

## MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

### TITULO:

CREACIÓN DE MODELO MURINO VALIDADO PARA LA EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL SÍNDROME METABÓLICO SOBRE EL DESARROLLO DE UROLITIASIS.

**Investigador principal:** Javier Sáenz Medina

**DURACIÓN:** 1 año  2 años  3 años

**RESUMEN (Objetivos y metodología del proyecto):** (Máximo 250 palabras)

El síndrome metabólico (SM) se considera una de las patologías mas relevantes de las sociedades occidentales, estimándose su prevalencia alrededor del 25%. Se ha demostrado una mayor prevalencia de patología litiásica en estos pacientes, estimándose un OR que oscila entre 1,5 y 2,2.

**Objetivo:** Establecer la influencia del síndrome metabólico sobre la formación de litiasis en un modelo murino combinado de síndrome metabólico y de litiasis, así como establecer los factores bioquímicos desencadenantes asociados a este proceso.

**METODOLOGÍA:** Se ha diseñado un modelo murino de inducción de síndrome metabólico mediante la administración de una dieta rica en fructosa. Por otro lado, se ha demostrado la efectividad de la administración del etilén glicol al 0,75% para la inducción de hiperoxaluria.

En base a estudios similares, y tomando como variable indicadora el porcentaje de túbulos afectados por depósito de cristales, se establecieron cuatro grupos de ratas macho Sprague Dawley: 1.- Grupo control (n=5): sin tratamiento, Grupo formador de litiasis (n=10+10): administración en el agua de bebida etilenglicol al 0,6 o al 0,75%. Grupo síndrome metabólico (n=5): Alimentación rica en fructosa. Grupo síndrome metabólico + formador de litiasis (n=10+10): Dieta rica en fructosa y EG al 0,6 ó 0,75%

La variable principal a estudio será el porcentaje de túbulos afectados por depósito de cristales. Además se realizará un estudio comparativo de peso, tensión arterial, glucemia, ácido úrico, y triglicéridos en sangre periférica, IL 1, 6 y TNF alfa; cristaluria, calciuria, uricosuria, oxaluria y pH en orina de 24 horas.

### TITLE:

BUILDING VALIDATED MURINE MODEL FOR THE EVALUATION OF THE INFLUENCE OF METABOLIC SYNDROME ON THE UROLITHIASIS DEVELOPMENT

**SUMMARY (Objectives and methodology):**

Metabolic syndrome is considered one of the most prevalent diseases of the western societies. Estimated prevalence is around 25%. The relationship between metabolic syndrome and urolithiasis has been demonstrated (OR 1,5-2,2).

**Objective:** To establish the influence of the metabolic syndrome on stone formation in a mixed murine model of metabolic syndrome and urolithiasis, and to set the biochemical triggers associated to this process.

**METHODS:** A murine model of fructose induced metabolic syndrome has been designed. On the other side, urinary excretion of oxalate has been showed to be increased rapid and significantly during chronic administration of ethilen glycol as a 0,75% aqueous solution.

Based on other similar studies and taking percentage of tubules affected by crystal deposits as primary endpoint, four male Sprague Dawley rat groups have been established. 1.- Control group (n=5) with treatment. 2.- Stone forming group: (n=10+10), administration of ethilen glycol as a 0,6 or 0,75% aqueous solution in drinking water. 3.- Metabolic syndrome group (n=5): Administration of fructose diet. 4.- Metabolic Syndrome and stone forming group (n=10+10): fructose diet associated with a 0,6 or 0,75% aqueous solution in drinking water.

The primary endpoint will be crystal deposits (% in total tubules). Comparative analysis will also be carried out over the following variables: weight, blood pressure, glucose, uric acid, triglycerides, IL-1, 6 y TNF alfa (peripheral blood), crystalluria, 24 hours urinary calcium, uric acid, oxalate, and urinary pH.

## MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**Investigador principal:** Javier Sáenz Medina

Antecedentes y estado actual del tema (Citar las referencias incluidas en el apartado siguiente)

(Máximo 3 páginas)

El síndrome metabólico (SM) se considera una de las patologías más prevalentes de las sociedades occidentales, estimándose su prevalencia en la población adulta española alrededor del 25%<sup>1</sup>. Está implicado en el desarrollo de diabetes mellitus y constituye un factor de riesgo importante para la aparición de enfermedades cardiovasculares.

Se considera una agrupación de factores de riesgo de origen metabólico: obesidad, dislipemia, glucemia alterada y tensión arterial alta<sup>2</sup>. Se han propuesto diversas definiciones para el diagnóstico del SM. A finales del 2009 se publicó un nuevo consenso internacional<sup>3</sup>, y posteriormente la Organización Mundial de la Salud (OMS) propuso un nuevo SM premórbido, excluyendo a los pacientes previamente diagnosticados de diabetes mellitus o enfermedades cardiovasculares, ya que el SM se considera factor de riesgo para estas enfermedades<sup>4</sup>.

