

**UNIVERSIDAD DE GRANADA. FACULTAD DE MEDICINA.
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA**



TESIS DOCTORAL

**EFFECTOS DE LA ACTIVACIÓN PPAR α EN EL HIPERTIROIDISMO
Y EN LA HIPERTENSIÓN EXPERIMENTAL EN RATAS**

Antonio H. Cruz Guerrero

Granada, 2010

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Antonio H. Cruz Guerrero
D.L.: GR 3109-2010
ISBN: 978-84-693-3298-6

**JOSÉ FÉLIX VARGAS PALOMARES, CATEDRÁTICO DEL
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE
GRANADA**

Certifica: Que los trabajos efectuados en la elaboración de la Tesis Doctoral titulada: **Efectos de la activación PPAR α en el hipertiroidismo y en la hipertensión experimental en ratas**, presentada por Antonio H. Cruz Guerrero, han sido realizados bajo mi supervisión y dirección, reuniendo las condiciones académicas necesarias para su presentación para optar al grado de Doctor.

Y para que conste donde proceda, firmo la presente en

Granada, a 14 de abril de 2010

Fdo. José Félix Vargas Palomares

**JUAN MANUEL MORENO AYUSO, PROFESOR DEL
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA.**

Certifica: Que los trabajos efectuados en la elaboración de la Tesis Doctoral titulada: **Efectos de la activación PPAR α en el hipertiroidismo y en la hipertensión experimental en ratas**, presentada por Antonio H. Cruz Guerrero, han sido realizados bajo mi supervisión y dirección, reuniendo las condiciones académicas necesarias para su presentación para optar al grado de Doctor.

Y para que conste donde proceda, firmo la presente en

Granada, a 14 de abril de 2010

Fdo. Juan Manuel Moreno Ayuso

**ISABEL RODRÍGUEZ GÓMEZ, DOCTORA EN FISIOLOGÍA EN LA
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

Certifica: Que los trabajos efectuados en la elaboración de la Tesis Doctoral titulada: **Efectos de la activación PPAR α en el hipertiroidismo y en la hipertensión experimental en ratas**, presentada por Antonio H. Cruz Guerrero, han sido realizados bajo mi supervisión y dirección, reuniendo las condiciones académicas necesarias para su presentación para optar al grado de Doctor.

Y para que conste donde proceda, firmo la presente en

Granada, a 14 de abril de 2010

Fdo. Isabel Rodríguez Gómez

Los resultados de esta Tesis Doctoral han sido enviados o parcialmente publicados en:

- Rodríguez-Gómez I, Cruz A, Moreno JM, Soler A, Osuna A, Vargas F. Clofibrate Prevents and Reverses the Hemodynamic Manifestations of Hyperthyroidism in Rats. *American Journal of Hypertension* 21(3): 341-347, 2008.
- Cruz A, Rodríguez-Gómez I, Perez-Abud R, Vargas MA, Wangenstein R, Quesada A, Osuna A, Moreno JM. Effects of Clofibrate on Salt Loading-Induced Hypertension in Rats.

A Sam y Ana

Agradecimientos:

A los directores de esta tesis, D. José Félix Vargas Palomares, D. Juan Manuel Moreno Ayuso y Dña. Isabel Rodríguez Gómez, que me han guiado en todo momento con sus conocimientos, dedicación y capacidad de trabajo durante el desarrollo de este proyecto.

Al Departamento de Fisiología y a la Unidad Experimental del Hospital Virgen de las Nieves, y a todo el personal de los mismos, que ha colaborado en la elaboración de esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio, por su ayuda desinteresada y su apoyo demostrado en todo momento.

A toda mi familia que siempre ha estado ahí, y como no, a mis padres, por haberme animado a embarcarme en este trabajo.

Lista de abreviaturas

AA: Ácido araquidónico

AACOF3: Fosfolipasa A2 araquidonil-trifluorometilcetona

ABT: 1-amniobenzotriazol

Ach: Acetilcolina

ACO: Acil-CoA oxidasa

ACr: Aclaramiento de creatinina

ADP: Adenosín-difosfato

AMPc: Adenosín-monofosfato cíclico

Ang II: Angiotensina II

Apa: Apamina

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ATP: Adenosín-trifosfato

AVP: Arginina vasopresina

BH₄: Tetrahidrobiopterina

BZF: Benzafibrato

Ca²⁺: Ión calcio

CAT: Catalasa

ChTx: Charybdotoxina

CO: Monóxido de carbono

COX: Ciclooxygenasa

CYP: Citocromo P450

DAG: Diacilglicerol

DiHETE: Ácidos dihidroxieicosatetranoicos

DOCA: Desoxicorticosterona acetato

ECA: Enzima convertidora de Angiotensina

EDHF/FHDE: Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
EDTA: Ácido etilendiaminotetracético
EET: Ácidos epoxieicosatrienoicos
Em: Potencial de membrana
ENaCs: Canales de Na⁺ epiteliales
eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial
ET-1: Endotelina-1
FABP: Proteína de unión a los ácidos grasos
FAD: Flavín adenín dinucleótido
FC: Frecuencia cardiaca
FCE: Factor de crecimiento epitelial/epidérmico
FMN: Flavín-mononucleótido
FRDE: Factor relajante derivado del endotelio
FSR: Flujo sanguíneo renal
GC: Guanilatociclasa
GLUT4: Transportador de glucosa sensible a insulina
GMPc: Guanosín-monofostato cíclico
GPX: Glutation-peroxidasa
GR: Glutation-reductasa
GRTH: Resistencia generalizada a hormonas tiroideas
HDL: Lipoproteínas de alta densidad
HETE: Ácidos Hidroxieicosatetranoicos
HEPES: Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-etanosulfónico
HT: Hormonas tiroideas
H₂O₂: Peróxido de hidrógeno
IECA: Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina
iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible

IP₃: Inositol 1-4-5 trifosfato

K⁺: Ión potasio

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

L-NAME: N^o-nitro-L-arginina-metil-éster

L-NMMA: Nitro-monometil-L-arginina

LPL: Lipoproteína-lipasa

MAPK: Proteín-kinasa activada por mitógenos

MCAD: Acil-CoA deshidrogenasa de cadena media

mCPT: Carnitín palmitoil transferasa muscular

MDA: Malondialdehído

MTZ: Metimazol

Na⁺: Ión sodio

NADPH: Nicotín adenina dinucleótido fosfato

NE: Norepinefrina

nNOS: Óxido nítrico sintasa neuronal

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintasa

NOSc: Óxido nítrico sintasa constitutiva

NPS: Nitroprusiato sódico

O₂⁻: Anión superóxido

ONOO⁻: Peroxinitrito

PA: Presión arterial

PAM: Presión arterial media

PAS: Presión arterial sistólica

PBS: Phosphate buffered saline

PC: Peso corporal

PCF: Peso corporal final

PCO: Peso corazón
P.Dif.: Presión diferencial
PDK4: Piruvato deshidrogenasa kinasa
PGH₂: Prostaglandina H₂
Phe: Fenilefrina
PHI: Peso del hígado
PIP₂: 4,5 fosfatidilinositol bifosfato
PKA: Proteína Kinasa A
PKC: Proteína Kinasa C
PLA₂: Fosfolipasa A₂
PLC: Fosfolipasa C
PMN: Polimorfonucleares
PMSF: Phenyl methyl sulfonyl fluoride
PNA: Péptido natriurético auricular
pNP: p-nitrofenol
PPAR α : Receptores alfa activados por los proliferadores de peroxisomas
PPRES: Elementos de respuesta a los proliferadores de peroxisomas
PP: Presión de pulso
PP: Proliferadores de peroxisomas
PR: Peso del riñón
PTI: Peso del tiroides
PV: Peso ventricular total
PVD: Peso ventricular derecho
PVI: Peso ventricular izquierdo
RAR: Receptor del ácido retinoico
ROS: Especies reactivas de oxígeno
RPP: Presión de perfusión renal

