



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**INFLUENCIA DE LAS HORMONAS SEXUALES EN EL METABOLISMO DEL
ACIDO ARAQUIDONICO VIA CICLOOXIGENASAS Y SU EFECTO SOBRE LA
VASCULATURA DEL RIÑÓN AISLADO DE RATA CON SINDROME
METABOLICO**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

- M. en C. Israel Pérez Torres

TUTOR: Dra. Guadalupe Baños de MacCarthy

COMITE TUTOR:

Dra. Martha Franco Guevara

Dr. Ignacio Camacho Arroyo

México, D.F.

Abril, 2010



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.


Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 28 de septiembre de 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de DOCTOR EN CIENCIAS del alumno PEREZ TORRES ISRAEL con número de cuenta 87373127 con la tesis titulada: "INFLUENCIA DE LAS HORMONAS SEXUALES EN EL METABOLISMO DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO VIA CICLOOXIGENASAS Y SU EFECTO SOBRE LA VASCULATURA DEL RIÑÓN AISLADO DE RATA CON SÍNDROME METABÓLICO.", realizada bajo la dirección del DRA. GUADALUPE DEL CARMEN BAÑOS MARHABER:

Presidente:	DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES
Vocal:	DR. MOHAMED EL HAFIDI BENTLAKDER
Vocal:	DRA. SANDRA LUZ GOMEZ ARROYO
Vocal:	DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO
Secretario:	DRA. GUADALUPE DEL CARMEN BAÑOS MARHABER
Suplente:	DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
Suplente:	DRA. MARTHA FRANCO GUEVARA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 02 de diciembre de 2009.


Dr. Juan Nuñez Farfán
Coordinador del Programa

AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al CONACYT por la beca No. 163099 para la realización de los estudios de posgrado.

Tesis apoyada por el proyecto CONACYT No. 43229-M.

Al Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”

Al Comité Tutor:

Dra. Guadalupe Baños de MacCarthy

Dra. Martha Franco Guevara

Dr. Ignacio Camacho Arroyo

AGRADECIMIENTOS

Dra. MacCarthy le agradezco por estos 13 años que le he robado a parte de su vida y que me los ha dedicado para mi formación académica, verdaderamente nunca olvidare los consejos y enseñanzas que me ha otorgado.

Dr. Mohammed si bien a veces no concordamos en todo, te agradezco tu tiempo y amistad y por el consejo que me diste cuando ya estaba decidido a abandonar este trabajo.

Dra. María del Carmen Ávila por permitirme realizar el doctorado.

A mi muy querido amigo José Luis Pacheco que a pesar de las circunstancias adversas por los que ha pasado, su fuerza me ha ayudado a seguir adelante pase lo que pase.

A ti mí querida, amada, esposa Lydia por ser mi confidente, amiga, amante y compañera en estos 15 años, verdaderamente todo lo que hago, lo hago por ti.

Por ti descubro incluso lo poco que queda de mí

A Jah por mis hijos que son fundamentales en mi familia y vida: Alan Axel, Michelle Israel, Misael Samir y Andrea Karen.

A mis padres y hermanas.

Dedicó este trabajo a mí, porque me costó mucho trabajo, esfuerzo, mermo mí salud física y en los primeros semestres verdaderamente pensaba que no lo concluiría, pero perseveré y está concluido, gracias Dios.

Ser Doctor en ciencias, no es la conclusión de este trabajo ni de los que vengan, es ser experto, docto en las ciencias que nos ayudan a comprender los mecanismos, las vías metabólicas involucradas en sostener la vida, pero ni con toda mi vida llegare a serlo.

A mí Dios Jah

Porque tú mismo produjiste mis riñones; me tuviste cubierto en resguardo en el vientre de mi madre.

Te elogiare porque de manera que inspira temor estoy maravillosamente hecho.

Tus obras son maravillosas, como muy bien percibe mi alma.

Mis huesos no estuvieron escondidos de ti cuando fui hecho en secreto, cuando fui tejido en las partes más bajas de la tierra.

Tus ojos vieron hasta mi embrión, y en tu libro todas sus partes estaban escritas.

(Salmos 139:13-16)

Todo lo ha hecho bello a su tiempo.....para que la humanidad nunca descubra la obra que el Dios (verdadero) ha hecho desde el comienzo hasta el fin.

(Eclesiastés 3:11)

**INFLUENCIA DE LAS HORMONAS SEXUALES EN EL METABOLISMO DEL
ÁCIDO ARAQUIDÓNICO VIA CICLOOXIGENASAS Y SU EFECTO SOBRE LA
VASCULATURA DEL RIÑÓN AISLADO DE RATA CON SÍNDROME
METABÓLICO**

INDICE

Indice	2
Tabla de abreviaturas	4
Resumen	5
Abstract	7
Introducción	9
Riñón	9
Hipertensión arterial sistémica	9
Nefropatía diabética	10
Síndrome metabólico	11
Microcirculación	12
Endotelio	12
Eicosanoides	13
Hormonas sexuales	17
Estrógenos	18
Testosterona	19
Antecedentes experimentales del modelo de síndrome metabólico	20
Planteamiento del problema	23
Hipótesis	23
Objetivo	23
Material y métodos	24
Grupos experimentales	24
Medición de la presión arterial sistólica	24
Tratamiento quirúrgico	24
Experimentos con riñón aislado y perfundido	25
Determinación de COX-1 y 2 por inmunotransferencia	27
Extracción de ácido araquidónico libre no esterificado	28
Medición de prostaglandinas	29
Análisis estadístico	29

Resultados	30
Peso	30
Grasa intra-abdominal	30
Hormonas sexuales	30
Presión arterial sistólica	33
Albuminuria	34
Acido araquidónico no esterificado	35
Efecto del ácido araquidónico sobre la presión de perfusión en hembras	36
Efecto del ácido araquidónico sobre la presión de perfusión en machos	38
Expresión de COX-1	40
Expresión de COX-2	41
Análisis de 6-KETO-PGF_{1α}, PGE₂, TXB₂ en eluido de riñón	42
Concentración de 6-KETO-PGF_{1α}, PGE₂ y TXB₂ en orina	44
Discusión	46
Conclusiones	53
Referencias	54

Tabla de abreviaturas

20-HETE	ácido 20-hidroxieicosatetraenoico
EEETs	ácido epoxieicosatrienoico
PBS	amortiguador de fosfatos
TBS	amortiguador de TRIS glicina
Cas	castradas
COX	ciclooxigenasa
PLA₂	fosfolipasa A₂
LK	leucotrienos
Ovx	ovariectomizadas
NO	óxido nítrico
Δ-PP	Δ-presión de perfusión
PC	prostaciclina
PG	prostaglandinas
SHR	ratas espontáneamente hipertensas
SM	síndrome metabólico
TX	tromboxanos
T	testigo

RESUMEN

Con excepción de los eritrocitos, en las células de los mamíferos el ácido araquidónico es el precursor de las prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX) y leucotrienos (LK); en tejidos como el endotelial y el renal estos metabolitos modulan la reactividad vascular.

En el modelo de rata espontáneamente hipertensa se ha observado un incremento en la vasoconstricción renal en respuesta a la infusión de ácido araquidónico; en el síndrome metabólico se ha descrito una alteración en el metabolismo de este ácido graso, dependiente del género. Además uno de los órganos afectados por el síndrome metabólico es el riñón.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia de las hormonas sexuales sobre el metabolismo del ácido araquidónico, vía ciclooxygenasas, en el riñón aislado y perfundido en un modelo de rata con síndrome metabólico.

El síndrome metabólico fue inducido en ratas Wistar hembra y macho, por administración de azúcar comercial al 30% en el agua de beber por 24 semanas.

La gonadectomía se realizó al destete de los animales. Se estudiaron 4 grupos experimentales por género: grupo 1, ratas testigo; grupo 2, ratas con síndrome metabólico; grupo 3, ratas testigo ovariectomizadas o castradas y grupo 4, ratas con síndrome metabólico ovariectomizadas o castradas.

En las ratas de todos los grupos experimentales se evaluaron la presión arterial sistólica, la albuminuria, el ácido araquidónico libre no esterificado, la Δ -presión de perfusión renal, la expresión de isoformas de ciclooxygenasas 1 y 2 (COX-1 y 2) y la síntesis de PG en orina y eluído de riñón.

La presión arterial sistólica, la albuminuria, la PGE₂ y el TXB₂ aumentaron en eluído y orina en el grupo de las ratas hembra con síndrome metabólico ovariectomizadas y macho con síndrome metabólico, estas variables se normalizaron por la castración en las ratas macho con síndrome metabólico.

La perfusión del ácido araquidónico en el riñón de las ratas macho con síndrome metabólico incrementó la Δ -presión de perfusión en comparación con sus testigos.

En las ratas hembra testigo y con síndrome metabólico la Δ -presión de perfusión

no se modificó; la gonadectomía disminuyó la Δ -presión de perfusión en las ratas macho con síndrome metabólico castrados pero la aumentó en las ratas hembra con síndrome metabólico.

Al perfundir ácido araquidónico en presencia de indometacina, inhibidor no selectivo de las COX, y de NS398, inhibidor selectivo de la COX-2, la Δ -presión de perfusión disminuyó en el riñón de las ratas hembra con síndrome metabólico ovariectomizadas y macho con síndrome metabólico en comparación con sus respectivos testigos.

El incremento de la Δ -presión de perfusión inducida por la perfusión del ácido araquidónico, se asoció en los riñones de las ratas hembra con síndrome metabólico ovariectomizadas y macho con síndrome metabólico con un aumento en la expresión de COX-1 y 2. La castración disminuyó la expresión de las isoformas de COX a niveles normales.

Los resultados sugieren que el metabolismo del ácido araquidónico vía COX se encuentra alterado en el riñón de la rata con síndrome metabólico y que las hormonas sexuales participan de manera significativa modulando la actividad de esta vía.

ABSTRACT

With the exception of the erythrocytes, in all mammalian cells the arachidonic acid is the precursor of prostaglandins (PG), thromboxanes (TX) and leukotrienes (LK); in the endothelium and renal tissue, these metabolites can modulate the vascular reactivity.

In a spontaneously hypertensive rat model an increment has been observed in renal vasoconstriction in response to the perfusion of arachidonic acid; in the metabolic syndrome, an alteration has been described in the fatty acid metabolism, dependent on gender. Furthermore, one of the organs largely affected by the metabolic syndrome is the kidney.

The main purpose of this study was to determine the influence of sex on the arachidonic acid metabolism through the COX pathway in the isolated perfused kidney in a rat model of metabolic syndrome.

The metabolic syndrome was induced by feeding a 30% sucrose solution for 24 weeks to intact and ovariectomized female and castrated male rats.

Four groups were investigated: Group 1: control rats, Group 2: metabolic syndrome rats, Group 3: gonadectomized control rats and Group 4: gonadectomized metabolic syndrome rats.

In all groups, measurements were carried out of systolic blood pressure, albuminuria, free arachidonic acid in kidney homogenate, Δ -perfusion pressure, cyclooxygenase (COX)-1 and 2 expression and levels of arachidonic acid metabolites in kidney perfusate and urine.

Systolic blood pressure, albuminuria, as well as prostaglandin E₂ and thromboxane B₂ from urine and perfusate increased in metabolic syndrome male and metabolic syndrome ovariectomized females; castration reduced them in metabolic syndrome males.

Perfusion of arachidonic acid in kidneys from metabolic syndrome males increased Δ -perfusion pressure compared with controls. No difference appeared in Δ -perfusion pressure between control and metabolic syndrome females.

Castration diminished Δ -perfusion pressure in metabolic syndrome; the opposite was observed in ovariectomized metabolic syndrome. Perfusion with arachidonic acid plus indomethacin decreased perfusion pressure in metabolic syndrome male kidneys and in castrated metabolic syndrome. In ovariectomized metabolic syndrome, arachidonic acid plus indomethacin decreased perfusion pressure, but not in female control, metabolic syndrome, and ovariectomized control. Increase in Δ -perfusion pressure with arachidonic acid in both male metabolic syndrome and ovariectomized metabolic syndrome was related to COX-1 and COX-2 overexpression in kidney. Castration reduced the expression of COX-1 and COX-2 in metabolic syndrome to control levels.

The results suggest that the alteration in arachidonic acid metabolism associated with changes in the expression of COX-1 and COX-2 induced by sucrose intake, and influenced by sex hormones, may contribute to renal damage.

INTRODUCCIÓN

Riñón

Los riñones son órganos fundamentales para mantener la homeostasis corporal¹, en condiciones normales realizan numerosas funciones, como²:

- a) Regulación de equilibrio hídrico y electrolítico.
- b) Regulación de la osmolalidad de los líquidos corporales y de las concentraciones de los electrolitos.
- c) Regulación del equilibrio ácido-básico.
- d) Excreción de los productos de desecho del metabolismo y de las sustancias químicas extrañas.
- e) Regulación de la presión arterial.
- f) Secreción de hormonas.
- g) Gluconeogénesis.

En las nefropatías crónicas o en la insuficiencia renal aguda³ estas funciones homeostáticas desaparecen y rápidamente se producen graves alteraciones en el metabolismo de los electrolitos, como sodio, potasio, cloro, depuración de creatinina, no retención de proteínas plasmáticas y otras sustancias lo que en pocos días puede producir la muerte⁴⁻⁵.

Entre algunas patologías que se asocian a la insuficiencia renal están:

Hipertensión arterial sistémica

La hipertensión arterial es una patología multifactorial influenciada en gran parte por factores ambientales que agregados a la predisposición genética ocasionan trastornos a corto y a largo plazo en órganos y sistemas que producirán una disminución de la sobrevida de los pacientes⁶.

Debido a la función del riñón en el control de largo plazo de la presión arterial, una de las manifestaciones más frecuentes de la alteración de los mecanismos de regulación es el desarrollo de diversos grados de hipertensión arterial sistémica⁷. Además, en el hipertenso, las variaciones en la presión de perfusión frecuentes

en condiciones de máximo estrés pueden agravar las alteraciones hemodinámicas, favoreciendo así el desarrollo de insuficiencia renal⁸.

La hipertensión arterial altera la hemodinámica intrarrenal lo que modifica los mecanismos de regulación de la presión intraglomerular y permite la progresión del daño renal⁹.

Nefropatía diabética

La nefropatía diabética produce un amplio espectro de alteraciones funcionales y estructurales renales, entre ellos la hipertrofia e hiperplasia glomerular. La hiperfiltración glomerular es el factor patogénico inicial de la nefropatía diabética, dependiente de la hiperglicemia y mediado por cambios hemodinámicos intraglomerulares, la reducción de la hiperfiltración y de albuminuria observadas con el estricto control metabólico. La restricción de proteínas en la dieta retarda la progresión de la nefropatía diabética¹⁰.

Hostetter y colaboradores demostraron, en ratas diabéticas, vasodilatación originada por la reducción de la resistencia arteriolar, de predominio aferente, que aumenta la presión hidráulica transcápilar, de modo que la hiperfiltración se produce por incremento del flujo plasmático glomerular, así el aumento de la presión hidrostática transcápilar es uno de los factores más importantes en el inicio de la nefropatía diabética¹¹.

Por otra parte, se sabe que en el riñón normal existe un balance entre el sistema renina angiotensina (vasoconstrictor) y el sistema de prostaglandinas (vasodilatador) y que ambos influyen sobre la hemodinámica renal. Las alteraciones de estos sistemas en la diabetes permiten que el desequilibrio entre ambos sistemas, vasoconstrictor y vasodilatador, a favor de éste último, produzca un aumento de flujo y de presión intraglomerular en la primera etapa de la nefropatía diabética. Es importante enfatizar que el sistema renina angiotensina no sólo actúa sobre los capilares glomerulares sino que además tiene efecto sobre el paso de macromoléculas hacia el mesangio y sobre el coeficiente de ultrafiltración de la membrana a través de la constricción de las células mesangiales¹⁰.

Síndrome metabólico

El síndrome metabólico es una entidad multifactorial que asocia varias alteraciones patológicas como: la hipertensión arterial, la diabetes, la resistencia a la insulina, las dislipidemias, la obesidad y la enfermedad cardiovascular^{6, 9}, (Figura 1). Es influenciado en gran parte por factores ambientales, (como una dieta inadecuada rica en carbohidratos y/o grasas saturadas, además de inactividad física), que asociados a la predisposición genética ocasionarán trastornos a corto y a largo plazo en órganos y sistemas que producirá una disminución de la sobrevida de los pacientes¹². Uno de los órganos implicados en el síndrome metabólico es el riñón, en el cual el conjunto de las alteraciones patológicas mencionadas ocasiona proteinuria, disminución de la depuración de creatinina, lesiones tubulares, infiltrado de células inflamatorias, acumulación de lípidos y esclerosis que producen en mayor o menor grado disminución de la función renal¹³. (En la Figura 1 se presenta un esquema del síndrome metabólico).

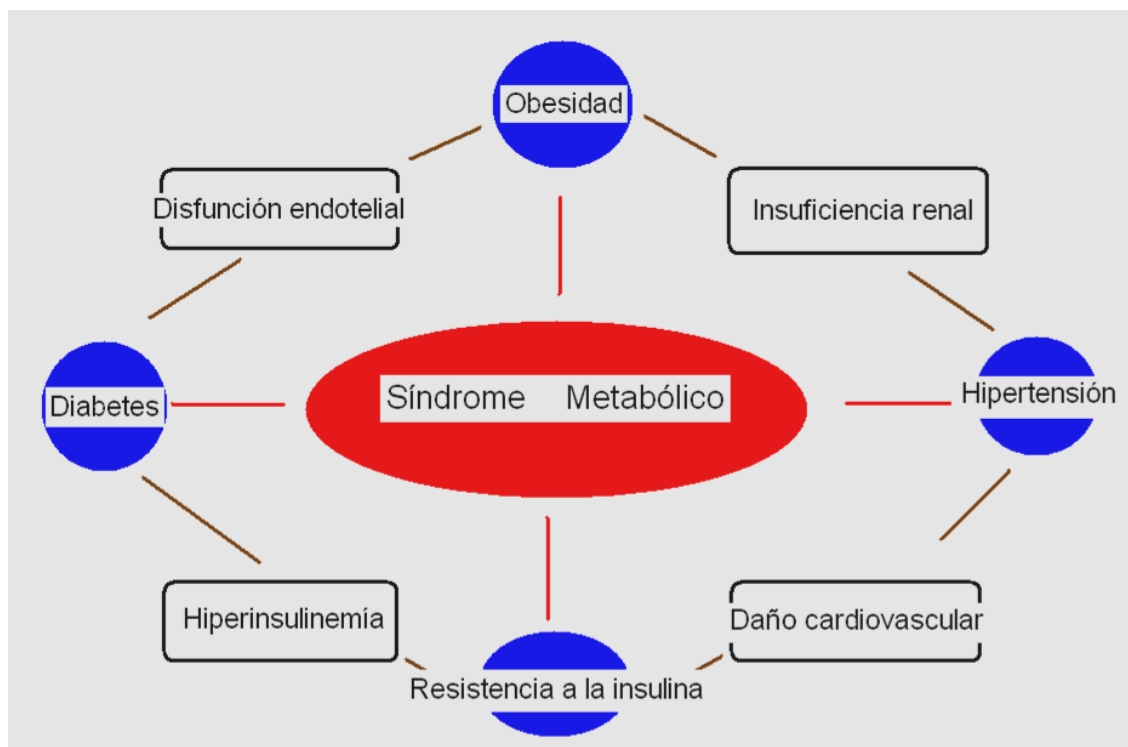


Figura 1. Síndrome metabólico.

Microcirculación

La microcirculación renal comprende las arteriolas de resistencia renal, capilares y vénulas, capaces de transportar el oxígeno y los nutrientes a las células. Las células endoteliales son la principal línea celular que forma la microcirculación renal¹⁴, (En la Figura 2 se esquematiza la microcirculación renal).

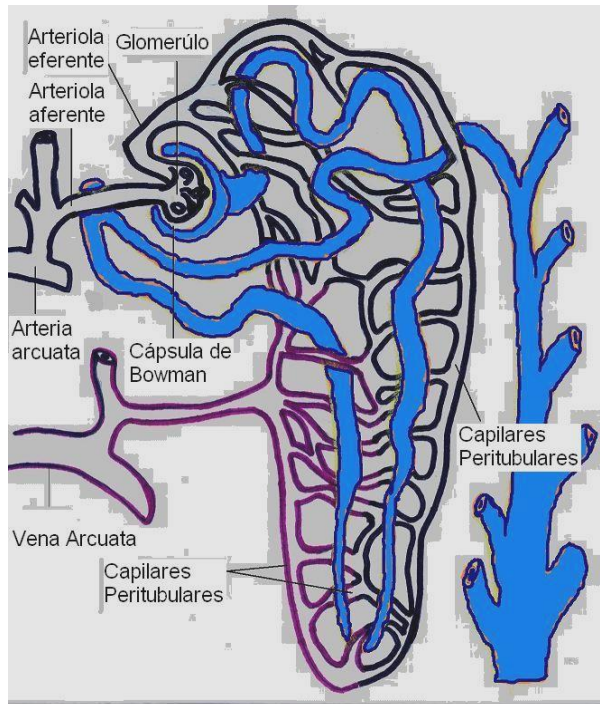


Figura 2. Esquema de la microcirculación renal.

Endotelio

El endotelio es una monocapa de células que reviste todo el árbol arterial, es altamente selectivo y proporciona una superficie no trombogénica, actúa activamente como sensor del estado físico y metabólico del sistema cardiovascular, controlando el tono vascular y la respuesta inflamatoria¹⁵ (En la Figura 3 se representa un vaso, con énfasis en el endotelio). Para controlar el tono vascular el endotelio es capaz de sintetizar distintas sustancias vasodilatadoras como el NO (óxido nítrico) y la prostaciclina (PGI₂), además de

sustancias vasoconstrictoras como la endotelina, angiotensina II, tromboxano A₂, leucotrieno C₄ y prostaglandina H₂¹⁶. El endotelio está constantemente expuesto a varios estímulos entre los que podemos destacar lipoproteínas oxidadas, fuerzas de fricción, agentes inflamatorios, citocinas, estrés y radicales libres incluyendo a los radicales superóxido.

La repetida estimulación del endotelio por estos factores puede conducir a disfunción endotelial¹⁵. Esta produce cambios estructurales y funcionales en las células del músculo liso de la microcirculación renal¹⁴ tales como incremento en la entrada de Ca⁺⁺, elevación en la respuesta vasoconstrictora y aumento en el número y sensibilidad de sus receptores a sustancias vasoconstrictoras¹⁷.

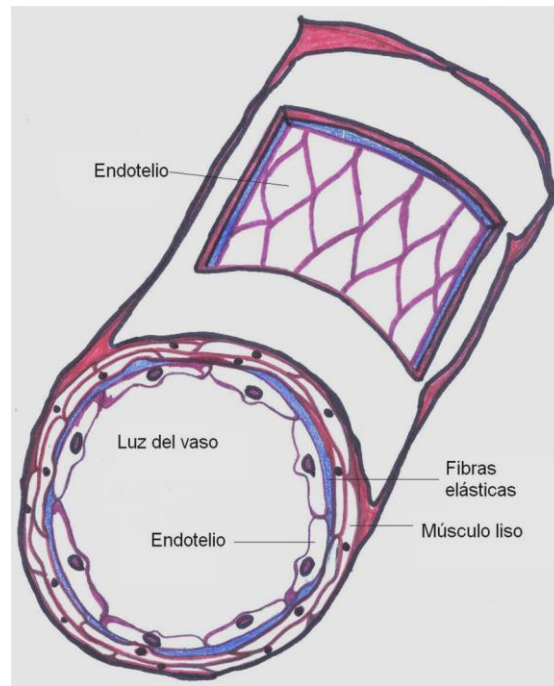


Figura 3. Representación esquemática de un vaso, con énfasis en el endotelio.

Eicosanoides

Con excepción de los eritrocitos, todas las células de los mamíferos sintetizan eicosanoides (compuestos de 20 carbonos) derivados del ácido araquidónico a través de tres vías: la de la ciclooxigenasa¹⁸, la de la lipooxigenasa y la del citocromo p450¹⁹, produciéndose sustancias tales como las prostaglandinas (PG), las prostaciclina (PC), los tromboxanos (TX) y los leucotrienos (LK). En general son muy potentes y tienen efectos fisiológicos importantes de diferente naturaleza

ya que participan en fenómenos como producción de dolor, fiebre, respuesta inflamatoria, regulación de la presión sanguínea, activación plaquetaria e iniciación de la cascada de la coagulación²⁰, modulación de funciones reproductivas, incluyendo la estimulación del músculo liso uterino durante el parto, regulación de los ciclos del sueño y de la vigilia. Las PG se generan por la acción de las ciclooxigenasas (COX) sobre el ácido araquidónico; de éstas, existen dos isoenzimas: la COX-1 constitutiva y la COX-2 inducible¹⁸.

