

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**EL SÍNDROME METABÓLICO INDUCIDO POR FRUCTOSA ES ASOCIADO
CON HIPERTENSIÓN GLOMERULAR Y DAÑO MICROVASCULAR RENAL
EN RATAS.**

ACTIVIDAD DE INVESTIGACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

ADRIANA JIMÉNEZ HERNÁNDEZ

MÉXICO, D.F.

AÑO 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Prof. Maria del Socorro Cecilia Reyna Rodríguez

VOCAL: Dr. José Pedraza Chaverri

SECRETARIO: Dr. Laura Gabriela Sánchez Lozada

1ER. SUPLENTE: Prof. Omar Noel Medina Campos

2º. SUPLENTE: Prof. Maria Elena Ibarra Rubio

Este tema fue desarrollado en el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, México, D.F.

Asesor

Dra. Laura Gabriela Sánchez Lozada

Sustentante

Adriana Jiménez Hernández

INDICE

Introducción,	1
Objetivos.	3
Diseño experimental.	4
Materiales y métodos.	5
Revisión bibliográfica.	8
Referencias.	13

Anexo

Sánchez-Lozada LG, Tapia1 E, **Jiménez A**, Bautista P, Cristóbal M, Nepomuceno T, Soto V, Ávila-Casado C, Nakagawa T, Johnson RJ, Herrera-Acosta J, Franco M. **Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hipertension and microvascular damage in rats.** *Am J Physiol Renal Physiol*, 292: F423-F429, 2007.

EL SÍNDROME METABÓLICO INDUCIDO POR FRUCTOSA ES ASOCIADO CON HIPERTENSIÓN GLOMERULAR Y DAÑO MICROVASCULAR RENAL EN RATAS.

INTRODUCCIÓN

La prevalencia de obesidad y síndrome metabólico se ha acentuado debido a los cambios en el tipo de dieta. En particular, la ingesta de fructosa se ha incrementado por el aumento en el consumo de refrescos y otras bebidas endulzadas con sacarosa y jarabe de maíz alto en fructosa. Un efecto peculiar del consumo de fructosa es que produce aumento del ácido úrico plasmático. Recientemente se encontró que la hiperuricemia asociada al consumo de fructosa en ratas, es parcialmente responsable del desarrollo de síndrome metabólico. Adicionalmente estudios clínicos y experimentales asocian a la hiperuricemia con la génesis y perpetuación de la hipertensión arterial y el daño renal.

Por lo tanto el objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de diferentes rutas de administración de la fructosa sobre la inducción de síndrome metabólico y sus consecuencias sobre la hemodinámica glomerular y la estructura renal. Para ello se estudiaron ratas Sprague-Dawley macho de 290-350 gr por 8 semanas. Con el fin de inducir síndrome metabólico se administró una dieta al 60% de fructosa (n=7) o fructosa al 10% en el agua de beber (n=7). El grupo control consistió de 7 ratas en dieta normal y agua pura. Se midió el peso corporal y la ingesta de alimento y agua semanalmente. En el periodo basal y a las 8 semanas se cuantificaron el ácido úrico y los triglicéridos plasmáticos y se midió la presión arterial sistólica en los animales concientes. Al final del periodo de estudio se evaluó la hemodinámica glomerular mediante técnicas de micropunción renal. Al final del experimento los riñones se fijaron por perfusión para el estudio histológico y se pesaron. Se midió la pared vascular en arteriolas aferentes de glomérulos localizados en la región más externa de la corteza renal mediante inmunohistoquímica y calculando el área arteriolar por análisis de imagen computarizado, además se cuantificó la expresión de α -actina y se determinó la presencia de gloméruloesclerosos y fibrosis tubulointersticial.

La administración de fructosa en la dieta produjo una ingesta calórica mayor de este carbohidrato comparado al que produjo el consumo en el agua de beber ($38\pm 2\%$ vs $78\pm 0.4\%$, $p < 0.001$). La administración de fructosa por ambas vías produjo hipertensión, hiperuricemia e hipertrigliceridemia, sin embargo hubo un incremento progresivo de estos parámetros a mayor consumo calórico de fructosa. Se encontraron correlaciones positivas entre el porcentaje de consumo calórico de fructosa y los valores de ácido úrico ($r = 0.64$, $p = 0.01$) y triglicéridos plasmáticos (TG: $r = 0.87$, $p < 0.0001$) a las 8 semanas. Adicionalmente el grupo que recibió fructosa en la dieta desarrolló hipertrofia renal, hipertensión glomerular, vasoconstricción cortical y arteriopatía de los vasos preglomerulares. Encontramos correlaciones positivas entre presión arterial sistémica y presión glomerular ($r = 0.56$, $p = 0.01$); ácido úrico plasmático y área arteriolar ($r = 0.77$, $p < 0.0001$); área arteriolar y presión glomerular ($r = 0.57$, $p = 0.007$), y área arteriolar y resistencia aferente ($r = 0.49$, $p = 0.02$).

En conclusión: (1) La ingesta de fructosa produce síndrome metabólico, a mayor consumo calórico del carbohidrato las características de síndrome metabólico se acentuaron. (2) El síndrome metabólico produjo hipertrofia renal, arteriopatía, hipertensión glomerular y vasoconstricción cortical. Estos cambios son más evidentes a mayor consumo de fructosa y son similares a los observados en hiperuricemia experimental. (3) Estos resultados apoyan la noción del papel fundamental de ácido úrico en el desarrollo del síndrome metabólico experimental.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la forma de administración de la fructosa, en la dieta o en el agua de beber, sobre la estructura y la hemodinámica glomerular en ratas,

Objetivos específicos.

Comparar el efecto de la forma de administración de la fructosa en la generación de síndrome metabólico a través de la cuantificación de los siguientes factores: peso, ácido úrico, triglicéridos e hipertensión arterial.

Comparar el efecto de la administración de la fructosa sobre los parámetros de hemodinámica glomerular utilizando la técnica de micropunción renal.

Comparar el efecto de la administración de la fructosa sobre la estructura renal evaluada como incremento de la pared vascular de la arteriola aferente, alteraciones glomerulares (esclerosis y expresión de α -actina) y fibrosis tutulointestinal mediante estudios histopatológicos.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se estudiaron 21 ratas macho que se dividieron en 3 grupos: normales (N, n=7), fructosa al 10% en el agua de beber (F10, n=7) y fructosa al 60% en la dieta (F60, n=7). Se cuantifico el ácido úrico plasmático (AU), y presión arteria sistólica (PAS) basal y a la 8 semanas de seguimiento. Al final del periodo de estudio se evaluó la hemodinámica glomerular con técnicas de micropunción renal y se realizo el estudio histopatológico.

MATERIALES Y METODOS

Animales. Los animales utilizados fueron machos de la cepa Sprague Dawley con un peso promedio de 290-350 gr adquiridos en Harlan México.

Reactivos. Se utilizó D-fructosa, 98% de Sigma-Aldrich para preparar la solución al 10% de fructosa que se utilizó como agua de beber, de la cual se dosificaron 100 mL diarios a cada animal. Para el grupo de fructosa en dieta se dosificaron 50 g diarios a cada animal de un alimento con un contenido de 60% de fructosa adquirido de Harlan Teklad, México S.A. de C.V.

Determinación del consumo de fructosa. Para el seguimiento del consumo de fructosa se pesó el alimento y midió el volumen de agua restantes. También se tomó el peso de los animales para conocer la correlación entre el consumo de fructosa y el aumento de masa corporal.

Presión arterial. La presión arterial sistólica se midió en los animales conscientes colocados en una jaula de restricción a la que fueron habituados por una semana previamente, Se introdujeron en una caja con lámparas para aumentar la temperatura de la cola de los animales y hacer más detectable el flujo sanguíneo. Para medir la presión arterial se utilizó un pletismógrafo con un transductor diferencial de presión que mide el flujo sanguíneo en la cola de la rata.

Ácido úrico, triglicéridos y glucosa séricos. Estas determinaciones se realizaron a partir de una muestra de sangre obtenida de la cola de la rata utilizando EDTA % como anticoagulante. Se utilizaron kits comerciales basados en métodos enzimáticos.

Hemodinámica glomerular. Se utilizó la técnica de micropunción renal mediante la cual se obtuvieron muestras de orina, líquido tubular y sangre de las arteriolas eferentes, y las presiones intratubular a flujo libre y flujo detenido, y capilar peritubular. A partir de estos datos se calcularon los parámetros de hemodinámica glomerular.

En breve las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (30 mg/Kg de peso corporal i.p.) y se colocaron en una mesa termorregulada a 37°C, se cateterizó la tráquea con tubo de polietileno PE-240, las venas yugulares y ambas arterial femorales con tubo de polietileno PE-50. Además se cateterizó una rama de una de las venas yugulares con tubo de polietileno PE-10 para suministrar dosis suplementarias de anestésico, según requerimientos. Se expuso el riñón a través de una incisión de lumbotomía y se colocó en una cápsula de lucita, conservando su posición fisiológica sin comprimir el uretero ni el pedículo renal. Se cateterizó el uretero con tubo de polietileno PE-10. El espacio entre la cápsula y el riñón se llenó con algodón y posteriormente con agar y la superficie del riñón se cubrió con solución Ringer a 37°C. El riñón se iluminó con luz fría transmitida por fibra óptica permitiendo visualizar claramente los túbulos y capilares de la corteza renal con un microscopio estereoscópico. Uno de los catéteres femorales se utilizó para obtener muestras de sangre periódicamente y el otro para monitorizar de forma continua la presión arterial media, mediante un transductor de presión (modelo P23db, Statham Instruments, Gould Div Inc Hato Rey, Pto Rico), conectado a un polígrafo (Grass Model RPS 7C8, Instruments, Quincy, Mass, EUA).