RT: Receptor tiroideo
RXR: Receptor X retinoide
SHR: Ratas espontáneamente hipertensas
SNC: Sistema nervioso central
SNS: Sistema nervioso simpático
SOD: Superóxido dismutasa
SRA: Sistema renina-angiotensina
T₃: Triyodotironina
T₄: Tiroxina
TALH: Porción gruesa del asa ascendente de Henle
TBG: Globulina transportadora de tiroxina
TC: Temperatura corporal
TEA: Tetraetilamonio
TFG: Tasa de filtrado glomerular
TG: Triglicéridos
TP: Túbulo proximal
TSH: Hormona estimulante del tiroides
TxA₂: Tromboxano A₂
UCP: Proteína desacoplante
UDPGA: Uridine Diphosphate Glucuronic Acid
UGT: Uridín-glucoronil-transferasas
VC: Vasoconstrictor
VD: Vasodilatador
VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad
VDR: Receptor de vitamina D₃

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. VARIABLES BIOLÓGICAS EN EL HIPERTIROIDISMO. MANIFESTACIONES CARDIOVASCULARES Y RENALES.....	3
1.1. Función cardiovascular	3
1.1.1. Cambios hemodinámicos.....	3
1.1.2. Función Vasculard.....	5
1.1.3. Función endotelial.....	6
1.1.4. Hipertrofia cardiaca.....	7
1.2. Función renal	9
1.2.1. Crecimiento renal y manejo del sodio renal.....	9
1.2.2. Flujo sanguíneo renal y tasa de filtración glomerular ...	9
1.2.3. Proteinuria.....	10
1.2.4. La función simpática en los desórdenes tiroideos.....	10
1.2.5. El sistema Renina-Angiotensina	11
1.2.6. Otras hormonas vasoactivas.....	11
1.3. Stress oxidativo en el hipertiroidismo.....	12

2. EFECTOS DE LOS METABOLITOS DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO SOBRE EL TONO VASCULAR E HIPERTENSIÓN	14
2.1. Metabolismo del Ácido Araquidónico.....	15
2.1.1. Metabolitos del Ácido Araquidónico por las enzimas Citocromo P450.....	15
2.1.2. ω -Hidroxilasas	17
2.1.3. Epoxigenasas.....	19
2.1.4. Regulación de los enzimas CYP.....	19
2.1.5. Inhibidores e Inductores CYP.....	21
2.2. Acciones pro- y antihipertensivas	24
3. EFECTOS DE LOS FIBRATOS SOBRE LA FUNCIÓN RENAL.....	28
3.1. Flujo Sanguíneo Renal	29
3.2. Túbulo proximal.....	30
3.3. Porción Gruesa del Asa Ascendente de Henle (TALH)	33
3.4. Conducto colector	33
4. EFECTOS DE LOS FIBRATOS SOBRE LA FUNCIÓN TIROIDEA.....	34
4.1. Receptores tiroideos (RT).....	34
4.2. Receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR)	36

4.3. Interacción RT-PPAR.....	39
4.4. Desiodinasas	45
4.5. Proteínas transportadoras.....	46
4.6. Glucuronidación.....	48
5. EFECTOS DE LOS FIBRATOS SOBRE EL STRESS	
OXIDATIVO	50
5.1. Fibratos y óxido nítrico.....	50
5.2. Fibratos y stress oxidativo.....	52
5.3. Óxido nítrico y actividad citocromo P-450	55
5.4. Óxido nítrico y función renal.....	56
6. OTRAS ACCIONES DE LOS FIBRATOS	58
6.1. Fibratos-Endotelina.....	58
6.2. Fibratos-Mitogénesis.....	59
II. PLANTEAMIENTOS Y OBJETIVOS	61
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	69
1. Fármacos e instrumentos utilizados.....	71
1.1. Fármacos.....	71
1.2. Instrumentos	71
2. Métodos experimentales	72
2.1. Animales y distribución	72

2.2. Determinación de la presión sistólica mediante pletismografía en rabo	74
2.3. Cateterización de la arteria femoral	75
2.4. Medida de la presión arterial y frecuencia cardiaca por registro directo.....	76
3. Protocolos experimentales	77
3.1. Experimento 1. Efectos del Clofibrato sobre las alteraciones inducidas por el hipertiroidismo	77
3.2. Experimento 2. Efectos del Clofibrato sobre la hipertensión provocada por la dieta rica en sal.....	79
3.3. Experimento 3. Efectos del Clofibrato sobre la hipertensión provocada por L-NAME.....	81
4. Procedimientos analíticos	82
4.1. Determinación de proteínas, electrolitos, urea, creatinina, lípidos y hormonas tiroideas	82
4.2. Actividad de la UGT	82
4.3. Determinación de isoprostanos F2 en orina	83
4.4. Determinación de nitratos y nitritos (NOx) en orina.....	84
4.5. Determinación de endotelina y vasopresina.....	86
4.6. Concentración de hormonas tiroideas en los tejidos	86
5. Análisis estadístico.....	86

IV. RESULTADOS	87
1. Experimento 1: Efectos del Clofibrato sobre las alteraciones inducidas por el hipertiroidismo	89
1.1. Variables morfológicas	89
1.2. Variables plasmáticas	91
1.3. Perfil lipídico en plasma.....	92
1.4. Variables metabólicas	93
1.5. Variables urinarias	94
1.6. Presión arterial sistólica y presión del pulso.....	95
1.7. Frecuencia cardiaca.....	97
1.8. Temperatura corporal.....	99
1.9. Actividad enzimática.....	100
1.10. Niveles de hormonas tiroideas en plasma.....	101
1.11. Efectos del Clofibrato durante la fase establecida del hipertiroidismo	103
2. Experimento 2: Efectos del Clofibrato sobre la hipertensión provocada por la dieta rica en sal	105
2.1. Variables morfológicas	105
2.2. Variables plasmáticas	107
2.3. Variables metabólicas	108
2.4. Variables urinarias	109
2.5. Presión sanguínea y frecuencia cardiaca	111
2.6. Niveles de hormonas tiroideas en los tejidos.....	113

3. Experimento 3: Efectos del Clofibrato sobre la hipertensión provocada por L-NAME	115
3.1. Variables morfológicas	115
3.2. Variables plasmáticas	117
3.3. Perfil lipídico en plasma.....	118
3.4. Presión arterial media.....	119
3.5. Frecuencia cardiaca	120
3.6. Presión del pulso	121
3.7. Niveles plasmáticos de hormonas tiroideas.....	122
V. DISCUSIÓN.....	125
VI. CONCLUSIONES.....	145
VII. BIBLIOGRAFÍA	149

I. INTRODUCCIÓN

1. VARIABLES BIOLÓGICAS EN EL HIPERTIROIDISMO. MANIFESTACIONES CARDIOVASCULARES Y RENALES

1.1. Función cardiovascular

1.1.1. Cambios hemodinámicos

Las alteraciones de la función tiroidea son conocidas desde hace más de un siglo (Parry, 1825; Feldman, 1995) y son frecuentes tanto en seres humanos como en animales. Las variaciones del estado eutiroideo afectan virtualmente a todos los sistemas fisiológicos pero los efectos sobre el sistema cardiovascular y renal son particularmente importantes (Klein, 1995, 2001; Larsen, 1998).