Inicialmente se produce la prostaglandina PGG₂ muy inestable y la PGH₂ vasoconstrictora, asociada a la hipertensión por envejecimiento. Posteriormente, por la acción de la sintasa de prostaciclina se sintetiza la prostaciclina PGI₂, vasodilatadora e inhibidora de la agregación plaquetaria; por otra parte y por medio de la sintasa PG se generan una serie de prostaglandinas, en su mayoría vasoconstrictoras, como la PGF_{2α}²¹. Los tromboxanos (TXA₂ metabolito inestable y TXB₂ metabolito estable), se producen por la acción de la sintasa del tromboxano, también son vasoconstrictores y pro-agregantes plaquetarios²¹. El ácido araquidónico que se metaboliza a través de otras vías, como la de la lipooxigenasa, que da lugar a LK y la vía del citocromo p450, por la cual, mediante hidroxilación y epoxigenación del ácido araquidónico se generan compuestos del tipo 20-HETE (vasoconstrictores) y 11,12-EET (vasodilatadores); ésta última parece ser la vía preferencial en varios órganos y sistemas, que incluye riñón y vasculatura periférica²², estos metabolitos actúan regulando la función renal, cardíaca y el tono vascular²³, (En la Figura 4 se esquematiza en metabolismo del ácido araquidónico).

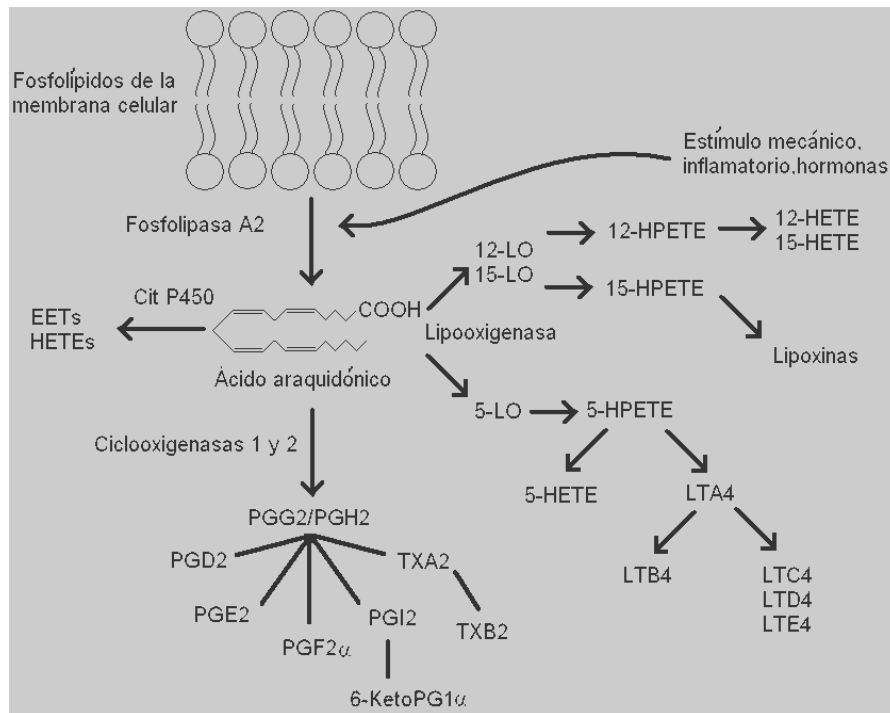


Figura 4. Metabolismo del ácido araquidónico. Cit 450: citocromo p450, EETs: epoxieicosatrienoicos, HETE:hidroxieicosatetraenoicos, HPETE:hidroxiperoxieicosatetraenoicos PG: prostaglandinas, TX: tromboxanos, LT: leucotrienos.

En algunos modelos de hipertensión experimental se ha observado que el ácido araquidónico y sus metabolitos pueden modificar la reactividad de algunos lechos vasculares y las respuestas difieren de las normales. Así, en la hipertensión renovascular inducida por coartación aórtica en la rata, el grupo de Escalante y colaboradores²⁴ encontraron que en riñones perfundidos el ácido araquidónico incrementa la presión de perfusión, efecto que es inhibido por indometacina o un bloqueador de endoperóxido/tromboxano. Por otra parte, los autores describen que la actividad, la proteína y la expresión del mRNA de la COX-1 están aumentadas en el tejido renal de las ratas hipertensas, dando por resultado la elevación de prostaglandinas vasopresoras²⁴; además en el túbulo proximal de la rata observaron que existe una relación entre la endotelina-1 y la sintasa del óxido nítrico (NO) con metabolitos del ácido araquidónico, en particular el 20-HETE¹⁹, cuya síntesis se intensifica al aumentarse el nivel de endotelina-1 y el tratamiento con L-NAME, para inducir un ascenso en la presión arterial por inhibición de la

sintasa de NO. Cuando se provoca lesión renal y desarrollo de hipertensión en ratas por tratamiento con angiotensina II o por reducción de masa renal, se han observado alteraciones que incluyen aumento en la presión arterial, la expresión de COX-2 y la concentración de PGE₂²⁵.

El tratamiento de estos animales con antagonistas de la angiotensina II evitó la aparición de estos cambios patológicos, con lo que los autores concluyen que el posible mecanismo por el que se desarrolla lesión renal es que al incrementar la concentración de angiotensina II también se modula la expresión de la COX-2, se favorece la síntesis de prostaglandinas y, por tanto, la lesión renal²⁶. En ratas espontáneamente hipertensas (SHR) se ha descrito la participación de prostanoïdes derivados de la vía de la ciclooxigenasa en la respuesta a serotonina, norepinefrina y angiotensina II en riñones aislados y perfundidos, demostrándose que los niveles de prostaciclina están reducidos en la rata SHR en condiciones basales, pero se aumentan en éstas y en los testigos normotensos, al infundir los vasoconstrictores. El vasoconstrictor TXA₂ se encontró elevado en condiciones basales en las ratas SHR, los vasoconstrictores serotonina y norepinefrina lo aumentaron sólo en las ratas SHR, pero la angiotensina II incrementó también en las normotensas²⁷.

De manera similar en los pacientes con hipertensión y dislipidemia existen alteraciones en el metabolismo del ácido araquidónico y sus derivados, los que no solamente podrían influenciar la regulación de la presión arterial, sino también el metabolismo de los lípidos y la glucosa²⁰, esto último ha sido comprobado en pacientes diabéticos en quienes algunas interacciones entre los metabolitos del ácido araquidónico pueden dar indicios del progreso de la enfermedad²⁸.

En otro modelo en rata con hipertensión, inducida por angiotensina II, se ha demostrado la participación de metabolitos derivados de la vía del p450, los que contribuyen a regular el tono vascular renal, además de la excreción de sal y el proceso inflamatorio propio de esta condición²⁹.

Los mismos autores al estudiar un modelo de ratón hipertenso por tratamiento con DOCA-sal, encontraron niveles anormalmente bajos de la actividad de la hidroxilasa del ácido araquidónico; el tratamiento con bezafibrato normalizó la

actividad y con ello se mejoró la hemodinámica renal alterada en este modelo³⁰. Existen evidencias del lugar preferencial que ocupa el metabolismo del ácido araquidónico regulado por la vía del citocromo p450 en cerebro, pulmón, riñón y vasos periféricos donde predomina la generación del ácido 20-hidroxieicosatetraenoico (20-HETE vasoconstrictor), y ácidos epoxieicosatrienoicos (EEETs vasodilatadores) de origen endotelial³¹. Estos metabolitos del ácido araquidónico tienen gran importancia en la regulación de la función renal, pulmonar, cardíaca, así como en el tono vascular, de manera que en diversos modelos de hipertensión, estas vías se encuentran alteradas³².

Hormonas sexuales

Por otro lado, en los padecimientos cardiovasculares se ha observado que existe una dependencia entre la edad, el género y los niveles circulantes de hormonas sexuales. Aunque existen datos controversiales, en términos generales los estrógenos son un factor de protección contra el desarrollo de enfermedades cardiovasculares: la edad promedio en la que se manifiestan síntomas de enfermedad coronaria en la mujer es mayor que la de los hombres³³, mientras que el riesgo de coronariopatías se duplica en mujeres que han sufrido histerectomía y ooforectomía, lo que no ocurre cuando solamente son histerectomizadas y se conservan los ovarios³⁴. El riesgo de coronariopatías disminuye con la terapia de reemplazo estrogénico en mujeres histerectomizadas o postmenopáusicas³⁵⁻³⁶.

En estudios epidemiológicos se ha demostrado que el género influye en la sobrevida de pacientes con problemas cardiovasculares. En el caso de insuficiencia cardíaca, particularmente si los individuos presentan disfunción ventricular de etiología no isquémica, la sobrevida es más prolongada en pacientes del sexo femenino, aún en etapas avanzadas de la enfermedad³⁷.

También se ha investigado la prevalencia de arritmias y el riesgo de muerte súbita con relación al sexo de los pacientes. En el estudio de Framingham³⁸ se demostró que en los hombres, aún sin antecedentes de coronariopatía, el riesgo de desarrollar arritmias ventriculares es dos veces mayor que en mujeres y en éstas

el riesgo de muerte súbita es sólo de 32% en relación con el de los hombres que es del 64%³⁹.

Estrógenos

El efecto protector cardiovascular de las hormonas sexuales femeninas se ha conocido por varios años. Parte de esta protección se atribuye a las bien demostradas propiedades antioxidantes de los estrógenos, tanto *in vivo* como *in vitro*⁴⁰⁻⁴¹.

Entre las hipótesis que se manejan del posible efecto protector de los estrógenos están: suprimen la síntesis de colágena⁴² y disminuyen la acumulación de LDL en las arterias coronarias y renales, pueden activar los receptores muscarínicos, los cuales estimulan a las células endoteliales para sintetizar NO⁴³, incrementando de manera significativa los niveles circulantes de nitratos y nitritos en el suero, también reducen la entrada de Ca⁺⁺ extracelular al interior del músculo liso vascular⁴⁴, disminuyen la afinidad de los receptores de sustancias vasoconstrictoras, además de tener un efecto relajante sobre el músculo liso, bajan los niveles de endotelina, vasoconstrictor derivado del endotelio, reducen los niveles de norepinefrina⁴⁵ (En la Figura 5 se muestra la participación de estrógenos en los vasos).

Se ha demostrado en mujeres post-menopáusicas, que los estrógenos potencian la vasodilatación colinérgica dependiente de endotelio y la de la vía de la COX-2, demostrado por la ausencia de esta respuesta en presencia del inhibidor específico de esta vía, el celecoxib⁴⁶.

Además los estrógenos pueden incrementar la síntesis de prostaciclina en arterias cerebrales, desviando la producción de la prostaglandina vasoconstrictora PGH₂ hacia el vasodilatador. Este efecto explica la mayor resistencia a la trombosis y al aumento de flujo sanguíneo cerebral en mujeres premenopáusicas⁴⁷.

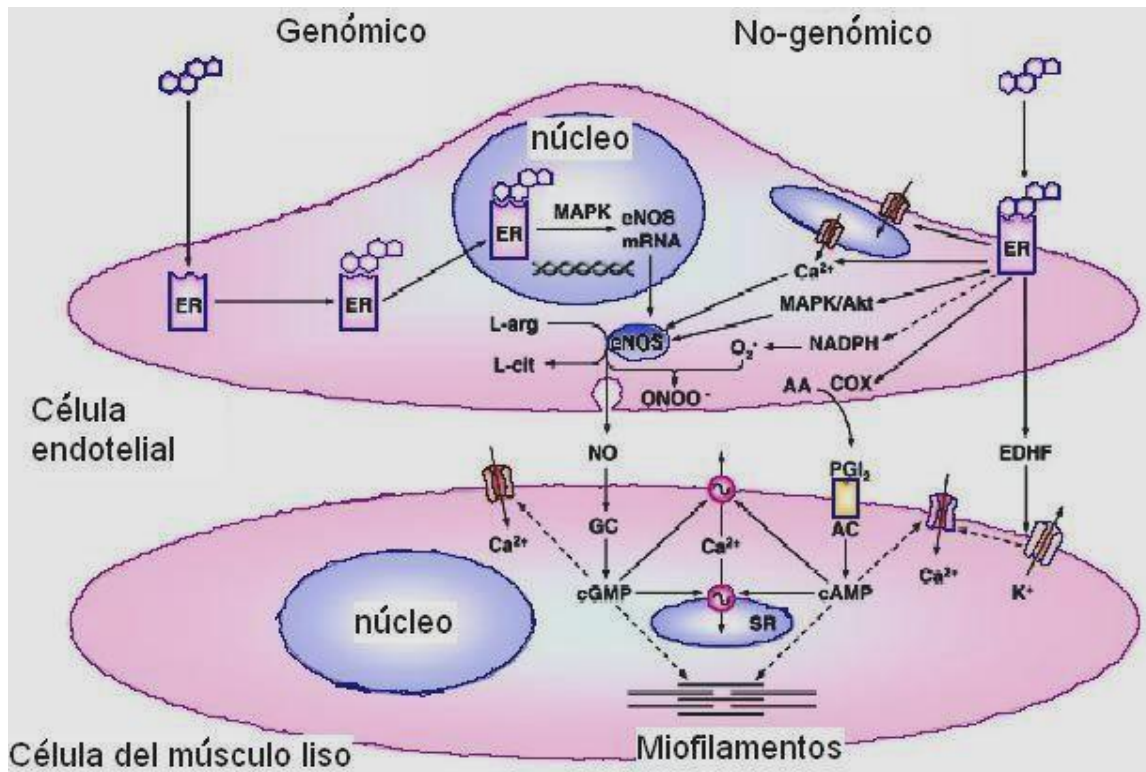


Figura 5. Participación del estradiol en la intima de los vasos de la microcirculación.

ER: receptor del estradiol, cGMP: guanosín monofosfato, eNOS: sintasa de óxido nítrico endotelial, NO: óxido nítrico, EDHF: factor hiperpolarizante derivado del endotelio, COX: ciclooxigenasa (Modificado de Orshal y Khalil. Gender, sex hormones, and vascular tone. Am J Phys 2004;286: R233-R249).

Testosterona

Numerosos trabajos han descrito que la testosterona puede contribuir al desarrollo de hipertensión en ratas SHR, a través del incremento de la actividad de la enzima tiroxina-hidrolasa⁴⁸, la cual aumenta principalmente los niveles de norepinefrina en el flujo sanguíneo⁴⁹.

Asimismo, otro estudio con el mismo modelo demostró que la testosterona eleva la expresión de COX-2. Gong y colaboradores encontraron que los andrógenos regulan la presión sanguínea en ratas SHR, mostrando que el tratamiento con testosterona eleva los niveles de receptores α_2 -adrenérgicos en hembras y en machos gonadectomizados, comparados con los testigos⁵⁰, sugiriendo con esto que los andrógenos modulan la expresión de los receptores α_2 -adrenérgicos. Los

cambios en el número de receptores α_2 -adrenérgicos se asocian con modificaciones en la presión sanguínea⁵¹⁻⁵². En otro estudio el tratamiento con testosterona en ratas hembras se asoció con disminución en la síntesis de PC y aumento en la expresión de COX-2⁵³ (En la figura 6 se describen algunos aspectos de la participación de la testosterona sobre el metabolismo del ácido araquidónico).

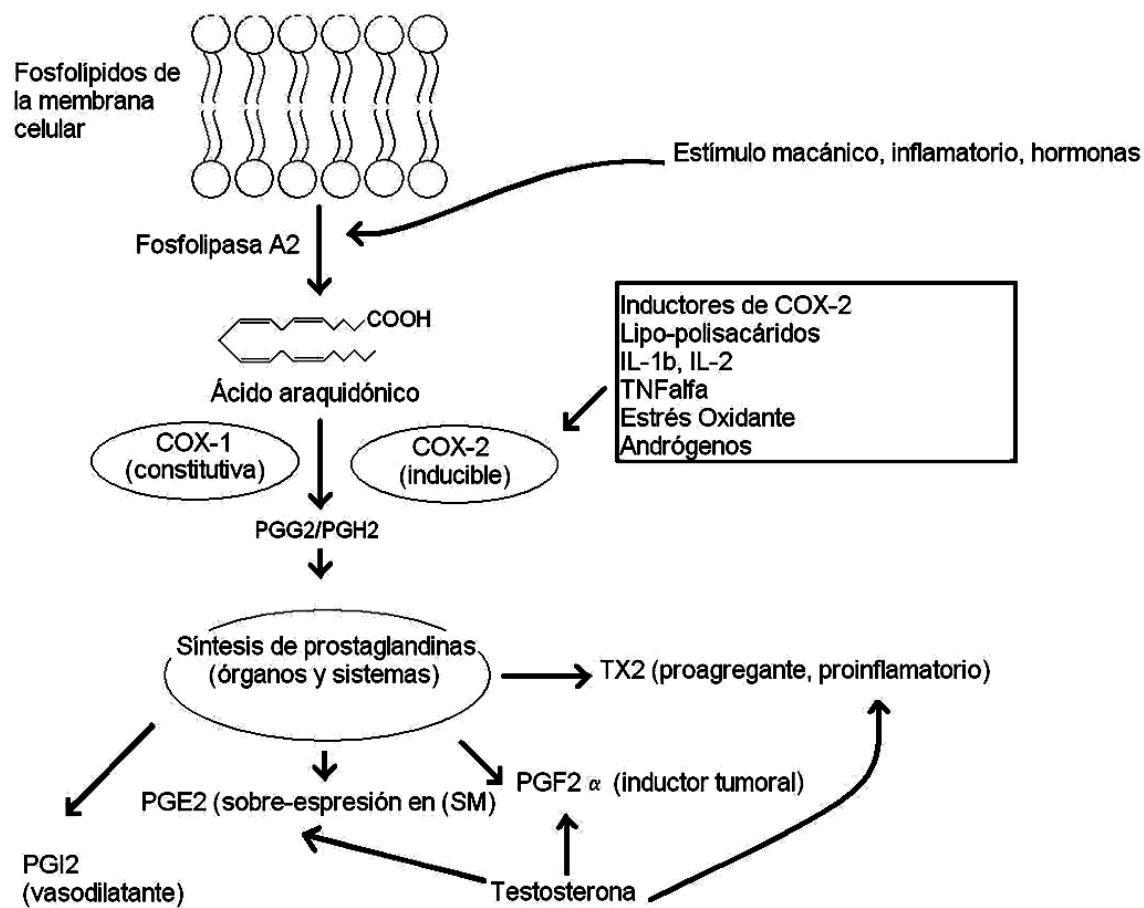


Figura 6. Efecto de la testosterona sobre el metabolismo del ácido araquidónico. COX: Ciclooxigenasas, PG: Prostaglandinas, TX: Tromboxanos, TNF: Factor de necrosis tumoral.

Antecedentes experimentales del modelo con síndrome metabólico

En nuestro laboratorio hemos desarrollado un modelo en rata con síndrome metabólico, una variante del modelo descrito por Reaven⁵⁴ en el cual las dietas con concentraciones altas de sacarosa o fructosa inducen hipertensión, hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia, resistencia a la insulina, nefropatía, acumulación de tejido graso intra-abdominal. Este cuadro patológico se observa

frecuentemente en la clínica. En el modelo que desarrollamos, las anormalidades metabólicas y funcionales se han inducido en ratas Wistar por la administración de azúcar comercial al 30 % en el agua de bebida, los hallazgos más relevantes son los siguientes:

1.- La adición de azúcar refinada comercial al agua de bebida (30%) en ratas Wistar produjo hipertrigliceridemia e hipertensión comparables a las encontradas por otros autores que administraron los carbohidratos (60%) con el alimento sólido. En nuestro modelo únicamente tuvimos que prolongar el tiempo de tratamiento a 20-24 semanas para obtener diferencias significativas con respecto a los testigos⁵⁵.

2.- La reactividad vascular de las ratas con síndrome metabólico reveló dos tipos de anormalidades: a) alteración en el tejido vascular (aórtico y mesentérico) manifiesta por hipercontractilidad a vasoconstrictores e hiporelajación a vasodilatadores dependientes de óxido nítrico endotelial, lo que sugiere daño al endotelio. Estos efectos disminuyeron en presencia de indometacina. b) un componente plasmático circulante, posiblemente los lípidos alterados, que al ser adicionado a preparaciones de vasos *in vitro* indujo hipercontractilidad y redujo la respuesta de relajación dependiente de acetilcolina y de óxido nítrico⁵⁶.

3.- Se han encontrado diferencias en la composición lipídica asociadas al género⁵⁵, en nuestro laboratorio hemos demostrado que la composición de los ácidos grasos del plasma de la rata hembra es diferente a la de la rata macho. Cuando se induce el estrés oxidante por medio de inyección de fierro en el animal entero, el índice de lipoperoxidación es menor en la hembra que en el macho, eso se debe probablemente al efecto protector de varios antioxidantes en la hembra⁵⁷⁻⁵⁹.

4.- La infusión de suero produce alteraciones en la función cardíaca en preparaciones de corazón aislado (Langendorff), incrementando las presiones de perfusión y ventricular. El suero normal induce mayor respuesta en los corazones de las ratas con síndrome metabólico que en los testigos y el suero de las ratas con síndrome metabólico provoca aumentos significativamente mayores que el

suero testigo en las presiones de ambos corazones, pero la respuesta del corazón de las ratas con síndrome metabólico es también de mayor magnitud⁶⁰.

5.- El alto consumo crónico de sacarosa ocasiona proliferación mesangial, daño a los procesos podocíticos, engrosamiento de la membrana basal⁶¹.

6.- En general, los cambios causados por el tratamiento en las ratas con síndrome metabólico son más numerosos y desfavorables en los machos. En las hembras los estrógenos contribuyen a su protección contra eventos patológicos cardiovasculares. Los patrones de respuestas se alteran cuando se modifican los niveles de hormonas sexuales por castración o por castración y tratamiento subsecuente con estradiol o testosterona⁶¹.

Otro grupo de investigadores, evaluando la hipertrigliceridemia producida por administración de fructosa durante un mes, una variante de la que hemos desarrollado, ha encontrado que puede modificarse por tratamiento con un inhibidor de la sintasa del tromboxano, con lo que la hipertensión característica no se manifiesta⁶².

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Considerando las observaciones anteriores, que sugieren la participación del ácido araquidónico y sus metabolitos en procesos metabólicos, funcionales y la influencia del género en el modelo en rata con síndrome metabólico estimamos importante estudiar la participación de las ciclooxigenasas, la modulación de los efectos de las hormonas sexuales y la contribución de algunos de los metabolitos en el incremento de la presión arterial sobre la función renal.

HIPÓTESIS

Puesto que las hormonas sexuales participan en la disfunción renal asociada al síndrome metabólico, modulando el metabolismo del ácido araquidónico, el estudio de la vía de las ciclooxigenasas en ratas gonadectomizadas podría determinar su contribución en la reactividad vascular renal que influye sobre la funcionalidad del órgano en el síndrome metabólico.

OBJETIVO

Evaluar la participación del metabolismo del ácido araquidónico por la vía de las ciclooxigenasas en el desarrollo de las alteraciones renales observadas en los animales con síndrome metabólico, así como la influencia de las hormonas sexuales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Grupos experimentales

Se utilizaron ratas Wistar, tanto machos como hembras. Los grupos con 10 animales cada uno fueron los siguientes: testigo-1 machos intactos, testigo-2 machos castrados, síndrome metabólico-1 machos intactos, síndrome metabólico-2 machos castrados, testigo-3 hembras intactas, testigo-4 hembras ovariectomizadas, síndrome metabólico-3 hembras intactas, síndrome metabólico-4 hembras ovariectomizadas. Los animales recién destetados recibieron agua y alimento comercial para roedores, las ratas con síndrome metabólico recibieron el mismo alimento sólido pero se añadió 30% de azúcar comercial en el agua de beber por 24 semanas.

Medición de la presión arterial sistólica

Al final del tratamiento y antes de sacrificar a los animales se les midió la presión arterial sistólica por medio de un pletismógrafo que consiste de un sistema que utiliza un sensor que se coloca en la cola del animal, conectado a un transductor de presión, que envía las señales a una computadora equipada con un programa para la captura y procesamiento de datos⁵⁷. Además a las ratas se les colocó en cajas metabólicas para recolectar la orina y cuantificar la albuminuria de 24 horas por el método de verde de bromocresol⁶³.

Tratamiento quirúrgico

La castración se realizó bajo anestesia general (pentobarbital sódico, 63 mg/Kg. de peso corporal, i.p.), ésta se realizó quirúrgicamente. Se efectuó una incisión longitudinal en el escroto. Los testículos se exteriorizaron y se ligaron los conductos aferentes, seccionándose inmediatamente por debajo de la ligadura. Después de la extirpación se suturó el corte. Para la ovariectomía, los animales se anestesiaron de la misma manera. Se realizó una incisión longitudinal en el área abdominal y pélvica de la parte dorsal. Se separaron la piel y el músculo y se realizaron dos incisiones en el músculo esquelético, una a cada lado de la primera

incisión, se exteriorizaron los ovarios, se ligaron las trompas de Falopio y se seccionaron los ovarios por debajo de la ligadura. Después de la extirpación se suturaron los cortes⁵⁶. Se comprobó la eficiencia del procedimiento por medición de los niveles de hormonas circulantes, testosterona o estradiol, así como frotis vaginal y tinción de Papanicolau en el caso de las hembras.