Las muestras de sangre se repusieron de forma simultánea con el mismo volumen obtenido de una rata donadora. Los animales se mantuvieron en condiciones de euvolemia mediante la administración intravenosa de plasma isooncótico de rata a dosis de 10 ml/kg de peso corporal en una hora, seguido de una infusión de polifructosán (Inutest. Fresenius Kabi, Austria) al 75% en solución Ringer vía i.v. a una velocidad de 2.2 ml/h durante todo el experimento. Después de un periodo de equilibrio de 60 min., se inició una recolección de orina de 30 a 40 min. en tubos de plástico. El volumen urinario se calculó por la diferencia de pesos entre el tubo con la muestra colectada y el tubo previamente pesado. Al principio y al final de la recolección de orina se obtuvieron muestras de sangre. Simultáneamente a la recolección de orina, se obtuvieron 7 a 9 muestras por micropunción del líquido tubular y de sangre de la arteria eferente y se midió la presión del capilar peritubular e intratubular a flujo libre y flujo detenido (para estimar la presión del capilar glomerular) con un equipo servo-null (Servonulling Pressure System model 4A, Instrumentation for Physiology and Medicine Inc, San Diego CA USA) conectado a un polígrafo (modelo P23db, Statham Instruments, Gould Div Inc Hato Rey, Pto Rico). Al final de los experimentos los riñones fueron fijados por perfusión para el estudio histológico.

Métodos analíticos: La concentración de polifruetosán en sangre y orina se midió con la técnica de antrona de Davidson y Sackner (J Lab Clin Med 62:351-6, 1963). El volumen de las muestras tubulares se midió con un capilar de cuarzo de diámetro constante, previamente calibrado a un volumen fijo de entre 8 y 12 nanolitros con un error del 2%. La concentración de polifruetosán se midió por triplicado por el método microfluorométrico de Vureck y Pegram (Anal Biochem 16:409-419, 1966). La concentración de proteínas plasmáticas aferentes y eferentes se midió por duplicado mediante el micrométodo fluorométrico de Viets (Anal Biochem 88:513-521, 1978). Con las mediciones anteriores se determinaron: la filtración glomerular por nefrona (FG/n), la presión capilar glomerular (PCG), el flujo plasmático glomerular (QA), el flujo sanguíneo glomerular (FSG), las presiones oncóticas aferente y eferente (π_A y π_E), las resistencias aferente y eferente (RA, RE), la presión efectiva de filtración (PEF), el delta de presión transcapilar (ΔP) y el coeficiente de ultrafiltración (Kf).

Estudios histopatológicos. Después de terminar el estudio de micropunción los riñones se fijaron en solución de paraformaldehído al 4% para realizar el análisis histológico de forma ciega. En la cuantificación de la morfología de las arteriolas aferentes se realizó la inmunohistoquímica en cortes de 4 μ m parafinizados con el anticuerpo primario contra α -actina y γ -actina de músculo liso. Se utilizó como contraste la tinción con ácido peryódico de Schiff (PAS). Con un microscopio Olympus a una magnificación de 1000x se seleccionaron vasos adyacentes a los glomérulos en la corteza externa, las arteriolas aferentes fueron diferenciadas de las eferentes por la presencia de una lámina elástica interna y de endotelio delgado y aplanado. Utilizando análisis de imagen computarizado (Image-Pro Plus) se midió el engrosamiento de la pared arteriolar en 5-10 arteriolas por biopsia. Previamente se reportó que las células mesangiales cambian su fenotipo y expresan α -actina en el glomérulo durante el desarrollo de daño renal hipertensivo por lo que se evaluaron de 20-30 glomérulos de las mismas muestras para cuantificar la α -actina en áreas mesangiales. La presencia de gloméruloesclerosis y fibrosis tubulointersticial fue determinada por medio de la tinción trícromica de Masson en todos los grupos de ratas.

REVISION BIBLIOGRAFICA

El síndrome metabólico comprende una serie de factores asociados con la resistencia a la insulina, que incluyen hiperglucemia, hipertrigliceridemia, disminución de lipoproteínas de alta densidad (HDLs) e hipertensión arterial. Actualmente se han incluido otros factores como la obesidad central, hiperuricemia y aumento de la lipoproteínas de baja densidad (LDLs) [1]. La gran importancia de este padecimiento radica en que las personas que lo presentan tienen riesgo de desarrollar diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular y enfermedad renal crónica [2, 3].

La prevalencia del síndrome metabólico se ha incrementado en los países desarrollados y la dieta es un factor ambiental importante que contribuye a la generación de obesidad y síndrome metabólico. Actualmente la ingesta de fructosa en México y Estado Unidos se ha incrementado debido al consumo de bebidas y alimentos procesados endulzados con sacarosa y jarabe de maíz alto en fructosa (JMAF). El uso comercial del JMAF comenzó en 1970, y para el año de 1985 alcanzaba el 35% de la cantidad de edulcorantes por peso seco y en 2001 los edulcorantes del maíz sumaron el 56% del consumo total de edulcorantes [1, 4]. En 1993 se estimó que el promedio del consumo de fructosa en adolescentes y adultos fue de 40 g/día, de los cuales 13g provenían de fuentes naturales y 27g de alimentos o bebidas adicionadas con fructosa [1].

En 1997 el promedio del consumo de fructosa fue de 97 g/día (388 kcal) y cabe señalar que dos refrescos de 355 mL pueden aportar 50g de fructosa (200 kcal) que sobrepasan el 10% de los requerimientos energéticos de una mujer adulta de mediana edad [1]. Por lo tanto, el aumento en el consumo de fructosa contribuye a la prevalencia de obesidad y anormalidades metabólicas.

Se ha encontrado que el metabolismo de la fructosa tiene efectos importantes en el metabolismo de la glucosa y de los lípidos que dan origen a una serie de anormalidades metabólicas correspondientes al síndrome metabólico [5-10].

La fructosa es absorbida en el intestino delgado a través del transportador Glut-5 no dependiente de sodio y posteriormente ésta llega al hígado por medio de la vena porta. Una vez en el hígado, la fructosa es metabolizada extensamente y sus metabolitos entran

a varias rutas metabólicas ocasionando alteraciones cuando se consume en dosis altas [5].

El metabolismo hepático de la glucosa esta limitado por su capacidad de almacenamiento como glucógeno y por la inhibición de la glucólisis mediante el efecto inhibitorio del ATP y el citrato sobre la enzima fosfofructocinasa. Por el contrario, la fructosa es metabolizada a fructosa -1-fosfato a través de la enzima fructocinasa y por lo tanto evita el paso de regulación de la fosfofructocinasa [1]. Se ha demostrado que durante el consumo simultáneo de glucosa y fructosa (sacarosa) se induce un aumento marcado en la incorporación hepática de glucosa así como un incremento significativo en la síntesis de glucógeno. Estos efectos son mediados por el incremento de la producción de fructosa-1-fosfato mediada por el metabolismo de la fructosa lo cual inhibe la glucógeno fosforilasa con la consecuente acumulación de glucógeno; adicionalmente el aumento de glucosa-6-fosfato activa a la glucógeno sintetasa que es la enzima responsable de la síntesis del glucógeno [9].

Por otro lado la fructosa funciona como una fuente no regulada en la producción de AcetilCoA que ocasiona un incremento en la lipogénesis de novo. La fructosa da origen a dos moléculas de gliceraldehído-3-fosfato que son convertidas, a través de una reacción catalizada por la enzima piruvato-cinasa, a piruvato, el cual a su vez genera AcetilCoA por acción de la enzima piruvato deshidrogenasa. La AcetilCoA es la principal fuente de carbono para la lipogénesis y depende de la concentración de piruvato, la cual esta regulada por la piruvato deshidrogenasa. Esta última enzima se encuentra activada cuando se administra una concentración de fructosa por arriba de la concentración fisiológica (1.3 mmol/L) por efecto de una disminución en la relación [ATP]/[ADP] provocada por la fosforilación de la fructosa en fructosa -1-fosfato [9]. Como resultado de la esterificación de la cadena de AcetilCoA ocurre la producción de fosfolípidos y triglicéridos que son los mayores precursores de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDLs). Así, las concentraciones elevadas de fructosa son utilizadas como una fuente no regulada de acetilCoA [9]. En efecto, estudios en humanos han demostrado que la ingestión de fructosa resulta en un incremento marcado de la lipogénesis de novo mientras que cantidades isocalóricas de glucosa no producen este efecto [9]. Así la fructosa es más lipogénica que la glucosa, efecto que puede ser exacerbado en sujetos con hiperlipidemia primaria, resistencia a insulina o diabetes tipo II. En un análisis de 33 estudios experimentales se demostró en 26 que ocurre un aumento de las

concentraciones plasmáticas de triglicéridos en respuesta a una dieta alta en fructosa [10].

Un efecto peculiar del consumo de fructosa es el aumento de las concentraciones plasmáticas de ácido úrico. Se ha observado en varios estudios experimentales y en humanos que el consumo de fructosa lleva al desarrollo de hiperuricemia [11, 12], y también se ha observado que los pacientes hipertensos tienen un aumento mayor en la concentración de ácido úrico después de una infusión de fructosa [10].