Para el diagnóstico de SM se exigen tres de los cinco criterios definidos en el último consenso<sup>4</sup>: glucemia en ayunas  $\geq 100$ mg/dl o tratamiento antidiabético; presión arterial sistólica  $\geq 130$ mmHg o diastólica  $\geq 85$ mmHg; colesterol HDL  $< 40$ mg/dl en los hombres o  $< 50$ mg/dl en las mujeres; triglicéridos  $\geq 150$ mg/dl; perímetro abdominal  $\geq 102$ cm para los hombres o  $\geq 88$ cm para las mujeres.

No se conocen las verdaderas causas del síndrome metabólico, ni si existe una relación con el sobrepeso, pero se han desarrollado numerosos modelos animales que desarrollan complicaciones muy similares a esta patología (obesidad, diabetes, HTA...). Casi todos ellos basados en alteraciones sobre la leptina, bien por déficit de producción de la misma (alteraciones del gen ob), o por resistencia de los receptores de leptina<sup>5</sup>.

La leptina es una hormona producida, en su mayoría, por los adipocitos, se expresa en el gen Ob, localizado en el cromosoma 7. Inicialmente se creyó que la función principal de la leptina consistía en prevenir la obesidad, regulando la ingesta alimenticia a través del hipotálamo. Estudios más recientes han demostrado que su función está en regular la formación de tejido adiposo, para acumular el exceso calórico. Cuando existen alteraciones de esta hormona, se produce un almacenamiento de los lípidos en tejidos no adiposos, produciéndose una infiltración lipídica de tejidos no adiposos y provocando un fenómeno llamado lipotoxicidad<sup>5</sup>.

En la mayoría de los tejidos la lipotoxicidad consiste en una disfunción mitocondrial, desencadenada por la producción de metabolitos tóxicos procedentes de la oxidación de los ácidos grasos, que desemboca en apoptosis celular. Los órganos más frecuentemente expuestos a la lipotoxicidad son el hígado, el páncreas, el corazón, el músculo esquelético y el riñón<sup>6</sup>. Esta afectación en los diferentes órganos es la responsable de las diferentes manifestaciones del síndrome metabólico. En el páncreas se produce inicialmente un incremento de las células beta pancreáticas como respuesta a la resistencia insulínica producida en los tejidos periféricos, que acaba desembocando en la lesión celular pancreática, en el déficit de producción de insulina y en la consiguiente diabetes. A nivel cardiaco también se ha descrito una infiltración de los lípidos en el miocardio, así como en las paredes de los vasos, produciendo disfunción miocárdica y fenómenos arterioscleróticos<sup>5</sup>.

El riñón, como órgano diana, de la lipotoxicidad presenta la particularidad de una mayor complejidad histológica con numerosas estructuras con diferentes contribuciones a la función renal en general (filtración, secreción, reabsorción...), así como a sus funciones metabólicas y endocrinas, de hecho, la acumulación de lípidos, en modelos de síndrome metabólico, se ha descrito tanto en el glomérulo como en el túbulo (fundamentalmente el proximal). Los mecanismos de daño renal descritos son tanto lipotóxicos como no lipotóxicos. La lesión renal por lipotoxicidad se produce, al igual que en otros órganos, por exceso de ácidos grasos intracelulares, cuyo metabolismo mitocondrial produce metabolitos como la ceramida, o el diacilglicerol, que genera especies reactivas de oxígenos intracelulares, que producen daño de los orgánulos celulares, alteración de los mecanismos de señal intracelular, liberación de factores proinflamatorios y apoptosis lípidoinducida. Por otro lado, también existen mecanismos de lesión celular renal "no lipotóxicos" como el defecto de NH<sub>4</sub>, producido como mecanismo competitivo con la glutamina y explicado más adelante<sup>6</sup>.

Entre las patologías renales, en cuya patogenia podría estar implicada la acumulación de lípidos intracelular y la apoptosis en el riñón, se encuentran la nefrosclerosis hipertensiva, la glomeruloesclerosis focal y segmentaria, la enfermedad de mínimos cambios o el síndrome hepatorenal.

Existen varios estudios epidemiológicos que demuestran una mayor incidencia de patología litiásica en pacientes con síndrome metabólico, el estudio NHANES III con la participación de 18825 pacientes en Estados Unidos, el de Rendina y cols con 2132 pacientes en el sur de Italia o el de Jeong en Corea con 34895 pacientes demuestran una mayor prevalencia de litiasis en pacientes con SM con OR que oscilan entre 1,25 y 2,2<sup>7</sup>.