Los principales cambios hemodinámicos y morfológicos de los desórdenes tiroideos son:

Grupos	Hiper-tiroidismo	Hipo-tiroidismo
Variables Hemodinámicas		
Presión arterial	↑	↓
Volumen sanguíneo	↑	↓
Gasto cardiaco	↑	↓
Resistencia periférica total	↓	↑
Frecuencia cardiaca	↑	↓
Presión del pulso	↑	↓

Grupos	Hiper-tiroidismo	Hipo-tiroidismo
Variables Morfológicas		
Peso corporal	↓	↓
Peso tiroideo	↓	↑
Peso ventricular	↑	↓
Peso renal	↑	↓
Peso ventricular/peso corporal	↑	↓
Peso renal/peso corporal	↑	↓
Ventrículo izq./ventrículo dcho	↓	No medido

Ilustración 01. Variables hemodinámicas y morfológicas en el hiper e hipotiroidismo experimental.

En el hipertiroidismo se observa una circulación hiperdinámica con aumento del volumen latido, ritmo cardiaco, presión del pulso y presión arterial y disminución de la resistencia vascular periférica, mientras que el estado hipotiroideo se asocia a un volumen minuto, frecuencia cardiaca, presión del pulso y presión arterial bajos y una resistencia vascular periférica elevada. (Klein, 1995, 2001; Larsen, 1998). El hipertiroidismo se puede asociar a una disminución de hasta el 50% en la resistencia vascular sistémica (RVS). Se ha observado que el hipertiroidismo está asociado a un mayor número de capilares en los músculos de seres humanos y de ratas. La densidad capilar aumentada puede ir acompañada por un aumento en el número de vasos arteriales de resistencia, que podrían reducir la resistencia vascular. También, la liberación local de vasodilatadores en los tejidos periféricos como

consecuencia del metabolismo tisular elevado asociado con el hipertiroidismo podría causar dilatación de los vasos de resistencia.

Una hipótesis alternativa implica la capacidad de la hormona tiroidea para reducir directamente el tono del músculo liso arteriolar en los vasos de conductancia y en los de resistencia. Se ha demostrado en animales que el bloqueo beta-adrenérgico revierte el descenso de la resistencia vascular sistémica y atenúa el incremento del gasto cardiaco mediados por la triyodotironina (T_3) (Kapitola, 1981).

Por otra parte, el aumento del flujo sanguíneo puede ser parcialmente abolido por la atropina, lo cual indica también la existencia de una respuesta colinérgica vasodilatadora en el hipertiroidismo.

1.1.2. Función Vascular

a) Vasoconstrictores:

No se ha alcanzado ningún consenso referente a la respuesta vasoconstrictora en el hiper/hipotiroidismo (Grieve, 1999). Los estudios realizados por diferentes laboratorios han mostrado resultados contradictorios en cuanto a la reactividad vascular en los diferentes tejidos, tiras de aorta, riñones perfundidos, cuartos traseros, lecho vascular mesentérico y arterias coronarias.

b) Vasodilatadores:

El aumento de la vasodilatación dependiente del endotelio que normalmente se observa en los vasos de resistencia de las ratas

hipertiroideas puede contribuir a la disminución de la resistencia vascular característica de esta enfermedad.

1.1.3. Función endotelial

Es bien sabido que el endotelio puede modular el tono del músculo liso vascular mediante la síntesis y liberación de varios factores relajantes derivados del endotelio como el óxido nítrico (NO) y el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF). Es posible que el gasto cardiaco aumentado del hipertiroidismo conduzca a una actividad aumentada de la óxido nítrico sintasa (NOS) mediante el aumento crónico de la tensión por estiramiento sobre el endotelio (Furchgott, 1998).

Además, el hipertiroidismo en ratas aumenta la sensibilidad de los vasos de resistencia al vasodilatador dependiente del endotelio, acetilcolina (Ach), tanto en los vasos de conductancia (aorta) como en los de resistencia (riñón aislado) (Vargas, 1995; McAllister, 1998; Bússemaker, 2003; Iwata, 2004).

McAllister et al. observaron que la respuesta contráctil a la norepinefrina (NE) se reduce en el hipertiroidismo en presencia de un endotelio funcional intacto, mientras que en los vasos sin endotelio no se observan diferencias en cuanto a la respuesta contráctil a la NE entre ratas eutiroides y ratas hipertiroideas.

Más recientemente, Bússemaker et al. describieron los efectos del hipertiroidismo agudo y crónico en la contribución diferenciada del NO

y del EDHF a la relajación dependiente del endotelio en anillos de arteria renal. Treinta y seis horas después de la administración de T_3 , la relajación mediada por EDHF y por NO fue aumentada notablemente. Después de ocho semanas de la administración de T_3 , la relajación mediada por EDHF disminuyó, mientras que la relajación mediada por NO seguía aumentada y la expresión de la óxido nítrico sintasa (NOS) endotelial estaba aumentada en la aorta (Büssemaker, 2003).

Por otra parte, estos autores también demostraron que las células del músculo liso de las arterias renales de ratas tratadas con T_3 durante ocho semanas estaban significativamente hiperpolarizadas con respecto a los controles, un fenómeno que puede también ser secundario a la elevación crónica de la tensión de estiramiento, ya que es conocido que este factor estimula la expresión de los canales de potasio en las células endoteliales (Hoger, 2005). En este sentido, las hormonas tiroideas aumentan la expresión de los canales de K^+ voltaje-dependientes y otras proteínas implicadas en la regulación del potencial de membrana (Ojamaa, 1999; Pachuki, 1999).

1.1.4. Hipertrofia cardiaca

La hormona tiroidea podría promover el desarrollo de una hipertrofia cardiaca, bien por un efecto directo en la síntesis de la proteína del miocardio y/o indirectamente a través de cambios en el gasto cardiaco (Klein, 1998). Estudios realizados en cultivos de células miocárdicas sugieren que la T_4 ejerce un efecto directo sobre el metabolismo proteico

(Sanford, 1978). En este sentido, se ha demostrado que el propanolol (B-bloqueante que suprime los síntomas del hipertiroidismo aunque no inhibe la síntesis de hormonas) no previene la hipertrofia cardiaca ni la necrosis celular multifocal en la rata con hipertiroidismo crónico (Gerdes, 1985).

Por otra parte, se ha sugerido que el sistema renina-angiotensina (SRA) local juega un papel primario en el desarrollo de la hipertrofia cardiaca inducida por el hipertiroidismo (Kobori, 1997). Sin embargo, el bloqueo crónico de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) o de los receptores selectivos de angiotensina (AT1) no altera significativamente la hipertrofia ventricular relativa tanto en ratas normotensas como en hipertensas hipertiroides (García del Río, 1997; Rodríguez-Gómez, 2003), indicando que el SRA circulante no juega un papel esencial en este tipo de hipertrofia cardiaca.