El incremento de ácido úrico por consumo de fructosa se relaciona con una caída en la concentración hepática de ATP y fosfato inorgánico. Está se encuentra asociada a la inhibición de la fosforilación oxidativa del ATP por escasez de fosfato inorgánico, que se encuentra secuestrado en forma de gliceraldehído-3 fosfato y fructosa-1-fosfato tras la fosforilación de la fructosa que lleva a cabo la enzima fructocinasa. La disminución en la concentración de ATP conduce a la eliminación de la inhibición alostérica de las enzimas que degradan el AMP: AMP desaminasa y 5-nucleotidasa. Este efecto genera un aumento en la concentración de inosina que es el sustrato para la formación de ácido úrico [9]; aunado a esto, la disminución de nucleosidos de adenina totales provoca la estimulación de la síntesis de novo de nucleótidos como una regulación por retroalimentación. Por consiguiente se elimina la inhibición alostérica de los dos primeros pasos de la síntesis de novo de nucleótidos, catalizados por las enzimas PRPP sintetasa y PRPP glutamil-amido-transferasa y hay un aumento en la producción de 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP), que da lugar a la formación de IMP, que es degradado también a ácido úrico, ya que la enzima 5-nucleotidasa sigue activa [9]. Así entonces la ingesta de fructosa propicia el aumento de ácido úrico por dos mecanismos: aumento de la concentración de inosina por degradación de ATP y estimulación de la síntesis de novo de nucleótidos y su consiguiente degradación.

Por otro lado se ha sugerido que la hipertensión secundaria al síndrome metabólico inducido por sobrecarga de fructosa podría estar asociada con el aumento de ácido úrico causada por la ingesta de este carbohidrato [13].

A este respecto, estudios epidemiológicos recientes han reevaluado el papel del ácido úrico en el desarrollo de hipertensión arterial. En varios estudios se encontró que la hiperuricemia predice el desarrollo de hipertensión arterial. De particular relevancia es un estudio en el que el ácido úrico se encontró aumentado en casi el 90% de adolescentes con hipertensión esencial de reciente diagnóstico. Además estudios piloto mostraron que la reducción de la hiperuricemia con alopurinol corrigió la hipertensión en 4 de 5 de estos pacientes [14]. Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que el aumento de ácido úrico puede participar en la patogénesis temprana de la hipertensión arterial.

Adicionalmente, un elemento sobresaliente en la hipertensión asociada a hiperuricemia es la presencia de lesiones vasculares independientes de la hipertensión. Se ha encontrado en pacientes hipertensos correlación entre la concentración de ácido úrico sérico y resistencia vascular renal, y disminución de la filtración glomerular [15]. Estos hallazgos sugieren que la hiperuricemia se asocia con daño vascular renal. En estudios realizados en autopsias de pacientes con gota se encontraron cambios histológicos vasculares renales en más del 75 % de los casos [16]. Adicionalmente se ha descrito un síndrome familiar de hiperuricemia juvenil caracterizado por disminución de la excreción fraccional de urato, hipertensión, daño vascular y túbulointersticial sin depósito de cristales de urato [17, 18].

Con el fin de determinar la participación del ácido úrico en la patogénesis de la hipertensión se desarrolló un modelo experimental de hiperuricemia moderada en la rata. La administración de ácido oxónico (inhibidor de la uricasa, enzima ausente en el hombre) induce hiperuricemia sin formación de cristales de urato. A las 4 semanas los animales desarrollaron hipertensión arterial, hipertrofia de la arteriola aferente e inflamación túbulointersticial. El tratamiento con alopurinol y benzodiarona previno las alteraciones descritas [19, 20]. Adicionalmente en estudios in vitro el ácido úrico indujo proliferación de células de músculo liso vascular [21].

Por otra parte, la producción de óxido nítrico (ON) derivado de la sintasa endotelial juega un papel importante en el mantenimiento de la microvasculatura, así una producción anómala de ON es común en sujetos con síndrome metabólico, hipertensión y/o enfermedad vascular [22, 23]. A este respecto se encontró que el ácido úrico reduce la concentración de ON en células endoteliales en cultivo humanas y de rata [24, 25].

Consistentemente con estos hallazgos se encontró que las ratas con hiperuricemia por ácido oxónico tienen concentraciones bajas de nitritos plasmáticos (producto de la degradación del ON) lo cual se previene si los animales son tratados con alopurinol [25]. Estas evidencias apoyan la noción de que la hiperuricemia puede producir disfunción endotelial. De hecho numerosos estudios han reportado que la disminución de la concentración de ácido úrico sérico con alopurinol mejora la función endotelial en pacientes con daño cardíaco, diabetes, hipercolesterolemia y en fumadores [26, 27, 28].

En estudios realizados en nuestro laboratorio encontramos que la hipertrofia de la arteriola aferente inducida por hiperuricemia se traduce en la alteración del mecanismo de autorregulación que permite mantener la presión glomerular normal en presencia de hipertensión sistémica [29, 30]. En los animales hiperuricémicos el aumento de la presión sistémica se transmitió al capilar glomerular induciendo hipertensión glomerular, a pesar de que el grado de arteriopatía aferente correlacionó positivamente con el grado de vasoconstricción cortical renal [29]. Es un hecho bien conocido que tanto la lesión vascular de la arteriola aferente como las lesiones túbulointersticiales inducidas por la isquemia renal prolongada producen a largo plazo hipertensión sensible a sal [31]. Adicionalmente se sabe que la hiperuricemia es un hallazgo común en otras condiciones relacionadas con hipertensión esencial como son las ratas de la cepa espontáneamente hipertensa [32]. Recientemente se ha demostrado en ratas, que la arteriopatía inducida por la administración de ácido oxónico por 7 semanas se asoció con aumento de la presión sistémica en respuesta a un aumento de sodio en la dieta [33]. Estos resultados sugieren que una vez que se establece la lesión estructural la hipertensión se auto-perpetua aunque se retire el insulto inicial. A este respecto es interesante que las ratas con sobrecarga de fructosa en el contexto de una dieta baja en sodio no desarrollaron hipertensión arterial [34].

REFERENCIAS

1. Sharon S Elliott, Nancy L Keim, Judith S Stern, Karen Teff, and Peter J Havel. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *Am. J. Clinical Nutrition*, Nov 2002; 76: 911 - 922.
2. García de Vinuesa S, Giocoechea M, Kanter J, Puerta M, Gómez Campdera F, Luño Síndrome metabólico (SM) y resistencia a la insulina en pacientes con enfermedad renal crónica (ERC), efecto del bloqueo del sistema renina-angiotensina. XXXV Congreso de la Nacional S. E. N. Málaga, 9-12 de octubre de 2005.
3. Aranda P, Aranda FJ, Frutos MA, López V, López de Novales E. Impacto del síndrome metabólico (SM) en la progresión de la enfermedad renal crónica (ERC) y daño cardiovascular (CV). XXXV Congreso de la Nacional S. E. N. Málaga, 9-12 de octubre de 2005.
4. Ley agrícola estadounidense de 2002. Implicaciones en el Mercado mundial del azúcar. Organización internacional del azúcar, 28 de abril de 2003.
5. Henry Robert R, Crapo Phyllis A. Current issues in fructose metabolism. *Annu Rev Nutr* 1991; 11:21-39.
6. Reaven Gerald M. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, 1988; 37:1595-1607.
7. Thorburn AW, Storlien LH, Jenkins AB, Khouri S, Kraegen EW. Fructose-induced in vivo insulin resistance and elevated plasma triglyceride levels in rats. *Am J Clin Nutr* 1989; 49:1155-1163.
8. Hallfrisch J, Ellwood KC, Michaelis OE, Reiser S, O' Dorisio TM, Prather ES. Effects of dietary fructose on plasma glucose and hormone responses in normal and hyperinsulinemic men. *J Nutr* 1983; 113:1819-1826.
9. Mayes Peter A. Intermediary metabolism of fructose. *Am J Clin Nutr* 1993;58(suppl):754S-765S.
10. Hallfrisch J. Metabolic effects of dietary fructose. *The FASEB Journal*, June 1990;4:2652-2660.
11. Fields M, Lewis CG, Lure MD. Allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidase, reduces uric acid levels and modifies the signs associated with copper deficiency in rats fed fructose. *Free Radic Biol Med* 1996; 20:595-600.
12. Fox IH, Kelley WN. Studies on the mechanism of fructose-induced hyperuricemia in men. *Metabolism* 1972; 21:713-721.
13. Nakagawa T, Hu H, Zharikov S, Tuttle KR, Short RA, Glushakova O, Ouyang X, Feig DI, Block ER, Herrera-Acosta J, Patel JM and Johnson RJ. A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006; 290: F625-F631.
14. Feig DI, Johnson RJ. Hyperuricemia in childhood primary hypertension. *Hypertension* 2003; 42:247-252.
15. Messerli FH, Frohlich ED, Dreslinski GR. Serum uric acid in essential hypertension: an indicator of renal vascular involvement. *Ann Intern Med* 1980; 93:817-821.
16. Cannon PJ, Stason WB, Demartini FE. Hyperuricemia in primary and renal hypertension. *N Engl J Med* 1966; 275:457-464.
17. Duncan H, Dixon AS. Gout, familial hyperuricaemia, and renal disease. *Q J Med*, 1960; 29:127-135.
18. McBride MB, Ridgen S, Haycock GB. Presymptomatic detection of familial juvenile hyperuricaemic nephropathy in children. *Pediatr Nephrol*, 1998; 12:357-364.
19. Mazzali M, Huges J, Kim YG, Jefferson JA, Kang DH, Gordon KL, Lan HY, Kivlighn S, Johnson RJ. Elevated uric acid increases blood pressure in the rat by a novel crystal-independent mechanism. *Hypertension*, 2001; 38:1101-1106.