No obstante, todavía no se conocen los mecanismos patogénicos concretos que facilitan la formación de litiasis en los enfermos con síndrome metabólico. Se ha descrito que la hiperinsulinemia asociada con la obesidad provoca un efecto directo sobre la composición urinaria. Leman et al describieron la elevación de calcio asociada con la ingestión de carbohidratos transitoria, probablemente secundaria a la disminución de la reabsorción tubular de calcio<sup>8</sup>. En modelos animales se ha demostrado que la hipercalcemia provocada por la hiperglucemia se puede inhibir bloqueando la secreción pancreática de insulina<sup>9</sup>. Así mismo, se ha demostrado que la hiperinsulinemia con niveles de glucemia normales incrementa la fracción de excreción urinaria de calcio, así como la absorción intestinal del mismo<sup>10</sup>. Esto unido a la hiperoxaluria que se produce tras la ingesta alimenticia constituye un factor de riesgo claro para la formación de litiasis cálcicas en estos enfermos.

Existen varios estudios que analizan la composición de las litiasis en relación con la obesidad. El más importante, publicado por Chou<sup>11</sup> sobre 907 enfermos describe una mayor prevalencia de litiasis de oxalato cálcico y ácido úrico en enfermos obesos.

Sólo se ha publicado un trabajo experimental en modelo murino de síndrome metabólico, con ratas OLETF (Otsuka Long Evans Tokushima Fatty), a las que se les ha administró etileno glicol al 1%. En este estudio se demostró una mayor formación de cristales de oxalato cálcico a nivel intratubular así como un mayor contenido de calcio a nivel de tejido renal<sup>12</sup>. A nivel intracelular y molecular no hay ningún estudio que haya estudiado la relación entre el síndrome metabólico y la litiasis, no obstante existen varios mecanismos intracelulares que podrían estar en relación con el síndrome metabólico.

La resistencia insulínica, característica del SM genera, sobre el riñón, una mayor producción de ácidos grasos que por un mecanismo competitivo con la glutamina, a nivel mitocondrial, produce un defecto en la producción de amonio en el túbulo proximal, provocando un descenso en el pH urinario<sup>6</sup>. Se ha demostrado en series de enfermos litiasicos, la relación positiva entre el peso y la disminución de pH urinario<sup>13</sup>. Aunque este hecho tiene habitualmente mas influencia sobre las litiasis de ácido úrico, también está relacionado con una disminución de la producción de citrato, constituyendo un factor de riesgo añadido a la formación de litiasis. Estos factores, unidos a la mayor excreción de ácido úrico demostrado en los enfermos obesos<sup>14</sup>, obligan a pensar en la obesidad como un factor de riesgo para la enfermedad y la enfermedad litiasica.

Por otra parte se ha descrito la activación de lipasas en cultivos celulares de células renales expuestas oxalato. La fosfolipasa A2 es una enzima que hidroliza el grupo acil, desde la posición sn-2 de los fosfolípidos, liberando ácido araquidónico. Se han descrito varios mecanismos que relacionan la acción de las lipasas con la producción de litiasis a través de varios mecanismos como la malfunción mitocondrial, lo que genera radicales libres y preoxidación lipídica participando en fenómenos apoptóticos y muerte celular. Los desechos procedentes de las células dañadas pudieran eventualmente participar en fenómenos de nucleación del cálculo<sup>15</sup>.

La elevación de la PGE2, producida a través de la vía COX2 procedente del metabolismo del ácido araquidónico, produce elevaciones de la 1,25 (OH)2 Vit D, a través de su degradación en la enzima 1 alfa hidroxilasa, lo que a su vez produce hipercalcemia<sup>16</sup>.

La hiperuricemia es una enfermedad muy frecuentemente relacionada con el síndrome metabólico y con una influencia evidente en la patogenia de la litiasis de los enfermos con síndrome metabólico. Existen varios mecanismos que explican la relación entre el síndrome metabólico y la hiperuricemia. Es conocida la relación inversa entre el aclaramiento de ácido úrico y la resistencia insulínica; la administración exógena de insulina reduce de forma significativa la excreción renal de uratos insulínica<sup>17,18</sup>. Por otro lado, se ha descrito la influencia de la insulina sobre el anión intercambiador de urato URAT 126, o el anión sodio dependiente cotransportador, localizado en el borde en cepillo de las membranas de las células del túbulo contorneado proximal, cuya estimulación aumenta la reabsorción de uratos a este nivel<sup>19</sup>. Otros factores como la leptina, el consumo de fructosa o la alteración de la fosforilación oxidativa, causante de mayores niveles de adenosina, contribuyen a la hiperuricemia, mediante el aumento de la reabsorción de uratos, sodio y agua, o el incremento de la producción de uratos<sup>20 21</sup>.

Entre los criterios de síndrome metabólico, la hiperuricemia establece la relación mas estrecha con el aumento del perímetro abdominal, si bien también se relaciona de forma significativa con la HTA, el consumo de diuréticos o la diabetes mellitus; otros factores relacionados también relacionados con la hiperuricemia son el consumo de alcohol o la enfermedad cardiovascular<sup>22-24</sup>. Existen estudios en los que la hiperuricemia se ha postulado como marcador del futuro desarrollo de resistencia insulínica, actuando como mediadora de desequilibrio proinflamatorio<sup>25</sup>.