Experimentos con el riñón aislado y perfundido

Se utilizó la técnica para el riñón aislado y perfundido según Langendorff modificada por Vázquez-Cruz y colaboradores²⁴. A los animales anestesiados (pentobarbital sódico, 63 mg/Kg. de peso corporal, i.p.) se les practicó una incisión en la línea media, se visualizó la aorta, arteria mesentérica y el riñón derecho. Se colocó un lazo laxo de seda 3-0 en la aorta abdominal sin comprimirla, por arriba de la arteria renal derecha y en la arteria mesentérica, se tensaron las ligaduras con pinzas hemostáticas, de inmediato se efectuó una incisión en la arteria mesentérica después de la ligadura y se introdujo rápidamente un catéter con cuidado para no perforar el vaso y se atravesó la aorta, el catéter se introdujo en la arteria renal y se le perfundió inmediatamente con solución de Krebs mantenida a 37°C y aereada con gas carbógeno (O₂ 95%-CO₂ 5%) con la siguiente composición (mM): NaCl 118, NaH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 25, KCl 4.7, CaCl₂ 1.2, MgSO₄ 4.2, glucosa 5.5, pH 7.4, inmediatamente se anudaron las ligaduras y se seccionó la vena cava y la aorta por arriba y por debajo de la arteria renal, se seccionó el úreter derecho en su extremo distal y se extrajo el riñón.

La cánula del riñón derecho fue removida y se fijó al sistema para órgano aislado y perfundido. Inmediatamente después de haber sujetado el riñón, se inició la calibración del flujo de la solución amortiguadora, hasta obtener un flujo constante entre 9-10 ml/min. de salida y durante todo el experimento se conservó este flujo por medio de una bomba peristáltica (MasterFlex, Easy-load II. ColeParmer No.77200-50), que se mantuvo a una presión de perfusión de 80 a 90 mmHg. La presión de perfusión se midió por medio de un transductor de presión (Grass Telefactor). El transductor se conectó a un polígrafo Grass 79D que amplificó la

señal y se registró en una computadora equipada con un programa especializado (Grass PolyView version 2.0).

Después de un período de 20 min. de equilibrio, se procedió a inyectar bolos de agonistas y antagonistas, los que se administraron a intervalos suficientemente largos para permitir que la presión de perfusión retornara al nivel basal (entre 80-90 mmHg).

Las secuencias de los bolos fueron: ácido araquidónico 4 µg, ácido araquidónico 4 µg + ozagrel 100 µM (inhibidor específico de la tromboxano sintasa), ácido araquidónico 4 µg + NS398 10 µM (inhibidor específico de COX-2) y ácido araquidónico 4 µg + indometacina 10 µM (inhibidor inespecífico de las COX). Preferentemente se ensayaron las tres series en el mismo riñón.

Para graficar los cambios de la presión de perfusión se obtuvo la delta (Δ) de presión de la siguiente manera: a la presión de perfusión máxima obtenida en cada ensayo se le restó la presión de perfusión basal, la diferencia se graficó en conjunto con las otras diferencias logradas en los demás ensayos.

Fórmula para calcular la delta (Δ).

Presión de perfusión máxima – presión de perfusión basal = Δ -presión de perfusión.

En el modelo de riñón aislado y perfundido según Langendorff, se valoró la reactividad vascular inducida por la perfusión de 4 µg de ácido araquidónico.

Al mantener al riñón con un flujo constante del amortiguador de Krebs, un ligero incremento en la presión de perfusión ocasionada por el metabolismo del ácido araquidónico representa cambios en la resistencia de la arteria renal que indican vasoconstricción²⁴.

De acuerdo con la teoría biogénica que postula que el flujo sanguíneo renal es igual a la presión arterial dividida por la resistencia vascular renal, a medida que aumenta la presión los vasos incrementan su resistencia, este mecanismo es intrínseco y autoregulatorio en condiciones renales normales, pero hay un desequilibrio en condiciones patológicas⁶⁴, por lo que al aumentar las resistencias arteriolares preglomerulares por acción de la vasoconstricción, la tasa de filtración glomerular disminuirá⁶⁵.

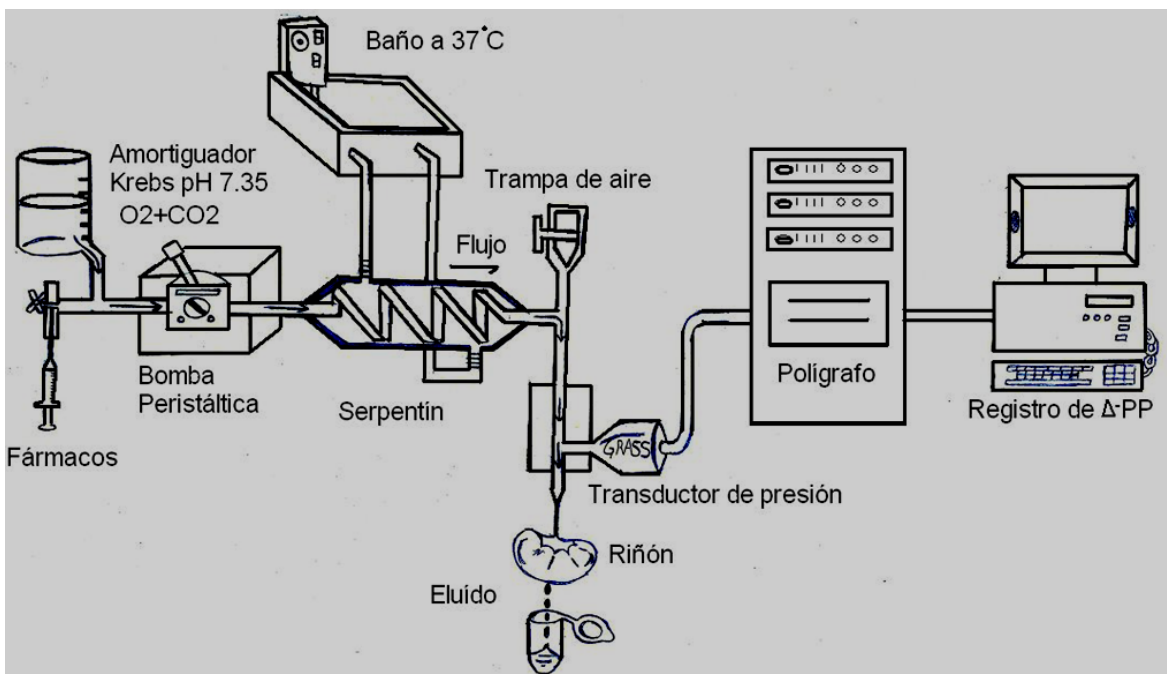


Figura 7. Esquema general del sistema de riñón aislado y perfundido.

Determinación de COX-1 y 2 por inmunotransferencia

Se utilizó el método descrito por López-Sánchez y cols²⁴. Se prepararon agregados de membrana celular del tejido renal como sigue: el tejido se disectó con ayuda de un microscopio estereoscópico y se homogeneizó en amortiguador Tris-sacarosa 0.1 M pH 7.4, se centrifugó a 1000 g por 5 min a 4 °C en centrífuga refrigerada. El sobrenadante se centrifugó a 9000 g por 10 min a 4 °C en ultracentrífuga y se descartó el precipitado. El sobrenadante se centrifugó a 44000 g por 1 h a 4 °C y la pastilla resultante se resuspendió en 250 µl de amortiguador de fosfatos (PBS) 0.1M. Se determinó la cantidad de proteína por el método de Bradford.

100 µg de proteína de agregado membranal se mezcló con amortiguador de carga (glicerol 59 % vol/vol; Tris-HCl, pH 6.5; SDS 1%, azul de bromofenol 0.1%, 2-mercaptoetanol 0.05%). La mezcla se calentó a 100°C por 1-2 min. Las proteínas se separaron en gel de SDS/PAGE al 8% bajo condiciones reductoras, al término de la electroforesis el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa 45µm

Hybond-P. La membrana se bloqueó durante 3 horas con TBS que tenía 5% de leche deshidratada desgrasada y Tween-20 al 0.05%.

Después la membrana se incubó con una dilución 1/1000 a una concentración final de 0.2pg/ml de anticuerpos primarios policlonales de conejo contra COX-1 y COX-2, según el caso, durante la noche a 4 °C con agitación constante; la membrana se enjuagó tres veces con TBS y se incubó con una dilución 1/1000 de anticuerpos secundarios policlonales de cabra anti IgG de conejo por tres horas a temperatura ambiente y se reveló con 3'3'diaminobenzidina. Después de la identificación de la proteína problema la membrana se lavó con amortiguador que contenía 1% de TRIS, 1% de SDS y 100 mM β -mercaptoetanol pH 2 por 2 horas, después se lavó con TBS, se bloqueó 3 horas y se incubó durante la noche con una dilución 1/2000 de anticuerpos monoclonales de ratón anti α -actina-biotinilados y se reveló con 3'3'diaminobenzidina⁶¹.

La membrana se analizó por densitofotometría mediante el programa Sigma Scan Plot versión 5⁶¹.

Extracción de ácido araquidónico libre no esterificado

La extracción del ácido araquidónico se realizó de acuerdo al método de Folch⁶⁶. A 1 mg de proteína de homogeneizado de riñón, se le agregó 20 μ g de ácido margárico como estándar interno, 1 ml de MetOH con BHT al 0.002%, 1 ml de NaCl al 0.09% y 2 ml de cloroformo con BHT al 0.002%. La muestra se agitó 30 seg y se centrifugó a 376 g/5 min. La fase de cloroformo se recuperó (se repitió la última parte 1 vez más). A los 4 ml de cloroformo obtenidos se les agregó 200 μ l de metanol y sulfato de sodio anhidro y se filtró; el cloroformo obtenido se evaporó con una corriente de N₂. Al residuo lipídico se le agregó 100 μ l MetOH con BHT al 0.002%, 100 μ l 2,2-dimetoxipropano y 10 μ l de H₂SO₄ y se incubó a temperatura ambiente por 15 min. Se agitó cada 5 min, después se le agregó 1 ml NaCl al 5%, 2 ml de hexano y se agitó 30 seg y se centrifugó a 376/5 min La fase del hexano se separó de la acuosa (se repitió la última parte una vez). Los 4 ml de hexano obtenidos se evaporaron con una corriente de N₂. Se separaron e identificaron por cromatografía de gases en un cromatógrafo (Modelo Shimadzu GC-2010) con una

columna capilar de 25 m x 0.25 mm de diámetro a 195°C y un flujo constante de helio 1 ml/min⁶⁸.

Medición de prostaglandinas

A 1 ml de orina o eluido de riñón, se le agregó 1 ml de etanol/agua 1:4 vol/vol y 10 µl de ácido acético; se agitó en vortex e incubó a temperatura ambiente 5 min, se centrifugó a 2500 g por 5 min. Se recuperó el sobrenadante y se filtró en una mini-columna Sep-Pak C18, previamente equilibrada con 2 ml de etanol al 10 %.

Después de filtrar el sobrenadante la columna se lavó con 1 ml de agua destilada, seguido de 1 ml de hexano, las PG se eluyeron con 1.5 ml de acetato de etilo, el cual se evaporó bajo una corriente de N₂. Las PG se resuspendieron en 300 µl de PBS pH 7.4 / etanol 2:1 vol/vol. Las concentraciones de 6-keto-PG1 α , PGE2 y TXA₂ se determinaron por EIA.

ANALISIS ESTADISTICO

Los datos se presentan como la media \pm error estándar. La diferencia estadística se determinó por análisis de varianza de dos vías y por la prueba t de Student. Una $p < 0.05$ fue considerada como significativa. Las gráficas y el análisis estadístico se realizaron con el programa SigmaPlot 11⁶¹ (Systat Software Inc., Richmond, California, USA).

RESULTADOS

PESO

No hubo diferencias significativas entre el peso corporal de las ratas hembras testigo, con síndrome metabólico y testigo ovariectomizadas, pero en las ratas con síndrome metabólico ovariectomizadas se observó un incremento en el peso en comparación con las ratas hembra con síndrome metabólico intactas ($p < 0.05$). En los machos testigo castrados y con síndrome metabólico castrados se presentó una disminución significativa ($p < 0.05$) del peso corporal en comparación con sus respectivos testigos (Tabla 1).

GRASA INTRA-ABDOMINAL

Las ratas hembra con síndrome metabólico presentaron mayor acumulación de grasa intra-abdominal en comparación con las ratas testigo ($p < 0.05$), después de la ovariectomía las ratas con síndrome metabólico ovariectomizadas presentaron significativamente más grasa intra-abdominal en comparación con las ratas con síndrome metabólico intactas ($p < 0.05$).

Las ratas macho con síndrome metabólico tuvieron mayor acumulación de grasa intra-abdominal en comparación con sus testigos ($p < 0.01$), pero la castración la disminuyó en las ratas con síndrome metabólico castrados en comparación con las ratas con síndrome metabólico intactas ($p < 0.01$, Tabla 1).

HORMONAS SEXUALES

En las ratas hembra y macho gonadectomizadas no se detectaron niveles de la hormona sexual predominante a cada género.

Los niveles de testosterona en las ratas hembra testigo y con síndrome metabólico no presentaron diferencia, pero en las ratas con síndrome metabólico ovariectomizadas los niveles de testosterona disminuyeron significativamente ($p < 0.05$) en comparación en las ratas testigo ovariectomizadas.

En las ratas macho con síndrome metabólico los niveles de testosterona fueron significativamente menores ($p = 0.01$) en comparación con sus testigos.

Los niveles de estradiol en las ratas testigo castrados y con síndrome metabólico castrados se incrementaron significativamente en comparación con sus respectivos testigos ($p < 0.01$, Tabla 1).

Tabla 1. Características generales de las ratas hembra y macho, control y con síndrome metabólico

	♀				♂			
	<i>T</i>	<i>SM</i>	<i>T Ovx</i>	<i>SM Ovx</i>	<i>T</i>	<i>SM</i>	<i>T Cas</i>	<i>SM Cas</i>
Peso (g)	363±9	387±13	362±3	455±7*	499±5	480±10	431±1**	405±3**
Grasa Intra abdominal (g)	5.6±0.4	13.3±0.9†	6.0±0.7	20.3±2.8†	5.0±0.1	18.3±1.4††	4.0±0.5	13.1±0.4††
Estradiol (nM)	0.28±0.10	0.38±0.03	<0.001	<0.001	0.003±0.001	0.002±0.001	0.12±0.04◇	0.11±0.02◇
Testosterona (µM)	0.013±0.005	0.008±0.003	0.016±0.003	0.005±0.001§	0.025±0.006	0.006±0.002*	<0.001	<0.001

T= testigo, SM= síndrome metabólico, Ovx=ovariectomizadas y Cas=castradas

♀: * p<0.05 vs SM, † p<0.05 SM vs T y SM Ovx, § p<0.05 vs SM

♂: * p<0.05 vs SM, ** p<0.01 T vs T Cas y SM vs SM Cas, †† p<0.01 T vs SM y SM Cas vs SM, ◇ p<0.05 vs T y SM

PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA

En las ratas hembra testigo, con síndrome metabólico y testigo ovariectomizadas la presión arterial sistólica fue (111.4 ± 2.7 mmHg, 120.7 ± 4.5 mmHg y 116.8 ± 2.1 mmHg, respectivamente) sin diferencia, pero en las ratas con síndrome metabólico ovariectomizadas la presión arterial sistólica se incrementó (139.3 ± 4.5 mmHg $p=0.01$) vs las ratas con síndrome metabólico.

En las ratas macho testigo la presión arterial sistólica fue menor ($p=0.001$) en comparación con las ratas con síndrome metabólico (123.1 ± 2.2 mmHg vs 144.9 ± 3.5 mmHg, respectivamente). La castración no modificó la presión arterial sistólica en las ratas testigo castrados (125.2 ± 1.3 mmHg) pero en las ratas con síndrome metabólico castrados la presión arterial sistólica disminuyó (128.4 ± 1.3 mmHg $p=0.001$) en comparación con las ratas con síndrome metabólico (Figura 1).

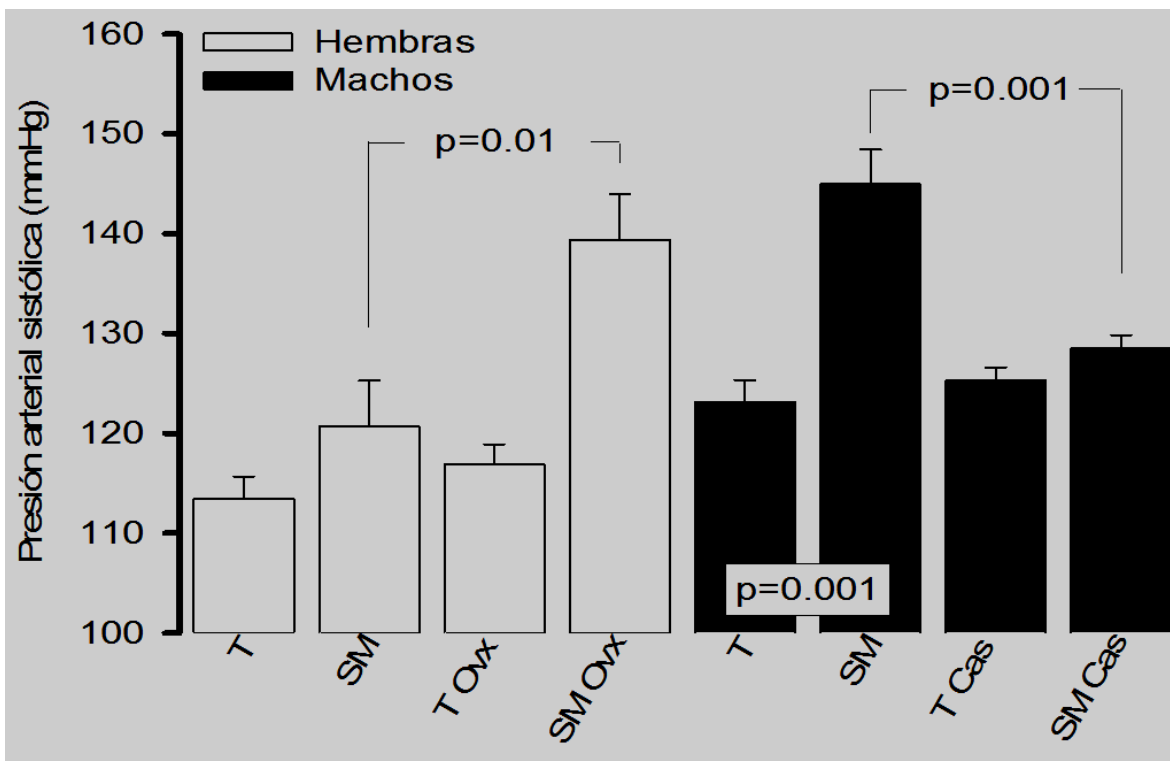


Figura 1. Presión arterial sistólica obtenida en los grupos de ratas hembra y macho. T= testigo, SM= síndrome metabólico, Ovx=ovariectomizadas y Cas=castradas

ALBUMINURIA

La excreción de albúmina urinaria en las ratas hembra testigo, con síndrome metabólico y testigo ovariectomizadas no se modificó, pero en las ratas con síndrome metabólico ovariectomizadas la albuminuria presentó un incremento significativo ($p=0.03$).

Las ratas macho con síndrome metabólico mostraron un incremento significativo en la albuminuria en comparación con las ratas testigo ($p<0.001$).

La castración en las ratas macho con síndrome metabólico castrados disminuyó la excreción de albúmina urinaria en comparación con las ratas con síndrome metabólico intactas ($p<0.001$), la castración en las ratas testigo no modificó la albuminuria en relación con su testigo (Figura 2).

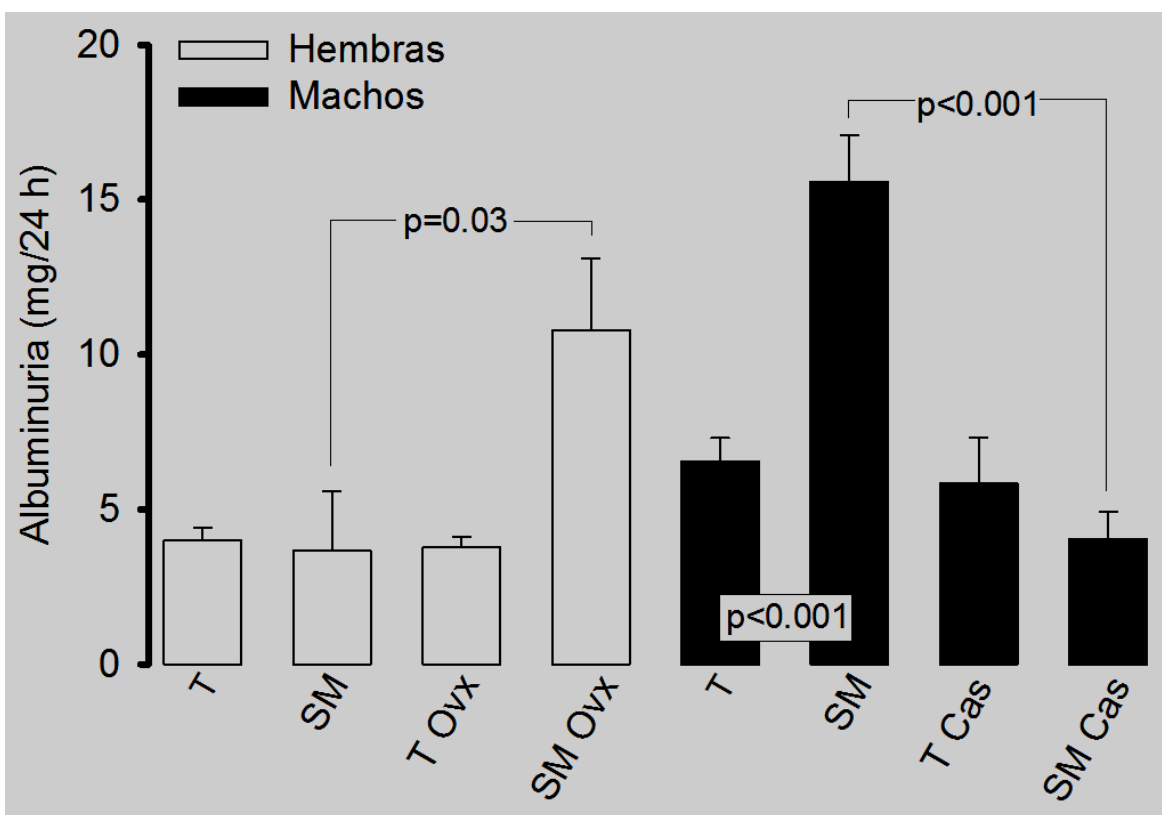
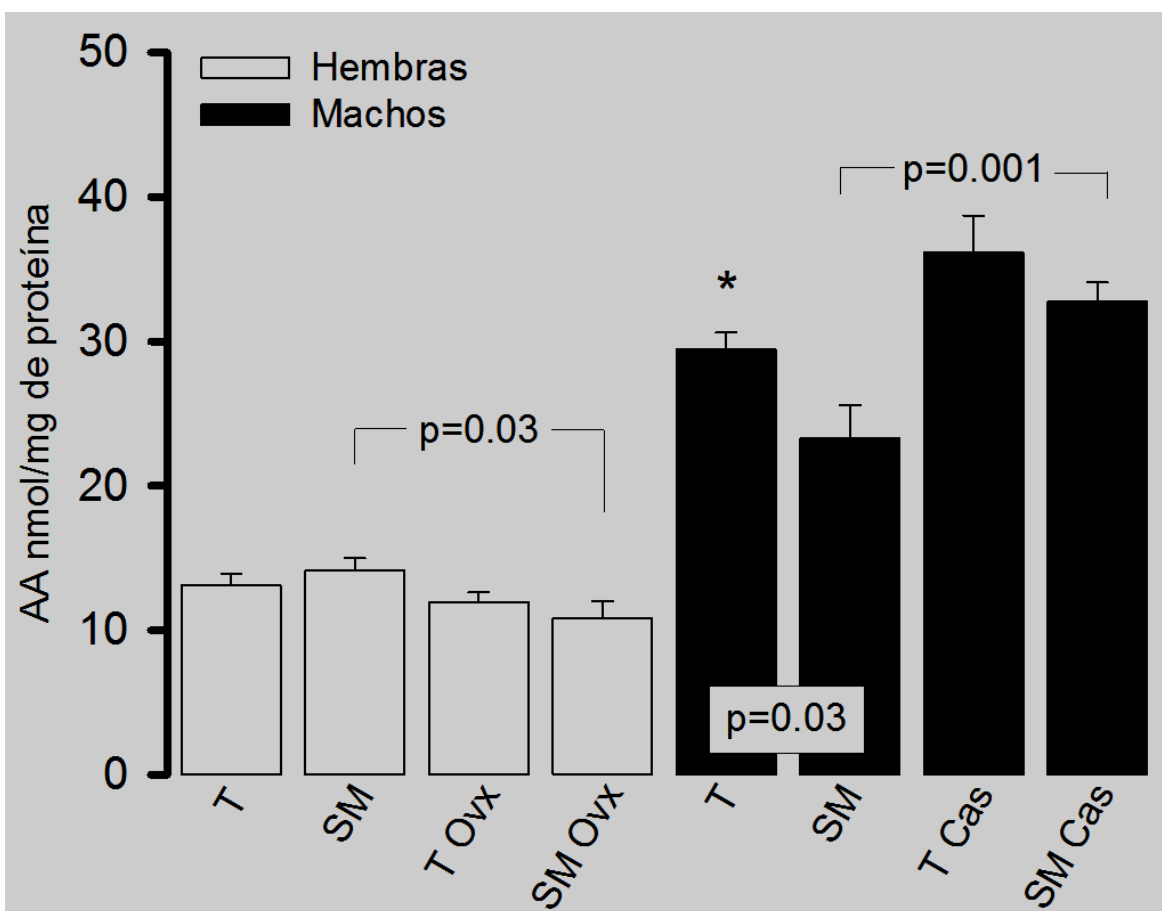


Figura 2. Excreción de albúmina urinaria en los grupos de ratas hembra y macho
T= testigo, SM= síndrome metabólico, Ovx=ovariectomizadas y Cas=castradas

ÁCIDO ARAQUIDÓNICO NO ESTERIFICADO

El ácido araquidónico no esterificado en el homogeneizado de riñón de las ratas hembra testigo, con síndrome metabólico y testigo ovariectomizadas no presentó cambios significativos, pero la ovariectomía en las ratas con síndrome metabólico disminuyó la cantidad de ácido araquidónico en comparación con las ratas con síndrome metabólico intactas ($p=0.03$).