20. Mazzali M, Kanellis J, Han L. Hyperuricemia induces a primary renal arteriopathy in rats by a blood pressure-independent mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002; 282; F991-F997.
21. Kang DH, Nakagawa T, Feng L. A role for uric acid in the progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol*, 2002; 13:2888-2897.
22. Deedwania PC. Mechanisms of endothelial dysfunction in the metabolic syndrome. *Curr Diab Rep*, 2003; 3:289-292.
23. Caballero AE. Endothelial dysfunction in obesity and insulin resistance: a road to diabetes and heart disease. *Obes Res*, 2003; 11:1278-1289.
24. Kang DH, Park SK, Lee IK, Johnson RJ: Uric Acid-Induced C-Reactive Protein Expression: Implication on Cell Proliferation and Nitric Oxide Production of Human Vascular Cells. *J Am Soc Nephrol* 16:3553-3562, 2005
25. Khosla UM, Zharikov S, Finch JL et al.: Hyperuricemia induces endothelial dysfunction. *Kidney Int* 67:1739-1742, 2005
26. Butler R, Morris AD, Belch JJ. Allopurinol normalizes endothelial dysfunction in type 2 diabetics with mild hypertension. *Hypertension*, 2002; 35:746-751.
27. Farquharson CA, Butler R, Hill A. Allopurinol improves endothelial dysfunction in chronic heart failure. *Circulation*, 2002; 106:221-226.
28. Doehner W, Schoene N, Rauchaus M. Effects of xanthine oxidase inhibition with allopurinol in endothelial function and peripheral blood flow in hyperuricemic patients with chronic heart failure: results from 2 placebo-controlled studies. *Circulation*, 2002; 105:2619-2624.
29. Sanchez-Lozada LG, Tapia E, Johnson RJ, Rodriguez-Iturbe B and Herrera-Acosta J. Glomerular hemodynamic changes associated with arteriolar lesions and tubulointerstitial inflammation. *Kidney Int Suppl*, 2003; S9-14.
30. Sanchez-Lozada LG, Tapia E, Santamaria J, Ávila-Casado C, Soto V, Nepomuceno T, Rodríguez-Iturbe B, Johnson RJ and Herrera-Acosta J. Mild hyperuricemia induces vasoconstriction and maintains glomerular hypertension in normal and remnant kidney rats. *Kidney Int*, 2005; 67:327-347.
31. Johnson RJ, Rodriguez-Iturbe B, Nakagawa T *et al.*: Subtle renal injury is likely a common mechanism for salt-sensitive essential hypertension. *Hypertension* 45:326-330, 2005.
32. Nakazono K, Watanabe N, Matsuno K. Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; 88:10045-10048.
33. Watanabe S, Kang DH, Feng L. Uric acid, hominoid evolution, and the pathogenesis of salt-sensitivity. *Hypertension*, 2002; 40:355-360.
34. Catena C, Cavarape A, Novello M. Insulin receptors and renal sodium handling in hypertensive fructose-fed rats. *Kidney Int* 2003; 64:2163-2171.



Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats

Laura G. Sánchez-Lozada, Edilia Tapia, Adriana Jiménez, Pablo Bautista, Magdalena Cristóbal, Tomás Nepomuceno, Virgilia Soto, Carmen Ávila-Casado, Takahiko Nakagawa, Richard J. Johnson, Jaime Herrera-Acosta and Martha Franco

Am J Physiol Renal Physiol 292:423-429, 2007. First published Aug 29, 2006;
doi:10.1152/ajprenal.00124.2006

You might find this additional information useful...

This article cites 32 articles, 14 of which you can access free at:

<http://ajprenal.physiology.org/cgi/content/full/292/1/F423#BIBL>

Updated information and services including high-resolution figures, can be found at:

<http://ajprenal.physiology.org/cgi/content/full/292/1/F423>

Additional material and information about *AJP - Renal Physiology* can be found at:

<http://www.the-aps.org/publications/ajprenal>

This information is current as of January 25, 2007 .

AJP - Renal Physiology publishes original manuscripts on a broad range of subjects relating to the kidney, urinary tract, and their respective cells and vasculature, as well as to the control of body fluid volume and composition. It is published 12 times a year (monthly) by the American Physiological Society, 9650 Rockville Pike, Bethesda MD 20814-3991. Copyright © 2005 by the American Physiological Society. ISSN: 0363-6127, ESSN: 1522-1466. Visit our website at <http://www.the-aps.org/>.



Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats

Laura G. Sánchez-Lozada,¹ Edilia Tapia,¹ Adriana Jiménez,¹ Pablo Bautista,¹ Magdalena Cristóbal,¹ Tomás Nepomuceno,¹ Virgilia Soto,² Carmen Ávila-Casado,² Takahiko Nakagawa,³ Richard J. Johnson,³ Jaime Herrera-Acosta,^{1†} and Martha Franco¹

Departments of ¹Nephrology and ²Pathology, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Mexico City, Mexico; and ³Nephrology, Hypertension and Transplantation, University of Florida, Gainesville, Florida

Submitted 13 April 2006; accepted in final form 23 August 2006

Sánchez-Lozada LG, Tapia E, Jiménez A, Bautista P, Cristóbal M, Nepomuceno T, Soto V, Ávila-Casado C, Nakagawa T, Johnson RJ, Herrera-Acosta J, Franco M. Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 292: F423–F429, 2007. First published August 29, 2006; doi:10.1152/ajprenal.00124.2006.—Fructose intake has been recently linked to the epidemic of metabolic syndrome and, in turn, the metabolic syndrome has been epidemiologically linked with renal progression. The renal hemodynamic effects of fructose intake are unknown, as well as the effects of different routes of administration. Metabolic syndrome was induced in rats over 8 wk by either a high-fructose diet (60%, F60, *n* = 7) or by adding fructose to drinking water (10%, F10, *n* = 7). Body weight and food and fluid intake of each rat were measured weekly during the follow-up. At baseline and at the end of wk 8, systolic blood pressure, plasma uric acid, and triglycerides were measured. At the end of week 8 glomerular hemodynamics was evaluated by micropuncture techniques. Wall thickening in outer cortical and juxtamedullary afferent arterioles was assessed by immunohistochemistry and computer image analysis. Fructose administration either in diet or drinking water induced hypertension, hyperuricemia, and hypertriglyceridemia; however, there was a progressive increment in these parameters with higher fructose intake (C<F10<F60). In addition, the F60 rats developed kidney hypertrophy, glomerular hypertension, cortical vasoconstriction, and arteriopathy of preglomerular vessels. In conclusion, fructose-induced metabolic syndrome is associated with renal disturbances characterized by renal hypertrophy, arteriopathy, glomerular hypertension, and cortical vasoconstriction. These changes are best observed in rats administered high doses (60% diet) of fructose.

uric acid; obesity

METABOLIC SYNDROME IS A PATHOPHYSIOLOGICAL entity characterized by insulin resistance, hyperinsulinemia, dyslipidemia, hypertension, and obesity (27). The risk for developing diabetes type 2, cardiovascular disease, and renal disease is increased with increasing manifestations of the various components of the syndrome within any individual.

The macronutrient content of the diet has been linked to the metabolic syndrome. Recently, consumption of dietary fructose has been suggested to be one of the environmental factors contributing to the development of obesity and the accompanying abnormalities of the metabolic syndrome (7). In fact, a

well-known experimental model of metabolic syndrome is induced by high consumption of fructose; this model induces hypertension, hypertriglyceridemia, hyperinsulinemia, and insulin resistance in rats (12). Fructose consumption is able to produce these effects because fructose is more lipogenic than glucose and usually causes greater elevations of triglycerides (10), which, in turn, increases intramyocellular triglyceride content in the skeletal muscle, causing insulin resistance.

Fructose is unique among sugars in that it also results in a marked synthesis of uric acid; this effect is secondary to fructose phosphorylation by fructokinase (also called ketohexokinase), which uses ATP as phosphate donor. Accumulation of fructose-1-phosphate causes depletion of hepatic ATP and increases the degradation of nucleotides to uric acid (10). In effect, it is well known that healthy individuals show a transient rise in serum uric acid following an oral or intravenous challenge of fructose, and this is greater in gouty patients or their siblings (8, 24).

Recently, the role of fructose-induced hyperuricemia in the development of metabolic syndrome was examined (20). In fructose-fed rats administration of allopurinol lowered uric acid levels and significantly reduced blood pressure, improved basal and stimulated insulin levels, corrected the hypertriglyceridemia, and prevented the weight gain (20). Since endothelial dysfunction is a hallmark of insulin resistance, it was interesting to find that vasorelaxation of arterial rings in response to acetylcholine, a process that is mediated by nitric oxide (NO), was blocked by uric acid (20). Thus uric acid-induced endothelial dysfunction with impaired NO production may participate in the development of insulin resistance in fructose-fed rats. On the other hand, renal arteriolar damage, glomerular hypertension, and cortical vasoconstriction have also been reported to be induced by hyperuricemia (29, 30) but it is not known whether this also occurs in fructose-overloaded rats.