Existen numerosos estudios que han estudiado la influencia de los mediadores de inflamación tanto en el desarrollo del síndrome metabólico como su asociación con la hiperuricemia. Existen estudios que demuestran desequilibrios en los niveles de algunos marcadores de inflamación de los enfermos con síndrome metabólico, asociándolos al desarrollo de arteriosclerosis. Por otro lado, la hiperuricemia juega un papel importante en la consecución de la arteriosclerosis

mediante dos mecanismos, por un lado disminuyendo los niveles de óxido nítrico y por el otro, estimulando la disfunción endotelial<sup>18</sup>.

Por todo lo expuesto anteriormente y para desarrollar nuestros objetivos hemos elegido un modelo murino de ratas Sprague-Dawley machos que desarrollan síndrome metabólico mediante la alimentación exclusiva con pienso con un 60% de fructosa, durante 10 semanas. En este modelo se objetiva aumento de peso, hipertensión, hiperuricemia, hipertrigliceridemia e hiperinsulinemia significativamente mayores que en las ratas control desde las 4 semanas, manteniendo posteriormente los niveles durante todo el experimento (10 semanas)<sup>26</sup>.

Por otro lado, se ha demostrado la efectividad del etileno glicol administrado en el agua de bebida al 0,75% para la producción de hiperoxaluria. A la semana del I tratamiento se demuestra un aumento significativo de oxalato, y concomitantemente una disminución en la excreción de calcio, magnesio y citrato. En este mismo modelo se describe la cristaluria a los 12 días de tratamiento y a las 3 semanas el comienzo de depósito de cristales en los túbulos<sup>27</sup>.

Rofe, en un modelo experimental realizado en 1985, para evaluar la influencia de la ingesta de azúcares en la producción de litiasis, demostró un mayor depósito renal de oxalato cálcico en ratas tratadas con EG y con fructosa en la dieta<sup>28</sup>.

Por estas tres razones, creemos que el desarrollo del modelo propuesto es el óptimo para el estudio patogénico de la influencia del síndrome metabólico en la formación de litiasis, ya que creemos que es el que de forma más fisiológica simula el síndrome metabólico producido en la especie humana por el cambio de los hábitos dietéticos en países industrializados. Reproduce por una parte los criterios de síndrome metabólico, de una forma más fisiológica de lo que lo hacen los modelos modificados genéticamente a partir de la manipulación del gen de la leptina, y además induce hiperuricemia, factor patogénico importante para la formación de litiasis.

En este trabajo se pretende optimizar el modelo, estableciendo en condiciones estandarizadas y homogéneas la influencia del SM sobre la litiasis. Además se pretende recolectar muestras de tejido renal para, en una segunda fase, analizar los mecanismos moleculares que explican esta relación.

## MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**Investigador principal:** Javier Sáenz Medina

### Bibliografía más relevante (Máximo 1 página)

1. Rodriguez, B. A., Garcia, P. P., Reviriego, F. J. et al.: Prevalence of metabolic syndrome and consistency in its diagnosis in type 2 diabetic patients in Spain. *Endocrinol Nutr*, **57**: 60, 2010
2. Grundy, S. M., Cleeman, J. I., Daniels, S. R. et al.: Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*, **112**: 2735, 2005
3. Alberti, K. G., Eckel, R. H., Grundy, S. M. et al.: Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*, **120**: 1640, 2009
4. Simmons, R. K., Alberti, K. G., Gale, E. A. et al.: The metabolic syndrome: useful concept or clinical tool? Report of a WHO Expert Consultation. *Diabetologia*, **53**: 600, 2010
5. Unger, R. H.: Lipotoxic diseases. *Annu Rev Med*, **53**: 319, 2002
6. Bobulescu, I. A.: Renal lipid metabolism and lipotoxicity. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, **19**: 393, 2010
7. Rendina D, Mossetti G, De Filippo G et al.: Association between metabolic syndrome and nephrolithiasis in an inpatient population in southern Italy: role of gender, hypertension and abdominal obesity. *Nephrol DialTransplant*, **24**: 900, 2009
8. Lemann, J., Jr., Piering, W. F., and Lennon, E. J.: Possible role of carbohydrate-induced calciuria in calcium oxalate kidney-stone formation. *N Engl J Med*, **280**: 232, 1969
9. Wood, R. J. and Allen, L. H.: Evidence for insulin involvement in arginine- and glucose-induced hypercalciuria in the rat. *J Nutr*, **113**: 1561, 1983
10. Rumenapf, G., Schmittler, J., and Schwille, P. O.: Intestinal calcium absorption during hyperinsulinemic euglycemic glucose clamp in healthy humans. *Calcif Tissue Int*, **46**: 73, 1990
11. Chou, Y. H., Su, C. M., Li, C. C. et al.: Difference in urinary stone components between obese and non-obese patients. *Urol Res*, 2010
12. Okamoto, M., Kohjimoto, Y., Iba, A. et al.: Calcium oxalate crystal deposition in metabolic syndrome model rat kidneys. *Int J Urol*, **17**: 996, 2010
13. Maalouf, N. M., Sakhaee, K., Parks, J. H. et al.: Association of urinary pH with body weight in nephrolithiasis. *Kidney Int*, **65**: 1422, 2004
14. Powell, C. R., Stoller, M. L., Schwartz, B. F. et al.: Impact of body weight on urinary electrolytes in urinary stone formers. *Urology*, **55**: 825, 2000
15. Jonassen, J. A., Kohjimoto, Y., Scheid, C. R. et al.: Oxalate toxicity in renal cells. *Urol Res*, **33**: 329, 2005
16. Baggio, B. and Budakovic, A.: Fatty acids and idiopathic calcium nephrolithiasis. *Urol Int*, **75**: 97, 2005
17. Ter Maaten, J. C., Voorburg, A., Heine, R. J. et al.: Renal handling of urate and sodium during acute physiological hyperinsulinaemia in healthy subjects. *Clin Sci (Lond)*, **92**: 51, 1997
18. Muscelli, E., Natali, A., Bianchi, S. et al.: Effect of insulin on renal sodium and uric acid handling in essential hypertension. *Am J Hypertens*, **9**: 746, 1996
19. Choi, H. K., Mount, D. B., and Reginato, A. M.: Pathogenesis of gout. *Ann Intern Med*, **143**: 499, 2005
20. Bakker, S. J., Gans, R. O., Ter Maaten, J. C. et al.: The potential role of adenosine in the pathophysiology of the insulin resistance syndrome. *Atherosclerosis*, **155**: 283, 2001
21. Balakrishnan, V. S., Coles, G. A., and Williams, J. D.: A potential role for endogenous adenosine in control of human glomerular and tubular function. *Am J Physiol*, **265**: F504, 1993
22. Alper, A. B., Jr., Chen, W., Yau, L. et al.: Childhood uric acid predicts adult blood pressure: the Bogalusa Heart Study. *Hypertension*, **45**: 34, 2005
23. Feig, D. I.: Uric acid and hypertension in adolescents. *Semin Nephrol*, **25**: 32, 2005
24. Maclachlan, M. J. and Rodnan, G. P.: Effect of food, fast and alcohol on serum uric acid and acute attacks of gout. *Am J Med*, **42**: 38, 1967
25. Fujii Y, Tanaka H, and Tsuruoka S.: Middle cerebral arterial blood flow velocity increases during laparoscopic cholecystectomy. *Anesth Analg*, **78**: 80, 1994
26. Nakagawa, T., Hu, H., Zharikov, S. et al.: A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol*, **290**: F625, 2006
27. Khan, S. R.: Animal models of kidney stone formation: an analysis. *World J Urol*, **15**: 236, 1997
28. Rofe, A. M., Bais, R., and Conyers, R. A.: The effect of dietary refined sugars and sugar alcohols on renal calcium oxalate deposition in ethylene glycol-treated rats. *Food Chem Toxicol*, **24**: 397, 1986

## MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**Investigador principal:** Javier Sáenz Medina

Hipótesis:

**Conceptual:** La asociación síndrome metabólico hiperuricemia estimula la litogénesis de pacientes litiásicos

**Operativa:**

[ La asociación síndrome metabólico-hiperuricemia induce cambios en la composición bioquímica de la orina de las ratas que estimula la formación de litiasis.

[ Existen fenómenos de inflamación en paciente con síndrome metabólico y en pacientes litiásicos que pueden estar relacionados.

[ La mayor incidencia de litiasis en estos enfermos está relacionada con mecanismos de lipotoxicidad sobre el riñón producidos por el síndrome metabólico

Objetivos

**Principal:** Establecer la influencia de la asociación síndrome metabólico-hiperuricemia sobre la formación de cálculos en pacientes formadores de litiasis, a través del desarrollo de un modelo en rata macho Sprague-Dawley.

**Secundarios:**

1. Establecer los cambios bioquímicos urinarios producidos por la inducción de síndrome metabólico-hiperuricemia en modelo murino.
2. Establecer la influencia de estos cambios sobre la formación de litiasis en un modelo murino de hiperoxaluria inducida con etilen glicol.
3. Analizar la influencia de los marcadores de inflamación (IL-1, IL-6, TNF alfa) en la producción de litiasis en ratas con síndrome metabólico.
4. Sentar las bases del modelo y adquirir las muestras en tejido renal para un posterior estudio molecular que establezca la influencia de los mecanismos de lipotoxicidad descritos en el síndrome metabólico para la formación de litiasis

Ajustarse al espacio disponible

## MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**Investigador principal:** Javier Sáenz Medina

Metodología (Diseño, sujetos de estudio, variables, recogida y análisis de datos y limitaciones del estudio)  
(Máximo 3 páginas)

Diseño: Experimental, prospectivo y controlado.

