



Universidad
de La Laguna

2017

Síndrome metabólico y actividad del receptor de mineralcorticoides



Estudiante: Raquel Cárdenes Brito

DNI: 45334648S

Tutores: Dr. Guadalberto Hernández

Dra. Silvia Velázquez García

Área de conocimiento: Fisiología

**Facultad: Ciencias de la Salud, sección
Farmacia**



Índice

Abstract.....	2
Palabras clave.....	3
Abreviaturas.....	3
Introducción.....	4-5
Hipótesis.....	6
Objetivos.....	6
Métodos.....	6-9
Conclusiones.....	9
Referencias.....	10-11

Abstract.

Metabolic syndrome (MetS) is defined by a cluster of interconnected physiological, biochemical, clinical and metabolic factors that directly increases the risk of cardiovascular diseases, type 2 diabetes mellitus among other diseases. Insulin resistance, visceral adiposity, atherogenic dyslipidemia, endothelial dysfunction, genetic susceptibility, elevated blood pressure, hypercoagulable state, and chronic stress are the several factors that contribute to cause this syndrome. Modern lifestyle modification therapy combines specific recommendations on diet and exercise with behavioral strategies. Pharmacological treatment should be considered for those patients whose risk factors are not adequately reduced with lifestyle changes. The Serum and Glucocorticoid-Regulated Kinase 1 (SGK1) is a serine/threonine-protein kinase which is involved in the regulation of a variety of physiological functions, i.e. ion channels, membrane transporters, cellular enzymes, transcription factors, neuronal excitability, cell growth, proliferation, survival, migration and apoptosis. As well as, contributes to regulation of renal Na^+ retention, renal K^+ elimination, salt appetite and sensitivity of peripheral glucose uptake, gastric acid secretion, intestinal Na^+/H^+ exchange and nutrient transport, insulin-dependent salt sensitivity of blood pressure, cardiac repolarization and memory consolidation. Since prevalence of MetS, both as national as international level, is quite high generating progressive increases in health system cost in developed countries, it should be assessed the search for new treatments, especially for those patients in whom exercise and diet do not improve their pathologies. In 2015 the patent for a series of compounds called Aminoindazole Urea Derivatives (DAUs) has been published. These compounds that could inhibit, regulate or modify the transduction of SGK-1 signaling, could be of particular interest on this regard. The hypothesis of this project will be carried out proposing the application of DAUs compounds in the treatment of MetS. To this purpose we will quantified the effects of one DAU compound, named A13, in two different populations of laboratory mice feeding with high fat diet: Wild-type (WT) and transgenic ones which are overactivated for SGK1 (B6.Tg.sgk1). To purpose and establish the guidelines of a research project in this sense, we propose two different experimental approaches in order to study the effect of A13 on cardiovascular and metabolic parameters in two groups of animals mentioned above.

Palabras clave.

- Síndrome Metabólico
- SGK1
- Diabetes Mellitus
- Hipertensión arterial
- Dislipidemia
- Derivados de aminoindazol urea

Abreviaturas.

- CH: Carbohidratos
- DAU: Derivados de aminoindazol urea
- DM: Diabetes Mellitus
- FFA: Ácidos grasos libres (*free fatty acids*)
- HDL: Lipoproteína de alta densidad (*High Density Lipoprotein*)
- HTA: Hipertensión arterial
- MetS: Síndrome Metabólico (*Metabolic Syndrome*)
- SGK1: Serine/threonine-protein kinasa tipo 1
- WT: Wildtype
- TG: Triglicéridos
- Na: Sodio
- K: Potasio
- Cl: Cloro
- Ca: Calcio

Introducción.

