoritmo que favorece la consistencia en los niveles de expresión intra-grupo, eliminando genes cuya variación entre las muestras de un mismo grupo sea elevada. Por otra parte, estos resultados podrían indicar que la señalización mediada por SGK1 si bien se sabe que puede afectar a la actividad de factores de transcripción como Foxo1, no conduce a la regulación de un elevado número de genes. En cualquier caso, partiendo de la lista obtenida de genes candidatos, decidimos validar mediante qPCR algunos de ellos cuyas características pudieran ser interesantes desde el punto de vista fisiopatológico, ampliando el análisis a los cuatro grupos de estudio (*wild type* y B6.Tg.sgk1 con nefrectomía y tratados o no con DOCA/Sal).

En este contexto estudiamos *cpb2* cuya expresión pudimos comprobar que depende fuertemente de la expresión del transgén (aproximadamente 60 veces superior en B6.Tg.sgk1) independientemente del tratamiento. La proteína de Cpb2, también conocida como TAFI (*Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor*), se sintetiza principalmente en el hígado y es secretada como zimógeno, se activa por proteólisis y reduce la fibrinólisis eliminando los residuos en el extremo carboxilo-terminal de la fibrina que son importantes para la unión y activación del plaminógeno. TAFI ha sido implicada en procesos fibróticos y cicatrización (Bajzar et al., 1995), aunque su papel en fibrosis tubulointersticial sigue siendo desconocido. Estudios *in vitro* han demostrado que el bloqueo de la actividad de TAFI está asociado con una disminución de la acumulación de matriz extracelular (Atkinson et al., 2013). Varios estudios en ratones transgénicos y *knockout* también indican que la modulación del sistema fibrinolítico puede alterar la respuesta al daño reduciendo la fibrosis renal o mejorando la función renal (Oda et al., 2001, Yang et al., 2002, Matsuo et al., 2005). Sin embargo, los datos obtenidos

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 828672	Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

examinando los efectos en daño renal de TAFI en ratones *knockout* son contradictorios en referencia a los datos obtenidos en otros modelos de estudio (Bruno et al., 2008a, Bruno et al., 2008b). Los trabajos que comparan ratones deficientes en TAFI con individuos *wild type* en el modelo de fibrosis inducida por obstrucción uretral unilateral (UUO) apuntan a que los individuos transgénicos tienen un aumento de actividad de plasmina y metaloproteinasas que inducen la deposición de colágeno en el intersticio renal. Se sabe que la plasmina induce la fibrosis renal intersticial en el modelo de UUO promoviendo la activación de TGF- β y metaloproteinasas. Por tanto, TAFI parece proteger contra el desarrollo de fibrosis renal intersticial en nefropatía obstructiva (Bruno et al., 2008a). Estas diferencias entre modelos podrían deberse a estímulos profibróticos distintos en cada uno, aunque tampoco puede descartarse la posibilidad de efectos compensatorios por otras vías alternativas. Estudios más recientes basados en observaciones clínicas y preclínicas de elevación de actividad TAFI y disminución de actividad de plasmina en disfunción renal han examinado el efecto del bloqueo de TAFI con un inhibidor específico (UK-396082) en un modelo de nefrectomía subtotal en rata (5/6). En este estudio la inhibición de TAFI se relaciona con una mejoría en la función renal (disminuye creatinina sérica, nitrógeno ureico en sangre -BUN- y proteinuria), una disminución en el desarrollo de fibrosis tubulointersticial y glomerular así como una disminución del desarrollo de glomerulosclerosis y de marcadores de daño renal en orina, entre ellos NGAL y KIM-1 (Atkinson et al., 2015). En nuestro modelo existe una relación directa entre el aumento de actividad de SGK1 y el aumento en la expresión de *cpb2* en riñón que tal vez pudiera intervenir en esa predisposición que padecen los animales transgénicos a padecer daño renal. Así, podrían ser factores a tener en cuenta el hecho de que en ausencia de tratamiento los animales transgénicos con nefrectomía unilateral presentan mayor hipertrofia glomerular y un aumento en la expresión de colágeno IV y fibronectina en comparación con los individuos *wild type*.

La serpin3b (*serine or cysteine peptidase inhibitor, clade A, member 3B*) muestra el mismo patrón de expresión que *cpb2*, con una expresión muy aumentada en animales transgénicos (unas 800 veces) independientemente del tratamiento. Las serpinas pertenecen a una superfamilia de inhibidores de proteasas muy diversas funcionalmente. La mayoría de los miembros de esta familia son inhibidores de proteasas de serina. Sin embargo, algunas serpinas tienen otras funciones no relacionadas con la inhibición de la actividad catalítica, como transportadores de hormonas (por ejemplo glucocorticoides) y regulación de la presión arterial (Silverman et al., 2001). Además las serpinas tienen un importante papel en procesos inflamatorios y coagulación. La serpin3 es una proteína inhibidora conocida anteriormente como antiquimotripsina. Inhibe la quimotripsina y catepsina G (Law et al., 2006). Esta serpina se encuentra en sangre, hígado, riñón y pulmón (Heit et al., 2013). Se han asociado polimorfismos en las serpinas con diferentes patologías, como trastornos en la coagulación

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

sanguínea, enfisema, cirrosis y demencia, así como tumorigénesis y metástasis. La serpin3 puede acelerar la aparición y severidad del Alzheimer (Gatto et al., 2013). Estudios para examinar las alteraciones globales en el transcriptoma en líneas celulares de túbulo proximal de riñón humano tratadas con un agente nefrotóxico encuentran un aumento en la expresión de IL-19, que proponen como marcador de daño renal, y de Serpina3, en la cual no profundizan (Jennings et al., 2015). Será interesante en el futuro estudiar en detalle el posible papel de esta serpin en el riñón y su relación con SGK1, incluyendo la posibilidad de que la serpin3 sea una diana directa de la señalización mediada por esta quinasa.

Otros de los genes del *microarray* cuya expresión estudiamos son col27A1 y Lypa1, cuya expresión es mayor en los animales transgénicos y aumenta con el tratamiento NPX-DOCA/Sal. El colágeno 27A1 es un gen poco conocido. El análisis de su expresión en ratón demuestran una alta expresión en cartílago, ojo y oreja, pero también en pulmón, colon y otros tejidos como cerebro, riñón y músculo esquelético. Es probable que el principal producto proteico de este gen, proa1(XXVII) sea un componente de la matriz extracelular de cartílago y de otros tejidos donde se detecta la expresión de este gen. Se ha propuesto que col27A1 podría estar implicado en el proceso de condrogénesis y quizás en la patogénesis de algunas condrodisplasias y trastornos en otros tejidos donde se exprese (Pace et al., 2003). Estudios recientes relacionan un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en éste gen con el síndrome de Tourette, un trastorno neuropsiquiátrico (Liu et al., 2015). No existen datos en la literatura que relacionen a este gen con procesos patológicos en riñón, pero dada su condición de colágeno fibrilar y su patrón de expresión regulado por DOCA/Sal y SGK1, podría constituir una nueva diana de la ruta de señalización MR/SGK1 implicada en la fibrosis exacerbada debido a un aumento de actividad de SGK1. En lo que respecta a Lypa1 hasta ahora es un gen que no se había relacionado con enfermedad renal crónica. Sin embargo, un estudio reciente sobre proteínas reguladas por Angiotensina II y excretadas en orina de pacientes con enfermedad renal policística autosómica dominante y enfermedad renal crónica, identifican a Lypa1 como una de ellas (Konvalinka et al., 2016). Este estudio nos indica que podría tratarse de un buen marcador de daño renal, si bien se precisan futuras investigaciones para conocer en detalle su modo acción y relación con la señalización mediada por SGK1.

Otro de los genes detectados por el análisis comparativo del transcriptoma y que elegimos como candidato de estudio es la quimiocina ccl28, también conocida como quimiocina epitelial mucosa-asociada (MEC). Su expresión se encuentra aumentada en los animales transgénicos con respecto a los *wild type* y tiene una tendencia no significativa a disminuir su expresión con el tratamiento. Pertenece la subfamilia de genes de citoquinas CC de pequeño tamaño. Las citoquinas son proteínas secretadas que están involucradas en procesos de inmunoregulación e inflamación. La citoquina codificada por este gen tienen actividad quimiotáctica para linfocitos T en reposo CD4 o CD8 positivos y eosinófilos. El producto de este gen se une a los receptores

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 828672	Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

de quimioquinas CCR3 y CCR10 y tiene un papel fisiológico importante en tejidos epiteliales extracutáneos, incluyendo los diversos órganos mucosos. Un análisis de *microarray* comparando la expresión génica en riñón de ratas *Sprague-Dawley* tras 8 semanas con dieta normal y dieta alta en sal demostró un aumento en la regulación de ccl28 entre otras citoquinas pro-inflamatorias. Además las ratas con dieta alta en sal muestran un aumento en la presión arterial, albuminuria, glomeruloesclerosis y fibrosis tubulointerstial (Gu et al., 2009). Estos datos no coinciden con los obtenidos en nuestro modelo, donde la ingesta alta de sal no está acompañada por un aumento en la expresión de ccl28. Es posible que las diferencias entre ambos modelos (NPX y DOCA) expliquen esta diferencia. En cualquier caso, no queda claro si la expresión aumentada de ccl28 en B6.Tg.sgk1 es consecuencia de la actividad aumentada de SGK1 o bien del daño renal exacerbado producido en estos ratones.

Por último, en relación con el estudio de genes candidatos del *microarray*, *Adamts12* muestra una expresión disminuida en animales transgénicos, independientemente del tratamiento. La proteína codificada por este gen es una glicoproteína secretada que se une a la superficie celular y a la matriz extracelular, y que interactúa con la proteína de unión a TGF- β latente. Estos datos apuntan a que una alteración en la expresión de *Adamts12* podrían relacionarse con alteraciones en la regulación de TGF- β .

Los genes candidatos seleccionados nos abren nuevos caminos de investigación en relación a SGK1 y enfermedad renal, pues existe poca bibliografía al respecto. Por tanto, este análisis nos aporta nuevos genes objeto de futuros estudios.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 828672	Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

7.2 Efecto de la actividad aumentada de SGK1 sobre el desarrollo de obesidad y alteraciones en la homeostasis de la glucosa

Los experimentos realizados muestran que el exceso de actividad sistémica de SGK1 en individuos macho en un contexto de dieta alta en grasa produce obesidad, alteraciones en la homeostasis de la glucosa, aumento en los niveles séricos de insulina y triglicéridos, esteatosis hepática, hipertensión y alteraciones en la función renal. Este fenotipo observado en los animales transgénicos reproduce las características del síndrome metabólico humano (Cornier et al., 2008). El sistema RAAS es clave en la regulación de la presión arterial, el balance de electrolitos y agua y está íntimamente relacionado con la patogénesis de la resistencia a la insulina (Briet and Schiffrin, 2011, Feraco et al., 2013, Munoz-Durango et al., 2016). Esto representa una estrecha relación entre enfermedades cardiovasculares y síndrome metabólico. Estudios con antagonistas de MR en ratones obesos *db/db* que expresan mayores niveles de mRNA de este receptor sugieren que la aldosterona y los niveles de MR están estrechamente relacionados con la obesidad (Guo et al., 2008). Esta relación se ve confirmada por el reciente estudio en colaboración con el Dr. F. Jaisser, donde se demuestra que una sobreexpresión de MR en adipocitos produce obesidad, además de resistencia a la insulina y otras características propias del síndrome metabólico (Urbanet et al., 2015).

En este trabajo, proponemos a SGK1 como mediador de los efectos deletéreos de MR en el desarrollo de síndrome metabólico basándonos en los resultados obtenidos y en la bibliografía. El exceso de actividad de SGK1 produce un aumento de peso a un ritmo superior al observado en individuos macho *wild type*, efecto que se observa con más claridad en un modelo de obesidad inducida por una dieta alta en grasa. Este aumento de peso se debe a un aumento en el tejido graso que se acumula en todas las localizaciones corporales examinadas, tanto viscerales como subcutáneas. El estudio histológico de tejido adiposo procedente de animales *wild type* y B6.Tg.sgk1 alimentados con HFD, nos indica que en estos últimos se produce hipertrofia adipocitaria. Este proceso debe ser precedido por un aumento en adipogénesis, según se ha descrito previamente (Caprio et al., 2007, Di Pietro et al., 2010, Marzolla et al., 2012) y se confirma por el aumento de expresión de algunos de los marcadores genéticos del proceso de adipogénesis (PPAR γ , CEBP α , DGAT y SREBP1) si bien estos no muestran diferencias entre genotipos, sugiriendo que si existe diferencia en la adipogénesis se produciría en estadios iniciales al desarrollo de la obesidad. Esta idea se ve apoyada por los resultados que obtuvimos utilizando un modelo *in vitro* de diferenciación de adipocitos a partir de células de la fracción estromal vascular derivadas del tejido adiposo blanco de individuos *wild type* y B6.Tg.sgk1. En este modelo, las células grasas diferenciadas que provienen de los animales transgénicos muestran una mayor acumulación de lípidos y un mayor aumento en la expresión de distintos marcadores del proceso de adipogénesis durante la diferenciación. Asimismo, muestran una mayor incorporación de glucosa y ácidos grasos inducida por insulina y un mayor aumento en la

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por:	Fecha:
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

expresión del transportador Glut4 con el proceso de diferenciación hacia adipocitos. De estos resultados concluimos, que el aumento de actividad de SGK1 *in vitro* ejerce una influencia positiva sobre el proceso de adipogénesis como se ha descrito previamente (Di Pietro et al., 2010). Un posible mecanismo que podría explicar este efecto es que SGK1 podría fosforilar a Foxo1 (Di Pietro et al., 2010), ejerciendo un efecto positivo en el proceso de adipogénesis e induciendo la expresión de marcadores como PPAR γ y CEBP α , así como estabilizar GLUT4 en la membrana del adipocito a través de la inactivación de AS160 (Figura 36).