### Sujetos de estudio

Se ha elegido un modelo de inducción de síndrome metabólico (SM) en ratas macho Sprague-Dawley por ser un modelo, de fácil reproducción, con mínima manipulación de la dieta, que refleja fielmente el complejo síndrome metabólico-hiperuricemia mediante la administración de una dieta con un 60% de fructosa como carbohidrato (3,6 Kcal/g) en 10 semanas<sup>26</sup>.

Por otro lado, se ha demostrado la efectividad de la administración de etilen glicol al 0,75%, con el agua de bebida, para la inducción de hiperoxaluria y de litiasis de oxalato cálcico<sup>27</sup>.

En base a los datos obtenidos en estudios de similares características a nuestro modelo experimental<sup>28</sup>, tomando como variable indicadora el porcentaje de túbulos afectados por depósito de cristales y de acuerdo con los objetivos establecidos previamente, se estableció en 20 animales por grupo, el número de animales necesarios para rechazar la hipótesis nula (ausencia de diferencias en el porcentaje de túbulos afectados de ambos grupos a estudio), asumiendo una probabilidad del 5% de identificar una diferencia en el porcentaje de túbulos afectados inexistente (error alfa) y una probabilidad del 20% de omitir (existiendo) una diferencia en el porcentaje de túbulos afectados entre ambos grupos (error beta). El poder estadístico del experimento es, por tanto, del 80%.

Para la consecución de los objetivos previamente descritos, se han establecido cuatro grupos:

- Grupo control (n=5): Ratas Sprague Dawley machos (SD)
- Grupo formador de litiasis (FL), (n=10+10): SD + Dieta normal + EG al 0,6 ó 0,75%
- Grupo SM (n=5): SD + Dieta rica en fructosa
- Grupo SM + formación litiasis (SM+FL), (n=10+10): Dieta rica en fructosa + EG al 0,6 o 0,75%.

### Condiciones de estabulación y toma de muestras.

Se adquirirán ratas macho de entre 150 y 200 g de peso. A los grupos SM y SM + FL se les administrará una dieta rica en fructosa durante 14 semanas. Al grupo control y al FL se les administrará pienso normal (3.1 Kcal/g, 46% de carbohidratos). A las 10 semanas de tratamiento a los grupos FL y SM + FL se les administrará etileno glicol al 0,6 o 0,75% en el agua de bebida, durante 5 semanas. A las 15 semanas del comienzo del estudio se les sacrificará

La estabulación se realizará en jaulas normales en grupos de 10 animales por jaula y en condiciones habituales. Se establecerán ciclos de luz oscuridad de 12 horas y se administrará la comida y el agua "ad libitum".

La exploración física, así como las muestras de sangre periférica, se realizarán inmovilizando al animal.

La extracción de sangre periférica se realizarán mediante venopunción de las venas de la cola, previo periodo de ayuno de 12 horas.

Para la extracción de las muestras de orina, se trasladarán los animales a una jaula metabólica de forma individualizada.

Previo al sacrificio, se anestesiará a los animales con ketamina+ valium + morfina intraperitoneal, se realizará punción intracardiaca, exanguinando al animal, posteriormente se extraerán los riñones, y se confirmará la muerte del animal, extrayendo el corazón.

Las muestras de sangre se procesarán para bioquímica, se realizarán determinaciones de IL-2, 6, TNF alfa mediante ELISA, las muestras de orina se procesarán en el laboratorio de bioquímica del hospital, además de para microscopía óptica para determinar la cristaluria. Se procesarán muestras de tejido renal para microscopía óptica (tinciones de hematoxilina-eosina, pizolato e inmunohistoquímica), microscopía electrónica de barrido y se congelarán muestras en nitrógeno líquido

### Variables a estudio:

### Control síndrome metabólico (EF + SP)

- Peso (g)
- TA (mm Hg)
- Glucemia (mg/dL)
- Acido urico (mg/dl)
- Triglicéridos (mg/dl)

### Bioquímica urinaria (orina 24h)

- Volumen urinario (cc)
- pH urinario
- Calciuria (mg 24h)
- Uricosuria (mg 24h)
- Oxaluria (mg 24h)
- Citraturia (mg 24h)
- NH<sub>4</sub><sup>+</sup>? (meq/mg)