Durante el metabolismo, producimos energía a partir de los alimentos, compuestos por proteínas, carbohidratos (CH) y lípidos. Los CH constituyen la principal fuente de energía celular. El glucógeno es un polisacárido almacenador de glucosa (reserva energética). Su degradación/movilización, suministrará glucosa en situaciones de carencia. Esta metabolización está regulada por hormonas. Cuando disminuyen las reservas de glucosa, inicialmente se obtiene energía de los depósitos de glucógeno muscular y hepático; si esta necesidad persiste, se utilizan los ácidos grasos libres (FFA) acumulados. En caso de que la necesidad de glucosa perdure (desnutrición), se sintetizará glucosa a partir de precursores no CH (gluconeogénesis), principalmente en el hígado, tras la señalización generada por la hormona pancreática glucagón. La insulina es otra de las hormonas pancreáticas, cuya función principal es mantener la concentración de glucosa plasmática en límites fisiológicos. La insulina posee efecto hipoglucemiante, ya que favorece la entrada de glucosa en las células para su utilización metabólica, así como su depósito en forma de glucógeno, tanto en el hígado como en la musculatura estriada (glucogenogénesis). Por lo cual e inversamente a la insulina, el glucagón es una hormona pancreática hiperglucemiante. Cuando la glucemia es baja, aumenta el glucagón, y estimula la liberación de las reservas de glucosa, para restablecer la homeostasis. El deterioro metabólico que condiciona un desequilibrio hiperglucémico se denomina Diabetes Mellitus (DM), cuyos síntomas principales son la poliuria, polifagia y polidipsia. En la DM tipo 1 (DM1) el páncreas no produce (o produce poca) insulina, por alteración de las células β de los islotes de Langherhans; la etiología precisa no se ha establecido, habiéndose propuesto que esté relacionada con la autoinmunidad, la ingesta excesiva o el condicionamiento genético (cosanguinidad), entre otros. [1] Por el contrario, la DM tipo 2 (DM2), se caracteriza por resistencia a la insulina, esto es, aunque la secreción de insulina pancreática sea adecuada, las células diana no la utilizan eficazmente; de la misma forma que con la DM1, la etiología de la DM2 es multifactorial siendo la obesidad, la ausencia de ejercicio físico, la predisposición genética o la dieta, factores que se han propuestos como implicados en la génesis de esta enfermedad.

El tejido adiposo es el mayor reservorio energético del organismo. En ayuno, los lípidos de los adipocitos, compuestos por triglicéridos (TG), se metabolizan a FFA, que se transportan en la sangre hacia otros tejidos. El almacenamiento y la metabolización lipídica lo regulan la insulina, las catecolaminas, el estado nutricional y la actividad física. La insulina promoverá al transporte de glucosa al interior de la célula adiposa, promoverá la síntesis de FFA, e impedirá la liberación de éstos a la sangre. En la DM, los TG son hidrolizados, liberando grandes cantidades de glicerol y FFA. La elevada concentración de lípidos, en especial de colesterol, condicionará diferentes tipos de dislipidemias, que aumentan el riesgo de aterosclerosis en pacientes diabéticos. La coexistencia de ambas patologías (diabetes y dislipidemia) asociadas a hipertensión arterial (HTA) y obesidad, se denomina Síndrome Metabólico (MetS) [2].

El MetS es una entidad nosológica acuñada por los investigadores alemanes Haller, Singer y colaboradores, en el año 1977. Diversos estudios epidemiológicos establecen que en Canarias, el 47.7% de los mayores de 65 años padece MetS [3], mientras que en el resto de España, su prevalencia es del 22.7% [4]. Internacionalmente, los valores varían [32% (EEUU); 25% (India); 16% (Marruecos), 53% (Nueva Zelanda)] [5]. Según la *Fundación para la Diabetes*, el 13.8% de los españoles mayores de 18 años (aproximadamente 5.3 millones de personas) padece DM2. Por otra parte, según la OMS, la HTA la padecen 11 millones de españoles (36.7%). Respecto a la obesidad, según el *Estudio Nutricional de la Población Española* (ENPE), más de la mitad de la población (60.9%) padece sobrepeso leve o moderado. Entre los varones con MetS, es más frecuente la elevación de la glucemia y los TG plasmáticos; mientras que entre las mujeres, predominan la obesidad abdominal y niveles plasmáticos bajos de lipoproteínas de alta densidad (HDL, *High Density Lipoproteins*). Las personas con MetS muestran un riesgo coronario moderado mayor que la población sin MetS, siendo el riesgo coronario asociado al MetS superior en mujeres. [6]. Si a los datos expuestos añadimos que la prevalencia del MetS afecta al 31% de la población mundial, se desprende el interés por profundizar en el conocimiento de las características del MetS y sus posibles abordajes terapéuticos.