La Figura 3 también muestra la cantidad de ácido araquidónico libre en el homogeneizado de riñón de las ratas macho. El ácido araquidónico libre en el homogeneizado de riñón de las ratas con síndrome metabólico decreció en relación con el de las ratas testigo y con síndrome metabólico castrados ($p=0.03$ y $p=0.001$ respectivamente) pero en las ratas testigo castrados se encontró un aumento significativo vs las ratas testigo ($p=0.03$).



*C vs. C Castrados $p<0.03$

Figura 3. Concentración de ácido araquidónico libre en homogeneizado de riñón
T= testigo, SM= síndrome metabólico, Ovx=ovariectomizadas y Cas=castradas

EFFECTO DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO SOBRE LA PRESIÓN DE PERFUSIÓN EN EL RIÑÓN AISLADO

HEMBRAS

La Δ -presión de perfusión no presentó diferencia entre los grupos de las ratas hembra testigo, con síndrome metabólico y testigo ovariectomizadas (19.4 ± 4.1 mmHg, 15.4 ± 3.7 mmHg y 20.4 ± 2.1 mmHg, respectivamente).

La ovariectomía aumentó la Δ -presión de perfusión en las ratas con síndrome metabólico ovariectomizadas (31.7 ± 5.3 mmHg, $p=0.02$) en comparación con las ratas con síndrome metabólico intactas.

Al perfundir $4 \mu\text{g}$ de ácido araquidónico más $10 \mu\text{M}$ de indometacina, la Δ -presión de perfusión no se modificó significativamente en el riñón de las ratas hembra testigo, con síndrome metabólico y testigo ovariectomizadas (8%, + 4% y 18%) en relación a la Δ -presión de perfusión obtenida sin la indometacina, pero en el riñón de las ratas con síndrome metabólico ovariectomizadas decreció significativamente (74% $p=0.01$) en comparación con la Δ -presión de perfusión sin la indometacina.

También la figura muestra la Δ -presión de perfusión conseguida en los grupos experimentales de ratas hembra al perfundir $4 \mu\text{g}$ de ácido araquidónico más $10 \mu\text{M}$ de NS398, sólo en el grupo con síndrome metabólico ovariectomizadas se logró diferencia significativa en comparación con su mismo grupo pero sin el inhibidor ($p=0.05$). Por último la figura describe la Δ -presión de perfusión obtenida al perfundir el ácido araquidónico en presencia de $100 \mu\text{M}$ de ozagrel, inhibidor de la tromboxano sintasa, en ninguno de los casos hubo diferencia. (Los resultados se presentan en la Figura 4).

4 Hembras

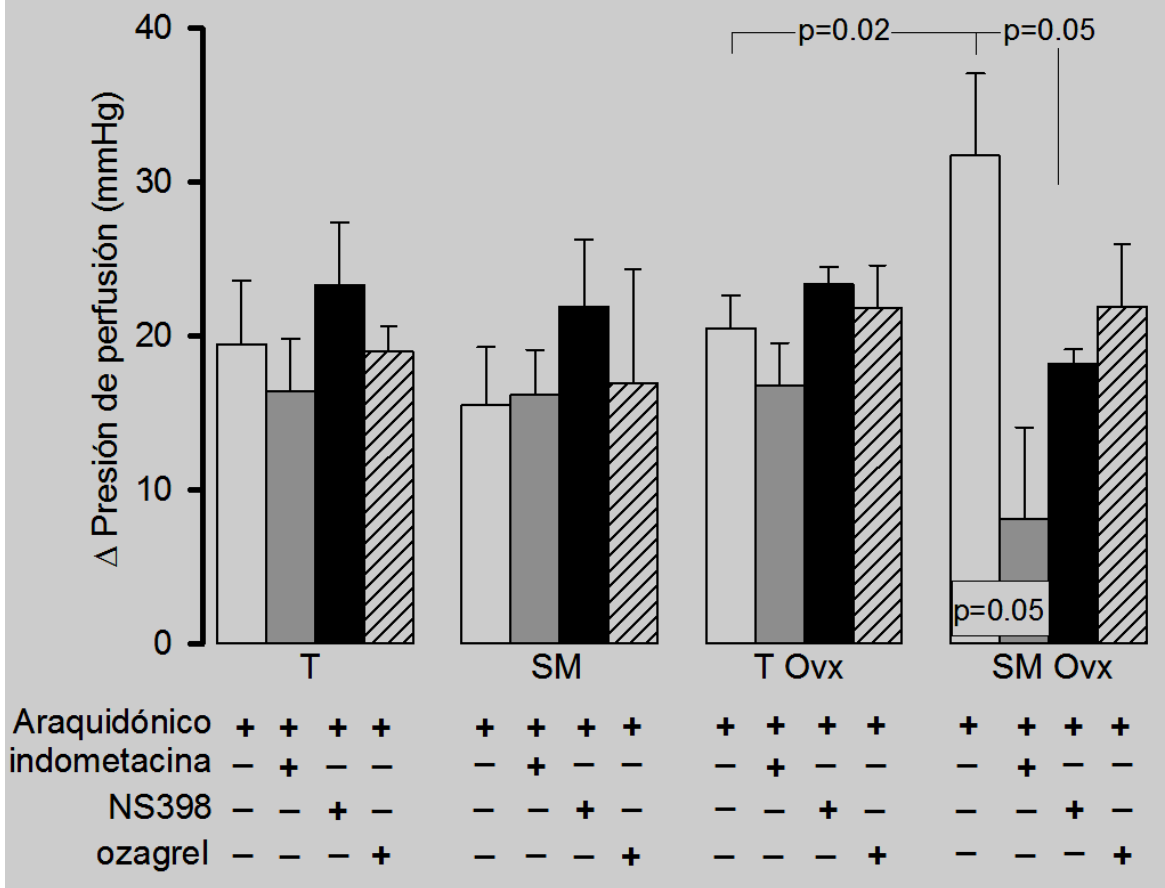


Figura 4. Δ -presión de perfusión obtenida al perfundir el riñón derecho de las ratas hembra testigo, con síndrome metabólico, testigo ovariectomizadas y con síndrome metabólico ovariectomizadas con 4 μ g de ácido araquidónico, en presencia o ausencia de indometacina, NS398 y ozagrel. T= testigo, SM= síndrome metabólico, Ovx=ovariectomizadas y Cas=castradas

MACHOS

La Δ -presión de perfusión se incrementó significativamente ($p < 0.001$) en el riñón de las ratas con síndrome metabólico en comparación con la de Δ -presión de perfusión en las ratas testigo (107.0 ± 10.0 mmHg vs. 49.5 ± 6.8 mmHg, respectivamente). La castración no modificó la Δ -presión de perfusión en las ratas testigo castrados (47.0 ± 8.2 mmHg) pero en las ratas con síndrome metabólico castrados la Δ -presión de perfusión disminuyó (59.8 ± 11.1 mmHg, $p < 0.001$) en comparación con las ratas con síndrome metabólico.

Al perfundir $4 \mu\text{g}$ de ácido araquidónico en presencia de $10 \mu\text{M}$ de indometacina, inhibidor no selectivo de COX-1 y 2, la Δ -presión de perfusión disminuyó en el riñón de las ratas testigo (41%) en relación a la Δ -presión de perfusión obtenida sin el inhibidor con diferencia significativa ($p = 0.01$). La Δ -presión de perfusión decreció en el riñón de las ratas con síndrome metabólico (89%) en comparación con la Δ -presión de perfusión sin la indometacina, con diferencia significativa ($p < 0.001$). Al inhibir las COX con indometacina, en los riñones de las ratas testigo castrados y con síndrome metabólico castrados, la Δ -presión de perfusión fue menor (39% y 51% respectivamente) a diferencia de la Δ -presión de perfusión registrada sin el inhibidor.

Además la figura muestra la Δ -presión de perfusión lograda al perfundir $4 \mu\text{g}$ de ácido araquidónico en presencia de NS398 inhibidor selectivo de COX 2.

La Δ -presión de perfusión en los riñones de las ratas macho testigo y con síndrome metabólico castrados no presentó cambios significativos en relación con la Δ -presión de perfusión alcanzada sin el inhibidor (20%, 18% respectivamente), la misma tendencia se registró con $100 \mu\text{M}$ ozagrel (19%, 14%, respectivamente). En las ratas testigo castrados la Δ -presión de perfusión exhibió una disminución significativa al utilizar el antagonista NS398, (50%), pero con el ozagrel la Δ -presión de perfusión no se modificó significativamente (25%).

En los riñones de las ratas con síndrome metabólico castrados la Δ -presión de perfusión decreció (66% y 42%), con diferencia significativa ($p < 0.01$), en presencia del NS398 y el ozagrel en relación con la Δ -presión de perfusión obtenida sin el inhibidor. (Los resultados se presentan en la Figura 5)

4 Machos

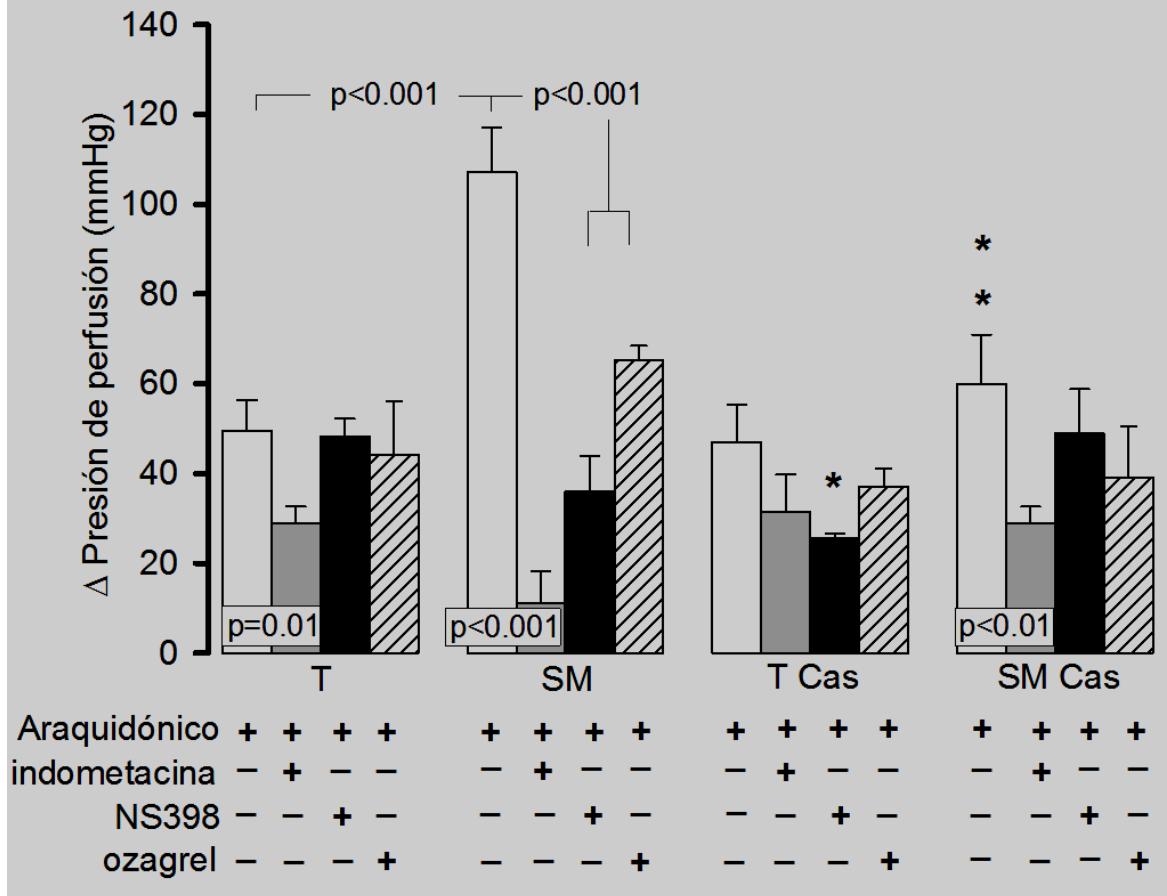


Figura 5. Δ -presión de perfusión obtenida al perfundir el riñón derecho de las ratas macho testigo, con síndrome metabólico, testigo castrados y con síndrome metabólico castrados con 4 μ g de ácido araquidónico, en ausencia o presencia de indometacina, NS398 y ozagrel. T= testigo, SM= síndrome metabólico, Ovx=ovariectomizadas y Cas=castradas

*testigo castrados + ácido araquidónico vs testigo castrados + ácido araquidónico + NS398 $p < 0.001$

**síndrome metabólico vs síndrome metabólico castrados $p < 0.001$

EXPRESIÓN DE COX-1

La expresión de COX-1 no mostró cambios significativos en las ratas hembra testigo, con síndrome metabólico y testigo ovariectomizadas pero en las ratas con síndrome metabólico ovariectomizadas se incrementó la expresión de la COX-1 significativamente en comparación con la de las ratas con síndrome metabólico ($p=0.01$).

Las ratas macho con síndrome metabólico presentaron incremento significativo en la expresión de la COX-1 vs las ratas macho testigo y con síndrome metabólico castrados con diferencia significativa ($p=0.03$ y $p=0.01$, respectivamente), (Figura 6).

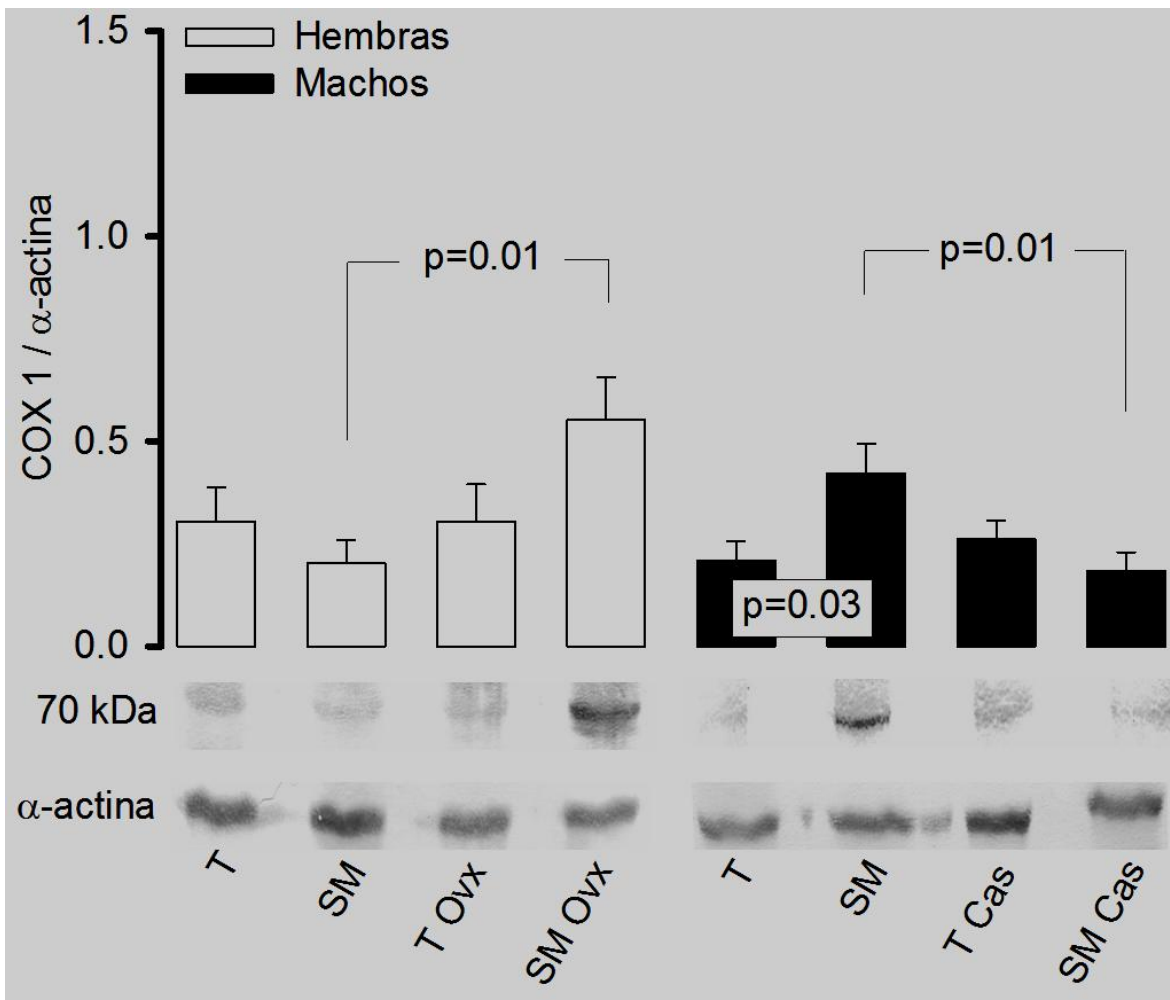


Figura 6. Expresión de la COX-1 en agregados de membrana celular de riñón de las ratas hembra y macho. T= testigo, SM= síndrome metabólico, OvX=ovariectomizadas y Cas=castradas

EXPRESIÓN DE COX-2

No hubo diferencia en la expresión de la COX-2 en las ratas hembra testigo, con síndrome metabólico y testigo ovariectomizadas pero en las ratas con síndrome metabólico ovariectomizadas se incrementó la expresión de la COX-2 significativamente en comparación con la de las ratas hembra con síndrome metabólico ($p=0.01$).

Las ratas macho con síndrome metabólico presentaron un incremento significativo en la cantidad de COX-2 en relación con la de las ratas macho testigo y con síndrome metabólico castrados con diferencia significativa ($p=0.02$).

La castración no modificó la expresión en las ratas testigo (Figura 7).

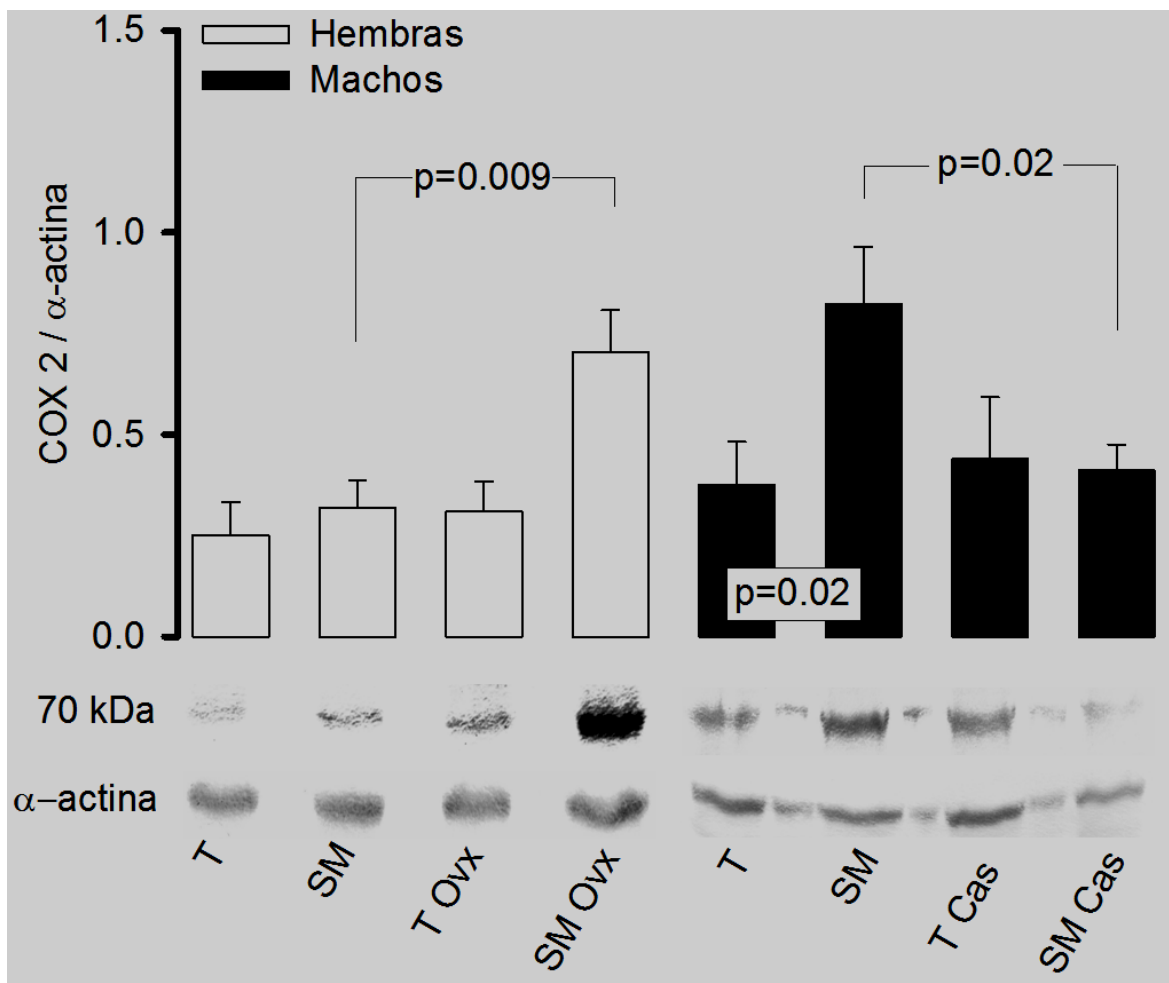


Figura 7. Expresión de la COX-2 en agregados de membrana celular de riñón de las ratas hembra y macho. T= testigo, SM= síndrome metabólico, Ovx=ovariectomizadas y Cas=castradas

ANÁLISIS DE LOS METABOLITOS DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO EN ELUIDO DE RIÑÓN

6-KETO-PGF_{1α} METABOLITO ESTABLE DE LA COX-1

En las ratas hembra y macho no hubo cambios significativos en ninguno de los grupos, (Tabla 2).

PGE₂ METABOLITO ESTABLE DE LA COX-2

En ninguno de los grupos de ratas hembra hubo cambios significativos.

En las ratas macho con síndrome metabólico la cantidad de PGE₂ fue mayor en relación con la de las ratas macho testigo y con síndrome metabólico castrados con diferencia significativa ($p=0.04$), (Tabla 2).

TXB₂ METABOLITO ESTABLE DE LA SINTASA DE TROMBOXANO

El TXB₂ fue significativamente mayor en las ratas hembra con síndrome metabólico ovariectomizadas en comparación con las ratas hembra con síndrome metabólico ($p<0.01$).

En las ratas macho con síndrome metabólico la cantidad de TXB₂ mostró un incremento significativo vs las ratas macho testigo y con síndrome metabólico castrados ($p=0.004$), (Tabla 2).

Tabla 2. Metabolitos del ácido araquidónico en eluidos de Riñón

(ng/ml)	♀				♂			
	<i>T</i>	<i>SM</i>	<i>T Ovx</i>	<i>SM Ovx</i>	<i>T</i>	<i>SM</i>	<i>T Cas</i>	<i>SM Cas</i>
6-keto-PG_{1α}	0.51 ± 0.15	0.51 ± 0.08	0.38 ± 0.06	0.53 ± 0.21	0.62 ± 0.14	0.54 ± 0.10	0.55 ± 0.17	0.30 ± 0.15
PGE₂	0.49 ± 0.04	0.42 ± 0.06	0.48 ± 0.11	0.78 ± 0.24	0.64 ± 0.13	1.10 ± 0.15†	0.66 ± 0.10	0.65 ± 0.06†
TXB₂	0.38 ± 0.13	0.40 ± 0.05	0.45 ± 0.07	0.97 ± 0.23*	0.49 ± 0.14	1.48 ± 0.17**	0.46 ± 0.13	0.43 ± 0.18**

T= testigo, SM= síndrome metabólico, Ovx=ovariectomizadas y Cas=castradas

♀: * p=0.01 vs SM

♂: ** p=0.04 T vs SM y SM vs SM Cas, † p=0.004 T vs SM y SM Cas vs SM Cas

ANÁLISIS DE LOS METABOLITOS DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO EN ORINA

FIGURA 8A. CANTIDAD DE 6-KETO-PGF_{1α}

En las ratas hembras no hubo cambios significativos en ninguno de los grupos, pero en las ratas macho con síndrome metabólico se registró decremento significativo en comparación con las ratas testigo y con síndrome metabólico castrados ($p < 0.001$).