Fructose-induced metabolic syndrome can be created experimentally either by feeding rats with a high-fructose diet (60%) (12, 20) or by adding fructose to drinking water (10–20%) (5); nevertheless, different routes of administration might induce a variable consumption of fructose and, in turn, result in variable manifestations of metabolic syndrome components.

Therefore, we hypothesized that different routes of fructose administration in rats probably induce variable degrees of metabolic syndrome that may induce different physiological and morphological renal responses.

† J. Herrera-Acosta is deceased.

Address for reprint requests and other correspondence: L. G. Sánchez-Lozada, Dept. of Nephrology, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chavez, Juan Badiano 1. 14080, Mexico City, Mexico (e-mail: lgsanchezlozada@hotmail.com).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

METHODS

Three groups of male Sprague-Dawley rats were studied (290–350 g, Harlan Mexico). Control group (C; $n = 7$) received regular diet (57.3% of carbohydrate, 41.2% as starch, cat. 2018S Harlan Teklad, Indianapolis, IN). Fructose 60 group (F60; $n = 7$) was fed a 60% fructose diet (Harlan Teklad). Fructose 10 group (F10; $n = 7$) was fed a regular diet, and fructose was administered as a 10% solution (prepared every 2 days) in drinking water. Animals consumed diets and fluids ad libitum. All groups were followed for 8 wk. Experiments were approved by the Ethics Committee of Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chavez.

Measurements. Body weight, food intake, and fluid intake of each rat were measured weekly during the follow-up. At baseline and at the end of 8 wk, systolic blood pressure (SBP) was measured in conscious rats by tail cuff sphyngomanometer (XBP-1000 Kent Scientific, Torrington, CT). All animals were preconditioned for blood pressure measurements 1 wk before each experiment. Plasma uric acid (Diagnostic Chem) and triglycerides (Spinreact) were measured at the same time points. In addition, plasma glucose (Spinreact) was measured at the end of *week 8* in C, F10, and F60 groups.

In all rats, a 24-h urine sample to assess the presence of albuminuria was collected in metabolic cages at the end of *week 8* of the study. Quantification of urinary rat albumin was performed by ELISA analysis (Nephra, Exocell, Philadelphia, PA).

Micropuncture. Animals were anesthetized with pentobarbital sodium (30 mg/kg ip) and placed on a thermoregulated table to maintain body temperature at 37°C. Trachea, jugular veins, femoral arteries, and the left ureter were catheterized with polyethylene tubing (PE-240, PE-50, and PE-10). The left kidney was exposed, placed in a Lucite holder, sealed with agar, and covered with Ringer solution. Mean arterial pressure (MAP) was monitored with a pressure transducer (model PT300; Grass Telefactor, Warwick, RI) connected to the catheter in the femoral artery and recorded on a polygraph (Grass Instruments, Quincy, MA). Blood samples were taken periodically and replaced with blood from a donor rat. Rats were maintained under euvoletic conditions by infusion of 10 ml/kg of body weight of isotonic rat plasma during surgery, followed by an infusion of 25% polyfructosan, at 2.2 ml/h (Inutest, Fresenius Kabi, Linz, Austria). After 60 min, five to seven samples of proximal tubular fluid were obtained to determine flow rate and polyfructosan concentrations. Intratubular pressure under free-flow (FF) and stop-flow (SFP) conditions and peritubular capillary pressure (P_c) were measured in other proximal tubules with a servo-null device (Servo Nulling Pressure System; Instrumentation for Physiology and Medicine, San Diego, CA). Glomerular colloid osmotic pressure was estimated from protein concentrations obtained from blood of the femoral artery (Ca) and surface efferent arterioles (Ce). Polyfructosan was measured in plasma and urine samples by the anthrone-based technique of Davidson and Sackner (6).

The volume of fluid collected from individual proximal tubules was estimated from the length of the fluid column in a constant bore capillary tube of known internal diameter. The concentration of tubular polyfructosan was measured by microfluorometric method of Vurek and Pegram (36). Protein concentration in afferent and efferent samples was determined according to the method of Viets et al. (35). Glomerular filtration rate (GFR), single-nephron GFR, glomerular capillary hydrostatic pressure (PGC), single-nephron plasma flow (QA), afferent (AR), efferent (ER) resistances, and K_f were calculated with equations previously reported (2).

Renal histology and quantification of morphology. After the micropuncture study, kidneys were washed by perfusion with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde, and weighed. Renal biopsies were embedded in paraffin. Four-micrometer sections of fixed tissue were stained with periodic acid Schiff (PAS) reagent. Arteriolar morphology was assessed in outer cortical and juxtamedullary (JM) nephrons by indirect peroxidase immunostaining using a monoclonal rat anti-

human antibody specific for cardiac, smooth and striated muscle α actin and smooth muscle γ actin (Clone HHHF35, DAKO, Carpinteria, CA) (15). Afferent arterioles were identified by their location adjacent to the vascular pole of the glomerular tuft, the presence of an internal elastic lamina, and by having fewer thin flattened endothelial cells than the efferent arteriole (25, 33). We excluded from measurement all vessels showing more than one layer of endothelium as suggested by Clapp and Croker (4). Renal sections incubated with normal rabbit serum were used as negative controls (29).

For each arteriole, the outline of the vessel and its internal lumen (excluding the endothelium) were generated using computer analysis to calculate the total medial area (outline-inline), in 5–10 arterioles per biopsy. The media/lumen ratio was calculated by the outline/inline relationship (29). Quantifications were performed blinded.

Previously, it was reported that mesangial cells change their phenotype and expressed α -smooth muscle actin in the glomeruli during the development of hypertensive renal damage (14). Thus we employed the same sections used for the assessment of arteriolar morphology to evaluate the immunostaining of muscle actin in mesangial areas. Twenty to 30 outer cortical and available juxtamedullary glomeruli ($\times 100$) per biopsy were analyzed using Image-Pro-Plus 5.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Positive brown color mesangial areas were selected and quantified in pixel units in each glomerulus. The mean amount of positive brown areas/glomerulus was obtained by averaging the values from the examined glomeruli.

In addition, the presence of glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis was assessed by Masson's trichrome staining in all groups of rats.

Statistical analysis. Values are expressed as means \pm SE. Groups were analyzed by one-way ANOVA. Comparisons among groups were performed with Bonferroni's multiple comparison test. Comparisons between F10 vs. F60 were done with unpaired *t*-test. The relationship between variables was assessed by correlation analysis. Statistical analysis was performed with Prism version 3.03 (GraphPad Software, San Diego, CA). $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

General parameters. Baseline values of SBP, plasma uric acid (UA), triglycerides (TG), and body weight (BW) are depicted in Fig. 1. We did not find differences in mean values of SBP (C: 115 ± 5 mmHg, F10: 123 ± 5 mmHg, F60: 107 ± 3 mmHg), UA (C: 0.53 ± 0.03 mg/dl, F10: 0.34 ± 0.045 mg/dl, F60: 0.43 ± 0.09 mg/dl), and BW (C: 325 ± 4 g, F10: 330 ± 5 g, F60: 328 ± 5 mg/dl) among the groups. Fasting TG levels were < 150 mg/dl in all groups at baseline, although they were slightly but significantly lower in the F10 group (C: 98 ± 11 mg/dl, F10: 50 ± 8 mg/dl, F60: 94 ± 10 mg/dl; $P < 0.05$ vs. C and F60).

Mean daily water and food consumption in control animals were 17 ± 0.21 g and 37 ± 0.7 ml of water. Similarly, the F60 group ingested 17 ± 0.41 g and drank 34 ± 0.8 ml of water (C vs. F60, $P =$ not significant). F10 rats ate 30% less food and drank 80% more water compared with C and F60 groups (12 ± 0.27 g, $P < 0.001$ vs. C and F60; 65 ± 6 ml, $P < 0.001$ vs. C and F60). The caloric intake was calculated based on daily food and fluid intakes and the caloric values of regular diet (3.3 Kcal/g) and fructose (4 Kcal/g). Fructose intake of rats accounted for $38 \pm 2\%$ of caloric intake in F10 and 66% in F60 ($P < 0.001$).

Absolute values of BW, SBP, and plasma UA and TG at *week 8* are depicted in Table 1. To better understand the changes induced by fructose intake, we calculated the ratio baseline/*week 8* of body weight, SBP, UA, and TG in each rat

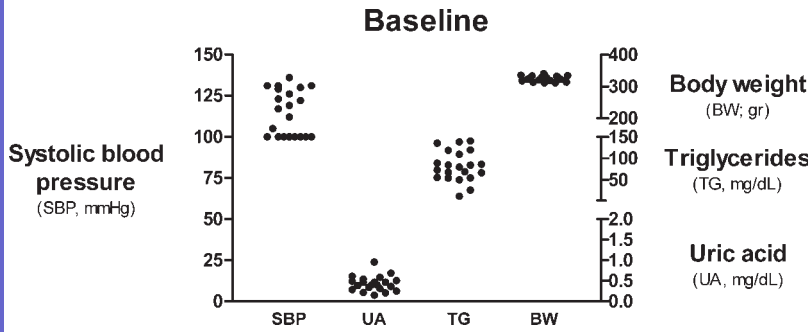


Fig. 1. Baseline values of systolic blood pressure (SBP), plasma uric acid (UA), triglycerides (TG), and body weight (BW).

and compared them among the groups. There were no significant differences in body weight gain among groups (C: 1.16 ± 0.02 , F10: 1.18 ± 0.03 , F60: 1.21 ± 0.01). SBP, UA, and TG changes were significantly higher in F10 and F60 compared with C (SBP: C, 0.96 ± 0.05 ; F10, 1.29 ± 0.07 ; F60, 1.39 ± 0.04 ; C vs. F10 and F60, $P < 0.05$. UA: C, 0.97 ± 0.19 ; F10, 2.97 ± 0.42 ; F60, 3.89 ± 0.94 , C vs. F10 and F60, $P < 0.05$. TG: C, 0.84 ± 0.06 ; F10, 2.20 ± 0.42 ; F60, 3.16 ± 0.32 , C vs. F10 and F60, $P < 0.05$). Although we did not find statistical differences in the ratios of BW, SBP, UA, and TG between F10 and F60, we observed a progressive increment in these parameters coupled with higher fructose intake (C<F10<F60). In addition, we found a linear relationship between fructose caloric intake vs. absolute values of UA and TG at week 8 (UA: $r = 0.57$, $P = 0.03$; TG: $r = 0.77$, $P = 0.001$) and between plasma uric acid and SBP ($r = 0.54$, $P < 0.01$).