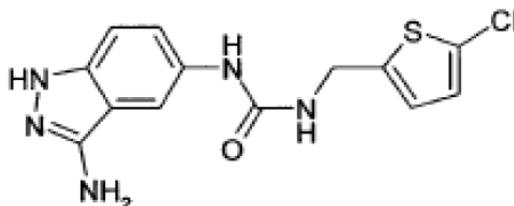
La serina/treonina proteínquinasa tipo 1 (SGK1) está implicada en la regulación de canales iónicos (Ca^{2+} , Cl^- , K^+ y Na^+). Esta enzima se expresa en la mayoría de los tejidos, con niveles más altos en páncreas, placenta, riñón y pulmón. Esta quinasa, sensible al Na^+ , está implicada en diversas funciones que afectan a la regulación de la conductancia a K^+ en las neuronas, el transporte de Na^+ y glucosa en células no nerviosas y la regulación de la secreción de insulina. La expresión de SGK1 se encuentra bajo el control de hormonas como los glucocorticoides y mineralocorticoides, y es regulada a nivel transcripcional por cambios osmóticos y por glucosa [7], además de por una gran variedad de estimuladores e inhibidores [8]. Existen evidencias de que la expresión de SGK1 se eleva en el MetS, entre otras patologías [9], así como que diversos polimorfismos de SGK1 se asocian con el padecimiento de HTA, DM y obesidad [10]. En resumen, según el estado del conocimiento actual, parece existir evidencias suficientes que relacionan el padecimiento del MetS con la actividad de la enzima SGK1.

Recientemente se han patentado unos compuestos denominados “**derivados de aminoindazol urea**” (DAU), que desempeñan un papel fundamental en la inhibición, regulación y/o modulación de la transducción de la señalización de quinasas SGK [11]. Estos compuestos, que se han descrito como inhibidores selectivos de las isoformas de la SGK (SGK1, SGK2, SGK3,...), constituirían una herramienta para el tratamiento de entidades nosológicas asociadas a trastornos en la (las) vía (vías) de señalización en las que participan estas enzimas. La identificación de compuestos que inhiban, regulen y/o modulen específicamente la transducción de la señalización de la SGK1, constituiría un objetivo para el tratamiento de enfermedades asociadas a la SGK1 (diabetes, obesidad, MetS).

Hipótesis.

Disponer de sustancias capaces de actuar sobre la expresión de la SGK1 o sobre las vías de transducción desencadenadas por esta enzima, podría resultar beneficioso para el tratamiento del MetS.

En este trabajo utilizaremos un DAU denominado 1-(3-amino-1H-indazol-5-il)-3-(5-bromo-tiofen-2-ilmetil)-urea, que identificaremos como A13 [11], cuya fórmula química es la siguiente:



Objetivos.

- 1) Cuantificar los efectos del tratamiento con A13, en un modelo animal, sobre parámetros circulatorios y metabólicos relacionados con el MetS:
 - a. Circulatorios: tensión arterial, obesidad y dislipidemia.
 - b. Metabólicos: glucemia, insulinemia y resistencia a la insulina.
- 2) Estudiar, en el mismo modelo animal, si los parámetros señalados en el apartado anterior se producen por modificación en la expresión de la enzima SGK1.
- 3) Aprender a diseñar y escribir un proyecto basado en la experiencia previa de un grupo de investigación.