FIGURA 8B. CANTIDAD DE PGE₂

Las ratas hembra con síndrome metabólico ovariectomizadas presentaron incremento significativo en relación con las ratas hembra con síndrome metabólico ($p = 0.04$).

En las ratas macho con síndrome metabólico la cantidad de PGE₂ fue mayor en analogía con las ratas macho testigo y con síndrome metabólico castrados con diferencia significativa ($p = 0.01$ y $p = 0.04$, respectivamente).

FIGURA 8C. CANTIDAD DE TXB₂

La concentración de TXB₂ fue significativamente mayor en las ratas hembra con síndrome metabólico ovariectomizadas vs las ratas hembra con síndrome metabólico y testigo ovariectomizadas ($p = 0.04$ y $p = 0.01$, respectivamente).

En las ratas macho con síndrome metabólico la cantidad de TXB₂ mostró un incremento significativo vs las ratas macho testigo y con síndrome metabólico castrados ($p < 0.001$ y $p = 0.01$, respectivamente).

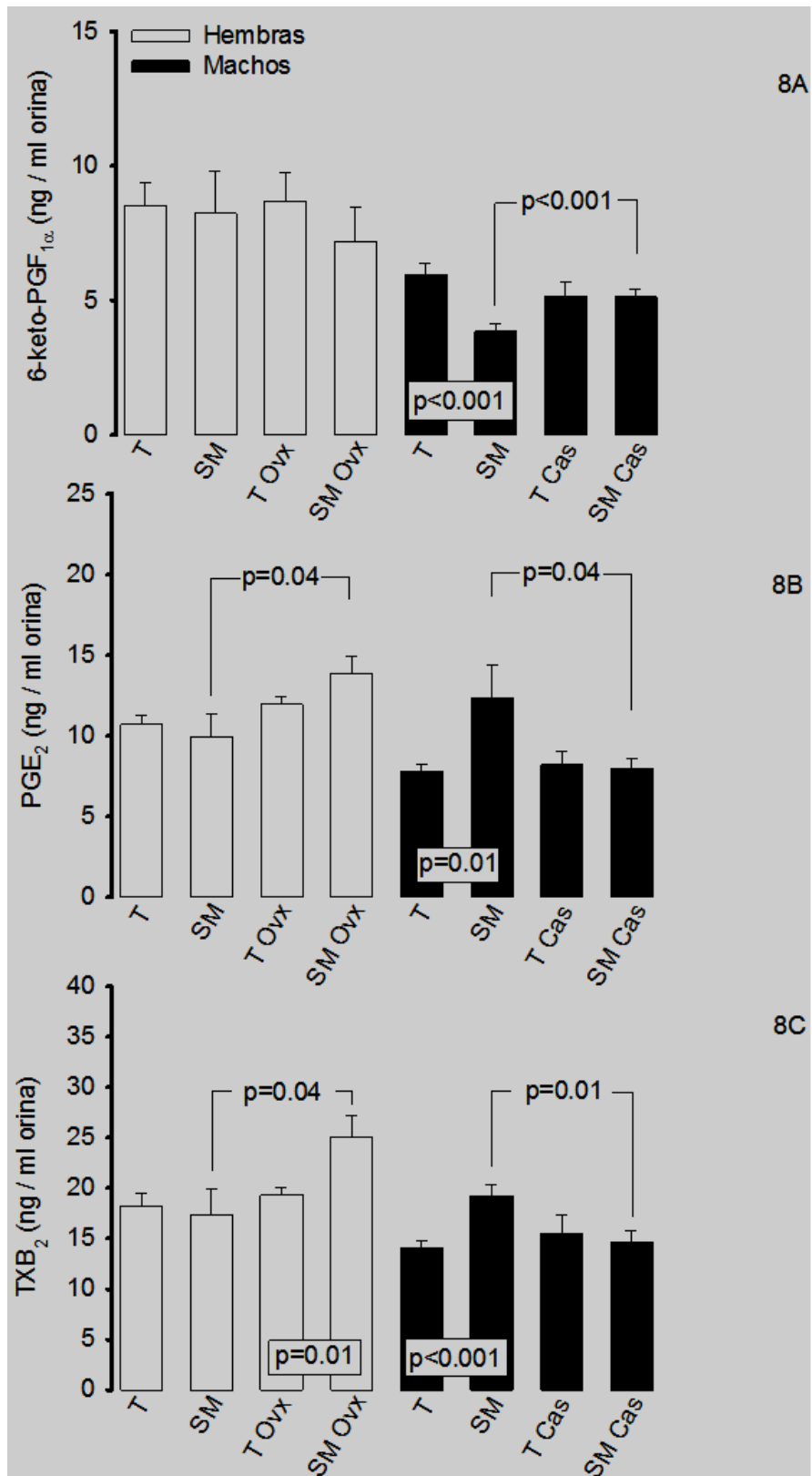


Figura 8A) Concentración de 6-KETO-PGF_{1α} , B) PGE₂ y C) TXB₂ en orina. T= testigo, SM= síndrome metabólico, Ovx=ovariectomizadas y Cas=castradas

DISCUSIÓN

Con mayor frecuencia las diversas alteraciones que conforman el síndrome metabólico cobran la vida de miles de personas cada año en todo el mundo, por lo que el comprender con claridad las vías metabólicas involucradas es de gran interés para la investigación básica y clínica. Una de las vías celulares involucradas en esta patología es la del metabolismo del ácido araquidónico en la que los metabolitos de este ácido graso intervienen de manera directa o indirecta en órganos y sistemas afectados como el cardiovascular y el renal, entre otros.

Además, los prostanoïdes participan en la regulación del tono vascular, liberación de renina, el metabolismo del sodio en la hemodinámica renal y la presión arterial, entre otros. En cada uno de estos sistemas involucrados las hormonas sexuales participan limitando o favoreciendo cada uno de ellos⁶⁸. El objetivo del estudio fue determinar la participación del metabolismo del ácido araquidónico, en particular la vía de la ciclooxigenasa, en el desarrollo de la patología renal observada en los animales con síndrome metabólico, influenciada por las hormonas sexuales.

Los resultados de este estudio sugieren una fuerte asociación entre el síndrome metabólico, la vía del ácido araquidónico en la disfunción renal y las hormonas sexuales. En aorta y en arteria mesentérica otros investigadores han descrito resultados semejantes en modelos de hipertensión en ratas, inducida por alto consumo de fructosa y el efecto de la castración⁶⁹.

Presión arterial sistólica

En resultados previos nuestro grupo ha demostrado que las ratas macho con síndrome metabólico desarrollan un incremento en la presión arterial sistólica después de 4 ó 5 meses del tratamiento con sacarosa en comparación con las ratas hembra con síndrome metabólico de la misma edad, en las cuales la presión arterial sistólica se incrementa más tardíamente⁷⁰.

En el presente estudio se observó una tendencia similar. El incremento de la presión arterial sistólica en las ratas hembra con síndrome metabólico ovariectomizadas y en las ratas macho con síndrome metabólico y el decremento en las ratas macho con síndrome metabólico castrados, respectivamente,

sugieren que las hormonas sexuales son necesarias para regular la presión arterial sistólica^{71,72}.

Otros investigadores han descrito que las ratas macho SHR tienen la presión arterial sistólica más elevada que las hembra SHR y que la castración en las macho disminuye la presión arterial sistólica⁷³. Se ha descrito que los estrógenos pueden disminuir la síntesis y liberación de PG vasoconstrictoras, las cuales están involucradas en el incremento de la presión arterial sistólica⁷⁴, pero que la testosterona induce un efecto opuesto⁷⁵.

Los andrógenos son necesarios para el desarrollo de hipertensión en modelos de rata macho con una dieta alta en fructosa, la testosterona puede incrementar la actividad de la tromboxano-sintasa con un subsiguiente aumento de tromboxano, el cual contribuye a la elevación de la presión arterial sistólica⁷⁶⁻⁷⁷.

La disminución de la presión arterial sistólica en las ratas macho con síndrome metabólico castrados y el incremento en las ratas hembras con síndrome metabólico ovariectomizadas hace evidente la participación de las hormonas sexuales sobre la función endotelial y las enzimas presentes en el endotelio tales como la sintasa del NO, la COX-1 y 2 entre otras⁷⁸.

El endotelio participa de manera directa en la regulación de la presión arterial sistólica. Por otra parte una dieta rica en fructosa o sacarosa induce síndrome metabólico en modelos animales de experimentación; el síndrome metabólico se relaciona con daño renal⁷⁰⁻⁷¹. El daño renal asociado con el incremento de la presión arterial sistólica contribuye a la insuficiencia renal⁷⁹

Albuminuria

La albuminuria se considera un marcador de daño renal⁸⁰. El incremento en la excreción de proteína urinaria en las ratas hembra con síndrome metabólico ovariectomizadas y en las ratas macho con síndrome metabólico en comparación con sus respectivos testigos y la disminución en las ratas macho con síndrome metabólico castrados, sugieren que las hormonas sexuales participan en la progresión del daño renal ocasionado en el síndrome metabólico⁸¹. El deterioro de la función renal evidenciado por proteinuria, incremento de la permeabilidad glomerular y glomeruloesclerosis⁸², es más rápido en hombres que en mujeres de

la misma edad⁷³⁻⁷⁴. Reckelhoff y colaboradores⁸³ han demostrado que los andrógenos modifican la hemodinámica renal, participan en el incremento de la presión arterial y proteinuria en ratas macho SHR⁷⁸ y que la castración disminuye la presión arterial, la proteinuria y preserva la función renal⁸³. Las hormonas sexuales probablemente participan en la síntesis y degradación de los componentes de la matriz extracelular que se asocian con cambios en la carga de la membrana basal glomerular⁸⁴⁻⁸⁶.

En este trabajo demostramos que la eliminación de la testosterona por efecto de la castración en las ratas macho con síndrome metabólico disminuyó la albuminuria; la eliminación de los estrógenos por la ovariectomía en las ratas hembra con síndrome metabólico la aumentó. Se ha descrito que la testosterona favorece el incremento del TXA₂, el cual induce la síntesis de colágena tipo IV, esta proteína participa en el desarrollo de daño renal⁸⁶⁻⁸⁷. Los datos obtenidos en nuestro trabajo apoyan lo anteriormente descrito⁸⁶⁻⁸⁸. La castración favoreció una disminución de TXB₂ y la ovariectomía lo incrementó tanto en la orina como en el eluido de riñón.

Metabolismo del ácido araquidónico en el riñón aislado y perfundido

En el riñón de las ratas macho con síndrome metabólico, la perfusión con ácido araquidónico incrementó la Δ -presión de perfusión en comparación con las ratas macho testigo; en presencia de indometacina se observó decremento significativo en la Δ -presión de perfusión. Los resultados sugieren que los metabolitos del ácido araquidónico sintetizados por la vía de las COX-1 y 2, contribuyen a la vasoconstricción observada en el síndrome metabólico. Se ha descrito que las isoformas de COX se asocian con la síntesis de TXA₂⁸⁹. La supresión de las hormonas sexuales por gonadectomía disminuyó la Δ -presión de perfusión en los riñones de las ratas macho con síndrome metabólico castrados y la aumentó en las ratas hembra con síndrome metabólico ovariectomizadas, lo cual sugiere que las hormonas sexuales participan en la regulación del metabolismo del ácido araquidónico⁸⁴⁻⁹⁰. Otros investigadores han descrito resultados similares en aorta en modelos experimentales de hipertensión inducidos por fructosa y el efecto de la castración^{56, 91}. Fortepiani y colaboradores⁹² investigaron el daño renal

ocasionado por la edad y la supresión de andrógenos en ratas SHR, demostrando que la castración mejora la filtración glomerular, la resistencia vascular renal y la proteinuria.

En presencia de NS398 la Δ -presión de perfusión disminuyó en las ratas hembra con síndrome metabólico ovariectomizadas y en las ratas macho con síndrome metabólico en comparación con la Δ -presión de perfusión obtenida sin el inhibidor, lo que sugiere que la COX-2 participa en la regulación de la Δ -presión de perfusión y que las hormonas sexuales pueden regular esta isoforma⁹³.

Se ha descrito que las PG sintetizadas por COX-2 pueden regular la síntesis y liberación de angiotensina II, la cual está involucrada en el incremento de la vasoconstricción de la vasculatura renal en la nefrectomía 5/6⁹⁴. En presencia de ozagrel la Δ -presión de perfusión disminuyó en las ratas macho con síndrome metabólico en comparación con la Δ -presión de perfusión sin el inhibidor, este resultado sugiere que la vía metabólica COX/tromboxano sintasa está alterada en las ratas macho con síndrome metabólico. El TXA₂ es un potente vasoconstrictor que puede ser sintetizado por el endotelio⁹⁵. Asimismo los cambios en la Δ -presión de perfusión obtenida al perfundir ácido araquidónico indican cambios en la resistencia vascular renal; la resistencia vascular depende en parte de las sustancias sintetizadas y liberadas por el endotelio²⁴. En modelos experimentales de hipertensión y de síndrome metabólico inducidos por alto consumo de fructosa se ha demostrado que el TXA₂ está incrementado⁶². La Δ -presión de perfusión en las ratas macho con síndrome metabólico castradas no mostró cambios significativos en presencia de ozagrel o NS398; este resultado indica que la eliminación de testosterona por castración puede modificar la actividad de la vía enzimática COX-2/tromboxano sintasa.

En el modelo de rata macho gonadectomizada y con alto consumo de fructosa se ha observado disminución significativa de TXA₂ en comparación con ratas macho falsamente operadas⁷⁵. Por lo que respecta a factores que contribuyen al daño renal se han descrito los siguientes: la PGE₂ y el TXA₂ incrementan la

transcripción de colágena tipo IV, laminina y fibronectina, proteínas involucradas en el engrosamiento de la membrana basal glomerular, característica predominante en el daño renal⁸⁶. Nuestros resultados evidencian incremento en la PGE₂ y TXA₂ en las ratas macho con síndrome metabólico y en las ratas hembra con síndrome metabólico ovariectomizadas. Un estudio realizado en pacientes diabéticos tratados con ozagrel, mostró que hubo disminución en la proteinuria; estos resultados sugieren que el TXA₂ participa en la insuficiencia renal⁷¹. Por otra parte se ha asociado la dislipidemia con progresión del deterioro renal⁹⁶. Diferentes estudios han mostrado la relación entre la reducción de la dislipidemia y la disminución del daño renal⁹⁷.

Las ratas macho con síndrome metabólico desarrollan dislipidemia caracterizada por hipertrigliceridemia e incremento de los ácidos grasos libres no esterificados los cuales probablemente contribuyen al deterioro de la función renal^{59, 61, 98}.

Ácido araquidónico libre no esterificado en homogeneizado de riñón

La concentración de ácido araquidónico libre no esterificado en los homogeneizados de riñón disminuyó en las ratas macho con síndrome metabólico en comparación con las ratas macho testigo; resultados previos de nuestro laboratorio ya han descrito esta tendencia^{67,98}.

La castración incrementa la concentración del ácido araquidónico en las ratas macho con síndrome metabólico castrados y testigo castrados, en comparación con las ratas macho con síndrome metabólico y testigo. La ovariectomía en las ratas hembra con síndrome metabólico disminuyó la cantidad de ácido araquidónico en relación con la de las ratas hembra con síndrome metabólico intactas. Estos cambios en la concentración del ácido araquidónico probablemente se deban a alteración en la expresión y actividad de la PLA₂, enzima clave en la liberación del ácido araquidónico de los fosfolípidos de la membrana celular^{24, 53, 56}. Se ha descrito que el estradiol puede incrementar la actividad de la PLA₂⁸⁷. Sin embargo, el análisis densitométrico de las inmunotransferencias no presentó cambios significativos en ninguno de los grupos experimentales, tanto en las ratas hembra como machos, (los datos no se muestran). El incremento en las expresiones de la COX-1 y 2 en los agregados de

membrana celular de riñón en las ratas hembra con síndrome metabólico ovariectomizadas y en las ratas macho con síndrome metabólico y la disminución en la expresión de dichas enzimas en las ratas macho con síndrome metabólico castrados en comparación con sus testigos, respectivamente, pueden contribuir a los cambios observados en la concentración del ácido araquidónico.

La disminución del ácido araquidónico en el homogeneizado de riñón en las ratas hembra con síndrome metabólico ovariectomizadas y en las ratas macho con síndrome metabólico puede ser un factor determinante en la síntesis de PG vasoconstrictoras involucradas en el incremento de la presión arterial sistólica en el síndrome metabólico^{56,99}.

El aumento del ácido araquidónico en las ratas macho testigo castrados y con síndrome metabólico castrados es debido probablemente a la disminución observada en la expresión de las isoformas de COX, este incremento del ácido araquidónico puede favorecer una mayor fluidez de la membrana celular al ser reinsertado en los fosfolípidos, sin embargo este análisis no se realizó en este estudio.

Se ha descrito que las células de la medula renal presentan abundantes vacuolas, ricas en ácidos grasos poliinsaturados entre ellos el ácido araquidónico¹⁰⁰⁻¹⁰¹. Muirhead y colaboradores demostraron que un trasplante de medula renal pero no de corteza, reduce la presión arterial sistólica en animales hipertensos¹⁰¹.

Expresión de las isoformas de COX

Por otra parte, la supresión de los estrógenos y la testosterona por efecto de la gonadectomía en las ratas hembra con síndrome metabólico ovariectomizadas y en las ratas macho con síndrome metabólico castrados en comparación con sus testigos, incrementó y disminuyó, respectivamente, la expresión de la COX-1 y 2. Se ha descrito que las hormonas sexuales pueden modificar la expresión y actividad de las dos isoformas de COX/tromboxano sintasa^{90, 102}. El aumento observado en la expresión de la COX-1 y 2 en las ratas hembra con síndrome metabólico ovariectomizadas y en las ratas macho con síndrome metabólico

favoreció un incremento en las síntesis de PGE₂ y TXA₂, involucradas en la vasoconstricción de la vasculatura renal¹⁰³. Las PG sintetizadas en las células de la médula renal por COX tales como la PGE₂ y TXA₂ están involucradas en la hemodinámica renal, en la regulación del tono vascular y en el balance de sodio, agua y renina⁸².

La testosterona puede incrementar la respuesta de agentes presores como el TX, involucrado en el síndrome metabólico e inhibir la sintasa de NO⁵⁶, contribuyendo a la vasoconstricción de las arteriolas renales^{91, 104}.

En un estudio, donde se valoró el daño renal por isquemia y reperfusión asociado al género, en un modelo de ratón, se demostró que la ausencia o presencia de testosterona se asocia con recuperación o no del daño por isquemia y reperfusión⁷⁷.

La testosterona puede indirectamente estimular la reabsorción de sodio, vía el túbulo proximal renal⁸⁵ y los componentes del sistema renina angiotensina¹⁰⁵⁻¹⁰⁶, lo que contribuye al incremento de la presión arterial sistólica y al daño renal. Los estrógenos pueden disminuir la actividad del sistema renina angiotensina^{91,107}. Además se ha demostrado que los metabolitos, productos de la actividad de la COX-2 sobre el ácido araquidónico, pueden incrementar la actividad del sistema renina angiotensina; un aumento de angiotensina II contribuye a la elevación de la presión arterial sistólica y al daño renal en el síndrome metabólico^{105,106}.

Prostaglandinas

Se han asociado los metabolitos estables de COX-1 y 2 como el 6-keto-PGF_{1α} y la PGE₂ al decremento y al incremento, respectivamente, de la presión arterial sistólica y al daño renal en modelos experimentales de hipertensión por alto consumo de fructosa^{69, 108}. Nuestros resultados demuestran decremento en las ratas macho con síndrome metabólico de 6-keto-PGF_{1α} en comparación con las ratas macho testigo y con síndrome metabólico castrados y un incremento de PGE₂ y TXA₂ en las ratas hembra con síndrome metabólico ovariectomizadas y

en las ratas macho con síndrome metabólico en comparación con sus respectivos grupos testigo. Estos resultados sugieren que las hormonas sexuales participan en la regulación del metabolismo del ácido araquidónico en el síndrome metabólico, favoreciendo o disminuyendo la síntesis de PG vasoactivas involucradas en la regulación de la microvasculatura renal^{23,72,104} y, como consecuencia, la mejoría o el deterioro de la función renal⁶¹. Además los resultados sugieren que la vía de las isoformas de COX/tromboxano sintasa se encuentra alterada y se desvia en el síndrome metabólico a una mayor síntesis y liberación de metabolitos como el TXB₂ y la PGE₂, involucrados en el deterioro de la función renal^{108, 86}.

CONCLUSIONES

- 1.- Los resultados sugieren que el metabolismo del ácido araquidónico se encuentra alterado en el riñón de la rata con síndrome metabólico.
- 2.- En las ratas hembra con síndrome metabólico los estrógenos y principalmente el estradiol inducen un efecto protector contra los cambios ocasionados por el alto consumo de sacarosa al metabolismo del ácido araquidónico en el riñón.
- 3.- La ovariectomía revierte algunos de estos efectos benéficos, induciendo incremento de la albuminuria, la Δ -presión de perfusión y la sobre-expresión de las isoformas de COX, entre otros.
- 4.- La ausencia de testosterona en las ratas macho con síndrome metabólico modifica las alteraciones observadas en el metabolismo del ácido araquidónico en comparación con su presencia, por ejemplo, disminuyendo la presión arterial sistólica, la Δ -presión de perfusión y la expresión de las isoformas de COX, lo cual contribuye a mejorar la función renal.

REFERENCIAS

1. Guyton A: Tratado de Fisiología Médica. Ed Interamericana 1998:26;343-360.
2. Robbins S, Cotran R, Kumar V, Tucker C. Patología estructural y funcional. Ed McGraw-Hill/interamericana 2005:7ª. Edición.
3. Anderson S, Brenner M. The role of intraglomerular pressure in the initiation and progression of renal disease. J Hypertens 1986;4:S236-S238.
4. Kaplan N. Microalbuminuria: A risk factor for vascular and renal complications of hypertension. Am J Med 1992;92;85-125.
5. Rennke G, Anderson S, Brenner M. Structural and functional correlations in the progression of renal disease. In Renal Pathology. Ed Lippincot.1989;43-66.
6. Sánchez Torres G, Baños G. Hipertensión Arterial: Fisiopatología. Ed. Piensa. 2004;13:184-189.
7. Drucker Colín R: Fisiología Médica. Ed Manual Moderno 2005;198.
8. Anderson S, Rennke G, Brenner M. Antihypertensive therapy must control glomerular hypertension to limit glomerular injury. J Hypertens 1986;4:S242-S244.
9. Exaire E, Alcocer L, González A, Alexanderson E, Rodríguez J. Problemas especiales, Hipertensión arterial y cardiopatía isquémica. Rev Mex Cardiol 2001;12:55-63.
10. Zatz R, Meyer T, Rennket H, and Brenner B Predominance of hemodynamic rather than metabolic factors in the pathogenesis of diabetic glomerulopathy Proc Natl Acad Sci 1985;82:5963-5967.
11. Hosstetter H, Troy L, Brenner H. Glomerular hemodynamics in experimental diabetes mellitus. Kidney Int 1981;19:410-415.

12. Baños G, El Hafidi M. Models of experimental hypertension In: Benhagen, E.,F. (Ed.), Hypertension New Research. Nova Science Publishers Inc., New York. 2005:1-46.
13. Locatelli F, Pozzoni P, Del Vecchio L. Renal manifestations in the metabolic syndrome J Am Soc Nephrol 2006;17:S81-S85.
14. Crimi E, Ignarro J, Napoli C. Microcirculation and oxidative stress. Free Radic Res 2007;41:1364-1375.
15. Meaney E. El papel del endotelio en las enfermedades cardiovasculares Ed. Grupo Mind México Tomo1 1999.
16. Gryglewski J, Botting M, Vane R: Mediators produced by the endothelial cell. Hypertension 1988;12:530-548.
17. Thyberg J, Hedin U, Sjolund M, Palmberg L, Bottger BA: Regulation of differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells. Arteriosclerosis 1990;10:966-990.
18. Dubois R, Abramson S, Crofford L, Gupta R, Simon L, Van de Putte L, Lipsky P. Cyclooxygenase in biology and disease. FASEB J 1998;12:1063-1073.
19. Escalante B, McGiff J, Oyekan A. Role of cytochrome p-450 arachidonate metabolites in endothelin signaling in rat proximal tubule. Am J Physiol Renal Physiol 2002;282:F144-150.
20. Yamada M, Omata K, Abe F, Ito S, Abe K. Changes in prostacyclin, thromboxane A2 and F2-isoprostanes, and influence of eicosapentaenoic acid and antiplatelet agents in patients with hypertension and hyperlipidemia. Immunopharmacology 1999;44:193-198.
21. Marnett L, Rowlinson S, Goodwin D, Kalgutkar A, Lanzo C. Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. J Biol Chem 1999;274:22903-22906.