Finally, we did not find differences in plasma glucose (C, 121 ± 6 mg/dl; F10, 107 ± 6 mg/dl; F60, 111 ± 4 mg/dl; $P =$ not significant; Table 1) and urinary albumin excretion (C, 11.6 ± 0.15 mg/dl; F10, 11.4 ± 0.22 mg/dl; F60, 11.1 ± 0.29 mg/dl; $P =$ not significant) among groups at the end of week 8.

Glomerular hemodynamics. Similarly to SBP, MAP was significantly higher in F10 and F60 groups compared with C rats (C: 116 ± 5 mmHg; F10: 145 ± 5 mmHg; F60: 142 ± 4 mmHg; C vs. F10 and F60, $P < 0.01$). Total GFR was similar among the groups (C: 0.78 ± 0.05 ml/min; F10: 1.00 ± 0.05 ml/min; F60: 1.02 ± 0.11 ml/min). In contrast, higher fructose caloric intake in F60 group was associated with a significant decrement of cortical single-nephron GFR (C: 38 ± 2 nl/min; F10: 50 ± 6 nl/min; F60: 25 ± 3 nl/min) and ultrafiltration coefficient (C: 0.058 ± 0.009 nl·s⁻¹·mmHg⁻¹; F10: 0.060 ± 0.006 nl·s⁻¹·mmHg⁻¹; F60: 0.025 ± 0.003 nl·s⁻¹·mmHg⁻¹) compared with C and F10 groups ($P < 0.05$; Fig. 2). In addition, glomerular plasma flow was numerically lower compared with C and reached statistical significance compared with F10 (C: 171 ± 11 nl/min; F10: 179 ± 18 nl/min; F60: 111 ± 15 nl/min; F10 vs. F60, $P < 0.05$; Fig. 2). The decrements in single-

nephron GFR and glomerular plasma flow in F60 resulted from the significant increase of afferent (C, 1.8 ± 0.15 dyn·s·cm⁻⁵; F10, 2.6 ± 0.28 dyn·s·cm⁻⁵; F60, 3.5 ± 0.41 dyn·s·cm⁻⁵; C vs. F60, $P < 0.01$) and efferent resistances (C, 1.0 ± 0.09 dyn·s·cm⁻⁵; F10, 1.1 ± 0.12 dyn·s·cm⁻⁵; F60, 1.7 ± 0.23 dyn·s·cm⁻⁵; F60 vs. C and F10, $P < 0.05$). Despite cortical vasoconstriction, F60 animals developed glomerular hypertension compared with the C group (C: 47 ± 1 mmHg; F10: 49 ± 1 mmHg; F60: 53 ± 1 mmHg; C vs. F60, $P < 0.01$; Fig. 2). In addition, we found a positive linear relationship between MAP and glomerular pressure ($r = 0.49$, $P < 0.05$) and a negative correlation between plasma uric acid and ultrafiltration coefficient ($r = -0.41$, $P < 0.05$).

Kidney size and renal histology. F60 rats had larger kidneys as percentage of BW than C and F10 groups (C: $0.36 \pm 0.02\%$; F10: $0.34 \pm 0.01\%$; F60: $0.40 \pm 0.01\%$; F10 vs. F60, $P < 0.01$). In addition, we found a positive correlation between fructose caloric intake and kidney size as percent of BW ($r = 0.57$, $P = 0.03$).

Figure 3 shows the renal arteriolar morphology in outer cortical glomeruli. We observed a progressive increment of arteriolar wall area with increasing fructose caloric intake, which was statistically significant when comparing Controls vs. F60 (C: 227 ± 8 μm²; F10: 264 ± 7 μm²; F60: 298 ± 16 μm²; C vs. F60, $P < 0.01$). In JM nephrons, we find a similar pattern, although it did not reach statistical significance (C: 210 ± 7 μm²; F10: 240 ± 30 μm²; F60: 289 ± 21 μm²; $P =$ not significant).

We also found positive linear relationships between plasma uric acid and outer cortical glomeruli arteriolar area ($r = 0.77$, $P < 0.0001$). Additionally, outer cortical glomeruli arteriolar area and glomerular pressure ($r = 0.57$, $P = 0.007$), and afferent resistance ($r = 0.49$, $P = 0.02$) correlated positively.

We did not find statistical significant differences in the media to lumen relationship among the groups in cortical (C: 2.4 ± 0.35 ; F10: 2.6 ± 0.3 ; F60: 2.8 ± 0.4 ; $P =$ not significant) and juxtamedullary nephrons (C: 2.0 ± 0.3 ; F10: 2.7 ± 0.5 ; F60: 1.7 ± 0.2 ; $P =$ not significant). However, when we compared cortical M/L vs. juxtamedullary M/L in the same group, we found a significant difference in F60 group ($P = 0.02$).

Additionally, we found a faint and nonsignificant α-actin staining in cortical (C: 197 ± 27 pixels/glomeruli; F10: 158 ± 20 pixels/glomeruli; F60: 134 ± 14 pixels/glomeruli; $P =$ not significant) and juxtamedullary (C: 253 ± 37 pixels/glomeruli; F10: 224 ± 23 pixels/glomeruli; F60: 177 ± 15 pixels/glomeruli) glomerular mesangial areas. Similarly, no differences were found in glomerulosclerosis and tubulointerstitial

Table 1. BW, SBP, and plasma UA, TG, and glucose at week 8

	BW, g	SBP, mmHg	UA, mg/dl	TG, mg/dl	Glucose, mg/dl
Control	376.7±5.5	108.3±4.2	0.51±0.10	79.1±8.5	121±6
F10	390.0±6.5	155.7±3.6*	0.86±0.06*	93.9±8.3	107±6
F60	397.6±4.5	147.8±2.4*	1.19±0.11*	280.1±16.5†	111±4

Values are means ± SE. BW, body weight; SBP, systolic blood pressure; UA, uric acid; TG, triglycerides. * $P < 0.05$ vs. C. † $P < 0.05$ vs. F10.

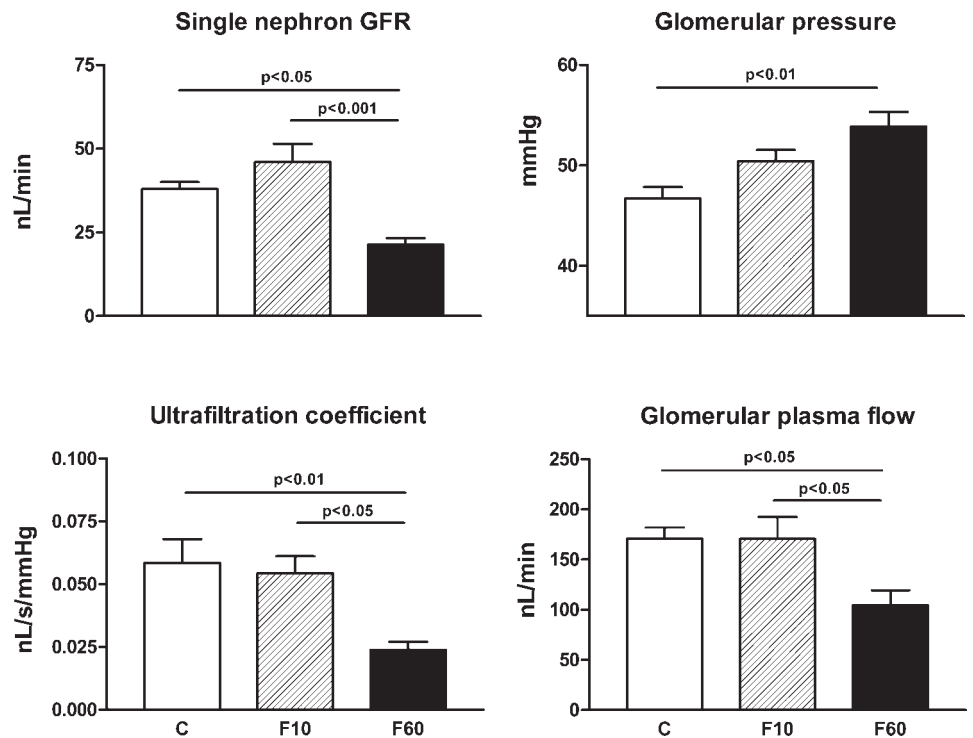


Fig. 2. Glomerular hemodynamics in control, F10, and F60 groups at the end of week 8.

fibrosis among groups and the Masson's trichrome-stained sections in F10 and F60 rats were comparable to Control animals.