Métodos.

Modelo animal: Para el desarrollo del presente estudio, disponemos de un grupo de ratones normales (wildtype-WT) y otro transgénicos (sobreactivados para SGK1, que se identifican como B6.Tg.sgk1). Esta sobreactivación, que se consigue por medio de la mutación S422D, ha sido previamente publicada [12, 13]. Ambos grupos de animales presentan el mismo fondo genético (C57BL6/J).

En la tesis doctoral de la Dra. Catalina Sierra Ramos, (componente del grupo ULL denominado “Fisiopatología de los Mineralcorticoides”) se estudió el efecto de la sobreactivación de la SGK1 en una serie de condiciones patológicas, entre ellas el MetS. Se utilizó un grupo de ratones WT C57BL6/J y la población transgénica B6-Tg-*sgk1* descrita anteriormente. Ambos grupos de animales, fueron sometidos durante 6 semanas a una dieta alta y baja en grasas, respectivamente. El resultado fue que sólo los animales transgénicos sometidos a dieta alta en grasas desarrollaron el fenotipo de MetS, con lo cual pudo establecerse y evaluarse el papel que representa la sobreactivación de la SGK1 en el desarrollo de MetS [14]. En este trabajo utilizaremos una réplica del modelo citado, sometiendo a ratones WT y transgénicos (12-14 semanas de edad) a una dieta alta en grasa (rodent diet with 60% kcal % Fat with blue dye, Open

Source Diet, pellets irradiados) durante las semanas indicadas en el diseño experimental (ver más adelante). Tanto el agua como el alimento se suministrarán *ad libitum*.

Realizaremos el estudio utilizando únicamente ratones machos, para evitar la posible influencia de las variaciones plasmáticas cíclicas de los esteroides sexuales.

Los protocolos experimentales descritos 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).

Compuesto: Las formulaciones farmacéuticas pueden adaptarse para ser administradas por cualquier vía apropiada. Éstas podrán producirse mediante todos los procedimientos conocidos en tecnología farmacéutica [11]. Por las características físico-químicas de los compuestos DAU, en nuestro trabajo utilizaremos la administración por vía intraperitoneal.

Según la información obtenida para el compuesto A13 [11], la concentración efectiva de la molécula se ubica en el rango de a 100 mg/kg/día y, de forma típica, entre 1 a 10 mg/kg/día. En nuestro experimento administraremos 3 dosis: 15 (dosis 1), 30 (dosis 2) y 60 (dosis 3) mg/kg/día con el objetivo de cubrir el mayor espectro posible de la concentración efectiva de la sustancia A13 (ver esquema del diseño experimental más adelante). Dada la hidrosolubilidad del compuesto A13, el vehículo será NaCl 0.9%.

Diseño experimental: Teniendo en cuenta que uno de los objetivos del presente TFG es aprender a diseñar y escribir un proyecto de investigación, a continuación se plantean dos diseños experimentales que, aunque son diferentes, persiguen responder a las preguntas planteadas en los dos primeros objetivos.

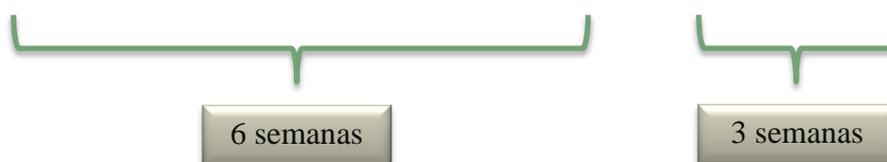
Diseño experimental 1:

Grupo 1	Ratones WT	+	DAG	+	Vehículo
Grupo 2	Ratones WT	+	DAG	+	A13 dosis 1
Grupo 3	Ratones WT	+	DAG	+	A13 dosis 2
Grupo 4	Ratones WT	+	DAG	+	A13 dosis 3
Grupo 5	Ratones Tg.SGK1	+	DAG	+	Vehículo
Grupo 6	Ratones Tg.SGK1	+	DAG	+	A13 dosis 1
Grupo 7	Ratones Tg.SGK1	+	DAG	+	A13 dosis 2
Grupo 8	Ratones Tg.SGK1	+	DAG	+	A13 dosis 3