22. Minuz P, Jiang H, Fava C, Turolo L, Tacconelli S, Ricci M, Patrignani P, Morganti A, Lechi A, McGiff JC. Altered release of cytochrome p-450 metabolites of arachidonic acid in renovascular disease. *Hypertension* 2008;5:1379-1385.
23. Pomposiello S, Quilley J, Carroll M, Falck J, McGiff J. 5,6-Epoxyeicosatrienoic acid mediates the enhanced renal vasodilation to arachidonic acid in the SHR. *Hypertension* 2003;42:548-554.
24. Vázquez-Cruz B, López P, Talamás-Rohana P, Escalante B. Increased renal vasoconstriction and gene expression of cyclooxygenase-1 in renovascular hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000;36:577-583.
25. Harris R, McKanna J, Akai Y, Jacobson H, DuBois R, Breyer M. Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa in rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest* 1994;94:2504-2510.
26. Hernández J, Astudillo H, Escalante B. Angiotensin II stimulates cyclooxygenase-2 mRNA expression in renal tissue from rats with kidney failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;282:592-598.
27. Tuncer M, Vanhoutte PM. Role of prostanoids in the increased responsiveness and delayed tachyphylaxis to serotonin in the kidney of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertension* 1991;9:623-629.
28. Hishinuma T, Koseki Y, Murai Y, Yamazaki T, Suzuki K, Mizugaki M. Urinary thromboxane A₂/prostacyclin balance reflects the pathological state of a diabetic. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 1999;58:263-271.
29. Kaergel E, Muller D, Honeck H, Theuer J, Shagdarsuren E, Mullally A, Luft F, Schunck W. P450-dependent arachidonic acid metabolism and angiotensin II-induced renal damage. *Hypertension* 2002;40:273-279.
30. Honeck H, Gross V, Erdmann B, Kargel E, Neunaber R, Milia A, Schneider W, Luft C, Schunck H. Cytochrome P450-dependent renal arachidonic acid metabolism in desoxycorticosterone acetate-salt hypertensive mice. *Hypertension* 2000;36:610-616.
31. Fukao M, Hattori Y, Kanno M, Sakuma I, Kitabatake A. Evidence against a role of cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolites in endothelium-

dependent hyperpolarization by acetylcholine in rat isolated mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 1997;120:439-446.

32. Roman R. P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol Rev* 2002;82:131-185.

33. Castelli P. Cardiovascular disease in women. *Am J Obstet Gynecol* 1998;6:1553-1560.

34. Colditz a, Willet C, StampfnerJ. Menopause and the risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med* 1987;316:1105-1110.

35. Sullivan M, Van der Zwagg R, Hughes P. Estrogen replacement and coronary artery disease. *Arch Int Med* 1990;150:2557-2562.

36. Stampfner J, Colditz A, Willet C. Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease: ten year follow-up from the Nurses Health Study. *N Engl J Med* 1991;325:756-762.

37. Adams F, Sueta A, Gheorghiade M, O'Connor M, Schwartz A, Koch G, Uretsky B, Swedberg K, McKenna W, Soler-Soler J, Califf M. Gender differences in survival in advanced heart failure. Insights from the first study. *Circulation* 1999;14:1816-1821.

38. Bikkina M, Larson M, Levy D. Prognostic implications of asymptomatic ventricular arrhythmias: The Framingham Heart Study. *Ann Intern Med* 1992;117:990-996.

39. Cupples A, Gagnon R, Kannel B. Long and short-term risk of sudden coronary death. *Circulation* 1992;85:11-18.

40. Lobo A. Cardiovascular implications of estrogen replacement therapy. *Obstet Gynecol* 1990;75:185-255.

41. Haarbo J, Marslew U, Gotfredsen A, Christiansen C. Postmenopausal hormone replacement therapy prevents central distribution of body fat after menopause. *Metabolism* 1991;40:1323-1326.

42. Fischer G, Swain M. Effect of sex hormones on blood pressure and vascular connective tissue in castrated and non castrated male rats. *Am J Physiol* 1977;232:H617-H621.

43. Node K, Kitakaze M, Kosaka H, Minamino T, Sato H, Kuzuya T, Hori T. Roles of NO and Ca²⁺- activated K⁺ channels in coronary vasodilation induced by 17 β -estradiol in ischemic heart failure. *FASEB J* 1997;11:793-799.
- 44.-Rosselli M, Imthurm B, Macas E, Keller J, Dubey K. Circulating nitrite/nitrate levels increase with follicular development; indirect evidence for estradiol mediated NO release. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;202:1543-1552.
45. Baños G, Pérez I, El Hafidi M. Medicinal agents in the metabolic syndrome. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2008;6:237-252.
46. Hiroaki K, Motoyama T, Kugiyama K. Gender difference in improvement of endothelium dependent vasodilation after estrogen supplementation. *J Am Coll Cardiol* 1997;30:914-919.
47. Kato T, Iwama Y, Iokumura K, Hashimoto H, Ito T, Satake T. Prostaglandin H₂ may be the endothelium-derived contracting factor released by acetylcholine in the aorta of the rat. *Hypertension* 1990;15:475-481.
48. Kumai T, Tanaka M, Watanabe M, Nakura H, Kobayashi S. Influence of androgen on tyrosine hydroxylase mRNA in adrenal medulla of spontaneous hypertensive rats. *Hypertension* 1995;26:208-212.
49. Kumai T, Tanaka M, Watanabe M, Matsumoto C, Kobayashi S. Possible involvement of androgens in increased norepinephrine synthesis in blood vessels of spontaneous hypertensive rats. *Jpn J Pharmacol* 1994;66:439-444.
50. Gong G, Johnson M, Pettinger A. Testosterone regulation of renal $\alpha_2\beta$ -adrenergic receptor mRNA levels. *Hypertension* 1995;25:350-355.
51. Smyth D, Phelan L, Stabko C. Renal α_2 -adrenoreceptors in New Zealand genetically hypertensive rats. *J Auton Pharmacol* 1992;12:73-80.
52. Stepniakowski K, Godfriend T, Egan B: Fatty acids enhance vascular α -adrenergic sensitivity. *Hypertension* 1995;25:774-778.
53. Wu F, Eckardstein A. androgens and coronary artery disease. *Endocr Rev* 2003;24:183-217.

54. Reaven G, Ho H. Sugar-induced hypertension in Sprague-Dawley rats. *Am J Hypertens* 1991;4:610-614.
55. Baños G, Carvajal K, Cardoso G. Vascular reactivity and effect of serum in a rat model of hypertriglyceridemia and hypertension. *Am J Hypertens* 1997;10:379-388.
56. Pérez I, El Hafidi M, Zamora-González J, Infante O, Chavira R, Baños G. Modulation of aortic vascular reactivity by sex hormones in a male rat model of metabolic syndrome. *Life Sci* 2007;80:2170-2180.
57. El Hafidi M, Baños G. In vivo plasma lipid oxidation in sugar-induced rat hypertriglyceridemia and hypertension. *Hypertension* 1997;30:624-628.
58. Pérez I, El Hafidi M, Sánchez C, Baños G. Effect of sugar-induced hypertension in rats on the pattern of serum arachidonic, dihomo-gamma-linoleic and linoleic acids. *Med Sci Res* 1999;27:847-848.
59. El Hafidi M, Valdez R, Baños G. Possible relationship between altered fatty acid composition of serum, platelets and aorta, and hypertension induced by sugar feeding in rats. *Clin Exp Hypertens* 2000;22:99-108.
60. Carvajal K, Baños G. Myocardial function and effect of serum in isolated heart from hypertriglyceridemic and hypertensive rats. *Clin Exper Hypertens* 2002;24:235-248.
61. Pérez I, Roque P, El Hafidi M, Diaz-Diaz E, Banos G. Association of renal damage and oxidative stress in a rat model of metabolic syndrome. Influence of gender. *Free Radic Res* 2009;12:1-11.
62. Galipeau D, Arikawa E, Sekirov I, McNeill J. Chronic thromboxane synthase inhibition prevents fructose-induced hypertension. *Hypertension* 2001;38:872-876.
63. BenGershom E. Screening for albuminuria: A case for estimation of albumin in urine. *Clin Chem* 1975;21:1795-1798.
64. Arraigada E. Fisiología Renal sito Web [www.idap.com.mx/Apuntes/Fisiologia/Renal\(4\).doc](http://www.idap.com.mx/Apuntes/Fisiologia/Renal(4).doc).

65. Tublin M, Tessier F, Murphy M. Correlation between renal vascular resistance, pulse pressure, and the resistive index in isolated perfused rabbit kidneys. *Radiology* 1999;23:258-264.
66. Folch L, Lees M, Sloane-Stanley C. A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. *J Biol Chem* 1957;226:497-509.
67. Pérez I, El Hafidi M, Carvajal K, Baños G. Castration modifies aortic vasoreactivity and serum fatty acids in a sucrose-fed rat model of metabolic syndrome. *Heart Vessels* 2009;24:147-155.
68. Sullivan J, Sasser J, Pollock D, Pollock J. Sexual dimorphism in renal production of prostanoids in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2005;45:406-511.
69. Busserolles J, Mazur A, Gueux E, Rock E, Rayssiquier Y. Metabolic syndrome in the rat: females are protected against the pro-oxidant effect of a high sucrose diet. *Exp Biol Med* 2002;227:837-842.
70. Baños G, Medina-Campos O, Maldonado P, Zamora J, Pérez I, Pavón N, Pedraza-Chaverrí J. Antioxidant enzymes in hypertensive and hypertriglyceridemic rats: effect of gender. *Clin Exp Hypertension* 2005;1:45-57.
71. Pérez I, El Hafidi M, Pavón N, Infante O, Avila MC, Baños G. Effect of gonadectomy on the metabolism of arachidonic acid in isolated kidney of a rat model of metabolic syndrome. *Metabolism* 2010;59:414-423.
72. Song D, Arikawa E, Galipeau D, Battle M, McNeill J. Androgens are necessary for the development of fructose-induced hypertension. *Hypertension* 2004;43:667-672.
73. Reckelhoff J, Zhang H, Granger J. Testosterone exacerbates hypertension and reduces pressure-natriuresis in male spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1998;31:435-439.
74. Okumura M, Imanishi M, Yamashita T, Yamamura Y, Kim S, Iwao H, Tanaka S, Fujii S. Renal production of thromboxane and prostaglandins in a rat model of type 2 diabetes. *Life Sci* 2000;66:371-377.

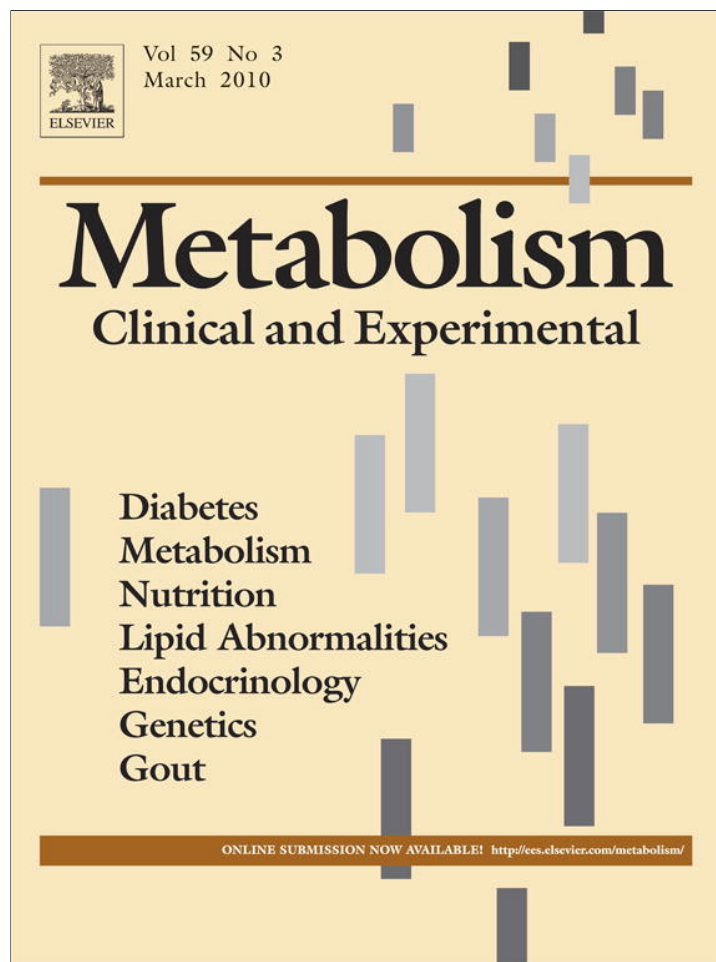
75. Park K, Kim J, Ahn Y, Bonventre A, Bonventre J. Testosterone is responsible for enhanced susceptibility of males to ischemic renal injury. *J Biol Chem* 2004;279:52282-52292.
76. Kienitz, T.; Quinkler, M. Testosterone and blood pressure regulation. *Kidney Blood Press* 2008;31:71-79.
77. Dey A, Williams R, Pollock D, Stepp D, Newman J, Hammock B, Imig J. Altered kidney CYP2 and cyclooxygenase-2 levels are associated with obesity-related albuminuria. *Obesity Research* 2004;12:1278-1289.
78. El Hafidi M, Pérez I, Carrillo S, Cardoso G, Zamora J, Chavira R, Baños G. Effect of sex hormones on non-esterified fatty acids, intra-abdominal fat accumulation, and hypertension induced by sucrose diet in male rats. *Clin Exp Hypertens* 2006;28:669-681.
79. Hall J, Crook E, Jones D, Wafford M, Dubbert P. Mechanisms of obesity-associated cardiovascular and renal disease. *Am J Med Sci* 2002;234:127-137.
80. Orth S, Ritz E. The nephritic syndrome. *N Engl J Med* 1998;338:1202-1211.
81. Reckelhoff J. Gender differences in the regulation of blood pressure. *Hypertension* 2001;137:1199-1208.
82. Sowers J, Epstein M, Frohlich E. Diabetes, hypertension and cardiovascular disease: an update. *Hypertension* 2001;37:1053-1059.
83. Orshal J, Khalil R. Gender, sex hormones, and vascular tone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;286:R286-R249.
84. Park K, Ki J, Ahn Y, Bonventre J. Testosterone is responsible for enhanced susceptibility of males to ischemic renal injury. *J Biol Chem* 2004;279:52282-52292.
85. Sheridan A, Bonventre J. Pathophysiology of ischemic acute renal failure. *Contrib Nephrol* 2001;132:7-21.
86. Silbiger S, Lei J, Neugarten J. Estradiol suppresses type I collagen synthesis in mesangial cells via activation of activator protein-1. *Kidney Int* 1999;55:1268-1276.

87. Rupnow H, Phernetton T, Modrick M, Wiltbank M, Bird T, Magness R. Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries: Estrogen and progesterone effects on cPLA2, COX-1, and PGIS protein expression. *Biol Rep* 2002;66:468-474.
88. Ospina JA, Duckles SP, Krause DN. 17beta-estradiol decreases vascular tone in cerebral arteries by shifting COX-dependent vasoconstriction to vasodilation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H241-H250.
89. Caughey G, Cleland C, Penglis P, Gamble J, James M. Roles of cyclooxygenase COX-1 and COX-2 in prostanoid production by human endothelial cells: selective upregulation of prostacyclin synthesis by COX-2. *J Immunol* 2001;167:2831-2838.
90. Fulton C, Stallone J. Sexual dimorphism in prostanoid-potentiated vascular contraction: roles of endothelium and ovarian steroids. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H2062-H2073.
91. Segura J, Campo C, Roldán C, Christiansen H, Vigil L, García-Robles R, Rodicio J, and Ruilope L. Hypertensive renal damage in metabolic syndrome is associated with glucose metabolism disturbances. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:S37-S42.
92. Fortepiani L, Yanes L, Zhang H, Racusen L, Reckelhoff J. Role of androgens in mediating renal injury in aging SHR. *Hypertension* 2003;42:952-955.
93. Cheuk B, Leung P, Lo A, Wong P. Androgen control of cyclooxygenase expression in the rat epididymis. *Biol Repro* 2000;63:775-780.
94. Sakemi T, Toyoshima H, Morito F. Testosterone eliminates the attenuating effect of castration on the progressive glomerular injury in hypercholesterolemic male Imai rats. *Nephron* 1994;67:469-476.

95. Tajiri Y, Inoguchi T, Umeda F, Nawata H. Reduction urinary albumin excretion by thromboxane synthetase inhibitor, OKY-046, through modulating renal prostaglandins in patients with diabetic nephropaty. *Diabetes Res Clin Pract* 1990;10:231-239.
96. Moorhead J, Chan M, El-Nahas M, Varghese Z. Lipid nephrotoxicity in chronic progressive glomerular and tubulo-interstitial disease. *Lancet* 1982;2:1309-1311.
97. Fried L, Orchard T, Kasiske B. Effect of lipid reduction on the progression of renal disease: a meta-analysis. *Kidney Int* 2001;59:260-269.
98. El Hafidi M, Pérez I, Zamora J, Soto V, Carvajal-Sandoval G, Baños G. Glycine intake decrease plasma free fatty acids, adipose cell size, and blood pressure in sucrose-fed rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;287:R1387-R1393.
99. Traynor T, Smart A, Briggs J, Schnermann J. Inhibition of macula densa-stimulated renin secretion by pharmacological blockade of cyclooxygenase-2. *Am J Physiol* 1999;46:F706-F705.
100. Hao C, Breyer M. Hypertension Cyclooxygenase-2 inhibitors target: the renal medulla. *Hypertension* 2004;44:396-397.
101. Muirhead E, Rightsel A, Leach E, Byers W, Pitcock A, Brooks B. Reversal of hypertension by transplants and lipid extracts of cultured renomedullary interstitial cells. *Lab Invest* 1977;36:162-172.
102. Williams B, Schrier R. Glucose-induced protein kinase C activity regulates arachidonic acid release and eicosanoid production by cultured glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 1993;92:2889-2896.
103. Imig J. Eicosanoid regulation of renal vasculature. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;279:F965-F981.

104. Ichihara A, Imig J, Navar L. Cyclooxygenase-2 modulates afferent arteriolar responses to increases in pressure. *Hypertension* 1999;34:843-847.
105. Quan A, Chakravarty S, Chen C, Loleh S, Saini N, Harris R, Capdevila J, Quigley R. Androgens augment proximal tubule transport. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;287:F452-F459.
106. Chen F, Naftilan J, Oparil S. Androgen-dependent angiotensinogen and renin messenger RNA expression in hypertensive rats. *Hypertension* 1992;19:456-463.
107. Lemos C, Mandarim-de-Lacerda A, Dorigo D, Coimbra T, Bregman R. Chronic renal failure in male and female rats. *J Nephrol* 2005;18:368-373.
108. Baber R, Deng W, Rodriguez J, Master G, Bivalacqua J, Hyman L, Philip J, Kadowitz J. Vasoactive prostanoids are generated from arachidonic acid by COX-1 and COX-2 in the mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H1476-H1487.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

Metabolism Clinical and Experimental 59 (2010) 414–423

Metabolism
 Clinical and Experimental

www.metabolismjournal.com

Effect of gonadectomy on the metabolism of arachidonic acid in isolated kidney of a rat model of metabolic syndrome

Israel Pérez-Torres^a, Mohammed El Hafidi^b, Natalia Pavón^b, Oscar Infante^c,
 Maria C. Avila-Casado^a, Guadalupe Baños^{b,*}

^aDepartment of Pathology, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" Juan Badiano 1, Sección XVI, Tlalpan, 14080 México DF, México

^bDepartment of Biochemistry, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" Juan Badiano 1, Sección XVI, Tlalpan, 14080 México DF, México

^cDepartment of Instrumentation, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" Juan Badiano 1, Sección XVI, Tlalpan, 14080 México DF, México

Received 27 February 2009; accepted 12 August 2009

Abstract

Influence of sex on arachidonic acid metabolism, a pathway involved in the link between metabolic syndrome (MS) and renal damage, was studied in isolated perfused kidney. Metabolic syndrome was induced by feeding 30% sucrose solution for 24 weeks to intact and gonadectomized female (Ovx) and male (Cas) rats. Systolic blood pressure, albuminuria, as well as prostaglandin E₂ and thromboxane B₂ from urine and perfusate increased in MS male and MS ovariectomized females; castration reduced them in MS males. Perfusion of arachidonic acid in kidneys from MS males increased perfusion pressure compared with controls. No difference appeared in perfusion pressure between control and MS females. Castration diminished perfusion pressure in MS; the opposite was observed in Ovx MS. Perfusion with arachidonic acid plus indomethacin decreased perfusion pressure in MS male kidneys and in Cas MS. In Ovx MS, arachidonic acid plus indomethacin decreased perfusion pressure, but not in female control, MS, and Ovx control. Increase in perfusion pressure with arachidonic acid in both male MS and Ovx MS was related to cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 overexpression in kidney. Castration reduced the expression of COX-1 and COX-2 in MS to control levels. The results suggest that the alteration in arachidonic acid metabolism associated with changes in the expression of COX-1 and COX-2 induced by sucrose intake, and influenced by sex hormones, may contribute to renal damage.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The metabolic syndrome (MS) is characterized by the association of various pathologies: hypertension, dyslipidemia, hyperinsulinemia, nephropathy, and cardiovascular alterations [1]. Its prevalence may depend on sex both in humans and in animal models [2,3]. The prevalence of MS in premenopausal women is lower than that of men of the same age; the incidence in women increases after the menopause and may become higher than that in men [4]. One of the organs that may be severely impaired in MS is the kidney [5].

In animal models of chronic renal disease, males show more accelerated progression of renal injury than females [6]. In male rats [7], castration and continuous blockade of

the androgen receptor attenuate renal injury, proteinuria, and blood pressure and inhibit renin-angiotensin system (RAS) [8]. Generally, estrogens are a protective factor against the development of nephropathy by diminishing vascular resistance and inhibiting circulating renin and angiotensin-converting enzyme, decreasing circulating angiotensin levels. Estrogen deficiency as a result of menopause or ovariectomy has the opposite effects on the RAS [9].

On the another hand, kidney arachidonic acid (AA) metabolism and the eicosanoids, products of the cyclooxygenase (COX) pathway, participate in the regulation of vascular tone, renin release, sodium metabolism, renal hemodynamics, and blood pressure, among other functions [10].

Eicosanoids are a diverse metabolite group, produced by the enzymatic oxidation of AA and catalyzed through 3 major enzymatic pathways: the COX (with the intervention of the 2 COX isoforms COX-1 and COX-2) [11], the

* Corresponding author. Tel.: +525 573 29 11x1298; fax: +525 573 09 26.
 E-mail address: gbanos@yahoo.com (G. Baños).

lipoxygenase, and the cytochrome P-450 pathways [12]. Cyclooxygenase-1 is constitutively expressed in the kidney; and COX-2 is induced by inflammatory stimuli, but is also constitutively localized in the macula densa and collecting tubules in the renal vasculature [13,14]. The expression of the COX-2 isoform is increased in the kidney during development, hypertension, obesity, and MS [15,16].

Arachidonic acid metabolite levels are determined by factors that include species, tissue, and hormonal background [17,18].

Reaven and Ho [19] developed MS in rats by administration of high-sucrose or high-fructose diets, which induce hypertriglyceridemia, hypertension, nephropathy, and hyperinsulinemia, and increase intraabdominal fat tissue and insulin resistance [20]. We have developed a variant whose abnormalities are induced by continuous administration of sucrose in the drinking water [21,22].

In this study, we investigated the effect of gonadectomy on the metabolism of AA in isolated kidneys of control and MS male and female rats.

2. Materials and methods

2.1. Animal groups

Weanling female and male Wistar rats weighing approximately 40 ± 2 g were used. The controls (C) received tap water for drinking, whereas the MS rats had 30% sucrose solution; both groups were fed commercial rat chow ad libitum for 24 weeks. These groups were further subdivided into 4 subgroups ($n = 8$ in each subgroup) of C or MS: group 1, intact C female and male; group 2, intact MS female and male; group 3, ovariectomized female (Ovx) C and MS; and group 4, castrated male (Cas) C and MS. The treatment period lasted 6 months. The animals were housed at room temperature of 21°C , with 12-hour cycles of light/darkness.

The care and use of animals followed the institutional guidelines and received institutional approval.

2.2. Gonadectomy

The gonadectomy was carried out at the beginning of the sucrose treatment. Castration and ovariectomy were performed under anesthesia (pentobarbital sodium 63 mg/kg of body weight) as previously described [23,24]. The surgical procedures were as humane as possible and complied with the guidelines for animal care of our institution.

2.3. Measurement of serum sex hormones

Serum testosterone and estradiol were measured using the Diagnostic Products (Los Angeles, CA) kit.

2.4. Systolic blood pressure

At the end of the treatment, systolic blood pressure (SBP) was measured by a tail-cuff attached to a pneumatic pulse transducer and programmed electrospigmomanometer

(Narco Scientific, Austin, TX), as described previously [23,24]. Briefly, the rats were immobilized in an acrylic device that allowed them to breathe freely, resting on a plate that kept them warm, but left the tail available to apply the tail-cuff. The animals were left to relax for some 15 to 20 minutes. Four measurements of SBP were carried out on each rat or until the readings were reproducible. The data obtained with this technique are not different from either those collected in our database along several years or those obtained by direct arterial cannulation.

2.5. Albuminuria

At the end of the treatment and previous to the collection of urine, the animals were placed in metabolic cages (Nalgene, San Diego, CA) for 5 days, with free access to food and water. The urine was filtered and collected on ice for 24 hours. Albuminuria was measured using bromocresol green reagent; this technique is specific for the quantification of albumin in urine [25].