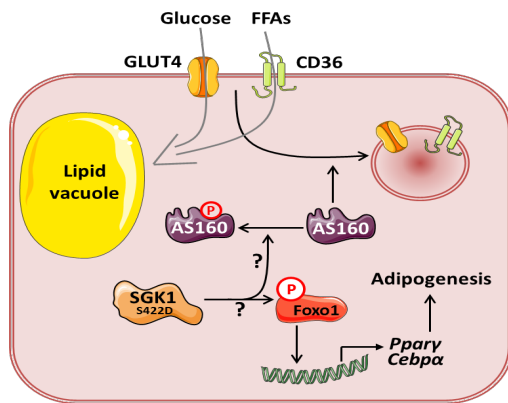


Figura 36. Posible mecanismo de aumento en la captación de lípidos y glucosa en los animales transgénicos. SGK1 podría simultáneamente inducir la adipogénesis a través de la fosforilación de Foxo1 y la estabilización de GLUT4 en la membrana del adipocito mediante la inactivación de AS160.

La expresión de marcadores del proceso de termogénesis en tejido adiposo pardo disminuye con el cambio de dieta, existe una menor expresión con HFD en ambos genotipos. Es interesante resaltar que cuando comparamos entre animales *wild type* y transgénicos alimentados con SCD, vemos una disminución de la expresión de la mayoría de estos marcadores en los animales transgénicos, lo que sugiere un menor consumo energético en estos animales, proporcionando una explicación para el aumento de peso acelerado en SCD. Con el cambio de dieta a HFD solo DIO2 mantiene un nivel significativamente menor de expresión en los animales transgénicos. Esta enzima cataliza la conversión de la tiroxina (3,5,3', 5'-tetraiodotironina, T4) a la hormona tiroidea bioactiva 3,5,3'-triiodotironina (T3). Una disminución en la expresión de DIO2 sugiere un fenotipo similar al hipotiroidismo detectado en ratones *knockout* de esta enzima, lo que podría contribuir al aumento de peso acelerado en individuos transgénicos incluso cuando presentan una ingesta inferior de HFD. Por tanto, el aumento de actividad de SGK1 podría ser considerado como un factor de riesgo para el desarrollo de obesidad inducida por una dieta alta en grasa. La principal función del tejido adiposo pardo es quemar grasa y convertir la energía química en calor para la termogénesis (Cinti, 2012). Tal como se comenta en la introducción numerosos estudios han demostrado que el proceso conocido como *Browning* protege ante la

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 828672		Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS		Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ		28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ		29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO		11/12/2016 10:56:17

ganancia de peso, la expansión de la masa grasa y la desregulación asociada del metabolismo de la glucosa y lípidos (Harms and Seale, 2013). En este contexto, el tratamiento con MRAs en animales alimentados con HFD produce la inducción de *Browning* en tejido adiposo blanco, aportando protección frente al desarrollo de obesidad y alteraciones en la homeostasis de la glucosa (Armani et al., 2014). Esto representa un herramienta potencial para el tratamiento de la obesidad y síndrome metabólico (Armani et al., 2015). El bloqueo de MR promueve la expresión de marcadores genéticos de tejido adiposo pardo en células precursoras de adipocitos blancos y simultáneamente atenúa los niveles de transcritos altamente expresados en el adipocito blanco (Armani et al., 2014). Sin embargo, no hay evidencias de que MR pueda ejercer efectos opuestos en la expresión de genes específicos de tejido adiposo blanco y pardo a través de la acción directa sobre elementos reguladores. Análisis de expresión génica a distintos tiempos podrían proporcionar algunas claves sobre los mecanismos de regulación mediados por MR (Armani et al., 2015). Estos autores especulan que las vías de señalización de MR en el adipocito podrían modular la expresión de factores de transcripción o correguladores transcripcionales afectando al perfil de expresión de genes en el adipocito. Entre estos factores podría estar SGK1, cuyo papel en tejido adiposo pardo aún no ha sido explorado.

Los marcadores de inflamación en tejido adiposo blanco están aumentados con HFD en ambos genotipos, y si comparamos entre individuos *wild type* y B6.Tg.sgk1 con HFD, en estos últimos existe un aumento en la expresión de IL-6, TNF α y MCP1. Por tanto, el aumento de actividad de SGK1 es un factor que promueve el desarrollo de obesidad, no solo induciendo hipertrofia adipocitaria sino también un estado de inflamación exacerbado en el tejido graso. La estrecha relación entre el incremento de grasa visceral y el desarrollo de perturbaciones clínicas y metabólicas hacen que ésta se considere un importante factor de riesgo en el desarrollo fisiopatológico de la enfermedad. Los adipocitos y tejido adiposo producen una gran variedad de hormonas y citoquinas, llamadas adipoquinas, involucradas en la regulación del comportamiento en la alimentación (leptina), el metabolismo de la glucosa y lípidos (adiponectina y lipoproteína lipasa entre otras), inflamación (IL-6, TNF α), presión arterial (Agt y Ang II) o coagulación (PAI-1) (Zennaro et al., 2009). Los niveles plasmáticos de adipoquinas aumentan con la acumulación de tejido adiposo e incrementan el volumen de los adipocitos, exceptuando la adiponectina plasmática que es menor en obesidad (Skurk et al., 2007). La desregulación de adipoquinas observada en síndrome metabólico es consecuencia tanto de la hipertrofia como de la infiltración de macrófagos asociada (Weisberg et al., 2003), que juntos crean un estado subinflamatorio local y sistémico. Este estado inflamatorio representa un mecanismo de inhibición de la conversión adiposa. Citoquinas como IL-6 y TNF α previenen el reclutamiento y diferenciación de preadipocitos (MacDougald and Mandrup, 2002). A pesar de que este fenómeno limita la expansión del tejido adiposo, también puede promover la acumulación ectópica de lípidos en el hígado y el músculo y, por lo tanto, la resistencia a la

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por:	Fecha:
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

insulina en estos tejidos (Antuna-Puente et al., 2008). En adipocitos maduros, IL-6 y TNF α alteran la acción y señalización de la insulina a través de distintos mecanismos conduciendo a resistencia a la insulina, incremento de la lipólisis e incorporación de glucosa disminuida en adipocitos (Antuna-Puente et al., 2008). Nuestros resultados son plenamente consistentes con estos antecedentes, ya que en nuestro modelo, el desarrollo de obesidad e hipertrofia adipocitaria se ve acompañado por la aparición de resistencia a la insulina y la acumulación ectópica de lípidos en el hígado. Queda por comprobar si este proceso se produce también en el músculo esquelético. Además podemos relacionar estos mecanismos con estudios clínicos y experimentales que demuestran que la aldosterona es un factor de riesgo cardiovascular, promoviendo la hipertensión, fibrosis cardíaca, nefrosclerosis, inflamación y remodelación vascular y anomalías metabólicas como resistencia a la insulina (Rossi et al., 2008). Estos efectos dependen de una activación inapropiada de MR, ya que el tratamiento con espironolactona o eplerenona hace que disminuyan estos efectos y podrían estar, al menos en parte, mediados por SGK1 entre otros factores. Esta quinasa estimula al transportador de glucosa acoplado a Na⁺ SGLT1 y, en consecuencia, acelera la absorción intestinal de glucosa (Lang et al., 2006). El incremento de actividad de SGLT1 a su vez se correlaciona con el desarrollo de obesidad por un rápido incremento en los niveles plasmáticos de glucosa, una liberación excesiva de insulina y la subsecuente deposición de grasa (Lang et al., 2006, Lang et al., 2009b, Lang and Stourmaras, 2013).

Además se conoce que SGK1 se expresa en tejido adiposo blanco, y que sus niveles de expresión aumentan durante el proceso de adipogénesis (Di Pietro et al., 2010). El tratamiento de preadipocitos con dexametasona induce rápidamente la expresión de SGK1 en los estadios tempranos de inducción de la adipogénesis (Di Pietro et al., 2010). La expresión temprana de SGK1 en la diferenciación parece ser crítica ya que el silenciamiento con siRNA conduce a la inhibición de la diferenciación, disminuyendo el contenido lipídico de las células. El aumento de actividad de SGK1 (^{S422D}SGK1) resulta en un incremento en el proceso de adipogénesis, aumentándose la expresión de PPAR γ , CEBP α y adiponectina, lo cual apunta a un papel de SGK1 en el proceso de adipogénesis *in vitro* (Di Pietro et al., 2010). De hecho, en humanos, polimorfismos que confieren un incremento de actividad de SGK1 se asocian con obesidad en una cohorte caucásica (Dieter et al., 2004). Además, se conoce que Foxo1 es una diana directa de SGK1 en adipocitos, y podría proporcionar una explicación mecanística potencial para los efectos proadipogénicos de SGK1 (Di Pietro et al., 2010), donde SGK1 fosforila a Foxo1 provocando su redistribución subcelular desde el núcleo al citosol produciendo su inhibición. Se ha demostrado que Foxo1 tiene una clara influencia negativa en el proceso de diferenciación de adipocitos (Nakae et al., 2003, Kim et al., 2009). Di Pietro et al. apuntan a que la redistribución subcelular de Foxo1 inducida por dexametasona es dependiente de SGK1, por tanto, esta quinasa podría ser un nexo crítico entre glucocorticoides y Foxo1. Así estos autores postulan

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por:	Fecha:
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

que en estados patológicos caracterizados por grandes cantidades de glucocorticoides circulantes, los niveles de SGK1 en tejido adiposo pueden aumentar promoviendo la diferenciación grasa.

El estudio de la homeostasis de la glucosa se realizó a través de los tests GTT e ITT. GTT proporciona una visión general fisiológica de cualquier cambio en la tolerancia a la glucosa, sin determinar los mecanismos causantes (Bowe et al., 2014). Para estudiar en mayor detalle la homeostasis de la glucosa han de realizarse en paralelo medidas de resistencia a la insulina. Para ello realizamos ITT, que mide el grado en el que descienden los niveles de glucosa plasmáticos en respuesta a la administración de insulina y es un indicativo de la sensibilidad del hígado y el músculo esquelético a esta hormona (Bowe et al., 2014). En nuestro estudio en individuos macho, ambos tests revelan diferencias entre genotipos incluso bajo SCD, aumentando estas diferencias con el cambio a dieta HFD y mostrando alteraciones en los mecanismos de regulación de la homeostasis de la glucosa en los individuos con exceso de actividad SGK1. Los individuos alimentados con HFD muestran además un incremento en los niveles séricos de insulina y el estudio de expresión de proteínas involucradas en las vías de señalización de la insulina en tejido adiposo blanco en los animales alimentados con HFD muestra un aumento en la expresión del receptor de insulina en los individuos B6.Tg.sgk1 y una disminución en IRS1, AKT y el transportador Glut4. En conjunto estas observaciones confirman la presencia de un fenotipo de resistencia a la insulina. Un gran número de estudios en modelos animales y celulares sugiere que la aldosterona afecta al metabolismo de la glucosa en diferentes niveles, como la secreción de insulina, la liberación y captación hepática de glucosa así como la difusión y captación en tejidos sensibles a la insulina (Remde et al., 2015). Los datos disponibles sobre el efecto de la terapia para el PA sugieren una influencia positiva de la adrenalectomía en el metabolismo de la glucosa. Los efectos de la terapia con MRAs en el metabolismo de la glucosa en PA no están tan claros (Remde et al., 2015). Se ha demostrado que la administración de aldosterona reduce significativamente la masa de células β pancreáticas en un modelo de ratón (Jin et al., 2013). Este efecto apoptótico de la aldosterona puede ser prevenido por el antioxidante N-acetilcisteína *in vivo* e *in vitro*, sugiriendo una acción ROS mediada por la aldosterona. Sin embargo, en otro estudio en ratón se observa que la aldosterona disminuye la secreción de insulina sin alterar la masa de células β pancreáticas. Este efecto no puede prevenirse mediante el bloqueo de MR, indicando un mecanismo independiente al mismo (Luther et al., 2011). En tejidos sensibles a la insulina, como músculo esquelético y tejido adiposo, la aldosterona interactúa directamente con la ruta del receptor de insulina (IR). La expresión de IR y proteínas relacionadas como IRS-1 y 2 está reprimida y las respectivas proteínas Akt-1 y 2 están fosforiladas bajo administración de aldosterona de manera tiempo y dosis dependiente (Wada et al., 2009, Selvaraj et al., 2013). En consecuencia la densidad de GLUT 4 en la superficie celular de los adipocitos, así como en células de músculo esquelético

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por:	Fecha:
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

está reducida. En el hígado, la aldosterona reduce la captura de glucosa descendiendo la expresión de GLUT 2 (Selvaraj et al., 2009). También se ha observado que la administración de aldosterona incrementa los niveles de glucosa en ayunas (Yamashita et al., 2004), indicando una liberación de glucosa hepática. Además MR parece tener una influencia en la síntesis hepática de citoquinas proinflamatorias ya que la administración de MRAs en HFD y dieta alta en fructosa conlleva una reducción significativa de los niveles de TNF α , IL-6 y MCP1 en el hígado (Wada et al., 2010). En nuestro modelo de estudio, los animales B6.Tg.sgk1 con HFD muestran un aumento en los niveles séricos de triglicéridos y acumulación de estos en el hígado, conduciendo a uno de los daños más importantes e irreversibles en esta patología, la presencia de hígado graso. En síndrome metabólico con resistencia a la insulina, el hígado está profundamente afectado por el exceso de nutrientes de la dieta desde el intestino y de adipoquinas inflamatorias desde el tejido adiposo hipertrofiado (Kahn et al., 2006, Fischer et al., 2013). La enfermedad de hígado graso no alcohólica incluye un gran espectro de manifestaciones, que van desde esteatosis aislada, esteatosis con inflamación, esteatosis con daño en los hepatocitos o esteatosis con fibrosis sinusoidal (Wada et al., 2010). Estudios en animales alimentados con HFD indican que el tratamiento con espironolactona en estos animales mejora las alteraciones en la homeostasis de la glucosa, el desarrollo de esteatosis hepática y suprime la inducción de genes involucrados en la lipogénesis e inflamación en el hígado (Wada et al., 2010). Wada et al. sugieren que la espironolactona podría suprimir la esteatosis hepática y la expresión de citoquinas proinflamatorias previniendo la afluencia hepática de adipoquinas o FFAs desde el tejido adiposo hipertrofiado.