Otras observaciones indican que la hipertrofia ventricular en el hipertiroidismo no está relacionada con la presión arterial. Así, aumentos en la presión arterial inducidos por L-NAME (Klein, 1995) o reducciones producidas por losartán (Rodríguez-Gómez, 2003) en ratas hipertiroides no modifican la hipertrofia ventricular. La hipertrofia cardiaca producida por las hormonas tiroideas es independiente de la sobrecarga cardiaca. Podría proponerse que un efecto trófico directo de las hormonas tiroideas sobre el corazón puede ser el responsable de la hipertrofia cardiaca en el hipertiroidismo. En apoyo a esta idea, estudios realizados en cardiomiocitos cultivados han demostrado que la

hormona tiroidea controla directamente la expresión génica y factores de crecimiento.

1.2. Función renal

1.2.1. Crecimiento renal y manejo del sodio renal

El hipertiroidismo aumenta el peso del riñón en relación al peso corporal y provoca una tendencia a la retención de sodio (Michael, 1972; Bradley, 1972; Emmanuel, 1974). Así, la excreción absoluta y fraccional de sodio está disminuida en ratas hipertiroideas (Katz, 1973) debido a una disminución de la carga filtrada de sodio a la vez que a un aumento de la reabsorción tubular de sodio (Vargas, 1994). Además, presentan una alteración en la relación presión-natriuresis con una presión arterial alta que permite mantener una tasa de excreción de sodio dentro de niveles normales (Guyton, 1980).

1.2.2. Flujo sanguíneo renal (FSR) y tasa de filtración glomerular (TFG)

Existen resultados contradictorios (Michael, 1972; Emmanuel, 1972; Taylor, 1964) aunque parece ser que la administración de tiroxina (T_4) produce una disminución del aclaramiento de creatinina normalizado por peso de riñón de forma relativa al tiempo de inducción y a la dosis de T_4 empleada (Rodríguez-Gómez, 2003, 2005; Vargas, 1994; García-Estañ, 1995; Moreno, 2005).

Por otra parte, Fregly et al. observaron que no parece existir diferencias entre el FSR y TFG en relación al peso del riñón entre ratas hipertiroideas y ratas control (Fregly, 1962).

1.2.3. Proteinuria

En el hipertiroidismo aparece un aumento de la excreción urinaria de proteínas normalizado por gramo de riñón (Weetman, 1965; Moreno, 2005). Esta alteración no está relacionada con la presión arterial ya que una terapia antihipertensiva no es capaz de reducir la proteinuria. Además, tampoco parece estar relacionada con la actividad del sistema renina-angiotensina o con el stress oxidativo. La proteinuria probablemente es debida a una acción directa de las hormonas tiroideas, que aumentan la permeabilidad de la barrera glomerular produciendo un síndrome nefrótico de cambios mínimos (Tanwani, 2002).

1.2.4. La función simpática en los desórdenes tiroideos

La taquicardia, el aumento de la presión diferencial, la circulación hiperdinámica y el gasto cardiaco aumentado son manifestaciones propias de la hiperactividad simpática. Se ha sugerido que las hormonas tiroideas podrían aumentar la liberación de catecolaminas (Levey, 1971) y/o aumentar el número de receptores beta-adrenérgicos, aunque existen resultados contradictorios (Harrison, 1967; Landsberg, 1977; Polikar, 1970; Bilezikian, 1982, 1983). Por otra parte, Dratman et al. han

sugerido un efecto directo de las hormonas tiroideas debido a su semejanza química estructural con las catecolaminas (Dratman, 1982).

1.2.5. El sistema Renina-Angiotensina

El hipertiroidismo se acompaña de una hiperactividad del sistema renina-angiotensina-aldosterona (Marchant, 1993; Ganong, 1982; Jiménez, 1982). Así pues existe un aumento de los niveles plasmáticos de actividad de renina, angiotensinógeno, angiotensina II y aldosterona, además de un aumento de la densidad de los receptores para angiotensina en el riñón, hígado y ventrículos cardiacos.

1.2.6. Otras hormonas vasoactivas

Se ha observado un aumento de respuesta a la vasopresina (AVP) en ratas hipertiroides (Vargas, 1991) aunque no parece existir variaciones en la cantidad de esta hormona excretada en orina respecto a ratas control en condiciones normales.

Se ha demostrado un aumento de la concentración de endotelina (ET) en la hipófisis de ratas hipertiroides, aunque existen resultados contradictorios respecto a las variaciones de endotelina en el plasma y tejidos periféricos como el corazón y glándulas adrenales (Singh, 1994).

El hipertiroidismo causa un incremento en la síntesis y secreción de péptido natriurético auricular (PNA) (Kohno, 1986, 1987; Wong, 1989).

1.3. Stress oxidativo en el hipertiroidismo

El stress oxidativo producido por el anión superóxido (O_2^-) y otras especies reactivas de oxígeno (ROS) contribuye al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, diabetes e insuficiencia renal. Numerosos estudios han relacionado el stress oxidativo con la patogénesis de la hipertensión arterial en modelos animales genéticos y en formas secundarias de esta enfermedad en ratas. Además el tempol, un mimético de la superóxido dismutasa (SOD), y otros antioxidantes disminuyen la presión sanguínea en ratas espontáneamente hipertensas (SHR), en ratas DOCA-sal y en la hipertensión producida por inhibidores del óxido nítrico (NO). Las ROS también juegan un importante papel en la patogénesis de las enfermedades renales, produciendo lesión vascular, glomerular, tubular e intersticial. Además, se ha demostrado que las ROS también participan en la hemodinámica renal y en la excreción de sodio, y que la administración de T_3 aumenta la concentración de anión superóxido (O_2^-) intracelular en la porción gruesa del asa ascendente de Henle (TALH) de la médula aislada del riñón de ratas Sprague-Dawley (Mori, 2004). Las ratas tratadas con tiroxina (T_4) muestran una disminución significativa de la actividad SOD en la corteza renal y en los ventrículos derecho e izquierdo (Moreno, 2005). Estos hallazgos indican una deficiencia cuantitativa de SOD intracelular en ratas hipertiroideas que puede producir un aumento del stress oxidativo renal y cardiovascular.

La actividad de otras enzimas antioxidantes como la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPX) y la glutatión reductasa (GR) también disminuyen con la administración de T₄ (Giavarotti, 1998; Asayama, 1989; Sawant, 2003; Seymen, 1999, 2004).

En general, estos hallazgos sugieren que el stress oxidativo en el hipertiroidismo puede ser debido a una disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes. Esta disminución puede dar lugar a una menor inactivación de O₂⁻, tal como indica el aumento de la excreción urinaria en 24h de isoprostanos F_{2α} y de los niveles plasmáticos de malonildialdehído (MDA) en ratas tratadas con T₄. Además la administración crónica de tempol atenúa el desarrollo de hipertensión en ratas hipertiroideas y reduce el MDA plasmático y la excreción urinaria total de F_{2α} isoprostanos en ratas hipertiroideas hipertensas pero no en las ratas control. En resumen, los resultados indican que el hipertiroidismo está asociado a una reducida actividad enzimática antioxidante en los tejidos renal y cardiaco. Esto sugiere que el stress oxidativo participa en la hipertensión inducida por T₄.

2. EFECTOS DE LOS METABOLITOS DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO SOBRE EL TONO VASCULAR E HIPERTENSIÓN

El clofibrato y otros derivados del ácido fíbrico (gemfibrozil, fenofibrato...) son agonistas sintéticos de los receptores alfa activados por los proliferadores de peroxisomas (PPAR α), un receptor nuclear también activado por ligandos naturales como los ácidos grasos libres y algunos eicosanoides (Hoebel, 1998). Incrementan la expresión de numerosos genes implicados en el metabolismo lipídico incluyendo los genes que codifican las monooxigenasas citocromo P450 que metabolizan el ácido araquidónico (AA) a 19- y 20-HETE y EETs (Luci, 2006; Sankaralingam, 2006; Bonilla, 2001).