2.6. Isolated perfused kidney

The rats were anesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (63 mg/kg body weight). The right kidney was exposed by midline laparotomy, and the mesenteric and right renal arteries were cleared of surrounding tissue. The right renal artery was cannulated through the mesenteric artery to avoid interruption of blood flow; and the kidney was removed, suspended, and perfused at constant flow by means of a peristaltic pump (MasterFlex Easy-load II, no. 77200-50; Cole-Parmer Instrument Co, Vernon Hills, IL) with Krebs solution at 37°C and oxygenated with 95% $\text{O}_2/5\%$ CO_2 . The solution had the following composition (in millimoles per liter): 118 NaCl, 1.2 NaH_2PO_4 , 25 NaHCO_3 , 4.7 KCl, 1.2 CaCl_2 , 4.2 MgSO_4 , and 5.5 glucose (pH 7.4). Flow was adjusted to a basal perfusion pressure (PP) of 75 to 90 mm Hg. Mean flow rate of the perfusing solution was 8 to 9 mL/min. Perfusion pressure was measured with a transducer (Grass Telefactor, Grass Technologies, Astro Med, West Warwick, RI), captured, and recorded by means of a Grass model polygraph 79D and online program (Grass PolyView). Data are expressed as changes (Δ) of PP in millimeters of mercury. After at least 15 minutes of perfusion and once a stable PP had been obtained, vasoconstrictor responses to 4 $\mu\text{g}/(\text{mL min})$ AA were determined in the absence and presence of 10 $\mu\text{mol/L}$ indomethacin (Indo) (COX pathway inhibitor), 10 $\mu\text{mol/L}$ NS398 (COX-2 selective inhibitor), or 100 $\mu\text{mol/L}$ ozagrel (pathway inhibitor of thromboxane synthase). These doses were selected from published data as more convenient after dose-response curves were obtained [26].

2.7. Prostaglandins

Prostaglandins were extracted from the urine or kidney perfusate by adding 0.5 mL of water-ethanol 1:4 and 10 μL of glacial acetic acid to 1 mL urine or perfusate. The mixture

was well shaken, and the samples were incubated at room temperature for 5 minutes and centrifuged at 2500g for 5 minutes. The supernatant was applied to a Sep-Pak C18 minicolumn (Millipore, Billerica, MA) previously equilibrated with 2 vol of 10% ethanol. The column was then washed with 1 vol of water followed by 1 vol of hexane; and prostaglandins were eluted with 1.50 mL of ethyl acetate. The samples were dried under a nitrogen stream and resuspended in 300 μ L phosphate-buffered saline–ethanol (2:1 vol/vol). The concentrations of the 3 prostanoids in urine or perfusate were determined by enzyme immunoassay with kits obtained from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI).

2.8. Arachidonic acid

Kidney homogenate AA was extracted as described by Folch et al [27], derivatized to the corresponding methyl esters, and analyzed by gas liquid chromatography (GC-2010 Shimadzu Gas Chromatograph, Shimadzu North America, Pleasanton, CA) as previously described [22,28].

2.9. Microsomes

The left kidney was dissected, cut up, and homogenized in 5 mL cold buffer (250 mmol/L sucrose, 10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA [pH 7.4]) in the presence of protease inhibitors (1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 μ mol/L pepstatin A, 2 μ mol/L leupeptin, and 0.1% aprotinin; Sigma-Aldrich, St Louis, MO); and the homogenate was kept on ice. The homogenate was then centrifuged at 600g for 5 minutes at 4°C. The pellet was discarded, and the supernatant was centrifuged at 8000g for 10 minutes at 4°C. The pellet was discarded, and the supernatant was centrifuged at 44 000g for 1 hour at 4°C; the resultant pellet was resuspended in 250 μ L 0.1 mol/L phosphate buffer.

2.10. Immunoblotting

The microsomes (100 μ g) were mixed with sample buffer (Tris-HCl [pH 6.5], 1% sodium dodecyl sulfate [SDS], 50% glycerol, and 0.1% bromophenol blue) and boiled for 2 minutes. Proteins were separated on a 10% SDS–polyacrylamide gel electrophoresis gel and transferred to Hybond-C extra nitrocellulose membrane (Millipore). The blots were blocked for 3 hours with Tris buffer solution (TBS) containing 5% nonfat dry milk and 0.5% Tween 20. A rabbit phospholipase A₂ polyclonal antibody, rabbit COX-1 polyclonal antibody, and rabbit COX-2 polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) were applied individually to each gel, at a dilution of 1:1000, for an entire night. The blots were washed in TBS and incubated with secondary antibody biotinylated-goat antirabbit immunoglobulin G (ZYMED Laboratories, San Diego, CA) at a dilution of 1:5000.

After incubation with the secondary antibody, the membranes were washed with TBS; and the band detection was carried out using 3'3'-diaminobenzidine. Membranes were stripped in a TBS containing 1% SDS and 100

mmol/L β -mercaptoethanol (pH 2), followed by incubation with a 1/2000 α -actin monoclonal mouse antibody. Band intensity was measured densitometrically with a Sigma Scan Pro5 program (Ashburn, VA).

2.11. Statistical analysis

The data are presented as mean \pm SE. Statistical significance was determined by 2-way analysis of variance test with Tukey honestly significant difference post hoc test (SigmaPlot 11; Systat Software, Chicago, IL). Differences were considered statistically significant at $P < .05$.

3. Results

3.1. Body weight

No difference in body weight was found between MS, C, and Ovx C female rats; but ovariectomy increased it in Ovx MS in comparison with MS females ($P < .05$). Castration significantly reduced body weight in MS and C in comparison with intact rats ($P < .05$).

3.2. Intraabdominal fat

The MS female rats accumulated significantly more intraabdominal fat compared with the C females ($P < .05$); but after ovariectomy, the highest increase was observed in MS compared with intact MS females ($P < .05$).

The accumulated intraabdominal fat in MS male rats was significantly greater than that in C animals ($P < .01$). Castration decreased fat accumulation in Cas MS when compared with intact MS male rats ($P < .01$).

3.3. Systolic blood pressure

The SBP did not differ between C, MS, and Ovx C female rats. In Ovx MS, it increased vs MS females ($P = .01$, Table 1). In MS males, SBP was significantly increased compared with C male rats ($P = .001$), whereas castration decreased it significantly in MS ($P = .001$) but did not affect it in C rats.

In a sample of measurements taken as described in “Materials and methods,” the coefficient of variability ranged from 0.16% to 2.8% ($n = 70$), with no apparent bias in any group.

3.4. Albuminuria

Albuminuria was not altered in C, MS, and Ovx C females; but it did increase ($P = .03$) in Ovx MS rats. In MS male rats, it was significantly increased vs C males ($P = .001$) (Table 1). Castration in MS rats decreased it vs intact MS rats ($P = .001$), whereas castration in C caused no significant change.

3.5. Sex hormones

Undetectable levels of the corresponding sex hormones proved the success of the gonadectomy procedure.

Table 1
General characteristics of experimental rat groups, control, and MS

	Female rats				Male rats			
	C	MS	Ovx C	Ovx MS	C	MS	Cas C	Cas MS
Body weight (g)	363 ± 9	387 ± 13	362 ± 3	455 ± 7*	499 ± 5	480 ± 10	431 ± 1 [¶]	405 ± 3 [¶]
Intraabdominal fat (g)	5.6 ± 0.4	13.3 ± 0.9 [†]	6.0 ± 0.7	20.3 ± 2.8 [†]	5.0 ± 0.1	18.3 ± 1.4 [#]	4.0 ± 0.5	13.1 ± 0.4 [#]
SBP (mm Hg)	111 ± 3	120 ± 5	116 ± 2	139 ± 5 [‡]	123 ± 2	145 ± 3 ^{**}	128 ± 1	125 ± 1 ^{**}
Albuminuria (mg/24 h)	3.9 ± 0.4	3.6 ± 1.9	3.7 ± 0.3	10.7 ± 2.3 [§]	6.5 ± 0.7	15.5 ± 1.5 ^{††}	5.8 ± 1.4	4.0 ± 0.9 ^{††}
Serum estradiol (nmol/L)	0.28 ± 0.01	0.38 ± 0.003	<0.001	<0.001	0.003 ± 0.001	0.002 ± 0.001 ^{‡‡}	0.12 ± 0.04 ^{‡‡}	0.11 ± 0.02 ^{‡‡}
Serum testosterone (μmol/L)	0.013 ± 0.005	0.008 ± 0.003	0.016 ± 0.003	0.005 ± 0.001	0.025 ± 0.006	0.006 ± 0.002 ^{§§}	<0.001	<0.001

Body weight, intraabdominal fat, SBP, albuminuria, and hormone concentration in C, MS, Ovx C, and Ovx MS female rat groups, and C, MS, Cas C, and Cas MS male rat groups. With the exception of the Ovx C vs Cas C in albuminuria and body weight, all groups showed significant difference between females and males ($P < .01$). Values are means ± SE.

Females:

- * Body weight MS vs Ovx MS; $P < .05$.
- † Intraabdominal fat C vs SM and MS vs Ovx MS; $P < .05$.
- ‡ SBP MS vs Ovx MS; $P < .05$.
- § Albuminuria MS vs Ovx MS; $P < .05$.
- || Serum testosterone MS vs Ovx MS; $P < .05$.

Males:

- ¶ Body weight C and MS vs Cas C and Cas MS; $P < .01$.
- # Intraabdominal fat C and Cas MS vs MS; $P < .01$.
- ** SBP C and Cas MS vs MS; $P < .01$.
- †† Albuminuria C and Cas MS vs MS; $P < .01$.
- ‡‡ Serum estradiol C and MS vs Cas C and Cas MS; $P < .05$.
- §§ Serum testosterone C vs MS; $P < .05$.

Testosterone levels in C and MS female rats showed no difference; but in Ovx MS, testosterone decreased in comparison with Ovx C ($P < .05$).

In MS male rats, basal testosterone was lower than that in C ($P = .01$). Estradiol levels in Cas C and Cas MS showed significant increase in comparison with those in C and MS ($P < .01$, Table 1).

3.6. Arachidonic acid

In kidney homogenate from C, MS, and Ovx C female rats, the concentration of free AA was not significantly different; but it decreased in the kidney homogenate from Ovx MS in comparison with that from MS females ($10.8 ± 1$ vs $14 ± 0.8$ nmol/mg protein, respectively; $P = .03$).

A decrease of AA was observed in the kidney homogenate from MS male rats compared with that from C males ($23.2 ± 1$ vs $29.4 ± 2.3$ nmol/mg protein, respectively; $P = .03$). The concentration of AA increased in Cas C ($36 ± 2.5$ nmol/mg protein) and Cas MS ($32.7 ± 1.3$ nmol/mg protein) in comparison with that of C and MS males ($P = .001$, Fig. 1).

3.7. Effect of AA on PP in female rat kidney

Perfusion pressure was measured in perfused isolated kidneys from C, MS, Ovx C, and Ovx MS female rats, with 4 μg of AA, in the presence or absence of Indo, NS398, or ozagrel. No difference in PP was found between C, MS, and Ovx C groups ($19.4 ± 4.1$, $15.4 ± 3.7$, and $20.4 ± 2$ mm Hg, respectively). Gonadectomy increased PP in Ovx MS rats ($31.7 ± 5.3$ vs $15.4 ± 3.7$ mm Hg, $P = .02$) in comparison

with that in intact MS (Fig. 2A). The perfusion of 4 μg of AA plus 10 μmol/L Indo decreased PP in kidney of Ovx MS by 74% ($P = .05$), but did not modify PP in the kidney from C, MS, and Ovx C rats, when compared with PP without Indo.

Fig. 2A shows PP in the female rat groups, when 4 μg of AA plus 10 μmol/L of NS398 was perfused in the kidney from Ovx MS rat. NS398 reduced the PP by 43% in comparison with MS ($P = .05$). In the kidneys from C, MS, and Ovx C rats, NS398 had no effect on PP. There was no change between groups when AA was perfused in the presence of 100 μmol/L ozagrel.

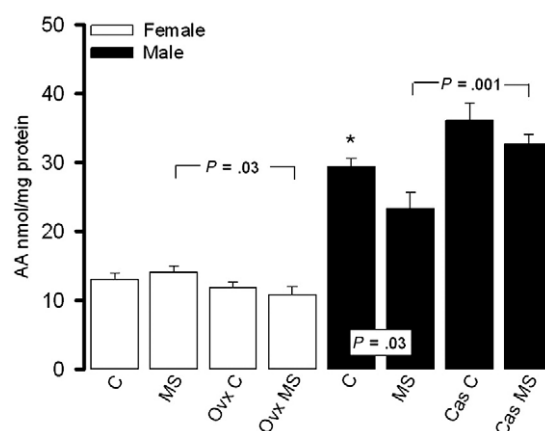


Fig. 1. Nonesterified AA concentration in the kidney homogenate of experimental rat groups. C vs Cas C; $P < .03$ (*). In all the cases, the difference between females and males was significant; $P < .001$. Values are means ± SE.

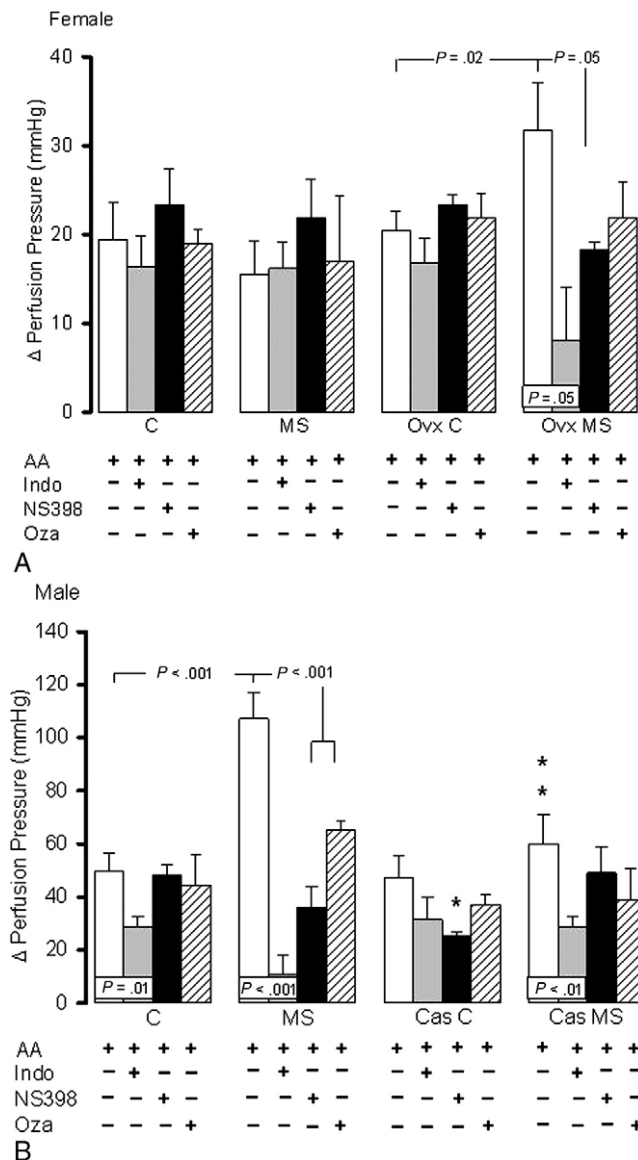


Fig. 2. Renal PP in isolated kidney. The C, MS, OvX C and OvX MS female rats (A) and C, MS, Cas C and Cas MS male rats (B) were perfused with 4 μ g of AA in the absence or the presence of inhibitors. Arachidonic acid 4 μ g, AA 4 μ g plus 10 μ mol/L Indo, AA 4 μ g plus 10 μ mol/L NS398, and AA 4 μ g plus 100 μ mol/L ozagrel. Male: Cas C plus AA vs Cas C plus AA + NS398 (*), SM vs Cas MS; $P < .001$ (**). When comparing female against male rats, the only groups that showed significant differences were OvX C vs Cas C with ozagrel ($P < .001$) and MS female vs MS male with AA ($P < .01$). Values are means \pm SE.

3.8. Effect of AA on PP in male rat kidney

The perfusion of 4 μ g AA in MS males increased PP in comparison with C rats (107.0 ± 10.0 vs 49.5 ± 6.8 mm Hg, respectively; $P < .001$). In Cas C rats, PP was not modified (47.0 ± 8.2 mm Hg) in comparison with that in C; but in Cas MS rats, PP diminished (59.8 ± 11.1 vs 107.0 ± 10.0 mm Hg, $P < .001$) in comparison with that in MS rats (Fig. 2B).

The perfusion of 4 μ g AA plus 10 μ mol/L Indo decreased PP in C rat kidney by 41% ($P = .01$) and by 89% in kidney

from MS rats ($P < .001$). However, the perfusion of Cas MS rat kidneys with 4 μ g AA plus Indo at the same concentration only diminished it by 51% ($P < .01$), as in control animals.

The addition of 4 μ g AA plus 10 μ mol/L NS398 or 100 μ mol/L ozagrel did not affect PP in C, Cas C, and Cas MS; but PP in MS rat kidney was decreased by 66% and 39% in the presence of NS398 and ozagrel, respectively ($P < .001$, Fig. 2B).

3.9. COX-1 and COX-2 expression

Kidney microsomes from OvX MS female rats had greater COX-1 protein expression than those from MS female rats ($P = .01$, Fig. 3A). In male kidney microsomes from C, there was a significantly lesser expression than that in MS. In Cas MS males, a decrease in COX-1 protein expression was observed in comparison with that from MS male rats ($P = .03$ and $P = .01$, respectively).

Cyclooxygenase-2 protein expression mostly showed a similar trend to that of COX-1 (Fig. 3B).

Kidney microsomes from MS female rats had significantly lesser COX-2 protein expression than those from OvX MS rats ($P = .009$). In the kidney microsomes from C and Cas MS male rats, a decrease of COX-2 protein expression was observed in comparison with that from MS male rats ($P = .02$).

3.10. Levels of AA metabolites in kidney perfusate

Table 2 shows no difference in the levels of thromboxane (TX) B_2 between C and MS in female kidney perfusate. Gonadectomy increased it in MS ($P = .01$) but not in C.

In MS males, TXB₂ was significantly increased compared with C male rats ($P = .004$), whereas castration decreased it significantly in MS ($P = .004$) but did not affect it in C rats.

In the levels of prostaglandin (PG) E₂ and 6-keto-PGF_{1 α} , no significant difference was observed among any of the female groups; but in MS male rats, PGE₂ was significantly increased in comparison with that in C ($P = .04$). Castration normalized the levels of PGE₂ in MS ($P < .04$), but did not change those in C male rats, whereas 6-keto-PGF_{1 α} was not changed in any of the groups of male rats.

3.11. Prostaglandin level in urine

The level of 6-keto-PGF_{1 α} in urine from female rats did not show significant differences in any of the groups; but in MS males, it decreased compared with C and Cas MS ($P < .01$, Fig. 4A).

The level of PGE₂ increased in OvX MS vs MS females ($P = .04$). In Cas MS and C male rats, the PGE₂ was decreased in comparison with MS males ($P = .04$ and $P = .01$, respectively; Fig. 4B).

In OvX MS, TXB₂ levels increased significantly in comparison with those from MS and OvX C ($P = .01$). In males, the highest level of TXB₂ was found in MS; and castration reduced it to the level found in C ($P < .01$ and $P = .01$, respectively; Fig. 4C).

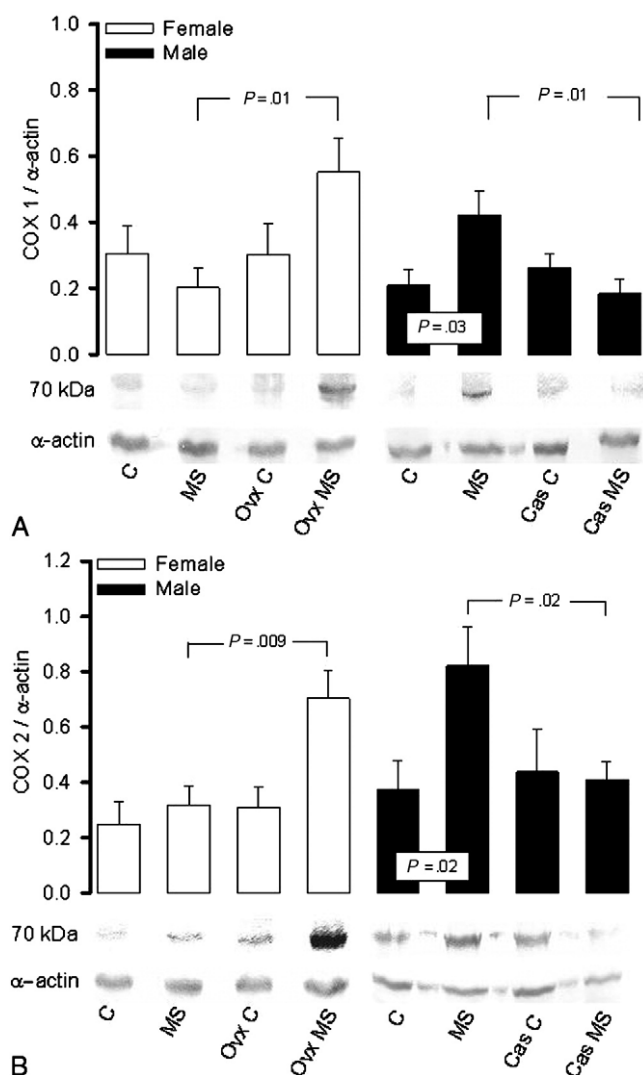


Fig. 3. Densitometric analysis of Western blots of COX-1 and COX-2 protein expression in kidney microsomes from female and male rats. Cyclooxygenase-1 expression (A). When comparing female against male rats, the only groups that showed significant difference were MS female vs MS male ($P < .05$) and Ovx MS vs Cas MS ($P < .001$). Cyclooxygenase-2 expression (B). The comparison between female and male rats showed that the groups significantly different were MS female vs MS male ($P < .001$) and Ovx MS vs Cas MS ($P < .01$). Values are means \pm SE.

4. Discussion

The main purpose of this study was to determine the effects of gonadectomy on AA metabolism of the isolated perfused kidney in a rat model of MS.

The high-sucrose diet increased fat deposits in both male and female rats, the effect being more pronounced in males. In male MS rats, the increased intraabdominal fat was associated with decreased serum testosterone levels, as has also been reported in android obesity, inversely associated with testosterone levels [29]. Moreover, castration of MS rats diminished the intraabdominal fat proportion because testosterone diminishes the activity of the hormone-sensitive lipase in adipocytes and increases the proportion of corporal fat and insulin resistance [30]. These observations suggest that testosterone concentration is an important factor in the development of MS associated with fat accumulation. In female MS rats, the increased intraabdominal fat accumulation by ovariectomy is associated with the loss of circulating estradiol. In women, the loss of circulating estrogen after menopause is associated with an increase in central body fat; and this effect is attenuated by estrogen treatment [31].

Systolic blood pressure in MS male rats was observed to be high after about 4 to 5 months of sucrose treatment, in comparison with MS female rats, in which the increase took place later [32]. In the present study, we observed a similar tendency. The increase and decrease of SBP in Ovx MS female and Cas MS male rats, respectively, suggest that sex hormones are involved in the regulation of SBP in our model; other investigators have observed that, in spontaneously hypertensive (SHR) rats, males have higher SBP than females [33]. A significant decrease in serum testosterone concentration was found in MS male rats when compared with C males. This might be due to its high metabolism rate resulting from the increased amount of intraabdominal fat in MS males. The partial loss of testosterone in MS animals can be associated with increased vasoconstriction and SBP, as described elsewhere [34]. However, the total elimination of testosterone from the circulation by castration improves some variables found altered in MS male rats, such as high SBP, fat accumulation, albuminuria, and COX expression,

Table 2
Levels of AA metabolites in perfusate from kidney

(ng/mL)	Female rats				Male rats			
	C	MS	Ovx C	Ovx MS	C	MS	Cas C	Cas MS
TXB ₂	0.38 \pm 0.13	0.40 \pm 0.05	0.45 \pm 0.07	0.97 \pm 0.23*	0.49 \pm 0.14	1.48 \pm 0.17 [†]	0.46 \pm 0.13	0.43 \pm 0.18 [†]
PGE ₂	0.49 \pm 0.04	0.42 \pm 0.06	0.48 \pm 0.11	0.78 \pm 0.24	0.64 \pm 0.13	1.10 \pm 0.15 [‡]	0.66 \pm 0.10	0.65 \pm 0.06 [‡]
6-keto-PGF _{1α}	0.51 \pm 0.15	0.51 \pm 0.08	0.38 \pm 0.06	0.53 \pm 0.21	0.62 \pm 0.14	0.54 \pm 0.10	0.55 \pm 0.17	0.30 \pm 0.15

In Ovx MS female rats and MS male rats, TXB₂ is the metabolite that shows higher participation in vascular-renal vasoconstriction followed by PGE₂ in MS male rats. Castration normalized it in Cas MS. Significant change was present in TXB₂ and PGE₂ in MS female vs MS male rats; $P = .002$. Values are means \pm SE.

* Female: MS vs Ovx MS, male: C and Cas MS vs MS; $P < .01$.

[†] Male: C and Cas MS vs MS; $P = .004$.

[‡] Male: C and Cas MS vs MS; $P = .04$.