En nuestro modelo de estudio, el exceso de actividad sistémica de SGK1 conduce al desarrollo de hipertensión arterial inducido por una dieta alta en grasa. Los mecanismos a través de los que la obesidad conduce a elevar la presión arterial no están claros. Varias hipótesis han sido propuestas, incluyendo un incremento de actividad del sistema nervioso simpático, una sobreactivación del sistema RAAS, una excesiva secreción de citoquinas adiposas o bien la inflamación y compresión de los riñones por el exceso de grasa peri-renal (Canale et al., 2013). Existen evidencias de la relación entre aldosterona y obesidad. Varios estudios han demostrado que existen niveles altos de aldosterona en individuos obesos, especialmente con obesidad visceral. Una disminución en los niveles de aldosterona y, en consecuencia, en la presión arterial producen una pérdida de peso (Calhoun and Sharma, 2010, Briet and Schiffrin, 2011). Dado que la aldosterona es una hormona que puede regular los cambios de volumen y presión sanguínea, sus niveles séricos pueden ser la conexión entre obesidad e hipertensión. Recientemente se ha propuesto a la leptina como agonista directo de la secreción de aldosterona, otros factores relacionados con los adipocitos como la lipoproteína de baja densidad (VLDL), cuyos niveles aumentan en obesidad, podría contribuir al aumento de aldosterona. La leptina regula la ingesta de alimento y también está involucrada en el control de la presión arterial y sus

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 828672	Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

niveles disminuyen con la pérdida de peso como ocurre con la aldosterona, por lo que podría existir una posible interacción entre estas dos hormonas (Xie and Bollag, 2016). Recientemente se demostró, tanto *in vitro* como *in vivo*, que la leptina es una adipoquina estimuladora de la aldosterona liberada por el tejido adiposo (Huby et al., 2015). Además de la hipertensión, la aldosterona puede ser mediador en varios procesos que contribuyen a la enfermedad cardiorenal a través de su interacción y la activación de MR, por otra parte, el cortisol también podría contribuir a la hipertensión inducida por obesidad a través de MR. Como habíamos visto en el apartado anterior (6.1), en condiciones normales el exceso de actividad de esta quinasa no produce modificaciones en la presión arterial de los animales transgénicos. Sin embargo, en un contexto de exceso de mineralocorticoides y sal, o como es el caso, de exceso de grasa a través de la dieta se establecen diferencias en los mecanismos de regulación de la presión arterial entre genotipos. La activación de SGK1 por insulina, conduce a la estimulación de la actividad de ENaC (Wang et al., 2001, Alvarez de la Rosa and Canessa, 2003) lo que debería aumentar la reabsorción de sal en el túbulo renal y podría fomentar la retención renal de sal y la hipertensión en diabetes tipo II (Lang et al., 2006, Lang et al., 2009b). SGK1 además contribuye a la hipertensión inducida por glucocorticoides (Lang et al., 2009b). El tratamiento con dieta rica en fructosa o dieta alta en grasa conlleva el desarrollo de hiperinsulinemia y sensibiliza la presión arterial a una ingesta de sal en animales *wild type* pero no en knockout para SGK1 (Lang et al., 2006, Ackermann et al., 2011).

Por último, estudiamos la posibilidad de que SGK1 acelere el desarrollo de daño renal asociado al síndrome metabólico. Para ello evaluamos el estado de la barrera de filtración glomerular a través del cociente albúmina/creatinina en orina y valoramos la funcionalidad renal a través de GFR. Observamos que la dieta alta en grasa, induce albuminuria en los animales transgénicos y produce hiperfiltración en los animales *wild type*. Curiosamente los valores de GFR de los animales transgénicos en SCD o HFD son similares a los observados en los individuos *wild type* en HFD. Estudios en ratones obesos diabéticos *db/db*, deficientes para el receptor de leptina, muestran que estos individuos padecen albuminuria y son hiperfiltrantes y que la hiperfiltración contribuye a la progresión de la nefropatía diabética donde la afección renal provoca en etapas avanzadas un descenso en GFR (Bivona et al., 2011). Durante la hiperfiltración, la dilatación de las arteriolas aferentes contribuyen al aumento de la presión de los capilares glomerulares. Es importante destacar que en modelos de obesidad GFR puede variar al normalizarlo por el peso corporal. En individuos *db/db* al normalizar por peso los individuos son hipofiltrantes (Bivona et al., 2011). Observamos resultados similares en nuestro modelo de estudio ya que los datos representados para GFR sin normalizar por peso corporal nos indican un aumento en los animales *wild type* HFD y en los animales B6.Tg.sgk1 independientemente de la dieta. Cuando normalizamos por peso corporal (datos no mostrados) los individuos *wild type* no muestran cambios en GFR si comparamos SCD con HFD (8.530 ± 0.893 vs 8.888 ± 1.491). Sin embargo,

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 828672	Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

hay un descenso significativo en GFR en los animales transgénicos con la dieta alta en grasa (11.850 ± 0.731 vs 7.600 ± 1.164).

Es importante destacar los efectos producidos *in vivo* por el inhibidor de SGK1 EMD638683 en el contexto del síndrome metabólico. El tratamiento con fructosa y salino conlleva un incremento en la presión arterial en ratones *wild type*, pero no en ratones *knockout* para SGK1 (Huang et al., 2006a). Observaciones similares se han realizado con dieta alta en grasa y salino (Huang et al., 2006b). Estos estudios sugieren que el efecto hipertensivo de la hiperinsulinemia está totalmente vinculado a SGK1. Estudios en ratones hiperinsulinémicos tratados con el inhibidor EMD638683 previenen este efecto de incremento en la presión arterial en individuos *wild type*, pero no en *sgk1^{-/-}* o en ratones normoinsulinémicos (Ackermann et al., 2011). Además en este estudio, EMD638683 tiene un efecto de disminución de peso en los individuos tratados. Un reciente estudio con este inhibidor, además demuestra que el tratamiento con EMD638683 mejora la obesidad y la hiperglicemia en ratones *db/db*. En este estudio se observa que la expresión intestinal de SGK1 y SGLT1 está incrementada en ratones obesos y diabéticos *db/db* y que el tratamiento con EMD638683 disminuye la excesiva expresión de SGLT1 en estos animales. Por último, la co-administración del inhibidor de SGK1 en células intestinales IEC-6 revierte parcialmente la absorción de glucosa inducida por dexametasona (Li et al., 2016). Este estudio revela que el inhibidor de SGK1 revierte la hiperglicemia en ratones *db/db* en parte a través de un descenso en la absorción de glucosa en el intestino, produciéndose un descenso en los niveles séricos de glucosa en ayunas y HbA1c. Además confirma los efectos de EMD638683 como antihipertensivo y su efecto de pérdida de peso observados previamente por Ackermann et al. Por último, los niveles de triglicéridos y colesterol en ratones *db/db* disminuyen con el tratamiento con el inhibidor de SGK1 (Li et al., 2016).

En síntesis, el estudio de las consecuencias de un aumento sistémico de SGK1 en un modelo de obesidad inducida por HFD demuestra que SGK1 es un factor de riesgo para el desarrollo de síndrome metabólico (Figura 37) proporcionando además un modelo muy completo de éste síndrome en ratones. Este hecho junto a los estudios con el inhibidor de SGK1 nos indican que podría ser una eficiente herramienta terapéutica en el tratamiento de síndrome metabólico.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 828672	Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

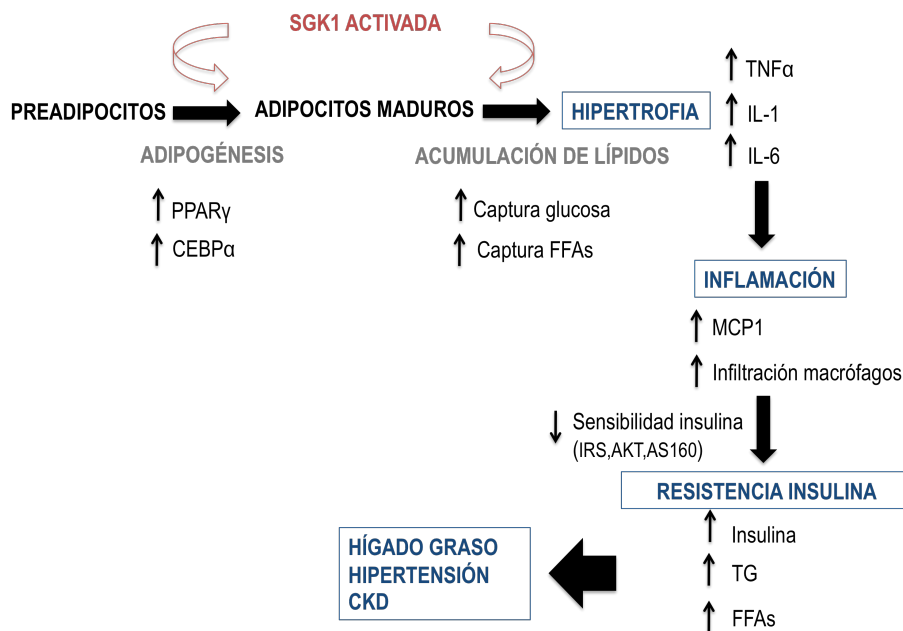


Figura 37. Efecto de la activación de SGK1 en tejido adiposo y consecuencias metabólicas. La activación de SGK1 promueve el proceso de adipogénesis y la acumulación de lípidos en la célula adiposa. En consecuencia se produce hipertrofia adipocitaria y expresión de adipoquinas proinflamatorias que producen inflamación y, en consecuencia, infiltración de macrófagos. Esto se traduce en un descenso en la sensibilidad a la insulina, que produce un aumento en los niveles de insulina, triglicéridos y ácidos grasos. Como efecto de estos cambios en el metabolismo se produce esteatosis epática, hipertensión y afección de la función renal que podría resultar en CKD.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 828672		Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS		Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ		28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ		29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO		11/12/2016 10:56:17

7.3 Nuevos genes diana de MR implicados en procesos patológicos

Fruto de la colaboración con el laboratorio del Dr. F. Jaisser se identificaron dos genes diana de MR/aldosterona, CTGF y PTGDS, implicados en el desarrollo de enfermedad cardiovascular directa o indirectamente.

Mediante el análisis del transcriptoma completo de ventrículo de corazón de ratones *wild type* y ratones con sobreexpresión de MR en cardiomiocitos tratados o no con aldosterona se identificó una lista de 43 genes candidatos como dianas específicas de MR/aldosterona en miocardio (Messaoudi et al., 2013). De esta lista se seleccionó CTGF para un estudio detallado dado su papel conocido en el desarrollo de fibrosis cardíaca y se demostró que es una diana de MR/aldosterona tanto *in vivo* como *in vitro*. Por primera vez se mostró que CTGF es una diana directa de MR/Aldosterona (pero no corticosterona) y que la aldosterona incrementa la expresión de CTGF en cardiomiocitos a través de la estimulación de MR en cardiomiocitos *in vivo* (Messaoudi et al., 2013). Los mineralocorticoides pueden además inducir la expresión de CTGF a través de otras vías, en el corazón, de una manera dependiente de SGK1 (Vallon et al., 2006) y en la vasculatura de una forma dependiente del estrés oxidativo (Pruthi et al., 2014). Esto no significa que estas rutas sean mutuamente excluyentes pudiendo estar implicada una señalización convergente. Es interesante resaltar que, a pesar del incremento de CTGF en los animales transgénicos inducido por aldosterona, la fibrosis cardíaca no estaba aumentada. En relación a este hecho, animales transgénicos con sobreexpresión de CTGF en riñón, hígado y corazón no desarrollan fibrosis (Brigstock, 2010). Se considera que CTGF proporciona un ambiente propicio para el desarrollo de fibrosis, pero no produce su desarrollo por sí mismo (Brigstock, 2010). Asimismo, la aldosterona puede promover el desarrollo de fibrosis a través de la inducción de moléculas que crean un ambiente favorable para ello. Esto explica que sea necesario un estímulo como un incremento en la ingesta de Na⁺ para inducir fibrosis cardíaca asociada a la activación de MR por aldosterona (Messaoudi et al., 2013). En cuanto a los estudios *in vitro*, mediante experimentos de luciferasa y ChIP identificamos al promotor de CTGF como diana directa de MR/aldosterona y determinamos que la unión del receptor al DNA se produce en una región sin secuencias consenso canónicas para la unión del mismo.

Además en los animales transgénicos (sin cambios en los niveles de aldosterona) existen 865 genes cuya expresión está alterada. Esto sugiere que el nivel de expresión cardíaca de MR tiene un importante papel en la señalización de MR. El aumento de señalización de MR puede ocurrir en presencia de niveles normales de aldosterona circulante, debido a un incremento local en la expresión de MR. Esto podría explicar por qué el tratamiento con bloqueantes de MR es tan eficaz en enfermedades cardíacas a pesar de existir niveles bajos o normales de aldosterona (Pitt et al., 1999, Zannad et al., 2011).