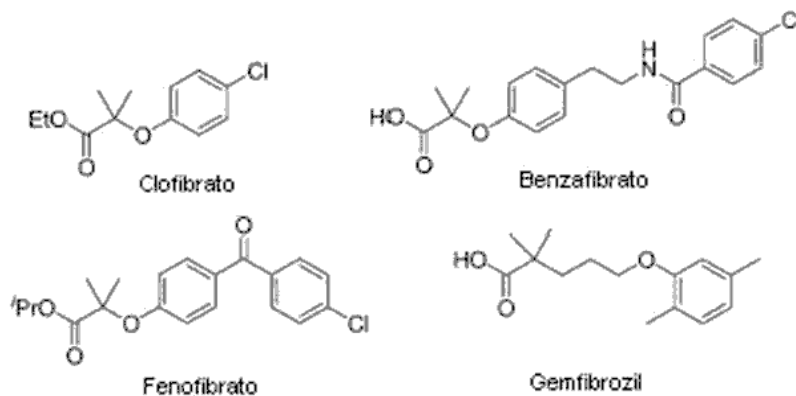


Ilustración 02. Estructura química de los fibratos agonistas PPAR α .

2.1. Metabolismo del Ácido Araquidónico

2.1.1. Metabolitos del Ácido Araquidónico por las enzimas Citocromo P450

El metabolismo del ácido araquidónico (AA) vía ciclooxigenasa (COX) produce prostaglandinas (PGs), prostaciclina y tromboxanos, mientras que la vía de la lipoxigenasa produce leucotrienos (Needleman, 1986; Smith, 1992; Jackson, 1993; Roman, 2002).

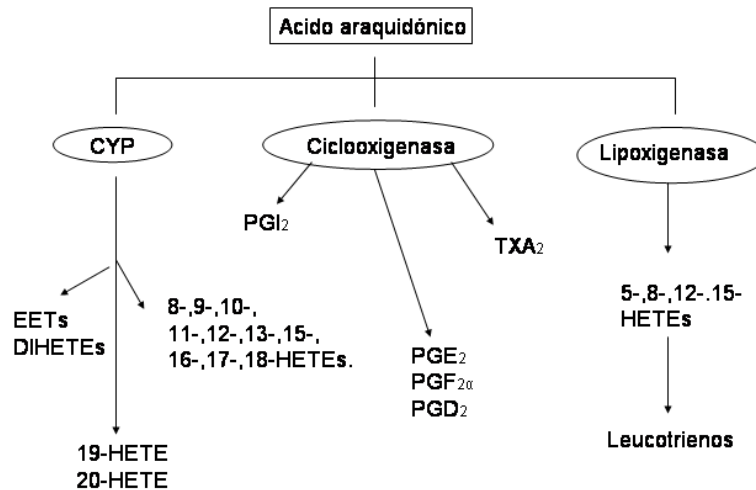


Ilustración 03. Vías metabólicas del ácido araquidónico.

Capdevila, Morrison y Oliw et al. estudiaron cómo el AA era también metabolizado por las enzimas citocromo P-450 (CYP) en el hígado y riñón hasta ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs) y ácidos dihidroxieicosatetranoicos (DiHETEs) (Capdevila, 1981; Morrison, 1981;

Oliw, 1981). Estos metabolitos tienen propiedades vasoactivas además de afectar de forma directa al transporte iónico renal (Straudinger, 1994).

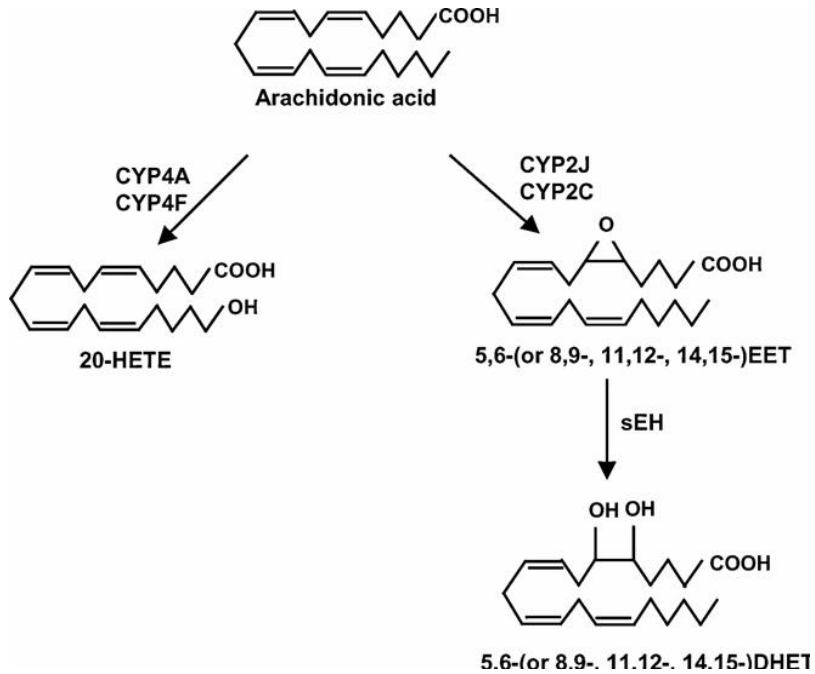


Ilustración 04. Estructura química de los metabolitos derivados del ácido araquidónico.

Iwai et al. identificaron al CYP4A2 como el gen que es sobreexpresado en el riñón de las ratas espontáneamente hipertensas (SHR). Sacerdoti y Omata et al. descubrieron cómo la producción de 20-HETE estaba elevada en los riñones de las ratas SHR (Iwai, 1991; Sacerdoti, 1988; Omata, 1992). Finalmente, numerosos investigadores demostraron que los agentes que inducen la hemoxygenasa y reducen la formación renal de 20-HETE previenen el desarrollo de hipertensión en las ratas SHR (Escalante, 1991; Levere, 1990; Sacerdoti, 1989). Estas observaciones

condujeron a la hipótesis de que una elevación de la producción renal de 20-HETE puede jugar un papel importante en el desarrollo de la hipertensión (McGiff, 1999).

2.1.2. ω -Hidroxilasas

Se han identificado más de 500 genes CYP (Nelson, 1996) los cuales se dividen en 78 familias. Catorce de estas familias (29 subfamilias) están expresadas en el tejido de mamíferos.

Citocromos productores de 20-HETE
Humano: 4A11, 4F2, 4F3, 4F11, 4F12
Murino: 4A10, 4A14, 4F15, 4F16
Conejo: 4A6
Rata: 4A1, 4A2, 4A3, 4A6
Ratón: 4A12

Ilustración 05. Citocromos productores de 20-HETE.

La expresión de CYP4A6 es inducida en el hígado y riñón de conejos por los fibratos de forma similar al efecto de los fibratos sobre las isoformas CYP4A1 en las ratas. La expresión de CYP4A7 es inducida en menor medida por los fibratos (Roman, 1993). Miembros de otras familias, como CYP4F15 y 4F16, se expresan en el hígado y riñón murinos y son inducidos por el NO y los fibratos (Cui, 2001). La expresión de CYP4A10 y CYP4A14 es también inducida por los fibratos en el hígado y riñón murinos de forma similar a la inducción en ratas de CYP4A1 y CYP4A3

(Bell, 1993; Honeck, 2000). La CYP4A12 se expresa en el hígado y riñón de ratones. La expresión de CYP4A12 es débilmente inducida por los fibratos.