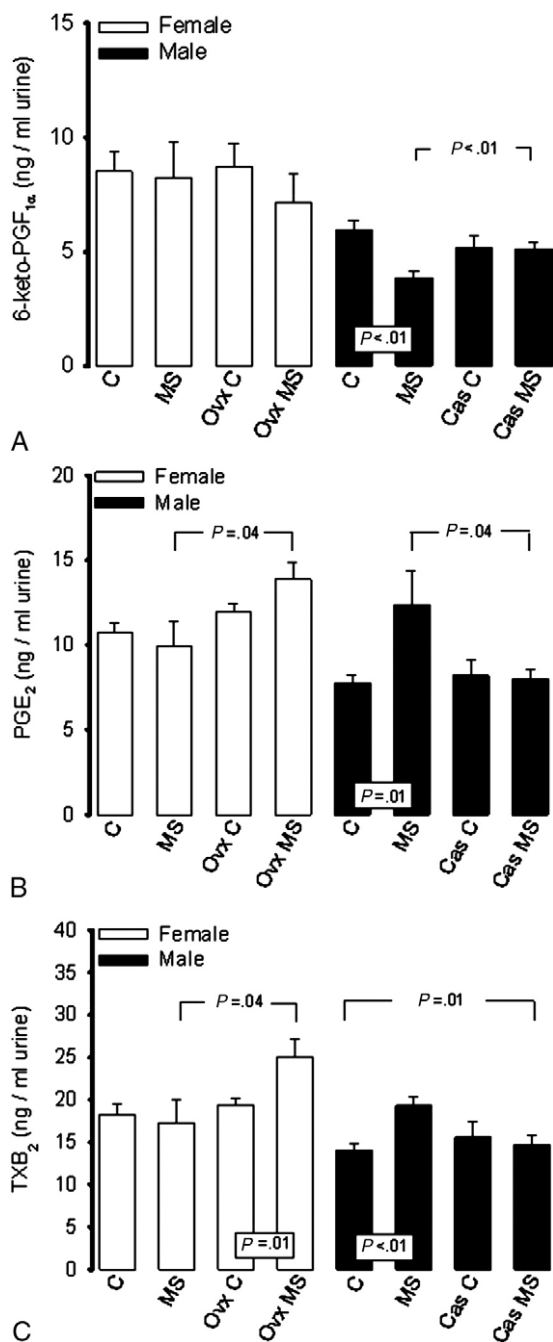


Fig. 4. Levels of 6-keto-PGF_{1α}, PGE₂, and TXB₂ in rat urine. 6-keto-PGF_{1α} (A). In all the cases, the difference between females and males was significant ($P < .01$). Prostaglandin E₂ (B). With the exception of the MS female vs MS male, all cases showed significant difference between females and males ($P < .001$). Thromboxane B₂ (C). With the exception of MS female vs MS male, all cases showed significant difference between females and males ($P < .01$). Values are means \pm SE.

suggesting that there is a threshold of testosterone level for the development of the MS in our animals. Besides, in Ovx MS females, the lowest level of testosterone corresponds with the highest BP. This supports the notion that there is a threshold for testosterone to contribute to higher BP and levels of albuminuria in Ovx MS females.

The increased levels of estradiol in both Cas C and MS males can be explained by extragonadal aromatization in adrenal glands and adipose tissue, as suggested by several authors [35,36].

The larger vasoconstriction found in kidneys from MS males and attributed to the altered AA metabolism, mediated by the COX pathway, may be associated with the concentration of testosterone. This proposal is supported by work which demonstrated that testosterone is essential for the development of endothelial dysfunction and hypertension, secondary to insulin resistance, suggesting a facilitating role for testosterone in increasing SBP in fructose-fed male rats [37].

Estradiol can decrease the synthesis and release of vasoconstrictor prostaglandins [38,39], whereas testosterone has an opposite effect [40]. Androgens are necessary for the development of hypertension induced by fructose diet in male rats because testosterone can regulate the thromboxane pathway, stimulating thromboxane synthase [41,42]. A testosterone threshold level may be necessary to manifest the vasoconstrictor effect of thromboxane in MS male rats. The decrease of SBP in Cas MS male rats and its increase in Ovx MS female rats suggest effects of sex hormones on prostanoid-potentiated vascular contraction [43]. Testosterone can indirectly stimulate sodium reabsorption via the proximal kidney tubule [44] and also via components of the RAS [45], influencing increase of SBP and thus contributing to renal failure. Estradiol can down-regulate the RAS [18,46–48].

The high-fructose or high-sucrose diet-induced high SBP in animal models of MS is associated with renal damage [21]; obesity may also contribute to nephropathy [49].

Proteinuria is an early predictor of rapid progression of renal damage [50]. Our results show that sucrose intake increases albuminuria in male but not in female rats.

The rate of progression of renal disease evidenced by the decline in renal function, increase of glomerular permeability, proteinuria, and glomerulosclerosis [51] appears more rapidly in men than in women [52]. Androgens may mediate sex differences in renal hemodynamics, SBP regulation, and proteinuria in male SHR; nevertheless, castration preserves renal function [33] and reduces proteinuria [53]. Fortepiani et al [54] investigated renal failure in SHR, caused by aging and androgen suppression, demonstrating that castration improves glomerular filtration, renal-vascular resistance, and proteinuria. The increased albuminuria in Ovx MS female rats and MS male rats, respectively, in comparison with their controls, and its decrease in Cas MS male rats suggest that albuminuria is BP-related and that sex hormones may modulate kidney failure in our MS model.

In kidney from MS males, but not in that from MS female rats, AA perfusion produced an increment in PP in comparison with that in C rats, whereas Indo inhibited it to a large extent. This indicates that AA metabolites, released through COX isoform pathways, contribute to increased vasoconstriction in the MS male. The attenuation by NS398

of increased PP induced by AA alone in MS male rats vs C suggests that COX-2 participates in the regulation.

The suppression of sex hormones by gonadectomy reduced or increased PP in kidneys in Cas MS and Ovx MS rats, respectively; and the difference in PP registered in kidneys from MS was larger than that in Cas MS male rats. Consequently, testosterone and estradiol may participate in the regulation of this metabolic pathway [18,41]. Ozagrel attenuated PP increase by AA in MS male rats; this indicated that COX-2 isoform/thromboxane pathways are up-regulated by a decrease in testosterone levels in MS males, but not in MS females. In experimental models of hypertension and MS induced by fructose, it was found that vascular production of TXA₂, a product of COX isoforms [55], is increased [41]. In Cas MS male rats, PP did not change significantly in the presence of ozagrel, but did so with Indo and NS398; this suggested that the total suppression of testosterone by castration could modify the thromboxane pathway.

In gonadectomized fructose-fed male rats, TXA₂ concentration decreases in comparison with that in sham-operated rats [56]. A study in diabetic patients treated with ozagrel showed a decreased urinary albumin excretion, indicating that there is TXA₂ participation in renal failure [57]. Furthermore, PGE₂ and TXA₂ induce transcription of type IV collagen, laminin, and fibronectin [58] in the glomerular basement membrane, which are involved in renal damage [52,59]. In addition, testosterone induces increases in PGE₂ and TXA₂ [53,60]. Dyslipidemia associated with renal failure may also contribute to its progression [61].

There is a relationship between lipid reduction and both the preservation of normal glomerular filtration and the absence of proteinuria [62].

In our MS, there is hypertriglyceridemia, intraabdominal fat, and an increase of all circulating free fatty acids [28] except for free AA, whose concentration was reduced, which may contribute to renal failure. The concentration of nonesterified AA in kidney homogenate was also found to be decreased in MS males vs C [28,63]. The reduction in nonesterified AA biosynthesis could be a determining factor that may account for altered synthesis of the derived prostaglandins, and also the increase of SBP and albuminuria in MS [63,64].

Castration increased the concentration of nonesterified AA in both Cas MS and Cas C male rats in comparison with C and MS males. In MS female rats, ovariectomy decreased nonesterified AA in comparison with MS female rats. The effect of ovariectomy on AA concentration may be due to the lack of estradiol, which increases phospholipase A₂ activity, a key enzyme for AA release from membrane phospholipids [65,66].

The increment in the expressions of kidney COX-1 and COX-2 in both Ovx MS females and MS males, and the decrease in the expressions in Cas MS male rats in comparison with controls, respectively, may contribute to the changes observed in the amount of nonesterified AA.

In Cas C and Cas MS male rats, the increment of nonesterified AA in kidney homogenate is probably due to the decrease in the expression of COX isoforms, resulting in AA accumulation in the cellular membrane phospholipids (analysis not performed in this study).

The interstitial cells located in the renal medulla present abundant vacuoles, rich in polyunsaturated fatty acids, among them AA [13]. The transplant of renal medulla, but not of cortex, reduces the SBP in hypertensive animals [67].

Gonadectomy in MS males vs MS intact males decreased COX-1 and COX-2 expressions, which are related to a decrement in the TXB₂ (stable metabolite of TXA₂) and PGE₂ in kidney perfusate. The overexpression of COX-1 and COX-2 in MS males is associated with significant increases of both TXB₂ and PGE₂ in the kidney perfusate. In addition, TXB₂ increased by 200% whereas PGE₂ only increased by 57%, suggesting that TXB₂ participates more than PGE₂ in our MS male model. In the MS female group, gonadectomy significantly increased the overexpression of COX isoforms, which was associated with a significant increase in TXB₂ by 142%; PGE₂ tended to increase without reaching significant difference. These results suggest that the lack of estradiol due to ovariectomy and the reduced levels of testosterone by extragonadal biosynthesis in adipose tissue, as previously described [22], in Ovx MS can modulate the metabolism of AA toward the biosynthesis of TXB₂ rather than of PGE₂. PGE₂ and TXB₂ in the renal medulla cells [68], which are involved in renal hemodynamics, participate in the regulation of the vascular tone and in the balance of water, salt, and renin [50,55]. There is an inverse association of COX-1 metabolite (6-keto-PGF_{1α}) [69] with the decrease of SBP and renal damage in experimental fructose-fed models [19,60,70].

Our results show a decrease of 6-keto-PGF_{1α} in urine of MS males in comparison with C and Cas MS male rats, but without change in kidney perfusate. The change in concentration of urine 6-keto-PGF_{1α} may be due to altered systemic metabolism in the MS male model.

However, it has been described that postmenopausal women undergoing estrogen replacement therapy have elevated urinary levels of TXA₂ and prostacyclin [43]. Our results show that, with the exception of intact MS females, in comparison with intact MS males, the concentrations of PGE₂ and TXB₂ were significantly increased in all female animals vs all male animals in urine but not in kidney perfusate; this variation in prostaglandin concentration may be due to an effect of estrogens on the systemic metabolism in female rats.

The estrogen effect of increased TXB₂-induced vasoconstriction in females has not been explained. However, the results suggest that TXB₂ does not have such effect in female rats when estrogens are present; but when they are eliminated by ovariectomy, it may exercise its vasoconstrictor effect. Vascular TXA₂ production has been described as important only in pathophysiologic states such as hypertension in males, but not under normal conditions or in females [43,71].

The results suggest that COX isoform pathways are altered and shift toward an increase of TXB₂ and PGE₂ in MS male rats; sex hormones can modulate them, thus improving renal function [6,60].

On the other hand, AA can be metabolized through different pathways, that is, those of lipoxygenase and cytochrome P-450, to produce other prostanoids like 12-, 15-, 20-HETEs and EETs, which may participate in inducing renal damage in MS. Sex differences may regulate the expression of CYP and derived metabolites, associated with renal failure in rodent models [72,73]. This suggestion needs further investigation [12,68,73,74].

We have evaluated aortic reactivity in a variety of male and female rats: intact, castrated, and castrated with replacement of testosterone and estradiol, in control and MS, including the effect on them of Indo in the preparations. The results indicate significantly beneficial effects caused by the presence of estradiol and by the absence of testosterone. Participation of the COX pathway metabolites is evidenced [23,24].

In conclusion, the results suggest that there is a close association between MS and renal dysfunction, mediated by alteration of the AA metabolism through the COX pathway and influenced by sex hormones. In MS female rats, gonadectomy indicates a protective effect by estrogens against the increase of PP and COX isoform expression. In MS male rats, a threshold level of testosterone is required to develop the MS. The absence of testosterone in MS male rats modifies this alteration with a protective effect, decreasing PP and COX isoform expression and contributing to improve renal function.

Acknowledgment

Our thanks to the Postgraduate Section in the Department of Biological Sciences of the National Autonomous University of Mexico for a scholarship to I Pérez, and for the technical support from Rodrigo Velázquez in immunoblotting.

This work was partially supported by grant 43229-M from the National Council for Science and Technology, Mexico, to GB.

References

- [1] Segura J, Campo C, Roldán C, et al. Hypertensive renal damage in metabolic syndrome is associated with glucose metabolism disturbances. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:S37-42.
- [2] Busserolles J, Mazur A, Gueux E, et al. Metabolic syndrome in the rat: females are protected against the pro-oxidant effect of a high sucrose diet. *Exp Biol Med* 2002;227:837-42.
- [3] Cárdenas G, Torres J, Zamora J, et al. Isolated heart function after ischemia and reperfusion in sucrose-fed rats: influence of gender and treatment. *Clin Exp Hypertens* 2006;28:85-107.
- [4] Isles C. Blood pressure in males and females. *J Hypertens* 1995;13:285-90.
- [5] Bloomgarden Z. Diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 2005;3:745-51.
- [6] Park K, Kim J, Ahn Y, Bonventre AJ, Bonventre JV, et al. Testosterone is responsible for enhanced susceptibility of males to ischemic renal injury. *J Biol Chem* 2004;279:52282-92.
- [7] Reckelhoff JF. Sex steroids, cardiovascular disease, and hypertension. *Hypertension* 2005;45:170-4.
- [8] McGuire B, Watson W, Pérez F, et al. Gender differences in the renin-angiotensin and nitric oxide systems: relevance in the normal and diseased kidney. *Kidney Blood Press Res* 2007;30:67-80.
- [9] Nielsen C, Flyvbjerg A, Bruun J, et al. Decreases in renal functional reserve and proximal tubular fluid output in conscious oophorectomized rats: normalization with sex hormone substitution. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:3102-10.
- [10] Quilley J, Chen Y. Role of COX-2 in the enhanced vasoconstrictor effect of arachidonic acid in the diabetic rat kidney. *Hypertension* 2003;42:837-43.
- [11] Marnett L, Rowlinson S, Goodwin D, et al. Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. *J Biol Chem* 1999;274:22903-6.
- [12] Pomposiello S, Quilley J, Carroll M, et al. 5,6-Epoxyeicosatrienoic acid mediates the enhanced renal vasodilation to arachidonic acid in the SHR. *Hypertension* 2003;42:548-54.
- [13] Harris R, McKanna J, Akai Y, et al. Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa in rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest* 1994;94:2504-10.
- [14] Dubois R, Abramson S, Crofford L, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 1998;12:1063-73.
- [15] Hao CM, Breyer MD. Hypertension and cyclooxygenase-2 inhibitors target: the renal medulla. *Hypertension* 2004;44:396-7.
- [16] Locatelli F, Pozzoni P, Vecchio L. Renal manifestations in the metabolic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:S81-5.
- [17] Giltay E, Duschek E, Katan M, et al. Raloxifene and hormone replacement therapy increase arachidonic acid and docosahexaenoic acid levels in postmenopausal women. *J Endocrinol* 2004;182:399-4089.
- [18] Ichihara A, Imig J, Navar L. Cyclooxygenase-2 modulates afferent arteriolar responses to increases in pressure. *Hypertension* 1999;34:843-7.
- [19] Reaven G, Ho H. Sugar-induced hypertension in Sprague-Dawley rats. *Am J Hypertens* 1991;4:610-4.
- [20] Baños G, Carvajal K, Cardoso G, et al. Vascular reactivity and effect of serum in a rat model of hypertriglyceridemia and hypertension. *Am J Hypertens* 1997;10:379-88.
- [21] Baños G, El Hafidi M. Models of experimental hypertension. In: Benhagen EF, editor. *Hypertension new research*. New York: Nova Science Publishers Inc; 2006. p. 1-46.
- [22] El Hafidi M, Pérez I, Carrillo S, et al. Effect of sex hormones on non-esterified fatty acids, intra-abdominal fat accumulation, and hypertension induced by sucrose diet in male rats. *Clin Exp Hypertens* 2006;28:669-81.
- [23] Pérez I, El Hafidi M, Zamora-González J, et al. Modulation of aortic vascular reactivity by sex hormones in a male rat model of metabolic syndrome. *Life Sci* 2007;80:2170-80.
- [24] Pérez I, El Hafidi M, Infante O, et al. Effects of sex hormone levels on aortic vascular reactivity and variables associated with the metabolic syndrome in sucrose-fed female rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2008;86:25-35.
- [25] BenGershôm E. Screening for albuminuria: a case for estimation of albumin in urine. *Clin Chem* 1975;21:1795-8.
- [26] Vázquez-Cruz B, López P, Talamas-Rohana P, et al. Increased renal vasoconstriction and gene expression of cyclooxygenase-1 in renovascular hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000;36:577-83.
- [27] Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957;22:697-709.
- [28] Pérez I, El Hafidi M, Sanchez C, et al. Effect of sugar-induced hypertension in rats on the pattern of serum arachidonic, dihomogamma-linoleic and linoleic acids. *Med Sci Res* 1999;27:847-9.
- [29] Bray GA. Obesity and reproduction. *Hum Reprod* 1997;12:26-32.

- [30] Nilsson C, Niklasson M, Eriksson E, Bjorntorp P, Holmang A. Imprinting of female offspring with testosterone results in insulin resistance and changes in body fat distribution at adult age in rats. *J Clin Invest* 1998;101:74-8.
- [31] Deroo B, Korach K. Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest* 2006;116:561-70.
- [32] Baños G, Medina-Campos O, Maldonado P, et al. Antioxidant enzymes in hypertensive and hypertriglyceridemic rats: effect of gender. *Clin Exp Hypertens* 2005;1:45-57.
- [33] Reckelhoff JF, Zhang H, Granger JP. Testosterone exacerbates hypertension and reduces pressure-natriuresis in male spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1998;31:435-9.
- [34] Jones RD, Jones TH, Channer KS. The influence of testosterone upon vascular reactivity. *Eur J Endocrinol* 2004;151:29-37.
- [35] Zhao H, Tian Z, Hao J, Chen B. Extragonadal aromatization increases with time after ovariectomy in rats. *Reprod Biol Endocrinol* 2005;3:6.
- [36] Ward GR, Abdel-Rahman AA. Effect of testosterone replacement or duration of castration on baroreflex bradycardia in conscious rats. *BMC Pharmacol* 2005;5:9.
- [37] Vasudevan H, Negareddy P, McNeill J. Gonadectomy prevents endothelial dysfunction in fructose-fed male rats, a factor contributing to the development of hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:H3058-64.
- [38] Okumura M, Imanishi M, Yamashita T, Yamamura Y, Kim S, Iwao H, et al. Renal production of thromboxane and prostaglandins in a rat model of type 2 diabetes. *Life Sci* 2000;66:371-7.
- [39] Ospina J, Krause D, Duckles S. 17-Estradiol increases rat cerebrovascular prostacyclin synthesis by elevating cyclooxygenase-1 and prostacyclin synthase. *Stroke* 2002;33:600-5.
- [40] Wu F, Eckardstein A. Androgens and coronary artery disease. *Endocr Rev* 2003;24:183-217.
- [41] Galipeau D, Arikawa E, Sekirov I, McNeill JH. Chronic thromboxane synthase inhibition prevents fructose-induced hypertension. *Hypertension* 2001;38:872-6.
- [42] Cheuk B, Leung P, Lo A, Wong PY. Androgen control of cyclooxygenase expression in the rat epididymis. *Biol Reprod* 2000;63:775-80.
- [43] Fulton C, Stallone J. Sexual dimorphism in prostanoid-potentiated vascular contraction: roles of endothelium and ovarian steroids. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H2062-73.
- [44] Quan A, Chakravarty S, Chen JC, Chen JC, Loleh S, Saini N, et al. Androgens augment proximal tubule transport. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;287:F452-9.
- [45] Chen YF, Naftilan AJ, Oparil S. Androgen-dependent angiotensinogen and renin messenger RNA expression in hypertensive rats. *Hypertension* 1992;19:456-63.
- [46] Dean SA, Tan J, O'Brien ER, Leenen FH. 17beta-Estradiol down-regulates tissue angiotensin-converting enzyme and ANG II type 1 receptor in female rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288:R759-66.
- [47] Lemos CC, Mandarin-de-Lacerda A, Dorigo D, et al. Chronic renal failure in male and female rats. *J Nephrol* 2005;18:368-73.
- [48] Reckelhoff JF. Gender differences in the regulation of blood pressure. *Hypertension* 2001;37:1199-208.
- [49] Hall JE, Crook ED, Jones DW, et al. Mechanisms of obesity-associated cardiovascular and renal disease. *Am J Med Sci* 2002;234:127-37.
- [50] Orth S, Ritz E. The nephritic syndrome. *N Engl J Med* 1998;338:1202-11.
- [51] Sowers JR, Epstein M, Frohlich ED. Diabetes, hypertension and cardiovascular disease: an update. *Hypertension* 2001;37:1053-9.
- [52] Neugarten J. Gender and the progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:2807-9.
- [53] Sakemi T, Toyoshima H, Morito F. Testosterone eliminates the attenuating effect of castration on the progressive glomerular injury in hypercholesterolemic male Imai rats. *Nephron* 1994;67:469-76.
- [54] Fortepiani LA, Yanes L, Zhang H, et al. Role of androgens in mediating renal injury in aging SHR. *Hypertension* 2003;42:952-5.
- [55] Tajiri Y, Inoguchi T, Umeda F, et al. Reduction urinary albumin excretion by thromboxane synthetase inhibitor, OKY-046, through modulating renal prostaglandins in patients with diabetic nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract* 1990;10:231-9.
- [56] Song D, Arikawa E, Galipeau D, et al. Androgens are necessary for the development of fructose-induced hypertension. *Hypertension* 2004;43:667-72.
- [57] Sullivan JC, Sasser JM, Pollock DM, et al. Sexual dimorphism in renal production of prostanoids in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2005;45:406-11.
- [58] Silbiger S, Lei J, Neugarten J, Estradiol suppresses type I. Collagen synthesis in mesangial cells via activation of activator protein-1. *Kidney Int* 1999;4:1268-76.
- [59] Sheridan AM, Bonventre JV. Pathophysiology of ischemic acute renal failure. *Contrib Nephrol* 2001;132:7-21.
- [60] Moorhead JF, Chan MK, El-Nahas M, et al. Lipid nephrotoxicity in chronic progressive glomerular and tubulo-interstitial disease. *Lancet* 1982;2:1309-11.
- [61] Fried LF, Orchard TJ, Kasiske BL. Effect of lipid reduction on the progression of renal disease: a meta-analysis. *Kidney Int* 2001;59:260-9.
- [62] El Hafidi M, Pérez I, Zamora J, et al. Glycine intake decreases plasma free fatty acids, adipose cell size, and blood pressure in sucrose-fed rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;287:R1387-93.
- [63] Williams B, Schrier R. Glucose-induced protein kinase C activity regulates arachidonic acid release and eicosanoid production by cultured glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 1993;92:2889-96.
- [64] Rupnow HL, Phermetton TM, Modrick ML, et al. Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. VIII. Estrogen and progesterone effects on cPLA2, COX-1, and PGIS protein expression. *Biol Reprod* 2002;66:468-74.
- [65] Muirhead EE, Rightsel WA, Leach BE, et al. Reversal of hypertension by transplants and lipid extracts of cultured renomedullary interstitial cells. *Lab Invest* 1977;36:162-72.
- [66] Yanagisawa H, Morrissey J, Klahr S. Mechanism of enhanced eicosanoid production by isolated glomeruli from rats with bilateral ureteral obstruction. *Am J Physiol* 1991;261:F248-55.
- [67] Imig J. Eicosanoid regulation of renal vasculature. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;279:F965-81.
- [68] Caughey GE, Cleland CG, Penglis PS, et al. Roles of cyclooxygenase COX-1 and COX-2 in prostanoid production by human endothelial cells: selective upregulation of prostacyclin synthesis by COX-2. *J Immunol* 2001;167:2831-8.
- [69] Baber SR, Deng W, Rodriguez J, et al. Vasoactive prostanoids are generated from arachidonic acid by COX-1 and COX-2 in the mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H1476-87.
- [70] Orshal J, Khalil R. Gender, sex hormones, and vascular tone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;286:R233-49.
- [71] Maggi FM, Tyrrell N, Maddox Y, Watkins W, Ramey ER, Ramwell PW. Prostaglandin synthetase activity in vascular tissue of male and female rats. *Prostaglandins* 1980;19:985-93.
- [72] Ishizuka T, Ito O, Omata K, et al. Role of androgens in the renal production of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid in spontaneously hypertensive rats. *Nippon Jinzo Gakkai Shi* 2004;46:685-92.
- [73] Zhou Y, Lin S, Chang HH, et al. Gender differences of renal CYP-derived eicosanoid synthesis in rats fed a high-fat diet. *Am J Hypertens* 2005;18:530-7.
- [74] Holla V, Adas F, Imig J, et al. Alterations in the regulation of androgen-sensitive Cyp 4a monooxygenases cause hypertension. *PNAS* 2001;98:5211-6.