Por otra parte, el análisis del transcriptoma de tejido adiposo visceral de ratones con sobreexpresión de MR en adipocitos reveló una larga lista de genes cuya expresión está

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

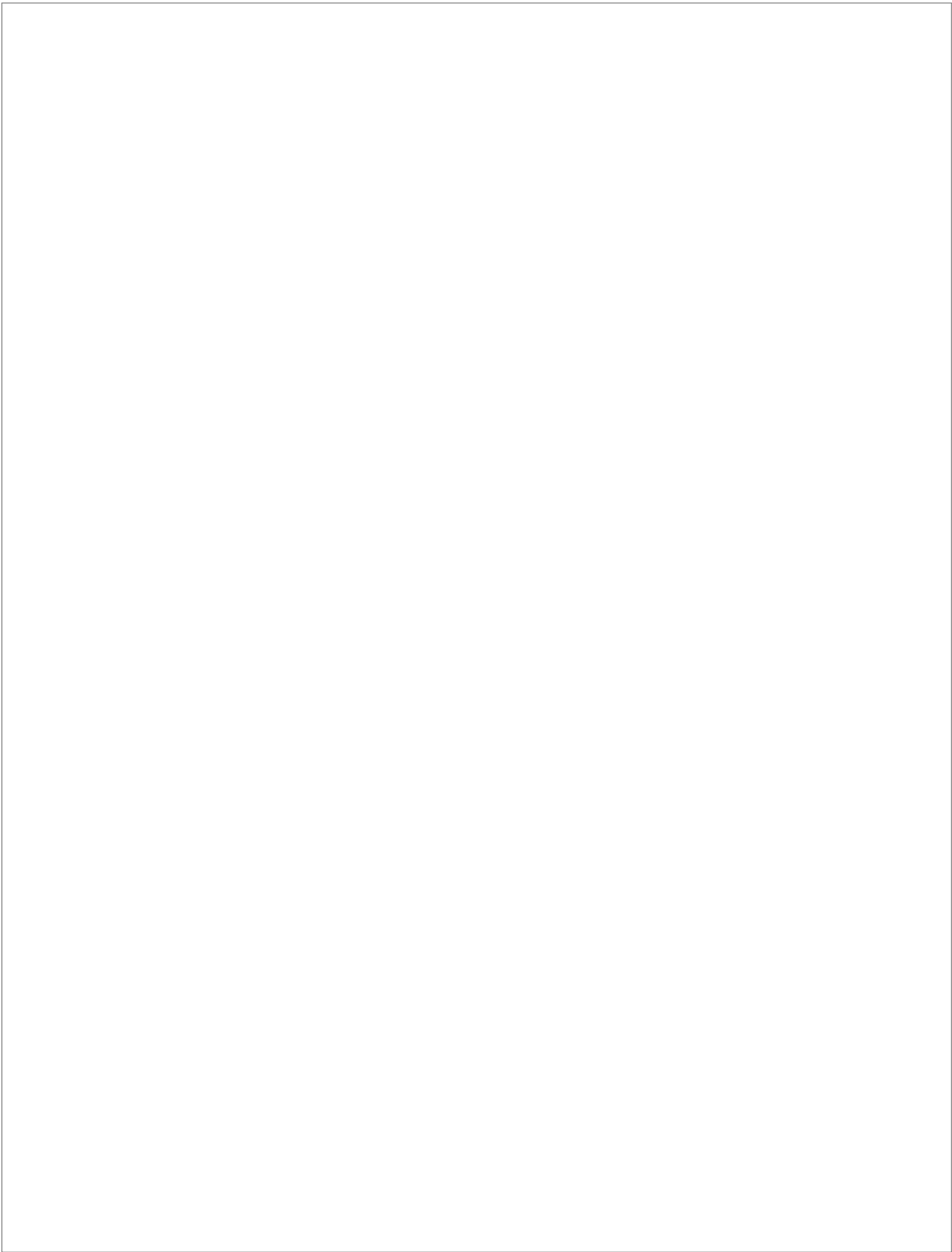
Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por:	Fecha:
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

aumentada y que tienen relación con rutas de señalización del metabolismo (Urbanet et al., 2015). Los resultados de este trabajo indican que, incluso en ausencia de HFD, el aumento de expresión de MR en tejido adiposo contribuye al desarrollo de síndrome metabólico, con numerosas alteraciones metabólicas, incluyendo obesidad visceral y ganancia de peso corporal, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina, así como dislipidemia. Además se identificó PTGDS como una nueva diana de MR en adipocitos, tanto en adipocitos de ratón como humanos, situando a PTGDS como un mediador de los efectos adipogénicos de la activación de MR (Urbanet et al., 2015). Por nuestra parte, realizamos estudios *in vitro* para determinar la unión de MR inducido por aldosterona o corticosterona a PTGDS. Mediante ensayos de luciferasa y ensayos dosis-repuesta con aldosterona y cortisol, se determinó que PTGDS es una diana directa de MR sin selectividad respecto al ligando activador y que MR ejerce su función a través de una secuencia canónica HRE.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 828672	Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS</i>	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ</i>	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ</i>	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO</i>	11/12/2016 10:56:17

Conclusiones

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

8 Conclusions

- I. Systemic increase in SGK1 activity potentiates mineralocorticoid/salt-induced hypertension and kidney injury.
- II. We have identified new target genes modulated by SGK1 and/or mineralocorticoid/salt signalling that may be involved in the kidney injury or could potentially serve as markers of the process.
- III. Systemic increase in SGK1 activity produces metabolic disorders of glucose homeostasis and potentiates the development of metabolic syndrome by high fat diet.
- IV. The transgenic mouse line B6.Tg.sgk1 fed with a high fat diet develop the main features of the human metabolic syndrome, including visceral obesity, dyslipidemia, glucose intolerance, insulin resistance and hypertension.
- V. Taken together, results obtained in transgenic mice with enhanced SGK1 activity indicate that this kinase could be a potential therapeutic target in the combined treatment of risks factors leading to cardiovascular disease.
- VI. CTGF and PTGDS, two genes proposed to be involved in mineralocorticoid receptor-mediated cardiac fibrosis and obesity, two risk factors for developing cardiovascular disease, are direct genomic MR targets.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 828672	Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

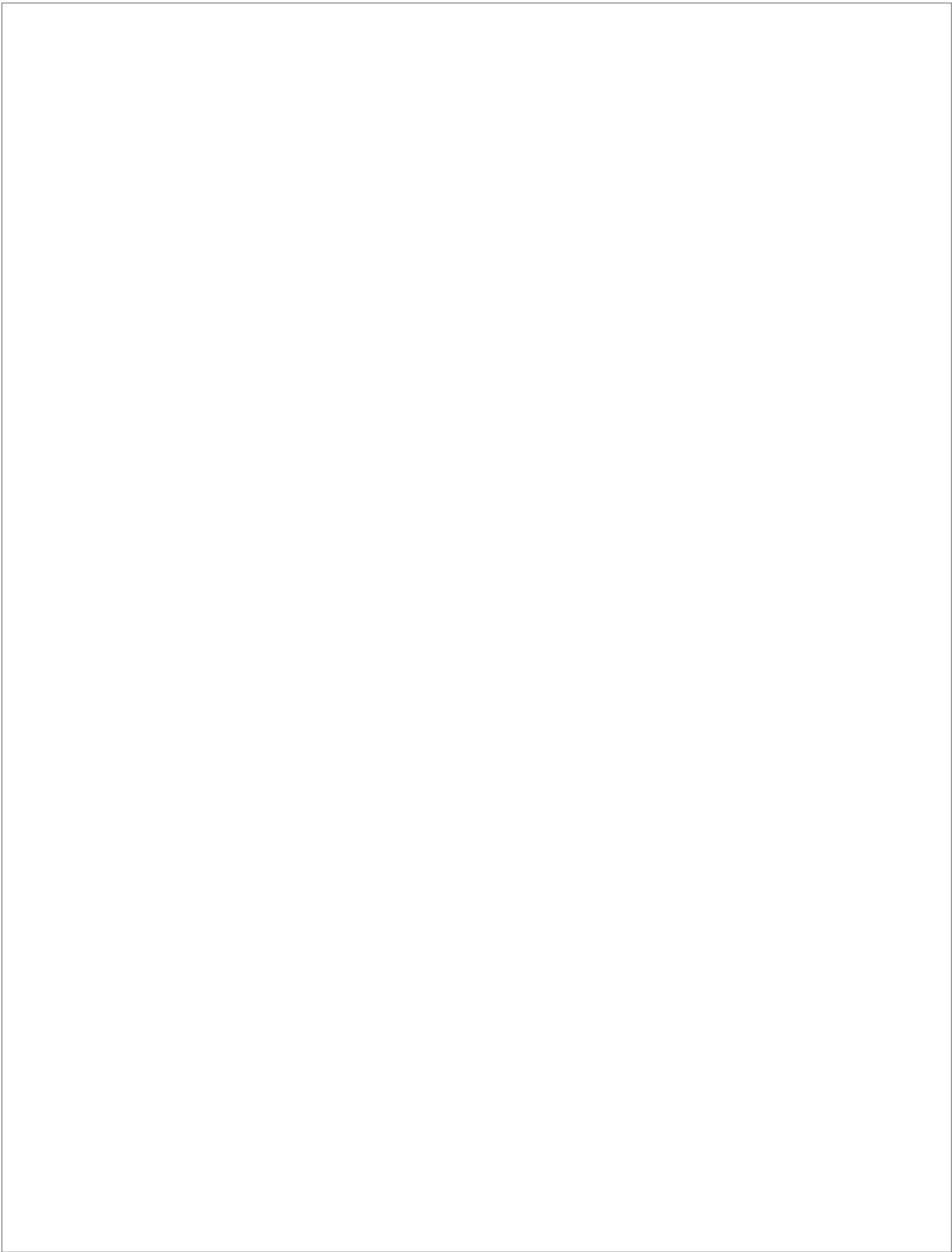
Bibliografía

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: <i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS</i>	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
<i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ</i>	28/11/2016 11:47:29
<i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ</i>	29/11/2016 14:09:00
<i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO</i>	11/12/2016 10:56:17



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS</i>	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ</i>	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ</i>	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO</i>	11/12/2016 10:56:17

Bibliografía

- Ackermann TF, Boini KM, Beier N, Scholz W, Fuchss T, Lang F (2011) EMD638683, a novel SGK inhibitor with antihypertensive potency. *Cell Physiol Biochem* 28:137-146.
- Aguilar-Sanchez C, Hernandez-Diaz I, Lorenzo-Diaz F, Navarro JF, Hughes TE, Giraldez T, Alvarez de la Rosa D (2012) Identification of permissive insertion sites for generating functional fluorescent mineralocorticoid receptors. *Endocrinology* 153:3517-3525.
- Aldigier JC, Kanjanbuch T, Ma LJ, Brown NJ, Fogo AB (2005) Regression of existing glomerulosclerosis by inhibition of aldosterone. *J Am Soc Nephrol* 16:3306-3314.
- Alvarez de la Rosa D, Canessa CM (2003) Role of SGK in hormonal regulation of epithelial sodium channel in A6 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 284:C404-414.
- Alvarez de la Rosa D, Gimenez I, Forbush B, Canessa CM (2006) SGK1 activates Na⁺-K⁺-ATPase in amphibian renal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 290:C492-498.
- Alvarez de la Rosa D, Paunescu TG, Els WJ, Helman SI, Canessa CM (2004) Mechanisms of regulation of epithelial sodium channel by SGK1 in A6 cells. *J Gen Physiol* 124:395-407.
- Alvarez de la Rosa D, Zhang P, Naray-Fejes-Toth A, Fejes-Toth G, Canessa CM (1999) The serum and glucocorticoid kinase sgk increases the abundance of epithelial sodium channels in the plasma membrane of *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 274:37834-37839.
- Andres-Mateos E, Brinkmeier H, Burks TN, Mejias R, Files DC, Steinberger M, Soleimani A, Marx R, Simmers JL, Lin B, Finanger Hedderick E, Marr TG, Lin BM, Hourde C, Leinwand LA, Kuhl D, Foller M, Vogelsang S, Hernandez-Diaz I, Vaughan DK, Alvarez de la Rosa D, Lang F, Cohn RD (2013) Activation of serum/glucocorticoid-induced kinase 1 (SGK1) is important to maintain skeletal muscle homeostasis and prevent atrophy. *EMBO Mol Med* 5:80-91.
- Antuna-Puente B, Feve B, Fellahi S, Bastard JP (2008) Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab* 34:2-11.
- Archer DF, Thorncroft IH, Foegh M, Hanes V, Glant MD, Bitterman P, Kempson RL (2005) Long-term safety of drospirenone-estradiol for hormone therapy: a randomized, double-blind, multicenter trial. *Menopause* 12:716-727.
- Armani A, Cinti F, Marzolla V, Morgan J, Cranston GA, Antelmi A, Carpinelli G, Canese R, Pagotto U, Quarta C, Malorni W, Matarrese P, Marconi M, Fabbri A, Rosano G, Cinti S, Young MJ, Caprio M (2014) Mineralocorticoid receptor antagonism induces browning of white adipose tissue through impairment of autophagy and prevents adipocyte dysfunction in high-fat-diet-fed mice. *FASEB J* 28:3745-3757.
- Armani A, Marzolla V, Fabbri A, Caprio M (2015) Cellular mechanisms of MR regulation of adipose tissue physiology and pathophysiology. *J Mol Endocrinol* 55:R1-10.
- Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G, Glaser TM, Handelin BL, Housman DE, Evans RM (1987) Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science* 237:268-275.
- Arteaga MF, Alvarez de la Rosa D, Alvarez JA, Canessa CM (2007) Multiple translational isoforms give functional specificity to serum- and glucocorticoid-induced kinase 1. *Mol Biol Cell* 18:2072-2080.