6 semanas

Diseño experimental 2:

Grupo 1	Ratones WT	+	DAG	+	Vehículo
Grupo 2	Ratones WT	+	DAG	+	A13 dosis 1
Grupo 3	Ratones WT	+	DAG	+	A13 dosis 2
Grupo 4	Ratones WT	+	DAG	+	A13 dosis 3
Grupo 5	Ratones Tg.SGK1	+	DAG	+	Vehículo
Grupo 6	Ratones Tg.SGK1	+	DAG	+	A13 dosis 1
Grupo 7	Ratones Tg.SGK1	+	DAG	+	A13 dosis 2
Grupo 8	Ratones Tg.SGK1	+	DAG	+	A13 dosis 3



Las variables a determinar en cada sujeto experimental son las siguientes:

Estudio de la Homeostasis de Glucosa:

- **Glucemia:** Determinaremos los niveles de glucosa en sangre tanto al inicio como al final del tratamiento, en ayunas (animal privado del alimento durante 16-18 horas) y en alimentación. Se realiza utilizando una gota de sangre de la cola, con la ayuda de un glucómetro. Este dispositivo realiza la lectura mediante la oxidación de la glucosa por la glucosa oxidasa contenida en la tira reactiva, midiendo la intensidad de color generado, dependiendo de la concentración de glucosa en sangre.
- **Insulinemia:** Determinaremos los niveles de insulina en plasma, al inicio y al final del tratamiento, en ayunas (animal privado del alimento durante 16-18 horas) y en alimentación. La muestra de sangre de la cola necesaria para esta prueba es superior a la necesaria para la glucemia, debido a que necesitamos plasma para realizar un ELISA específico de insulina de ratón.
- **Resistencia a la insulina:** Se realiza mediante dos pruebas diferentes:
 - 1° *Test de tolerancia a la glucosa (GTT):* Tomaremos muestras para glucemia a distintos tiempos (0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos), tras la inyección de 2g/Kg de glucosa a animales en ayunas. Se pueden tomar también muestras para determinar los niveles de insulina tras la inyección de glucosa, en tal caso se realizaría la extracción a los 0, 30 y 120 minutos.
 - 2° *Test de tolerancia a la insulina (ITT):* Consiste igualmente en la determinación de la glucemia a distintos tiempos, aunque en este caso se inyecta insulina (1.5 UI/Kg) en animales no ayunados.

Determinación de la Presión Arterial: Mediante pletismografía, utilizando un manguito en la vena de la cola (tail cuff) mediante un sistema no invasivo de cuantificación (LE5007 de Panlab con el software SEDACOM 2.0), que permite registrar presión sistólica, presión diastólica y frecuencia cardíaca. Los animales deberán adaptarse a este dispositivo durante una semana, antes de comenzar los registros.

Niveles de expresión de SGK1: Utilizaremos tejido pancreático debido al elevado nivel de expresión de la enzima en este órgano. Podemos utilizar distintos métodos para cuantificar la expresión de la enzima: A) A nivel génico necesitamos extraer RNA total de la muestra biológica, para luego hacer una síntesis de cDNA desde el mRNA y después hacer una cuantificación de la reacción en cadena de la polimerasa (qPCR). B) A nivel proteico debemos emplear la técnica de western blot cuantificando mediante densitometría, el nivel de expresión de la proteína, que también podría medirse por ELISA.

Conclusiones.