### Marcadores inflamación (SP)

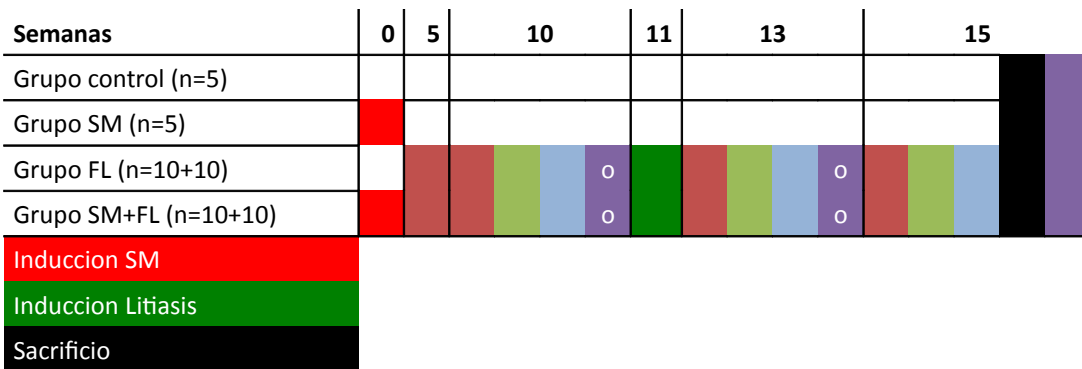
- IL-1
- IL-6
- TNF alfa

### Estudios morfológicos (o+AP)

- Microscopía óptica (x100)
  - orina
  - Tinción hematoxilina-eosina
  - Tinción Pizzolato
- Microscopía electrónica

SM: Síndrome metabólico, FL: Formación de litiasis (administración de EG), EF: Exploración física, SP: Sangre periférica, o: Microscopía óptica de orina.

### Cronograma del modelo:





## MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**Investigador principal:** Javier Sáenz Medina

Plan de trabajo (Etapas de desarrollo y distribución de tareas de todo el equipo investigador, incluyendo los proyectos en los que participa cada uno de sus integrantes. Indicar también el lugar de realización del proyecto)  
(Máximo 1 página)

Actividad	Personas involucradas	Lugar	Año														
				E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D		
Adquisición de material	Sáenz	Investigación P.Hierro	1	x	x	x											
			2														
Desarrollo experimental	Sáenz/	Investigación P.Hierro	1				x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
			2	x	x	x	x	x	x	x							
Procesado de muestras	Sáenz/Durán	Investi P.Hierro/URJC	1											x	x	x	x
			2	x	x	x	x	x	x	x	x	x					
Análisis de resultados, preparación publicaciones	Sáenz/Durán	Urología PH/URJC	1														
			2												x	x	x
Preparación de informe final	Sáenz/Durán	Urología PH/URJC	1														
			2														x

## MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**Investigador principal:** Javier Sáenz Medina

Experiencia del equipo investigador sobre el tema (Máximo 1 página)

La actividad investigadora del investigador principal se ha dirigido, en los últimos años, al estudio clínico de la litiasis urinaria, publicándose los siguientes trabajos:

- [ Sáenz Medina J et al. Prognostic factors of spontaneous expulsion in ureteral lithiasis. Actas Urol Esp.34 - 10, pp. 882 - 887.
- [ Sáenz Medina J et al. Relational database for urinary stone ambulatory consultation. Assessment of initial outcomes. Actas Urol Esp.34 - 5, pp. 467 -477.

Más en concreto, se han realizado trabajos clínicos sobre obesidad y recidiva litiásica:

- [ Sáenz J et al. Obesity as risk factor for lithiasic recurrence. Actas Urol Esp.36 - 4, pp. 228 – 233
- [ Influencia del síndrome metabólico en las características de la litiasis urinaria y en la recidiva de la enfermedad. Aguilar Gisbert L; Sáenz Medina J; et al. LXXVI Congreso Nacional de Urología. Málaga 2011.
- [ La obesidad como precursora de litiasis urinaria. Influencia en la recidiva litiásica. Alarcón Parra RO; Sáenz Medina J et al. LXXVI Congreso Nacional de Urología. Málaga 2011.

El investigador principal además ha desarrollado otros modelos experimentales en relación con el trasplante renal:

- [ Sáenz Medina J; et al. Experimental models for research and training in renal transplant. Actas Urol Esp.32 - 1, pp. 83
- [ Sáenz J et al. Comparative analysis of the hemodynamic and respiratory parameters during laparoscopic versus open living donor nephrectomy: an experimental model.

Y más en concreto sobre la descripción de la respuesta inflamatoria en un modelo animal de nefrectomía laparoscópica.

Sáenz J et al. Immunohumoral response during laparoscopic and open living donor nephrectomy: an experimental model. Transplant Proc.39 - 7, pp. 2102

## MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**Investigador principal:** Javier Sáenz Medina

Plan de difusión:

- 1.- Relevancia del proyecto en cuanto a su impacto clínico, asistencial y / o desarrollo tecnológico
- 2.- Relevancia del proyecto en cuanto a su impacto bibliométrico

El presente estudio es un proyecto de investigación básica que pretende aportar una herramienta efectiva para el estudio molecular de la formación de la litiasis en pacientes con síndrome metabólico. El estudio de esta patología es básico para la eventual prevención y tratamiento de esta patología en un grupo de pacientes muy numeroso sobre todo en países desarrollados.