Firmado por:	Fecha:
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

- Arteaga MF, Coric T, Straub C, Canessa CM (2008) A brain-specific SGK1 splice isoform regulates expression of ASIC1 in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:4459-4464.
- Artunc F, Amann K, Nasir O, Friedrich B, Sandulache D, Jahovic N, Risler T, Vallon V, Wulff P, Kuhl D, Lang F (2006) Blunted DOCA/high salt induced albuminuria and renal tubulointerstitial damage in gene-targeted mice lacking SGK1. *J Mol Med (Berl)* 84:737-746.
- Artunc F, Lang F (2014) Mineralocorticoid and SGK1-sensitive inflammation and tissue fibrosis. *Nephron Physiol* 128:35-39.
- Atkinson JM, Pullen N, Da Silva-Lodge M, Williams L, Johnson TS (2015) Inhibition of Thrombin-Activated Fibrinolysis Inhibitor Increases Survival in Experimental Kidney Fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 26:1925-1937.
- Atkinson JM, Pullen N, Johnson TS (2013) An inhibitor of thrombin activated fibrinolysis inhibitor (TAFI) can reduce extracellular matrix accumulation in an in vitro model of glucose induced ECM expansion. *Matrix Biol* 32:277-287.
- Bajzar L, Manuel R, Nesheim ME (1995) Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem* 270:14477-14484.
- Bauersachs J, Jaisser F, Toto R (2015) Mineralocorticoid receptor activation and mineralocorticoid receptor antagonist treatment in cardiac and renal diseases. *Hypertension* 65:257-263.
- Bertocchio JP, Warnock DG, Jaisser F (2011) Mineralocorticoid receptor activation and blockade: an emerging paradigm in chronic kidney disease. *Kidney Int* 79:1051-1060.
- Bivona BJ, Park S, Harrison-Bernard LM (2011) Glomerular filtration rate determinations in conscious type II diabetic mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 300:F618-625.
- Blom IE, Goldschmeding R, Leask A (2002) Gene regulation of connective tissue growth factor: new targets for antifibrotic therapy? *Matrix Biol* 21:473-482.
- Boor P, Floege J (2012) The renal (myo-)fibroblast: a heterogeneous group of cells. *Nephrol Dial Transplant* 27:3027-3036.
- Bowe JE, Franklin ZJ, Hauge-Evans AC, King AJ, Persaud SJ, Jones PM (2014) Metabolic phenotyping guidelines: assessing glucose homeostasis in rodent models. *J Endocrinol* 222:G13-25.
- Briet M, Schiffrin EL (2011) The role of aldosterone in the metabolic syndrome. *Curr Hypertens Rep* 13:163-172.
- Brigstock DR (2010) Connective tissue growth factor (CCN2, CTGF) and organ fibrosis: lessons from transgenic animals. *J Cell Commun Signal* 4:1-4.
- Brilla CG, Weber KT (1992) Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis. *J Lab Clin Med* 120:893-901.
- Brilla CG, Zhou G, Matsubara L, Weber KT (1994) Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone. *J Mol Cell Cardiol* 26:809-820.
- Bruno NE, Yano Y, Takei Y, Gabazza EC, Qin L, Nagashima M, Morser J, D'Alessandro-Gabazza CN, Taguchi O, Sumida Y (2008a) Protective role of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor in obstructive nephropathy-associated tubulointerstitial fibrosis. *J Thromb Haemost* 6:139-146.
- Bruno NE, Yano Y, Takei Y, Qin L, Suzuki T, Morser J, D'Alessandro-Gabazza CN, Mizoguchi A, Suzuki K, Taguchi O, Gabazza EC, Sumida Y (2008b) Immune complex-mediated glomerulonephritis is ameliorated by thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor deficiency. *Thromb Haemost* 100:90-100.

Identificador del documento: 828672		Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS		Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ		28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ		29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO		11/12/2016 10:56:17

- Calhoun DA, Sharma K (2010) The role of aldosteronism in causing obesity-related cardiovascular risk. *Cardiol Clin* 28:517-527.
- Canale MP, Manca di Villahermosa S, Martino G, Rovella V, Noce A, De Lorenzo A, Di Daniele N (2013) Obesity-related metabolic syndrome: mechanisms of sympathetic overactivity. *Int J Endocrinol* 2013:865965.
- Caprio M, Antelmi A, Chetrite G, Muscat A, Mammi C, Marzolla V, Fabbri A, Zennaro MC, Feve B (2011) Antiadipogenic effects of the mineralocorticoid receptor antagonist drospirenone: potential implications for the treatment of metabolic syndrome. *Endocrinology* 152:113-125.
- Caprio M, Feve B, Claes A, Viengchareun S, Lombes M, Zennaro MC (2007) Pivotal role of the mineralocorticoid receptor in corticosteroid-induced adipogenesis. *FASEB J* 21:2185-2194.
- Catela C, Kratsios P, Hede M, Lang F, Rosenthal N (2010) Serum and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1) is necessary for vascular remodeling during angiogenesis. *Dev Dyn* 239:2149-2160.
- Cinti S (2012) The adipose organ at a glance. *Dis Model Mech* 5:588-594.
- Cordas E, Naray-Fejes-Toth A, Fejes-Toth G (2007) Subcellular location of serum- and glucocorticoid-induced kinase-1 in renal and mammary epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 292:C1971-1981.
- Cornier MA, Dabelea D, Hernandez TL, Lindstrom RC, Steig AJ, Stob NR, Van Pelt RE, Wang H, Eckel RH (2008) The metabolic syndrome. *Endocr Rev* 29:777-822.
- Das S, Aiba T, Rosenberg M, Hessler K, Xiao C, Quintero PA, Ottaviano FG, Knight AC, Graham EL, Bostrom P, Morissette MR, del Monte F, Begley MJ, Cantley LC, Ellinor PT, Tomaselli GF, Rosenzweig A (2012) Pathological role of serum- and glucocorticoid-regulated kinase 1 in adverse ventricular remodeling. *Circulation* 126:2208-2219.
- Debonneville C, Flores SY, Kamynina E, Plant PJ, Tauxe C, Thomas MA, Munster C, Chraïbi A, Pratt JH, Horisberger JD, Pearce D, Loffing J, Staub O (2001) Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na⁽⁺⁾ channel cell surface expression. *EMBO J* 20:7052-7059.
- Di Pietro N, Panel V, Hayes S, Bagattin A, Meruvu S, Pandolfi A, Hugendubler L, Fejes-Toth G, Naray-Fejes-Toth A, Mueller E (2010) Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1) regulates adipocyte differentiation via forkhead box O1. *Mol Endocrinol* 24:370-380.
- Dieter M, Palmada M, Rajamanickam J, Aydin A, Busjahn A, Boehmer C, Luft FC, Lang F (2004) Regulation of glucose transporter SGLT1 by ubiquitin ligase Nedd4-2 and kinases SGK1, SGK3, and PKB. *Obes Res* 12:862-870.
- Dimke H (2011) Exploring the intricate regulatory network controlling the thiazide-sensitive NaCl cotransporter (NCC). *Pflugers Arch* 462:767-777.
- Engelsberg A, Kobelt F, Kuhl D (2006) The N-terminus of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase Sgk1 specifies mitochondrial localization and rapid turnover. *Biochem J* 399:69-76.
- Erlenkamp S, Glitsch HG, Kockskamper J (2002) Dual regulation of cardiac Na⁺-K⁺ pumps and CFTR Cl⁻ channels by protein kinases A and C. *Pflugers Arch* 444:251-262.
- Farjah M, Roxas BP, Geenen DL, Danziger RS (2003) Dietary salt regulates renal SGK1 abundance: relevance to salt sensitivity in the Dahl rat. *Hypertension* 41:874-878.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por:	Fecha:
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

- Farman N, Rafestin-Oblin ME (2001) Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity. *Am J Physiol Renal Physiol* 280:F181-192.
- Feng Y, Wang Q, Wang Y, Yard B, Lang F (2005) SGK1-mediated fibronectin formation in diabetic nephropathy. *Cell Physiol Biochem* 16:237-244.
- Feraco A, Armani A, Mammi C, Fabbri A, Rosano GM, Caprio M (2013) Role of mineralocorticoid receptor and renin-angiotensin-aldosterone system in adipocyte dysfunction and obesity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 137:99-106.
- Fiebeler A, Nussberger J, Shagdarsuren E, Rong S, Hilfenhaus G, Al-Saadi N, Dechend R, Wellner M, Meiners S, Maser-Gluth C, Jeng AY, Webb RL, Luft FC, Muller DN (2005) Aldosterone synthase inhibitor ameliorates angiotensin II-induced organ damage. *Circulation* 111:3087-3094.
- Firestone GL, Giampaolo JR, O'Keeffe BA (2003) Stimulus-dependent regulation of serum and glucocorticoid inducible protein kinase (SGK) transcription, subcellular localization and enzymatic activity. *Cell Physiol Biochem* 13:1-12.
- Fischer E, Adolf C, Pallauf A, Then C, Bidlingmaier M, Beuschlein F, Seissler J, Reincke M (2013) Aldosterone excess impairs first phase insulin secretion in primary aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab* 98:2513-2520.
- Fiseha T, Tamir Z (2016) Urinary Markers of Tubular Injury in Early Diabetic Nephropathy. *Int J Nephrol* 2016:4647685.
- Foidart JM, Faustmann T (2007) Advances in hormone replacement therapy: weight benefits of drospirenone, a 17alpha-spirolactone-derived progestogen. *Gynecol Endocrinol* 23:692-699.
- Fraccarollo D, Berger S, Galuppo P, Kneitz S, Hein L, Schutz G, Frantz S, Ertl G, Bauersachs J (2011) Deletion of cardiomyocyte mineralocorticoid receptor ameliorates adverse remodeling after myocardial infarction. *Circulation* 123:400-408.
- Friedrich B, Warntges S, Klingel K, Sauter M, Kandolf R, Risler T, Muller GA, Witzgall R, Kriz W, Grone HJ, Lang F (2002) Up-regulation of the human serum and glucocorticoid-dependent kinase 1 in glomerulonephritis. *Kidney Blood Press Res* 25:303-307.
- Fullerton MJ, Funder JW (1994) Aldosterone and cardiac fibrosis: in vitro studies. *Cardiovasc Res* 28:1863-1867.
- Funder JW (2004) Is aldosterone bad for the heart? *Trends Endocrinol Metab* 15:139-142.
- Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I (2004) Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 114:1752-1761.
- Garg R, Adler GK (2012) Role of mineralocorticoid receptor in insulin resistance. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 19:168-175.
- Gatto M, Iaccarino L, Ghirardello A, Bassi N, Pontisso P, Punzi L, Shoenfeld Y, Doria A (2013) Serpins, immunity and autoimmunity: old molecules, new functions. *Clin Rev Allergy Immunol* 45:267-280.
- Gomez-Sanchez CE, de Rodriguez AF, Romero DG, Estess J, Warden MP, Gomez-Sanchez MT, Gomez-Sanchez EP (2006) Development of a panel of monoclonal antibodies against the mineralocorticoid receptor. *Endocrinology* 147:1343-1348.
- Gomez-Sanchez EP (2016) Third-generation Mineralocorticoid Receptor Antagonists: Why Do We Need a Fourth? *J Cardiovasc Pharmacol* 67:26-38.
- Gomez-Sanchez EP, Gomez-Sanchez CE (2012) Central regulation of blood pressure by the mineralocorticoid receptor. *Mol Cell Endocrinol* 350:289-298.