La realización del presente proyecto ha abordado y alcanzado una serie de objetivos, los cuales se enumeran en las siguientes conclusiones:

- 1) Se ha adquirido conocimiento actualizado de forma integrada, mediante revisión bibliográfica, sobre el denominado Síndrome Metabólico (MetS), una entidad nosológica cuyos índices de prevalencia son importantes en países desarrollados.
- 2) Se ha investigado sobre unas sustancias, derivados del aminoindazol urea, que están bajo patente y en fase experimental, que podrían convertirse en terapia farmacológica para el MetS por sus efectos sobre la señalización mediada por la enzima Serina-treonina protein kinasa 1 (SGK1).
- 3) Se han adquirido conocimientos, habilidades y destrezas relacionadas con el planteamiento y escritura de un proyecto de investigación que ha desembocado en la propuesta de dos diseños experimentales diferentes para responder a las preguntas planteadas en los objetivos de este trabajo.

Referencias:

- [1] Gillespie KM (2006). *Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention*. CMAJ 175 (2): 165-170.
- [2] Guyton AC, Hall JE (2016). *Tratado de Fisiología Médica 13ª Ed.* S.A. Elsevier España.
- [3] Moreno P, Rodríguez C, Santiago M, Rijo MC, Aguirre A, Abreu R, Arias A (2014). *Síndrome metabólico y mortalidad en población mayor de 65 años de la isla de Tenerife*. Nutrición clínica y dietética hospitalaria 34 (2): 63-70.
- [4] Guallar P, Francisco R, López E, León LM, Aguilera MT, Graciani A, Gutiérrez JL, Banegas JR, Rodríguez F. (2014). *Magnitude and Management of Metabolic Syndrome in Spain in 2008-2010: The ENRICA Study*. Revista Española de Cardiología 67(5): 367-373.
- [5] Ryder E. (2005). *Una epidemia global: El Síndrome Metabólico*. Anales Venezolanos de Nutrición 18(1): 105-109.
- [6] Fernández D, Cabrera A, Sanz H, Elosua R, Guembe MJ, Alzamora M, Vega T, Félix FJ, Ortiz H, Rigo F, Lama C, Gavrila D, Segura A, Lozano L, Marrugat J. (2012). *Síndrome metabólico en España: prevalencia y riesgo coronario asociado a la definición armonizada y a la propuesta por la OMS. Estudio DARIOS*. Revista Española de Cardiología 65(3): 241-8.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] Martín-Fernández B, De las Heras N, Valero-Muñoz M, Ballesteros S, Cachofeiro V, Lahera V. (2012). *Papel de la quinasa regulada por suero y glucocorticoides 1 en las alteraciones cardíacas producidas por la aldosterona en ratas*. Clínica e Investigación en Arteriosclerosis 24 (6): 267-274.
- [10] Gómez-Reino J. (2012). *Adipoquinas: Un centro de complejidad entre inflamación, metabolismo e inmunidad*. I Simposio Internacional de Inmunología. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela, España.

- [11] Markus K, Gericke R, Beier N, Lang F (2015). Número de publicación: 2 537 195. *Derivados de aminoindazol urea*. Oficina Española de Patentes y Marcas.
- [12] Miranda P., Cadaveira-Mosquera A., González-Montelongo R., Villarroel A., González-Hernández T., Lamas J.A., Álvarez 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(6):2684-96.
- [13] Andres-Mateos E., Brinkmeier H., Burks T.N., Mejias R., Files D.C., Steinberger M., Soleimani A., Marx R., Simmers J.L., Lin B., Finanger Hedderick E., Marr T.G., Lin B.M., Hourde C., Leinwand L.A., Kuhl D., Foller M., Vogelsang S., Hernandez-Diaz I., Vaughan D.K., Alvarez de la Rosa D., Lang F., Cohn R.D. (2013) *Activation of serum/glucocorticoid-induced kinase 1 (SGK1) is important to maintain skeletal muscle homeostasis and prevent atrophy*. EMBO MolMed 5(1):80-91.
- [14] Sierra Ramos C. (2017). *SGK1 como mediador de los efectos deletéreos del receptor de mineralcorticoides*. Tesis doctoral. Universidad de La Laguna, Tenerife.