El uso de animales es fundamental para la obtención de muestras en condiciones homogéneas y controladas que de otra forma sería imposible conseguir, por motivos éticos y metodológicos.

Los resultados del presente estudio se pretenden publicar en revistas incluidas en las bases de datos del ISI y en las que el grupo tiene experiencia previa de publicación. Además tenemos previsto participar en los Congresos de la Asociación Española de Urología y de la European Association of Urology

Medios disponibles para la realización del proyecto

El proyecto se va a realizar mayoritariamente en las instalaciones del Instituto de investigación Puerta de Hierro. El Instituto de investigación cuenta con animalario de pequeños y grandes animales. Además de quirófanos de pequeños animales y material disponible para el cuidado de los animales.

Entre el material se dispone de: aparatos de anestesia y monitorización de pequeños animales, material de microdissección, lupa y fuente de luz acoplada

El instituto de investigación cuenta además con laboratorios específicos de, inmunología y bioquímica. Cuenta con unidades específicas de microscopía.

Se dispone de material de laboratorio de uso común, espectrofotómetro, ordenadores, microscopios.

Ajustarse al espacio disponible

## MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**Investigador principal:** Javier Sáenz Medina

Justificación detallada de la ayuda solicitada (Máximo 1 página)

En los últimos años se ha incrementado considerablemente la clínica urológica asociada al SM. Así en individuos con esta patología se ha descrito una mayor tendencia a la formación de litiasis. Tanto el síndrome metabólico como la enfermedad litiásica renal comparten tres características, su elevada prevalencia, su relación con mecanismos de inflamación y su relación con alteraciones metabólicas. El probable nexo de unión de todas estas relaciones se encuentra en los mecanismos de lipotoxicidad.

Para el estudio de los mecanismos de lipotoxicidad sobre el riñón, y mas en concreto sobre la formación de litiasis, es necesario el desarrollo de modelos experimentales que permitan la recolección de muestras para su estudio genético, molecular y bioquímico, no posible en humanos por razones éticas y de validez experimental. Además, estos modelos deben conjugar, por un lado, el desarrollo de un SM lo mas parecido al desarrollado por los humanos, con la formación de litiasis de forma mas fisiológica y mas común en nuestra población. Por todo ello nos hemos decantado por un modelo que, si bien es mas lento que los modificados genéticamente, es mas fisiológico.

La adquisición de 50 ratas macho Sprague-Dawley de entre 150 y 200 g se ha presupuestado en 907 euros

Para la alimentación de los animales se ha calculado en aproximadamente 50 Kg el pienso necesario para la realización del proyecto, y se ha pedido presupuesto a la empresa Harlan, siendo este de 2247 euros

En relación con el material, se solicita como material inventariable una jaula metabólica para la recolección de las muestras de orina de 24 horas en condiciones estándar. Dicho material nos permitirá ampliar los recursos existentes, pudiendo realizar el modelo experimental en los plazos indicados. A la conclusión del proyecto, pasará a formar parte de la infraestructura investigadora del Servicio de Urología en el Instituto de investigación Puerta de Hierro. Se ha pedido presupuesto a la empresa "Harvard apparatus" que lo ha presupuestado en 2022 euros. Para la monitorización de los animales se precisa además un manguito de presión de cola de rata, adaptable a los aparatos de anestesia de nuestro hospital. Se ha pedido presupuesto a la empresa "Harvard apparatus" que lo ha presupuestado en 265 euros.

Para el procesado de las interleuquinas es imprescindible la adquisición de kits de ELISA, que se han presupuestado en 1800 euros.

Además debemos hacer frente a los gastos de gestión del instituto de investigación Puerta de Hierro, cuya tarifa está establecida en el 20%

**MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

Investigador principal: Javier Sáenz Medina

**PRESUPUESTO SOLICITADO**

<b>Gastos de ejecución</b>	<b>Euros</b>
<b>a) Adquisición de bienes y contratación de servicios</b> (Inventariable, fungible y otros gastos)	
1. 50 ratas macho Sprague Dayley	907,5
2. Pienso 60% fructosa	2248
3. Jaula metabólica	2023
4. Kits ELISA IL2, 6 TNF alfa	265
5. Manguito presión	1800
6. Gastos de gestión (20% de 7500 E)	1500
<b>SUBTOTAL</b>	<b>8743,5</b>
<b>b) Viajes y dietas</b> Asistencias a congresos y reuniones	2000
<b>SUBTOTAL</b>	<b>2000</b>
<b>SUBTOTAL GASTOS EJECUCIÓN</b>	<b>10743,5</b>
<b>TOTAL AYUDA SOLICITADA</b>	<b>10743,5</b>

**MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**Investigador principal:** Javier Sáenz Medina

**ANEXOS**