Firmado por:	Fecha:
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

- Gu JW, Young E, Pan ZJ, Tucker KB, Shparago M, Huang M, Bailey AP (2009) Long-term high salt diet causes hypertension and alters renal cytokine gene expression profiles in Sprague-Dawley rats. *Beijing Da Xue Xue Bao* 41:505-515.
- Gundersen HJ (1988) The nucleator. *J Microsc* 151:3-21.
- Guo C, Ricchiuti V, Lian BQ, Yao TM, Coutinho P, Romero JR, Li J, Williams GH, Adler GK (2008) Mineralocorticoid receptor blockade reverses obesity-related changes in expression of adiponectin, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, and proinflammatory adipokines. *Circulation* 117:2253-2261.
- Harms M, Seale P (2013) Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med* 19:1252-1263.
- Heit C, Jackson BC, McAndrews M, Wright MW, Thompson DC, Silverman GA, Nebert DW, Vasiliou V (2013) Update of the human and mouse SERPIN gene superfamily. *Hum Genomics* 7:22.
- Helms MN, Yu L, Malik B, Kleinhenz DJ, Hart CM, Eaton DC (2005) Role of SGK1 in nitric oxide inhibition of ENaC in Na⁺-transporting epithelia. *Am J Physiol Cell Physiol* 289:C717-726.
- Hernandez-Diaz I, Giraldez T, Arnau MR, Smits VA, Jaisser F, Farman N, Alvarez de la Rosa D (2010) The mineralocorticoid receptor is a constitutive nuclear factor in cardiomyocytes due to hyperactive nuclear localization signals. *Endocrinology* 151:3888-3899.
- Hirata A, Maeda N, Hiuge A, Hibuse T, Fujita K, Okada T, Kihara S, Funahashi T, Shimomura I (2009) Blockade of mineralocorticoid receptor reverses adipocyte dysfunction and insulin resistance in obese mice. *Cardiovasc Res* 84:164-172.
- Hoorn EJ, Nelson JH, McCormick JA, Ellison DH (2011) The WNK kinase network regulating sodium, potassium, and blood pressure. *J Am Soc Nephrol* 22:605-614.
- Huang DY, Boini KM, Friedrich B, Metzger M, Just L, Osswald H, Wulff P, Kuhl D, Vallon V, Lang F (2006a) Blunted hypertensive effect of combined fructose and high-salt diet in gene-targeted mice lacking functional serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290:R935-944.
- Huang DY, Boini KM, Osswald H, Friedrich B, Artunc F, Ullrich S, Rajamanickam J, Palmada M, Wulff P, Kuhl D, Vallon V, Lang F (2006b) Resistance of mice lacking the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1 against salt-sensitive hypertension induced by a high-fat diet. *Am J Physiol Renal Physiol* 291:F1264-1273.
- Huby AC, Antonova G, Groenendyk J, Gomez-Sanchez CE, Bollag WB, Filosa JA, Belin de Chantemele EJ (2015) Adipocyte-Derived Hormone Leptin Is a Direct Regulator of Aldosterone Secretion, Which Promotes Endothelial Dysfunction and Cardiac Fibrosis. *Circulation* 132:2134-2145.
- Huby AC, Otvos L, Jr., Belin de Chantemele EJ (2016) Leptin Induces Hypertension and Endothelial Dysfunction via Aldosterone-Dependent Mechanisms in Obese Female Mice. *Hypertension* 67:1020-1028.
- Humphreys BD, Xu F, Sabbisetti V, Grgic I, Movahedi Naini S, Wang N, Chen G, Xiao S, Patel D, Henderson JM, Ichimura T, Mou S, Soeung S, McMahon AP, Kuchroo VK, Bonventre JV (2013) Chronic epithelial kidney injury molecule-1 expression causes murine kidney fibrosis. *J Clin Invest* 123:4023-4035.
- Iraqi W, Rossignol P, Angioi M, Fay R, Nuee J, Ketelslegers JM, Vincent J, Pitt B, Zannad F (2009) Extracellular cardiac matrix biomarkers in patients with acute myocardial infarction complicated by left ventricular dysfunction and heart

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por:	Fecha:
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

failure: insights from the Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHESUS) study. *Circulation* 119:2471-2479.

- Ishibashi J, Seale P (2010) *Medicine*. Beige can be slimming. *Science* 328:1113-1114.
- Jaisser F, Farman N (2016) Emerging Roles of the Mineralocorticoid Receptor in Pathology: Toward New Paradigms in Clinical Pharmacology. *Pharmacol Rev* 68:49-75.
- Jennings P, Crean D, Aschauer L, Limonciel A, Moenks K, Kern G, Hewitt P, Lhotta K, Lukas A, Wilmes A, Leonard MO (2015) Interleukin-19 as a translational indicator of renal injury. *Arch Toxicol* 89:101-106.
- Jin HM, Zhou DC, Gu HF, Qiao QY, Fu SK, Liu XL, Pan Y (2013) Antioxidant N-acetylcysteine protects pancreatic beta-cells against aldosterone-induced oxidative stress and apoptosis in female db/db mice and insulin-producing MIN6 cells. *Endocrinology* 154:4068-4077.
- Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM (2006) Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444:840-846.
- Kang N, Walther T, Tian XL, Bohlender J, Fukamizu A, Ganten D, Bader M (2002) Reduced hypertension-induced end-organ damage in mice lacking cardiac and renal angiotensinogen synthesis. *J Mol Med (Berl)* 80:359-366.
- Kim JJ, Li P, Huntley J, Chang JP, Arden KC, Olefsky JM (2009) FoxO1 haploinsufficiency protects against high-fat diet-induced insulin resistance with enhanced peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation in adipose tissue. *Diabetes* 58:1275-1282.
- Kimura G (2005) Glomerular function reserve and sodium sensitivity. *Clin Exp Nephrol* 9:102-113.
- Kobayashi T, Cohen P (1999) Activation of serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate phosphatidylinositide 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) and PDK2. *Biochem J* 339 (Pt 2):319-328.
- Kok HM, Falke LL, Goldschmeding R, Nguyen TQ (2014) Targeting CTGF, EGF and PDGF pathways to prevent progression of kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 10:700-711.
- Konvalinka A, Batruch I, Tokar T, Dimitromanolakis A, Reid S, Song X, Pei Y, Drabovich AP, Diamandis EP, Jurisica I, Scholey JW (2016) Quantification of angiotensin II-regulated proteins in urine of patients with polycystic and other chronic kidney diseases by selected reaction monitoring. *Clin Proteomics* 13:16.
- Laloti M, Heath J (2001) A new method for generating point mutations in bacterial artificial chromosomes by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 29:E14.
- Lang F, Artunc F, Vallon V (2009a) The physiological impact of the serum and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 18:439-448.
- Lang F, Bohmer C, Palmada M, Seebohm G, Strutz-Seebohm N, Vallon V (2006) (Patho)physiological significance of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase isoforms. *Physiol Rev* 86:1151-1178.
- Lang F, Gorchach A, Vallon V (2009b) Targeting SGK1 in diabetes. *Expert Opin Ther Targets* 13:1303-1311.
- Lang F, Klingel K, Wagner CA, Stegen C, Warntges S, Friedrich B, Lanzendorfer M, Melzig J, Moschen I, Steuer S, Waldegger S, Sauter M, Paulmichl M, Gerke V, Risler T, Gamba G, Capasso G, Kandolf R, Hebert SC, Massry SG, Broer S

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por:	Fecha:
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

- (2000) Deranged transcriptional regulation of cell-volume-sensitive kinase hSGK in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8157-8162.
- Lang F, Stourmaras C (2013) Serum and glucocorticoid inducible kinase, metabolic syndrome, inflammation, and tumor growth. *Hormones (Athens)* 12:160-171.
- Latouche C, El Moghrabi S, Messaoudi S, Nguyen Dinh Cat A, Hernandez-Diaz I, Alvarez de la Rosa D, Perret C, Lopez Andres N, Rossignol P, Zannad F, Farman N, Jaisser F (2012) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a novel mineralocorticoid target in the cardiovascular system. *Hypertension* 59:966-972.
- Law RH, Zhang Q, McGowan S, Buckle AM, Silverman GA, Wong W, Rosado CJ, Langendorf CG, Pike RN, Bird PI, Whisstock JC (2006) An overview of the serpin superfamily. *Genome Biol* 7:216.
- Li P, Hao Y, Pan FH, Zhang M, Ma JQ, Zhu DL (2016) SGK1 inhibitor reverses hyperglycemia partly through decreasing glucose absorption. *J Mol Endocrinol* 56:301-309.
- Liang X, Butterworth MB, Peters KW, Frizzell RA (2010) AS160 modulates aldosterone-stimulated epithelial sodium channel forward trafficking. *Mol Biol Cell* 21:2024-2033.
- Liu S, Yu X, Xu Q, Cui J, Yi M, Zhang X, Ge Y, Ma X (2015) Support of positive association in family-based genetic analysis between COL27A1 and Tourette syndrome. *Sci Rep* 5:12687.
- Lombes M, Oblin ME, Gasc JM, Baulieu EE, Farman N, Bonvalet JP (1992) Immunohistochemical and biochemical evidence for a cardiovascular mineralocorticoid receptor. *Circ Res* 71:503-510.
- Lopez-Andres N, Martin-Fernandez B, Rossignol P, Zannad F, Lahera V, Fortuno MA, Cachafeiro V, Diez J (2011) A role for cardiotrophin-1 in myocardial remodeling induced by aldosterone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301:H2372-2382.
- Lopez-Andres N, Rousseau A, Akhtar R, Calvier L, Inigo C, Labat C, Zhao X, Cruickshank K, Diez J, Zannad F, Lacolley P, Rossignol P (2012) Cardiotrophin 1 is involved in cardiac, vascular, and renal fibrosis and dysfunction. *Hypertension* 60:563-573.
- Lothar A, Berger S, Gilsbach R, Rosner S, Ecke A, Barreto F, Bauersachs J, Schutz G, Hein L (2011) Ablation of mineralocorticoid receptors in myocytes but not in fibroblasts preserves cardiac function. *Hypertension* 57:746-754.
- Lothar A, Furst D, Bergemann S, Gilsbach R, Grahmmer F, Huber TB, Hilgendorf I, Bode C, Moser M, Hein L (2016) Deoxycorticosterone Acetate/Salt-Induced Cardiac But Not Renal Injury Is Mediated By Endothelial Mineralocorticoid Receptors Independently From Blood Pressure. *Hypertension* 67:130-138.
- Lothar A, Moser M, Bode C, Feldman RD, Hein L (2015) Mineralocorticoids in the heart and vasculature: new insights for old hormones. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 55:289-312.
- Lou Y, Zhang F, Luo Y, Wang L, Huang S, Jin F (2016) Serum and Glucocorticoid Regulated Kinase 1 in Sodium Homeostasis. *Int J Mol Sci* 17.
- Luis-Lima S, Rodriguez-Rodriguez AE, Martin-Higueras C, Sierra-Ramos C, Carrara F, Arnau MR, de la Rosa DA, Salido E, Gaspari F, Porrini E (2016) Iohexol plasma clearance, a simple and reliable method to measure renal function in conscious mice. *Pflugers Arch*.
- Luther JM, Luo P, Kreger MT, Brissova M, Dai C, Whitfield TT, Kim HS, Wasserman DH, Powers AC, Brown NJ (2011) Aldosterone decreases glucose-stimulated

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por:	Fecha:
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

- insulin secretion in vivo in mice and in murine islets. *Diabetologia* 54:2152-2163.
- MacDougald OA, Mandrup S (2002) Adipogenesis: forces that tip the scales. *Trends Endocrinol Metab* 13:5-11.
- Marionneau C, Abriel H (2015) Regulation of the cardiac Na⁺ channel NaV1.5 by post-translational modifications. *J Mol Cell Cardiol* 82:36-47.
- Martin-Fernandez B, Valero Munoz M, de las Heras N, Ballesteros S, Lahera V (2014) Relevance of SGK1 in structural, functional and molecular alterations produced by aldosterone in heart. *Horm Mol Biol Clin Investig* 18:53-61.
- Marzolla V, Armani A, Zennaro MC, Cinti F, Mammi C, Fabbri A, Rosano GM, Caprio M (2012) The role of the mineralocorticoid receptor in adipocyte biology and fat metabolism. *Mol Cell Endocrinol* 350:281-288.
- Matsuo S, Lopez-Guisa JM, Cai X, Okamura DM, Alpers CE, Bumgarner RE, Peters MA, Zhang G, Eddy AA (2005) Multifunctionality of PAI-1 in fibrogenesis: evidence from obstructive nephropathy in PAI-1-overexpressing mice. *Kidney Int* 67:2221-2238.
- McCurley A, Pires PW, Bender SB, Aronovitz M, Zhao MJ, Metzger D, Chambon P, Hill MA, Dorrance AM, Mendelsohn ME, Jaffe IZ (2012) Direct regulation of blood pressure by smooth muscle cell mineralocorticoid receptors. *Nat Med* 18:1429-1433.
- Messaoudi S, Gravez B, Tarjus A, Pelloux V, Ouvrard-Pascaud A, Delcayre C, Samuel J, Launay JM, Sierra-Ramos C, Alvarez de la Rosa D, Clement K, Farman N, Jaisser F (2013) Aldosterone-specific activation of cardiomyocyte mineralocorticoid receptor in vivo. *Hypertension* 61:361-367.
- Miranda P, Cadaveira-Mosquera A, Gonzalez-Montelongo R, Villarroel A, Gonzalez-Hernandez T, Lamas JA, Alvarez de la Rosa D, Giraldez T (2013) The neuronal serum- and glucocorticoid-regulated kinase 1.1 reduces neuronal excitability and protects against seizures through upregulation of the M-current. *J Neurosci* 33:2684-2696.
- Moes AD, van der Lubbe N, Zietse R, Loffing J, Hoorn EJ (2014) The sodium chloride cotransporter SLC12A3: new roles in sodium, potassium, and blood pressure regulation. *Pflugers Arch* 466:107-118.
- Munoz-Durango N, Fuentes CA, Castillo AE, Gonzalez-Gomez LM, Vecchiola A, Fardella CE, Kalergis AM (2016) Role of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System beyond Blood Pressure Regulation: Molecular and Cellular Mechanisms Involved in End-Organ Damage during Arterial Hypertension. *Int J Mol Sci* 17.
- Nagai Y, Miyata K, Sun GP, Rahman M, Kimura S, Miyatake A, Kiyomoto H, Kohno M, Abe Y, Yoshizumi M, Nishiyama A (2005) Aldosterone stimulates collagen gene expression and synthesis via activation of ERK1/2 in rat renal fibroblasts. *Hypertension* 46:1039-1045.
- Nagase M, Fujita T (2008) Aldosterone and glomerular podocyte injury. *Clin Exp Nephrol* 12:233-242.
- Nagy TR, Clair AL (2000) Precision and accuracy of dual-energy X-ray absorptiometry for determining in vivo body composition of mice. *Obes Res* 8:392-398.
- Nakae J, Kitamura T, Kitamura Y, Biggs WH, 3rd, Arden KC, Accili D (2003) The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Dev Cell* 4:119-129.
- Nakano D, Kwak CJ, Fujii K, Ikemura K, Satake A, Ohkita M, Takaoka M, Ono Y, Nakai M, Tomimori N, Kiso Y, Matsumura Y (2006) Sesamin metabolites induce an endothelial nitric oxide-dependent vasorelaxation through their

Identificador del documento: 828672		Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS		Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ		28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ		29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO		11/12/2016 10:56:17

antioxidative property-independent mechanisms: possible involvement of the metabolites in the antihypertensive effect of sesamin. *J Pharmacol Exp Ther* 318:328-335.