DISCUSSION

In the present study, we examined the effect of two different methods of fructose administration in the development of metabolic syndrome and on glomerular hemodynamic changes and afferent arteriole morphology. Fructose administration either in drinking water or in the diet was able to induce systemic hypertension, hyperuricemia, and hypertriglyceridemia. However, 60% fructose diet resulted in a higher fructose caloric intake, which was associated with worsening metabolic syndrome parameters as well as renal arteriolar damage, glomerular hypertension, and cortical vasoconstriction. These data thus demonstrate a direct relationship between increasing fructose consumption and worsening features of the metabolic syndrome with deleterious effects on renal hemodynamics and morphology.

There is clinical and epidemiological evidence that suggests a progressive association between fructose consumption and the development of metabolic syndrome (7). Indeed, a marked increase in obesity and metabolic syndrome in the last 20 years within the United States has been linked to a 30% overall increase in fructose ingestion, in part, because of the introduction of high fructose corn syrup as a sweetener in soft drinks and other foods (22). In the present study, we observed a gradual but mild increment in blood pressure, plasma uric acid, and triglycerides with increasing caloric intake of fructose (C<F10<F60) supporting the causal role of greater consumption of fructose with the worsening of metabolic syndrome parameters. Although we did not observe changes in plasma glucose at the end of the study among the groups, this finding

is not atypical in this experimental model characterized by insulin resistance instead of hyperglycemia (12, 20).

Recent epidemiological evidence indicates that metabolic syndrome may be a risk factor for renal damage and is also a predictor of poor outcome in patients with chronic renal failure (3, 13, 17). In this regard, we found that higher fructose intake was associated with kidney hypertrophy; in other pathophysiological conditions such as diabetes mellitus, the development of irreversible renal changes is always preceded by early hypertrophic processes (31). Since glomerular hemodynamics changes are considered one of the main factors that lead to renal damage, we determined whether fructose-induced metabolic syndrome was able to produce glomerular hemodynamic disturbances. While we found that fructose induced features of metabolic syndrome, either in diet or drinking water, only rats that received 60% fructose diet developed glomerular hypertension and cortical vasoconstriction as indicated by a significant decrease of single-nephron GFR and ultrafiltration coefficient and a rise of afferent and efferent resistances. Due to the fact that glomerular hemodynamics are determined by microvascular structure and function (28), it was interesting to find that F60 rats developed thickening of the vascular wall of the afferent arterioles in outer cortical nephrons. We previously showed that arteriopathy of preglomerular vessels has a detrimental impact in glomerular function in hyperuricemic rats (29). In this study, we confirmed this association since arteriolar area and glomerular pressure ($r = 0.57$, $P = 0.007$), as well as arteriolar area and afferent resistance, ($r = 0.49$, $P = 0.02$) correlated positively. In addition, we found a positive linear relationship between MAP and glomerular pressure ($r = 0.49$, $P < 0.05$); this finding

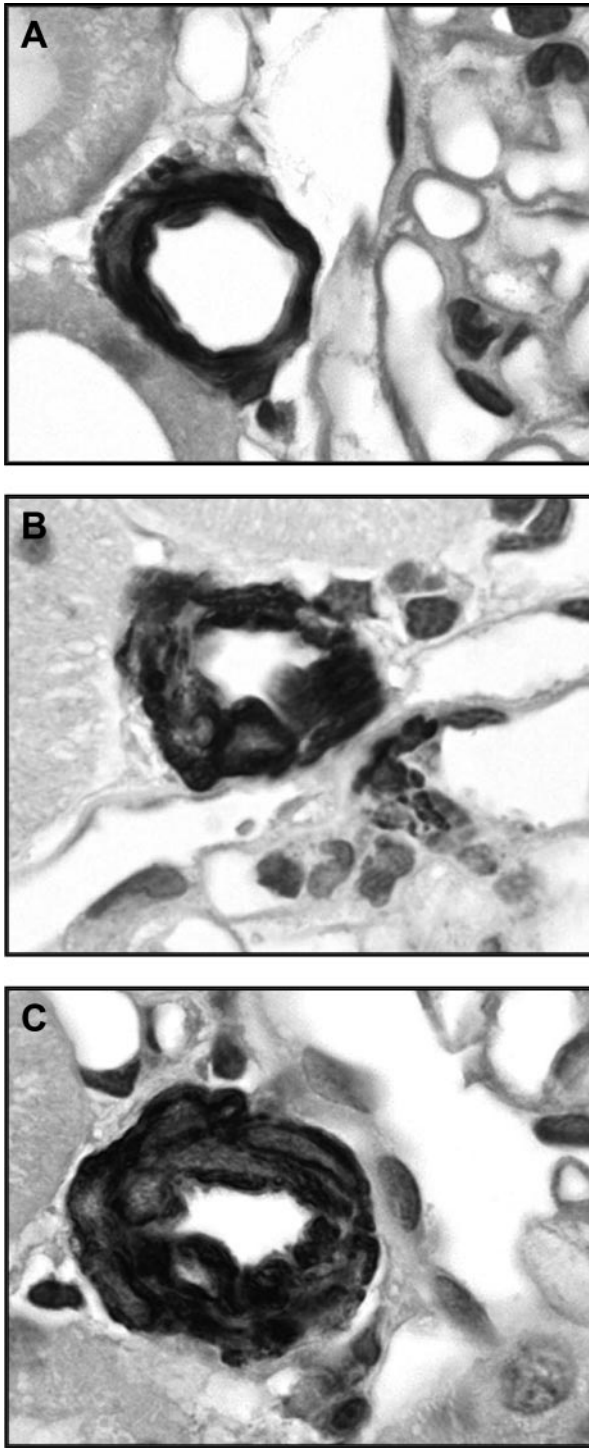


Fig. 3. Afferent arteriolar morphology in outer cortical nephrons in Control (A), F10 (B), and F60 (C) groups ($\times 1,000$).

suggests an impairment of the autoregulatory capacity of preglomerular vessels in F60 rats.

We do not have an explanation why mild differences in blood pressure, plasma UA, and TGs produced such a considerable effect on glomerular hemodynamics in the F60 rats. It was also interesting that F10 rats did not demonstrate cortical vasoconstriction; however, fructose in drinking water induced

a marked increment in water consumption; thus, volume expansion in F10 rats may have had a renal vasodilatory effect.

It is assumed that glomerular hemodynamic changes precede structural damage. In the present study, functional alterations in cortical nephrons in F60 rats were not accompanied by increased expression of mesangial α -actin, glomerulosclerosis, or tubulointerstitial fibrosis. In addition, urinary excretion of albumin was normal in the fructose-treated groups. Thus these findings suggest that, at this time point, renal alterations resulting in metabolic syndrome are limited to glomerular hemodynamic changes and that it likely takes a more prolonged period of time to produce glomerular or tubulointerstitial structural lesions. Indeed, we recently found that chronic feeding of fructose (60%) in the remnant kidney model does accelerate renal progression (Gersch M and Johnson R, unpublished data).

On the other hand, the selective alteration of superficial nephron dynamics implies a correlative increase in filtration in deeper nephrons as total GFR did not change in the F60 group. In this regard, there are a number of anatomical and functional differences between cortical and JM nephrons. JM glomeruli are larger and GFR is also higher than those of cortical nephrons (1). Hence, it has been suggested that in chronic arterial hypertension and ischemic nephropathies, such as may be occurring in F60 rats, that JM nephrons undergo a disproportionate rise in SNGFR, presumably associated with excessive high PGC and/or blood flow (23). In this study, we found a significant lower M/L ratio in JM compared with cortical afferent arterioles in F60 group, implying that JM nephrons have a larger lumen which could be associated with a higher blood flow in this population. This finding is in agreement with an increased GFR in deeper nephrons.

Hyperuricemia is considered a component of the metabolic syndrome. A unique feature of fructose ingestion is that it produces an increment of UA levels due to its hepatic catabolic pathway (10). In the present study, plasma UA levels correlated with fructose ingestion even in individual animals as demonstrated by the positive correlation between %fructose caloric intake and UA at *week 8*. Previously, we demonstrated that rats made hyperuricemic by inhibiting uricase with oxonic acid had increased blood pressure, afferent arteriole thickening, glomerular hypertension, and cortical vasoconstriction (29). In the present study, we found positive linear relationships between plasma uric acid and SBP ($r = 0.54$, $P < 0.01$) and arteriolar area ($r = 0.64$, $P < 0.001$) and a negative correlation with ultrafiltration coefficient, a marker of glomerular vasoconstriction ($r = -0.41$, $P < 0.05$). Therefore, higher UA levels induced by 60% fructose diet may be partially responsible for the glomerular hemodynamic alterations.

Several studies have shown that ANG II plays an important role in the alterations induced by high fructose consumption in rats. Actions of ANG II in this model are associated with the development of hypertension, suppression of adiponectin secretion (26), increase of adipocyte size (9), and generation of oxidative stress (32). In addition, blockade of ANG II abolished the increased VSMC proliferation, restored eNOS activity (19), and improved the insulin sensitivity (11). Since hyperuricemia is associated with activation of RAS (18, 21), it is tempting to speculate that increased synthesis of ANG II in this model could be secondary to the rise of plasma uric acid.