A diferencia del fenobarbital y los hidrocarburos aromáticos, que producen una inducción generalizada de las enzimas P450, el clofibrato es un inductor específico de la familia de genes P450-A, la cual regula la ω -hidroxilación de ácidos grasos en el hígado y el riñón (Gibson, 1989; Roman, 1993). Los mecanismos por los cuales el clofibrato induce esta ω -hidroxilación no están claros. Hardwick et al. establecieron que esto implica directamente la activación transcripcional del gen P450 4A1 por el clofibrato (Hardwick, 1987). Por otra parte se ha señalado que la inducción de la actividad P450/ ω -hidroxilasa puede ser secundaria a las acciones antilipémicas del clofibrato y el consiguiente incremento del recambio intracelular de los ácidos grasos (Sharma, 1989). Si esto fuera cierto, otros agentes antilipémicos podrían también inducir la actividad P450/ ω -hidroxilasa renal y disminuir la presión sanguínea. En este sentido la lovastatina disminuyó la presión arterial en ratas Dahl SS/Jr (Schmitz, 1991; O'Donnell, 1991).

2.1.3. Epoxigenasas

Los EETs producen vasodilatación al ser capaces de hiperpolarizar la musculatura lisa vascular mediante la apertura de canales de K⁺ y constituyen un posible candidato como factor hiperpolarizante dependiente del endotelio (EDHF) (Campbell, 1999; Mombouli, 1997). En el riñón, los EETs regulan la hemodinámica renal e inhiben el transporte de sodio (Jacobson, 1985; Madhun, 1991; Rahman, 1997; Romero, 1991; Sakairi, 1995).

La enzima CYP2C8 parece ser la epoxigenasa más importante expresada en el hígado humano (Zeldin, 1996) y la CYP2J2 parece ser la mayor productora de EETs en los tejidos extrahepáticos, tales como corazón, riñón y páncreas (Wu, 1996; Zeldin, 1995, 1996, 1997; Zhang, 1998).

En ratas, las isoformas CYP2C23 y CYP2J parecen predominar en el riñón (Holla, 1999; Ma, 1999), la CYP2C11, CYP2D18 y CYP2C18 en el cerebro (Alkayed, 1996) y la CYP2J3 en el corazón, páncreas, hígado y pulmón.

2.1.4. Regulación de los enzimas CYP

La expresión del ARNm de las enzimas CYP está influida por multitud de factores. Entre los factores que favorecen la síntesis de EETs y 20-HETEs podemos incluir:

- Los agentes antilipémicos, como el clofibrato, inducen la expresión de CYP4A1 y 4A3 y la síntesis de 20-HETE en el hígado y riñón

(Aoyoma, 1990; Gibson, 1989; Hardwick, 1987; Roman, 1993; Simpson, 1997). La activación de los receptores PPAR α por el clofibrato conduce a la activación de los genes productores de la proteína CYP450 4A (Lawrence, 2001; Cheon, 2005). Los PPAR α tienen un papel prominente en la regulación de la expresión de CYP4A (Green, 1995; Kroetz, 1998).

- Dieta rica en sal: aumenta la expresión de CYP2C23 y la síntesis de EETs en el riñón de rata (Capdevila, 1992; Makita, 1994).
- Casi todos los agentes vasoconstrictores también aumentan la síntesis y liberación de 20-HETE en el riñón y músculo liso vascular: ANG II, norepinefrina, vasopresina, endotelina y fosfolipasas activadas (Carroll, 1996, 1997; Croft, 2000; McGiff, 1999; Oyekan, 1998; Vazquez, 1995).
- Angiotensina II (ANG II): aumenta la formación de EETs en el túbulo proximal (Madhun, 1991; Rahman, 1997). Carroll et al. descubrieron como la ANG II incrementa la liberación de 16-, 17-, 18-, 19- y 20-HETE en la orina y vasos sanguíneos renales después del bloqueo de la síntesis de 20-HETE con N-metilsulfonil-12,12-dibromododec-11-enamide (DDMS) (Carroll, 1997).
- Factor de crecimiento epidérmico (FCE) (Lin, 1995), dopamina (Aperia, 1998; Nowicki, 1997) y hormona paratiroidea (PTH) aumentan la formación de 20-HETE en el túbulo proximal (Ominato, 1996; Ribeiro, 1994; Silverstein, 1998).
- El AA es también metabolizado por las enzimas CYP hasta 7-, 10-, 13-HETE (hígado) (Brash, 1995), 16-, 17-, 18-HETE (riñón) (Carroll,

1996, 1997), 16-HETE (PMNs) (Bednar, 2000) y 8-, 9-, 11-, 12-, 15- y 20- HETE. Los análogos estructurales del 20-HETE como el 5-, 15- y 19-HETE podrían servir como antagonistas competitivos del efecto vasoconstrictor del 20-HETE (Alonso-Galicia, 1999).

- Glucocorticoides, mineralocorticoides y progesterona aumentan la expresión de proteína CYP4A en el riñón y pulmón (Lapuerta, 1988; Masters, 1991; Simpson, 1997).
- Periodo postnatal: el 20-HETE es un potente factor mitogénico (Lin, 1995; Muthalif, 1998, 2000) y puede contribuir al crecimiento y desarrollo del riñón.
- Weintraub et al. describieron como la bradikinina libera EETs y DiHETES desde las células endoteliales, y así aumenta la vasodilatación producida por la bradikinina (Weintraub, 1997)

2.1.5. Inhibidores e Inductores CYP

La administración de 1-aminobenzotriazol (ABT) (50 mg/kg ip) inhibe selectivamente enzimas de la familia CYP4A y reduce la formación de 20-HETE en el riñón de ratas. Sin embargo, otros trabajos muestran que el ABT también bloquea la actividad de otras isoformas CYP (CYP2B, 1A, 2C) que producen EETs en el hígado y el pulmón (Knickle, 1992; Mathews, 1985).

Parece ser que la administración de ABT (50 mg/kg ip) bloquea completamente la formación de EETs, DiHETEs y 20-HETE en el riñón de ratas al cabo de 2 horas y reduce la excreción urinaria de 24h de 20-

HETE en más del 50% (Maier, 2000). También reduce la formación de 20-HETE y EETs en el hígado y pulmón en aproximadamente un 50%. Aunque el ABT no es selectivo en el bloqueo de la formación de EETs versus 20-HETE, sigue siendo útil para evaluar el papel de los metabolitos CYP y AA en la mediación de las respuestas biológicas in vivo, puesto que es barato, fácilmente asequible, activo por vía oral y bien tolerado por las ratas durante más de 2 semanas (Meschter, 1994). Además inactiva irreversiblemente las enzimas CYP, de modo que permite recoger los órganos y tejidos preparados para valorar el grado de inhibición de las diferentes isoformas CYP.