- Oda T, Jung YO, Kim HS, Cai X, Lopez-Guisa JM, Ikeda Y, Eddy AA (2001) PAI-1 deficiency attenuates the fibrogenic response to ureteral obstruction. *Kidney Int* 60:587-596.
- Pace JM, Corrado M, Missero C, Byers PH (2003) Identification, characterization and expression analysis of a new fibrillar collagen gene, COL27A1. *Matrix Biol* 22:3-14.
- Palacios S, Foidart JM, Genazzani AR (2006) Advances in hormone replacement therapy with drospirenone, a unique progestogen with aldosterone receptor antagonism. *Maturitas* 55:297-307.
- Panduru NM, Sandholm N, Forsblom C, Saraheimo M, Dahlstrom EH, Thorn LM, Gordin D, Tolonen N, Waden J, Harjutsalo V, Bierhaus A, Humpert PM, Groop PH, FinnDiane Study G (2015) Kidney injury molecule-1 and the loss of kidney function in diabetic nephropathy: a likely causal link in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 38:1130-1137.
- Perez-Rojas J, Blanco JA, Cruz C, Trujillo J, Vaidya VS, Uribe N, Bonventre JV, Gamba G, Bobadilla NA (2007) Mineralocorticoid receptor blockade confers renoprotection in preexisting chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol* 292:F131-139.
- Perez-Rojas JM, Derive S, Blanco JA, Cruz C, Martinez de la Maza L, Gamba G, Bobadilla NA (2005) Renocortical mRNA expression of vasoactive factors during spironolactone protective effect in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol* 289:F1020-1030.
- Pitt B, Pfeffer MA, Assmann SF, Boineau R, Anand IS, Claggett B, Clausell N, Desai AS, Diaz R, Fleg JL, Gordeev I, Harty B, Heitner JF, Kenwood CT, Lewis EF, O'Meara E, Probstfield JL, Shaburishvili T, Shah SJ, Solomon SD, Sweitzer NK, Yang S, McKinlay SM, Investigators T (2014) Spironolactone for heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med* 370:1383-1392.
- Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J (1999) The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 341:709-717.
- Polman JA, de Kloet ER, Datson NA (2013) Two populations of glucocorticoid receptor-binding sites in the male rat hippocampal genome. *Endocrinology* 154:1832-1844.
- Preston RA, Norris PM, Alonso AB, Ni P, Hanes V, Karara AH (2007) Randomized, placebo-controlled trial of the effects of drospirenone-estradiol on blood pressure and potassium balance in hypertensive postmenopausal women receiving hydrochlorothiazide. *Menopause* 14:408-414.
- Pruthi D, McCurley A, Aronovitz M, Galayda C, Karumanchi SA, Jaffe IZ (2014) Aldosterone promotes vascular remodeling by direct effects on smooth muscle cell mineralocorticoid receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34:355-364.
- Reed MG, Howard CV, GS DEY (2010) One-stop stereology: the estimation of 3D parameters using isotropic rulers. *J Microsc* 239:54-65.
- Remde H, Hanslik G, Rayes N, Quinkler M (2015) Glucose Metabolism in Primary Aldosteronism. *Horm Metab Res* 47:987-993.
- Rickard AJ, Morgan J, Bienvenu LA, Fletcher EK, Cranston GA, Shen JZ, Reichelt ME, Delbridge LM, Young MJ (2012) Cardiomyocyte mineralocorticoid

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por:	Fecha:
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

- receptors are essential for deoxycorticosterone/salt-mediated inflammation and cardiac fibrosis. *Hypertension* 60:1443-1450.
- Rickard AJ, Morgan J, Chrissobolis S, Miller AA, Sobey CG, Young MJ (2014) Endothelial cell mineralocorticoid receptors regulate deoxycorticosterone/salt-mediated cardiac remodeling and vascular reactivity but not blood pressure. *Hypertension* 63:1033-1040.
- Rickard AJ, Morgan J, Tesch G, Funder JW, Fuller PJ, Young MJ (2009) Deletion of mineralocorticoid receptors from macrophages protects against deoxycorticosterone/salt-induced cardiac fibrosis and increased blood pressure. *Hypertension* 54:537-543.
- Rondinone CM, Rodbard D, Baker ME (1993) Aldosterone stimulated differentiation of mouse 3T3-L1 cells into adipocytes. *Endocrinology* 132:2421-2426.
- Rossi GP, Sechi LA, Giacchetti G, Ronconi V, Strazzullo P, Funder JW (2008) Primary aldosteronism: cardiovascular, renal and metabolic implications. *Trends Endocrinol Metab* 19:88-90.
- Satoh N, Nakamura M, Suzuki M, Suzuki A, Seki G, Horita S (2015) Roles of Akt and SGK1 in the Regulation of Renal Tubular Transport. *Biomed Res Int* 2015:971697.
- Selvaraj J, Muthusamy T, Srinivasan C, Balasubramanian K (2009) Impact of excess aldosterone on glucose homeostasis in adult male rat. *Clin Chim Acta* 407:51-57.
- Selvaraj J, Sathish S, Mayilvanan C, Balasubramanian K (2013) Excess aldosterone-induced changes in insulin signaling molecules and glucose oxidation in gastrocnemius muscle of adult male rat. *Mol Cell Biochem* 372:113-126.
- Shavit L, Lifschitz MD, Epstein M (2012) Aldosterone blockade and the mineralocorticoid receptor in the management of chronic kidney disease: current concepts and emerging treatment paradigms. *Kidney Int* 81:955-968.
- Shindo T, Kurihara H, Maemura K, Kurihara Y, Ueda O, Suzuki H, Kuwaki T, Ju KH, Wang Y, Ebihara A, Nishimatsu H, Moriyama N, Fukuda M, Akimoto Y, Hirano H, Morita H, Kumada M, Yazaki Y, Nagai R, Kimura K (2002) Renal damage and salt-dependent hypertension in aged transgenic mice overexpressing endothelin-1. *J Mol Med (Berl)* 80:105-116.
- Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettins PG, Irving JA, Lomas DA, Luke CJ, Moyer RW, Pemberton PA, Remold-O'Donnell E, Salvesen GS, Travis J, Whisstock JC (2001) The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J Biol Chem* 276:33293-33296.
- Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H (2007) Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 92:1023-1033.
- Snyder PM, Olson DR, Thomas BC (2002) Serum and glucocorticoid-regulated kinase modulates Nedd4-2-mediated inhibition of the epithelial Na⁺ channel. *J Biol Chem* 277:5-8.
- Stanford KI, Middelbeek RJ, Townsend KL, An D, Nygaard EB, Hitchcox KM, Markan KR, Nakano K, Hirshman MF, Tseng YH, Goodyear LJ (2013) Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J Clin Invest* 123:215-223.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por:	Fecha:
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

- Stevens VA, Saad S, Poronnik P, Fenton-Lee CA, Polhill TS, Pollock CA (2008) The role of SGK-1 in angiotensin II-mediated sodium reabsorption in human proximal tubular cells. *Nephrol Dial Transplant* 23:1834-1843.
- Terada Y, Kuwana H, Kobayashi T, Okado T, Suzuki N, Yoshimoto T, Hirata Y, Sasaki S (2008) Aldosterone-stimulated SGK1 activity mediates profibrotic signaling in the mesangium. *J Am Soc Nephrol* 19:298-309.
- Urbanet R, Nguyen Dinh Cat A, Feraco A, Venteclef N, El Mogrhabi S, Sierra-Ramos C, Alvarez de la Rosa D, Adler GK, Quilliot D, Rossignol P, Fallo F, Touyz RM, Jaissier F (2015) Adipocyte Mineralocorticoid Receptor Activation Leads to Metabolic Syndrome and Induction of Prostaglandin D2 Synthase. *Hypertension* 66:149-157.
- Vallon V, Huang DY, Grahammer F, Wyatt AW, Osswald H, Wulff P, Kuhl D, Lang F (2005) SGK1 as a determinant of kidney function and salt intake in response to mineralocorticoid excess. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289:R395-R401.
- Vallon V, Lang F (2005) New insights into the role of serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1 in the regulation of renal function and blood pressure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 14:59-66.
- Vallon V, Wyatt AW, Klingel K, Huang DY, Hussain A, Berchtold S, Friedrich B, Grahammer F, Belaiba RS, Grolach A, Wulff P, Daut J, Dalton ND, Ross J, Jr., Flogel U, Schrader J, Osswald H, Kandolf R, Kuhl D, Lang F (2006) SGK1-dependent cardiac CTGF formation and fibrosis following DOCA treatment. *J Mol Med (Berl)* 84:396-404.
- Viengchareun S, Le Menuet D, Martinerie L, Munier M, Pascual-Le Tallec L, Lombes M (2007) The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho)physiological biology. *Nucl Recept Signal* 5:e012.
- von Wovorn F, Berglund G, Carlson J, Mansson H, Hedblad B, Melander O (2005) Genetic variance of SGK-1 is associated with blood pressure, blood pressure change over time and strength of the insulin-diastolic blood pressure relationship. *Kidney Int* 68:2164-2172.
- Wada T, Kenmochi H, Miyashita Y, Sasaki M, Ojima M, Sasahara M, Koya D, Tsuneki H, Sasaoka T (2010) Spironolactone improves glucose and lipid metabolism by ameliorating hepatic steatosis and inflammation and suppressing enhanced gluconeogenesis induced by high-fat and high-fructose diet. *Endocrinology* 151:2040-2049.
- Wada T, Ohshima S, Fujisawa E, Koya D, Tsuneki H, Sasaoka T (2009) Aldosterone inhibits insulin-induced glucose uptake by degradation of insulin receptor substrate (IRS) 1 and IRS2 via a reactive oxygen species-mediated pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology* 150:1662-1669.
- Waldegger S, Barth P, Forrest JN, Jr., Greger R, Lang F (1998) Cloning of sgk serine-threonine protein kinase from shark rectal gland - a gene induced by hypertonicity and secretagogues. *Pflugers Arch* 436:575-580.
- Waldegger S, Barth P, Raber G, Lang F (1997) Cloning and characterization of a putative human serine/threonine protein kinase transcriptionally modified during anisotonic and isotonic alterations of cell volume. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4440-4445.
- Waldegger S, Klingel K, Barth P, Sauter M, Rfer ML, Kandolf R, Lang F (1999) h-sgk serine-threonine protein kinase gene as transcriptional target of transforming growth factor beta in human intestine. *Gastroenterology* 116:1081-1088.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por:	Fecha:
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

- Wang J, Barbry P, Maiyar AC, Rozansky DJ, Bhargava A, Leong M, Firestone GL, Pearce D (2001) SGK integrates insulin and mineralocorticoid regulation of epithelial sodium transport. *Am J Physiol Renal Physiol* 280:F303-313.
- Wang Y, Zhu M, Xu H, Cui L, Liu W, Wang X, Shen S, Wang DH (2015) Role of the monocyte chemoattractant protein-1/C-C chemokine receptor 2 signaling pathway in transient receptor potential vanilloid type 1 ablation-induced renal injury in salt-sensitive hypertension. *Exp Biol Med (Maywood)* 240:1223-1234.
- Waring WS, Moonie A (2011) Earlier recognition of nephrotoxicity using novel biomarkers of acute kidney injury. *Clin Toxicol (Phila)* 49:720-728.
- Webster MK, Goya L, Ge Y, Maiyar AC, Firestone GL (1993) Characterization of sgk, a novel member of the serine/threonine protein kinase gene family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum. *Mol Cell Biol* 13:2031-2040.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1796-1808.
- White WB, Hanes V, Chauhan V, Pitt B (2006) Effects of a new hormone therapy, drospirenone and 17-beta-estradiol, in postmenopausal women with hypertension. *Hypertension* 48:246-253.
- Wolf G, Schroeder R, Ziyadeh FN, Stahl RA (2004) Albumin up-regulates the type II transforming growth factor-beta receptor in cultured proximal tubular cells. *Kidney Int* 66:1849-1858.
- Wulff P, Vallon V, Huang DY, Volkl H, Yu F, Richter K, Jansen M, Schlunz M, Klingel K, Loffing J, Kauselmann G, Bosl MR, Lang F, Kuhl D (2002) Impaired renal Na(+) retention in the sgk1-knockout mouse. *J Clin Invest* 110:1263-1268.
- Xie D, Bollag WB (2016) Obesity, hypertension and aldosterone: is leptin the link? *J Endocrinol* 230:F7-F11.
- Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H (2003) Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112:1821-1830.
- Xu L, Pan L, Li J, Huang B, Feng J, Li C, Wang S, The E, Liu Y, Yuan T, Zhen L, Liang D, Liu Y, Li L, Cui Y, Jiang X, Peng L, Chen YH (2015) Nucleoporin 35 regulates cardiomyocyte pH homeostasis by controlling Na⁺-H⁺ exchanger-1 expression. *J Mol Cell Biol* 7:476-485.
- Yamashita R, Kikuchi T, Mori Y, Aoki K, Kaburagi Y, Yasuda K, Sekihara H (2004) Aldosterone stimulates gene expression of hepatic gluconeogenic enzymes through the glucocorticoid receptor in a manner independent of the protein kinase B cascade. *Endocr J* 51:243-251.
- Yang J, Shultz RW, Mars WM, Wegner RE, Li Y, Dai C, Nejak K, Liu Y (2002) Disruption of tissue-type plasminogen activator gene in mice reduces renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *J Clin Invest* 110:1525-1538.
- Yang P, Huang T, Xu G (2016) The novel mineralocorticoid receptor antagonist finerenone in diabetic kidney disease: Progress and challenges. *Metabolism* 65:1342-1349.
- Zannad F, Alla F, Dousset B, Perez A, Pitt B (2000) Limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart failure: insights from the randomized aldactone evaluation study (RALES). *Rales Investigators. Circulation* 102:2700-2706.