In summary, our results demonstrate several important new findings potentially related to the ongoing epidemic of metabolic syndrome. First, we provide evidence that increasing amounts of fructose result in increasing features of the metabolic syndrome. Second, we demonstrate that fructose-induced metabolic syndrome results in renal hypertrophy, afferent arteriopathy, glomerular hypertension, and renal vasoconstriction. These changes are similar to what we have observed with experimental hyperuricemia (29), and indeed, in previous experimental studies we have been able to largely block the features of fructose-induced metabolic syndrome by lowering serum UA (20). This latter finding is all the more relevant since humans lack uricase and hence develop hyperuricemia more readily than rodents in response to diet (16). Indeed, the administration of small doses of an uricase inhibitor to rats fed fructose dramatically increases the serum UA (34). Thus, while large doses (>60% caloric intake) of fructose were needed to observe the renal hemodynamic effects in these rats, it is likely that lower doses would be necessary in humans. Since the average fructose intake in young adults may approach 10–20% of overall caloric intake (7, 22), the observations in this study may be of great clinical relevance to the effects of fructose on the metabolic syndrome and the kidney in humans. Further studies to determine the effect of lowering UA on the renal hemodynamic and morphological changes in fructose-induced metabolic syndrome are planned.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank J. Santamaría, J. A. Alvarado, and B. Chávez-Rentería for technical assistance.

GRANTS

Funding was supported in part by National Institutes of Health Grants DK-52121 and HL-68607.

DISCLOSURES

Dr. R. J. Johnson is consultant for TAP Pharmaceuticals.

REFERENCES

1. Baines AD, de Rouffignac C. Functional heterogeneity of nephrons. II. Filtration rates, intraluminal flow velocities and fractional water reabsorption. *Pflugers Arch* 308: 260–276, 1969.
2. Baylis C, Deen WM, Myers BD, Brenner BM. Effects of some vasodilator drugs on transcapillary fluid exchange in renal cortex. *Am J Physiol* 230: 1148–1158, 1976.
3. Chen J, Muntner P, Hamm LL, Jones DW, Batuman V, Fonseca V, Whelton PK, He J. The metabolic syndrome and chronic kidney disease in US adults. *Ann Intern Med* 140: 167–174, 2004.
4. Clapp WL, Croker BP. Adult kidney. In: *Histology for Pathologists*, edited by Sternberg S. New York: Raven, 1997, p. 799–834.
5. Dai S, McNeill JH. Fructose-induced hypertension in rats is concentration- and duration-dependent. *J Pharmacol Toxicol Methods* 33: 101–107, 1995.
6. Davidson WD, Sackner MA. Simplification of the anthrone method for the determination of inulin in clearance studies. *J Lab Clin Med* 62: 351–356, 1963.
7. Elliott SS, Keim NL, Stern JS, Teff K, Havel PJ. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *Am J Clin Nutr* 76: 911–922, 2002.
8. Fox IH, Kelley WN. Studies on the mechanism of fructose-induced hyperuricemia in man. *Metabolism* 21: 713–721, 1972.
9. Furuhashi M, Ura N, Takizawa H, Yoshida D, Moniwa N, Murakami H, Higashiura K, Shimamoto K. Blockade of the renin-angiotensin system decreases adipocyte size with improvement in insulin sensitivity. *J Hypertens* 22: 1977–1982, 2004.

10. Hallfrisch J. Metabolic effects of dietary fructose. *FASEB J* 4: 2652–2660, 1990.
11. Hsieh PS. Reversal of fructose-induced hypertension and insulin resistance by chronic losartan treatment is independent of AT2 receptor activation in rats. *J Hypertens* 23: 2209–2217, 2005.
12. Hwang IS, Ho H, Hoffman BB, Reaven GM. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension* 10: 512–516, 1987.
13. Iseki K, Ikemiya Y, Kinjo K, Inoue T, Iseki C, Takishita S. Body mass index and the risk of development of end-stage renal disease in a screened cohort. *Kidney Int* 65: 1870–1876, 2004.
14. Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A, Lombardi D, Pritzl P, Floege J, Schwartz SM. Renal injury from angiotensin II-mediated hypertension. *Hypertension* 19: 464–474, 1992.
15. Johnson RJ, Iida H, Alpers CE, Majesky MW, Schwartz SM, Pritzl P, Gordon K, Gown AM. Expression of smooth muscle cell phenotype by rat mesangial cells in immune complex nephritis. α -Smooth muscle actin is a marker of mesangial cell proliferation. *J Clin Invest* 87: 847–858, 1991.
16. Johnson RJ, Rideout BA. Uric acid and diet—insights into the epidemic of cardiovascular disease. *N Engl J Med* 350: 1071–1073, 2004.
17. Kambham N, Markowitz GS, Valeri AM, Lin J, D’Agati VD. Obesity-related glomerulopathy: an emerging epidemic. *Kidney Int* 59: 1498–1509, 2001.
18. Mazzali M, Hughes J, Kim YG, Jefferson JA, Kang DH, Gordon KL, Lan HY, Kivlighn S, Johnson RJ. Elevated uric acid increases blood pressure in the rat by a novel crystal-independent mechanism. *Hypertension* 38: 1101–1106, 2001.
19. Miatello R, Risler N, Castro C, Gonzalez S, Ruttler M, Cruzado M. Aortic smooth muscle cell proliferation and endothelial nitric oxide synthase activity in fructose-fed rats. *Am J Hypertens* 14: 1135–1141, 2001.
20. Nakagawa T, Hu H, Zharikov S, Tuttle KR, Short RA, Glushakova O, Ouyang X, Feig DI, Block ER, Herrera-Acosta J, Patel JM, Johnson RJ. A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F625–F631, 2006.
21. Nakagawa T, Mazzali M, Kang DH, Kanellis J, Watanabe S, Sanchez-Lozada LG, Rodriguez-Iturbe B, Herrera-Acosta J, Johnson RJ. Hyperuricemia causes glomerular hypertrophy in the rat. *Am J Nephrol* 23: 2–7, 2003.
22. Nakagawa T, Tuttle KR, Short RA, Johnson RJ. Hypothesis: fructose-induced hyperuricemia as a causal mechanism for the epidemic of the metabolic syndrome. *Nature Clinical Practice Nephrology* 1: 80–86, 2005.
23. Newbold KM, Sandison A, Howie AJ. Comparison of size of juxtamedullary and outer cortical glomeruli in normal adult kidney. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 420: 127–129, 1992.
24. Perheentupa J, Raivio K. Fructose-induced hyperuricaemia. *Lancet* 2: 528–531, 1967.
25. Quiroz Y, Pons H, Gordon KL, Rincon J, Chavez M, Parra G, Herrera-Acosta J, Gomez-Garre D, Largo R, Egido J, Johnson RJ, Rodriguez-Iturbe B. Mycophenolate mofetil prevents salt-sensitive hypertension resulting from nitric oxide synthesis inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol* 281: F38–F47, 2001.
26. Ran J, Hirano T, Fukui T, Saito K, Kageyama H, Okada K, Adachi M. Angiotensin II infusion decreases plasma adiponectin level via its type 1 receptor in rats: an implication for hypertension-related insulin resistance. *Metabolism* 55: 478–488, 2006.
27. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37: 1595–1607, 1988.
28. Sanchez-Lozada LG, Tapia E, Johnson RJ, Rodriguez-Iturbe B, Herrera-Acosta J. Glomerular hemodynamic changes associated with arteriolar lesions and tubulointerstitial inflammation. *Kidney Int Suppl* 64: S9–S14, 2003.
29. Sanchez-Lozada LG, Tapia E, Santamaría J, vila-Casado C, Soto V, Nepomuceno T, Rodriguez-Iturbe B, Johnson RJ, Herrera-Acosta J. Mild hyperuricemia induces vasoconstriction and maintains glomerular hypertension in normal and remnant kidney rats. *Kidney Int* 67: 237–247, 2005.
30. Sanchez-Lozada LG, Tapia E, Avila-Casado C, Soto V, Franco M, Santamaría J, Nakagawa T, Rodriguez-Iturbe B, Johnson RJ, Herrera-Acosta J. Mild hyperuricemia induces glomerular hypertension in normal rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 283: F1105–F1110, 2002.

31. **Schwieger J, Fine LG.** Renal hypertrophy, growth factors, and nephropathy in diabetes mellitus. *Semin Nephrol* 10: 242–253, 1990.
32. **Shinozaki K, Ayajiki K, Nishio Y, Sugaya T, Kashiwagi A, Okamura T.** Evidence for a causal role of the renin-angiotensin system in vascular dysfunction associated with insulin resistance. *Hypertension* 43: 255–262, 2004.
33. **Skov K, Mulvany MJ, Korsgaard N.** Morphology of renal afferent arterioles in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 20: 821–827, 1992.
34. **Stavric B, Johnson WJ, Clayman S, Gadd RE, Chartrand A.** Effect of fructose administration on serum urate levels in the uricase inhibited rat. *Experientia* 32: 373–374, 1976.
35. **Viets JW, Deen WM, Troy JL, Brenner BM.** Determination of serum protein concentration in nanoliter blood samples using fluorescamine or 9-phthalaldehyde. *Anal Biochem* 88: 513–521, 1978.
36. **Vurek G, Pegram S.** Fluorometric method for the determination of nanogram quantities of inulin. *Ann Biochem* 16: 409–419, 1966.