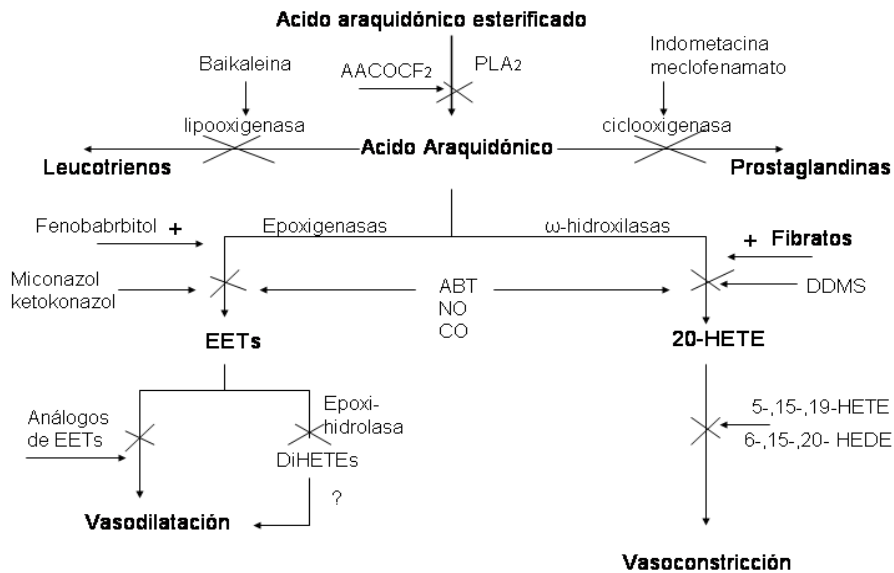


Ilustración 06. Agentes inductores e inhibidores del metabolismo del ácido araquidónico.

El NO y el CO se unen al grupo hemo e inactivan los enzimas CYP. A una concentración <100nM, bloquean completamente la formación de EETs y 20-HETE en los microsomas renales y hepáticos y en las arterias cerebrales y renales. Parece ser que actúan como moduladores de la actividad del metabolismo CYP sobre el AA en el riñón y la vasculatura periférica in vivo. De hecho, muchas de las acciones no mediadas por el GMPc producidas por el NO y el CO sobre el tono vascular y el transporte epitelial están relacionadas con su habilidad para inhibir la formación endógena de 20-HETE en los diferentes tejidos.

Otros inhibidores son: quinacrina, heparina, AACOF3 (fosfolipasa A2 araquidonil-trifluorometil cetona), indometacina, meclofenamato, baikaleina, CDC (cinamil-3, 4-dihidroxi- α -ciano-cianamato); ETYA (5,8,11,14-ácido eicosatetranoico), hemoarginato, SnCl₂, CoCl₂, 17-ODYA (ácido17-octadeinoico), DDMS (12,12-dibromododec-11-enamida), HET-0016 (N-hidroxi-N'-(4-butil-2-metilfenil) formamida), SKF-525 (β -dietil-aminoetil-difenilpropilacetato), análogos del 20-HETE, oligonucleótidos dirigidos contra CYP4A1 y antimicóticos.

2.2. Acciones pro- y antihipertensivas

La producción de 20-HETE y EETs está alterada en muchos modelos de hipertensión. A nivel del túbulo renal, el 20-HETE y EETs inhiben el transporte y reabsorción de sodio y se oponen al desarrollo de la hipertensión (Jacobson, 1985; Sakairi, 1995). Sin embargo, en el sistema vascular, el 20-HETE produce vasoconstricción e hipertensión y los EETs tienen un efecto vasodilatador (Zhou, 2005).

El clofibrato induce la expresión de CYP4A en el túbulo proximal (TP) y porción gruesa del asa ascendente de Henle (TALH) pero no en los microvasos renales. Esta inducción se correlaciona con una fuerte señal de la expresión de PPAR α en los TP y TALH pero no en las arteriolas preglomerulares (Ishizuka, 2003; Cummings, 1999).

Por tanto, el 20-HETE posee acciones pro- y antihipertensivas. En el TP y TALH, lugares donde actúa el clofibrato, el 20-HETE inhibe la reabsorción de sodio favoreciendo la natriuresis y disminuye el volumen plasmático y la presión sanguínea. En la vasculatura renal y glomérulos, el 20-HETE tiene un efecto constrictor que disminuye la tasa de filtración glomerular, aumenta la retención de sodio y aumenta la presión arterial. En la circulación periférica, el 20-HETE aumenta el tono vascular y la presión arterial sistémica.

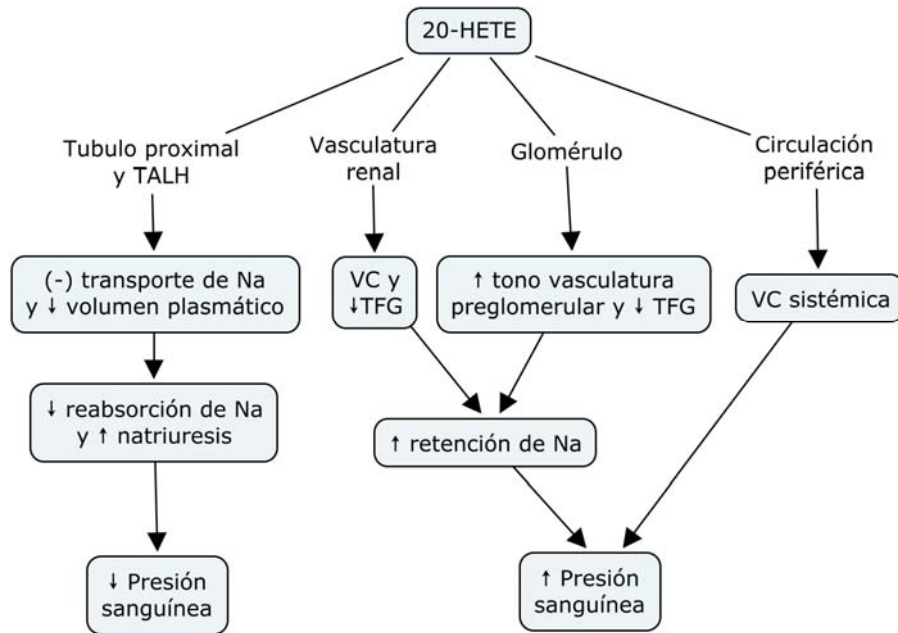


Ilustración 7. Acciones pro- y antihipertensivas del 20-HETE.

En la porción gruesa del asa ascendente de Henle (TALH) el 20-HETE, formado localmente, modula la actividad del cotransportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ (Zhou, 2005). Escalante et al. han correlacionado la hipertensión en ratas Dahl sensibles a sal con la elevada expresión del cotransportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ y del canal de K^+ (ROMK) y la consiguiente retención de sodio (Escalante 1991, 1994; Carroll, 1991; Hoaglard, 2004). En ratas Dahl sensibles a sal (Dahl SS/Jr) la hipertensión es debida a un aumento en la reabsorción de sodio en el TALH producida por un déficit de 20-HETE (Matsui, 1979; Mol, 1984).

En contraste, en ratas SHR el aumento de 20-HETE en los microvasos preglomerulares produce hipertensión debida a la vasoconstricción

renal y a la retención de sal y agua (Sterling, 1966; Visser, 1993). El tratamiento con SnCl_2 o hemoarginato reduce la formación de 20-HETE y disminuye la presión arterial (Lever, 1990). Por tanto, en este modelo de hipertensión el clofibrato aumentaría la formación CYP450-AA de 20-HETE en las arteriolas aferentes glomerulares y aumentaría la presión arterial (Roman, 1993; Omata, 1992; Iwai, 1991).