Identificador del documento: 828672		Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS		Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ		28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ		29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO		11/12/2016 10:56:17

- Zannad F, McMurray JJ, Krum H, van Veldhuisen DJ, Swedberg K, Shi H, Vincent J, Pocock SJ, Pitt B, Group E-HS (2011) Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N Engl J Med* 364:11-21.
- Zarrinpashneh E, Poggioli T, Sarathchandra P, Lexow J, Monassier L, Terracciano C, Lang F, Damilano F, Zhou JQ, Rosenzweig A, Rosenthal N, Santini MP (2013) Ablation of SGK1 impairs endothelial cell migration and tube formation leading to decreased neo-angiogenesis following myocardial infarction. *PLoS One* 8:e80268.
- Zennaro MC, Caprio M, Feve B (2009) Mineralocorticoid receptors in the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab* 20:444-451.
- Zhang L, Cui R, Cheng X, Du J (2005) Antiapoptotic effect of serum and glucocorticoid-inducible protein kinase is mediated by novel mechanism activating I κ B kinase. *Cancer Res* 65:457-464.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 828672	Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: <i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS</i>	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
<i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ</i>	28/11/2016 11:47:29
<i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ</i>	29/11/2016 14:09:00
<i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO</i>	11/12/2016 10:56:17

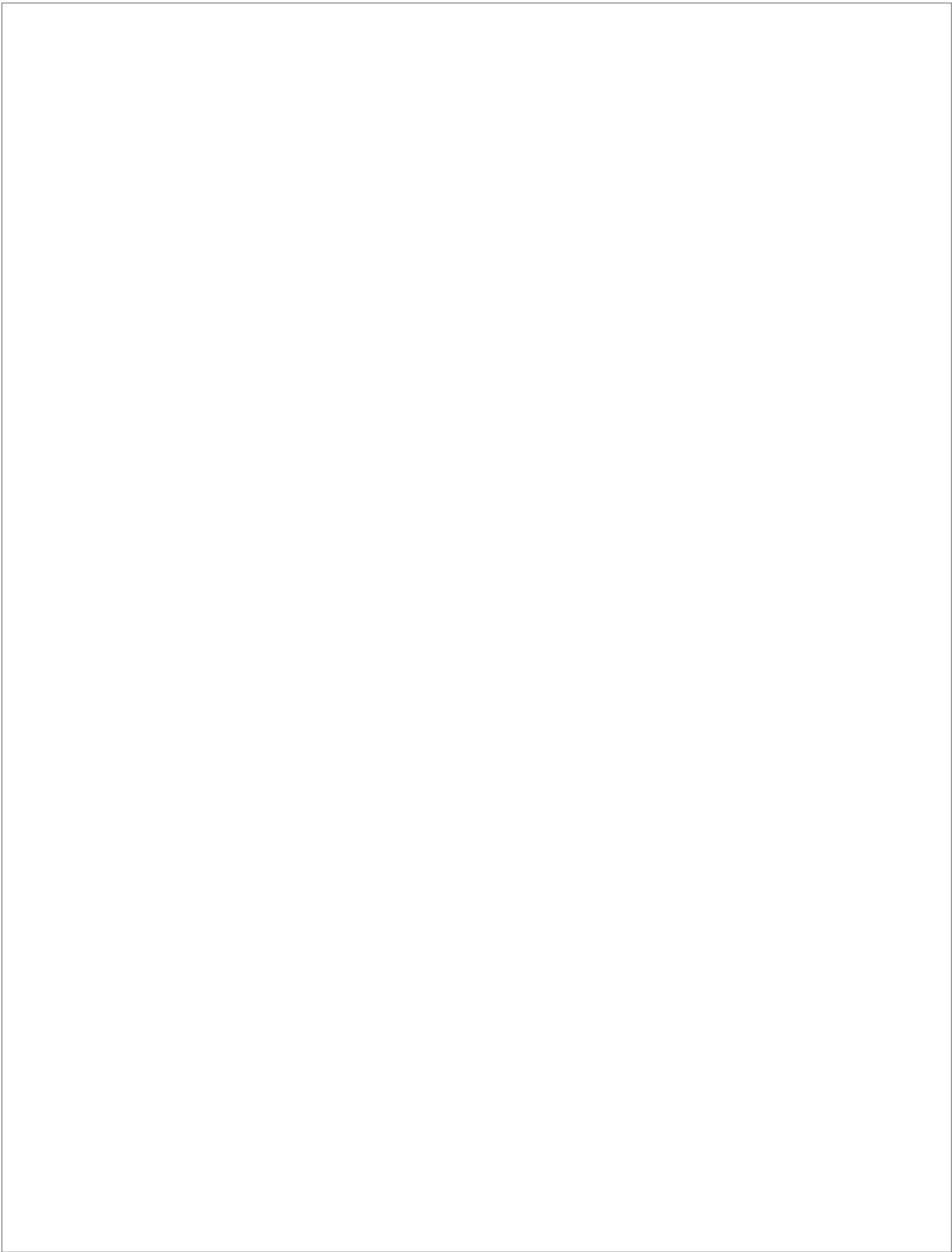
Anexos

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS</i>	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ</i>	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ</i>	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA <i>En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO</i>	11/12/2016 10:56:17



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

Anexo I. Genes con variación estadísticamente significativa entre animales *wild type* y transgénicos tratados con DOCA/Sal.

Análisis de expresión diferencial transgénicos vs *wild type* tratados con DOCA/Sal. 101 genes-probesets con FDR= 0.101 (10% falsos positivos). En rojo se indican los genes cuya expresión está inducida en los animales transgénicos y en azul aquellos que reprimen su expresión en comparación con los animales *wild type*.

dvalue	p value	qvalue	R fold	Genename
16,22041547	6,91049E-07	0,02217692	10,42804381	Cpb2
9,474916124	6,21944E-06	0,024641022	2,022855052	Nnt
7,737698699	9,67469E-06	0,025588754	3,714218318	Pisd-ps3
7,842075126	8,29259E-06	0,025588754	2,859092611	Pisd-ps2
7,568953849	1,03657E-05	0,025588754	2,028766132	Alad
6,890165858	1,3821E-05	0,029569227	2,726329868	Gm7120
7,065924056	1,31299E-05	0,029569227	1,906662276	Lyplal1
6,301131472	1,86583E-05	0,031047688	2,853480972	Igkv4-68
6,719599396	1,58941E-05	0,031047688	1,647474905	Serpina3b
5,649236043	3,59346E-05	0,042274754	4,174206615	Igkv4-59
5,537262703	4,07719E-05	0,042274754	1,760128749	Nell2
5,517785489	4,1463E-05	0,042274754	1,68074354	Nepn
5,680363257	3,45525E-05	0,042274754	1,454080798	N4bp211
5,446208241	4,63003E-05	0,043701578	1,493899471	Gjal
5,373352715	5,04466E-05	0,044969866	1,354798837	Fam214a
5,249076945	6,01213E-05	0,047058342	4,494557678	Ccl28
5,265029128	5,73571E-05	0,047058342	1,681053928	Lrrc31
5,157048182	6,77228E-05	0,04989807	1,799601754	Hdhd3
5,174632178	6,56497E-05	0,04989807	1,338424157	Gm13660
4,782865957	0,000101584	0,059272859	1,668630564	A130010J15Rik
4,678437212	0,000114023	0,062464991	1,826431171	Pcdh17
4,674603517	0,000115405	0,062464991	1,357335391	Esm1
4,601778724	0,000131299	0,064732631	1,619234802	Neo1
4,513552067	0,000143738	0,064732631	1,610159655	Cdhr2
4,613837897	0,000127844	0,064732631	1,550042517	Erbp3
4,590045229	0,000132681	0,064732631	1,465326014	Pxdn
4,468351204	0,000157559	0,066818772	2,476067531	Igfbp1
4,431350434	0,000165161	0,067092201	1,813896163	Vmn1r20
4,31743322	0,000194185	0,070019264	3,192221426	Igkv4-70
4,318333693	0,000193494	0,070019264	1,379442286	Mx2
4,294665534	0,000201095	0,070146562	4,448534975	Igj
4,251599004	0,000214916	0,073372576	1,338904268	Mafk
4,230182713	0,000220445	0,073692057	1,51818192	Acsf2
4,191045299	0,000241176	0,078387727	1,452385443	Slc8a1
4,181564559	0,000246705	0,078387727	1,372918045	Lrig2
4,163107613	0,000256379	0,078966416	1,460383335	Glt1d1
4,040104205	0,000317883	0,082938075	2,863281156	Igkv8-30
4,000227264	0,000342069	0,086612223	1,38929661	Plekhn2
3,942069778	0,000381459	0,089488558	1,934864342	Cpe
3,924769312	0,00039528	0,089488558	1,511302113	Olfir1392

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672 Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

3,953404812	0,000373167	0,089488558	1,450109959	Col27a1
3,941385537	0,000382841	0,089488558	1,44195227	Vmn1r127
3,924319636	0,000395971	0,089488558	1,352393349	Slc13a2
3,955225533	0,000371093	0,089488558	1,266530214	Mtmr11
3,88072292	0,000420158	0,089890449	3,688882171	Igkv4-55
3,888049964	0,000417394	0,089890449	1,325684961	Ptpdc1
3,814320174	0,000470604	0,094149869	2,154686036	Igkv1-133
3,806278775	0,000475442	0,094149869	1,39286052	Grpel2
3,792150128	0,000482352	0,094387135	1,568048445	Tbc1d23
3,784351152	0,000487881	0,094719496	1,477845786	Zfp867
3,737707461	0,000519669	0,096399097	1,475012027	Clec2h
3,738936525	0,000516905	0,096399097	1,229759841	Osbpl6
3,715672935	0,00054662	0,098123579	1,347126506	Wdr70
3,701554019	0,000560441	0,099008435	1,543980861	Tfrc
3,698733372	0,000562514	0,099008435	1,267569072	Slc11a2
3,69281882	0,000568733	0,099193506	2,799121925	Igh-VJ558
3,674804114	0,000588774	0,100621876	1,457280709	Ppm1k
3,641214162	0,000622635	0,104069817	1,292061458	Trp53imp1
3,619502029	0,000654424	0,107700222	1,20625421	Prosc
3,603437166	0,000670318	0,109092526	1,347053363	Zfp760
3,589553604	0,00068483	0,110438833	1,540662693	Sectm1b
3,578523329	0,000698651	0,111546598	2,027205004	Igkv9-120
3,569995056	0,00071109	0,112970548	1,460767213	Phyhipl
3,520053055	0,00077052	0,11609045	2,461196921	Igk
3,524433653	0,000763609	0,11609045	1,644503436	Serpina3a
3,511975602	0,000787796	0,11628667	1,519365145	Tfb2m
3,504233695	0,000800235	0,11628667	1,492089233	Smyd2
3,513782263	0,000785032	0,11628667	1,440793575	Snx29
3,484630822	0,000827877	0,11628667	1,399433244	Fzd6
3,476808253	0,000838934	0,11628667	1,310873203	Atp6v1g1
3,490355887	0,000816129	0,11628667	1,309601193	Guf1
3,513706045	0,000786414	0,11628667	1,231252266	Gm6756
3,471322702	0,000847917	0,11628667	1,206735752	Apopt1
3,464738032	0,000865885	0,116544818	1,444725855	Sft2d1
3,466002606	0,000862429	0,116544818	1,392888679	Cyp4v3
3,464319647	0,000867267	0,116544818	1,38124472	Fnip2
3,463563198	0,000867958	0,116544818	1,261952329	Cir1
-10,10546627	4,83734E-06	0,02217692	0,419480109	Akr1c21
-8,996701199	6,91049E-06	0,024641022	0,010243096	Serpina1d
-7,822925908	8,98364E-06	0,025588754	0,396184117	Nxpe3
-6,424639862	1,72762E-05	0,031047688	0,543639213	Gm21464
-5,973894128	2,55688E-05	0,039073621	0,641236364	Adamts12
-5,864123072	2,69509E-05	0,039313631	0,634485951	1700112E06Rik
-5,735501234	3,31704E-05	0,042274754	0,723565102	Gm15315
-5,403541429	4,76824E-05	0,043720214	0,414722909	Gm10325
-5,332040948	5,32108E-05	0,046151969	0,551924406	Phyhip
-5,260308284	5,87392E-05	0,047058342	0,652743691	Gm21451
-4,634449265	0,000124389	0,064384606	0,745292501	Ccl22
-4,552784253	0,000137519	0,064732631	0,725469056	Ntn4
-4,409007388	0,000169307	0,067625917	0,653463348	Banp

162

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 828672

Código de verificación: 1kMe7orQ

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17

-4,376591082	0,000178291	0,068935486	0,491722816	Gm10002
-4,376591082	0,000178291	0,068935486	0,491722816	Gm10002
-4,213949985	0,000227355	0,075218626	0,577859556	Slc51b
-4,187042476	0,000245322	0,078387727	0,719829743	Mir143hg
-4,157756783	0,000259143	0,078966416	0,793937161	Zbtb3
-4,084252977	0,000295769	0,080694171	0,713954631	Hs3st4
-4,09492587	0,000290241	0,080694171	0,538209216	Rhox2c
-4,116917868	0,000281948	0,080694171	0,425102512	Serpina1c
-4,065201986	0,000305444	0,081254781	0,751218935	Gm10033
-4,05999292	0,000306826	0,081254781	0,699036387	Atoh8

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 828672	Código de verificación: 1kMe7orQ
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de CATALINA SIERRA RAMOS	Fecha: 28/11/2016 10:59:05
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	28/11/2016 11:47:29
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	29/11/2016 14:09:00
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	11/12/2016 10:56:17