El 20-HETE es vasoconstrictor y promueve la retención de sodio en ratas SHR, mientras que atenúa el desarrollo de hipertensión en ratas Dahl SS/Jr (Ma, 1999). De hecho, en humanos, los mayores niveles de 20-HETE suelen aparecer en pacientes con enfermedad hepática avanzada e incipiente síndrome hepatorenal, una condición asociada con la intensa disminución de la presión arterial. (Bastomsky, 1976; Visser, 1993).

Estos efectos opuestos del 20-HETE sobre la presión sanguínea están basados en la generación de 20-HETE por diferentes isoformas de ω -hidroxilasa (4A1, 2, 3, y 8) localizadas en diferentes estructuras: 4A1 y 3 en los túbulos renales, 4A2 en los microvasos renales (Owens, 1992). Además, las isoformas ω -hidroxilasas están sujetas a diferentes factores reguladores. Por ejemplo, la angiotensina no estimula la producción de 20-HETE en los túbulos proximales (Harding, 1988) pero sí en el TALH (Heirwegh, 1972). La isoforma 4A2 de ω -hidroxilasa está parcialmente regulada por la testosterona en los microvasos renales (Barter, 1992) en los cuales el 20-HETE puede ser liberado por la ANG II pero no por la ET-1 (Sterling, 1966). Por tanto, las estructuras donde las isoformas ω -

hidroxilasa están localizadas determinan los efectos biológicos diversos del 20-HETE tanto sobre el movimiento de iones como sobre la vasomoción y su efecto final sobre la presión arterial.

3. EFECTOS DE LOS FIBRATOS SOBRE LA FUNCIÓN RENAL

El clofibrato induce la expresión de la proteína CYP4A en el túbulo proximal y en la porción gruesa del asa ascendente de Henle (TALH) pero no afecta a la expresión de CYP450 en los microvasos renales (arteriolas renales preglomerulares y glomérulos). Además el clofibrato induce selectivamente la actividad ω -hidroxilasa (producción de 20-HETE) sin ejercer un efecto significativo sobre la actividad de la epoxigenasa (producción de EETs).

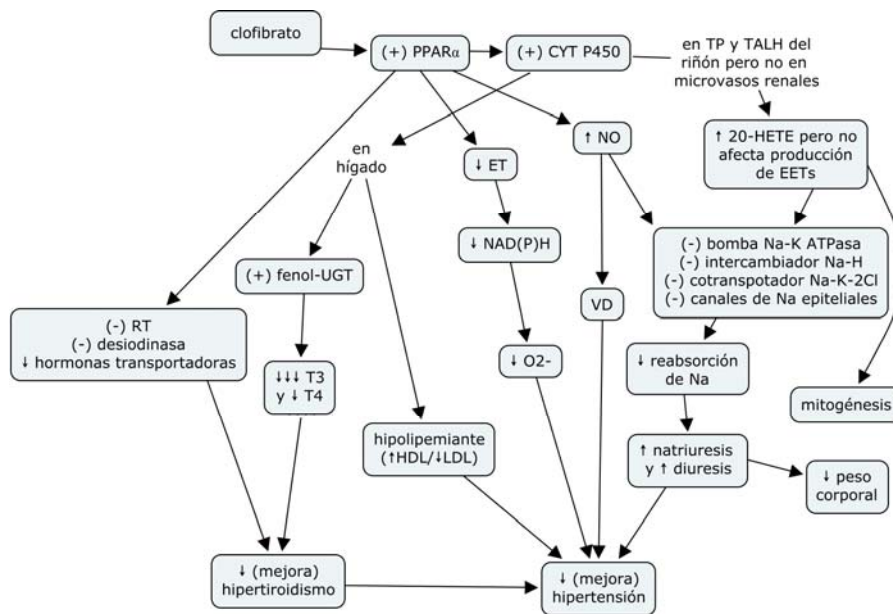


Ilustración 8. Efectos de la inducción CYP-450 por el clofibrato.

El tratamiento con clofibrato ejerce un efecto normalizador sobre la excreción de sodio y sobre el mecanismo presión-natriuresis en el riñón (Wilson, 1998). Esto conduce a una disminución de la tasa de filtración glomerular (TFG), disminución de la retención de sodio, aumento de la natriuresis, aumento del volumen de orina, disminución de la presión arterial sistémica (PAS) y disminución del peso corporal (Zhou, 2005).

3.1. Flujo Sanguíneo Renal

En las arterias renales, el 20-HETE es un potente vasoconstrictor (Schwartzman, 1989; Rosolowski, 1990; McGiff, 1999) que actúa como modulador de la autorregulación del flujo sanguíneo renal y del feedback tubuloglomerular. El 20-HETE actúa como segundo mensajero en la regulación del tono vascular renal (Zou, 1994).

Así, el 20-HETE potencia el efecto vasoconstrictor de la endotelina-1 (ET-1) (Imig, 2000) y de la angiotensina II (ANG-II) (Croft, 2000) mediante la activación de los canales de Kca en las células del músculo liso vascular y esto mantiene alta la concentración de Ca^{+2} intracelular que es dependiente de la entrada de Ca^{+2} a través de canales voltaje-dependientes (Sun, 1999).

De forma contraria, el óxido nítrico (NO) inhibe la formación de 20-HETE en las células del músculo liso vascular y produce vasodilatación (Alonso-Galicia, 1997, 1998; Sun, 1988).

Por otra parte, la tasa de filtración glomerular (TFG) es modulada por el 20-HETE que es liberado directamente por las células de la mácula

densa, o bien, actúa como segundo mensajero a nivel de la arteriola aferente para transducir la respuesta vasoconstrictora de algún otro mediador liberado por la mácula densa, quizás la adenosina o el ATP (Inscho, 1999; Ito, 1998).

3.2. Túbulo proximal

El túbulo proximal (TP) es responsable de aproximadamente el 70% de la absorción de la carga filtrada de sodio y agua (Feraille, 1999).

El 20-HETE inhibe la reabsorción de sodio en el TP mediante la inhibición de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ (Schwartzman, 1985; Quigley, 2000; Roman, 2002; Laniado, 1992).

La bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ consta de las subunidades α ($\alpha 1\text{-}\alpha 4$), β ($\beta 1\text{-}\beta 3$) y δ ($\delta 1\text{ y } \delta 2$), de las cuales la isoforma $\alpha 1$ representa el principal sistema de transporte de sodio (Herrera, 1994). En diferentes especies y diferentes tejidos, la actividad de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ está regulada estrechamente por complejos mecanismos hormonales y segundos mensajeros para mantener la concentración plasmática de los electrolitos y el pH durante las fluctuaciones dietéticas y patológicas (Fisone, 1994). Tal regulación implica la activación de distintas moléculas de señalización intracelular hormona-específicas y tejido-específicas, como la proteína-kinasa C (PKC), que fosforila la subunidad α de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$, y la proteína-kinasa A (PKA) (Pedemonte, 2001; Feraille, 2001; Nowicki, 1997).

El aumento en la formación de 20-HETE media el efecto natriurético del clofibrato, así como de la angiotensina II (ANG II) (Sanchez-Mendoza, 2000), hormona paratiroidea (PTH) (Ominato, 1996; Ribeiro, 1994; Satoh, 1992; Silverstein, 1998), dopamina (Aperia, 1998; Nowicki, 1997) y AA (Li, 2000), en este segmento de la nefrona (Ribello, 1994; Nowick, 1997). Estas hormonas inhiben la actividad de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ en el túbulo proximal mediante la activación de la fosfolipasa A2 (PLA2) que libera AA y estimula la formación de 20-HETE.

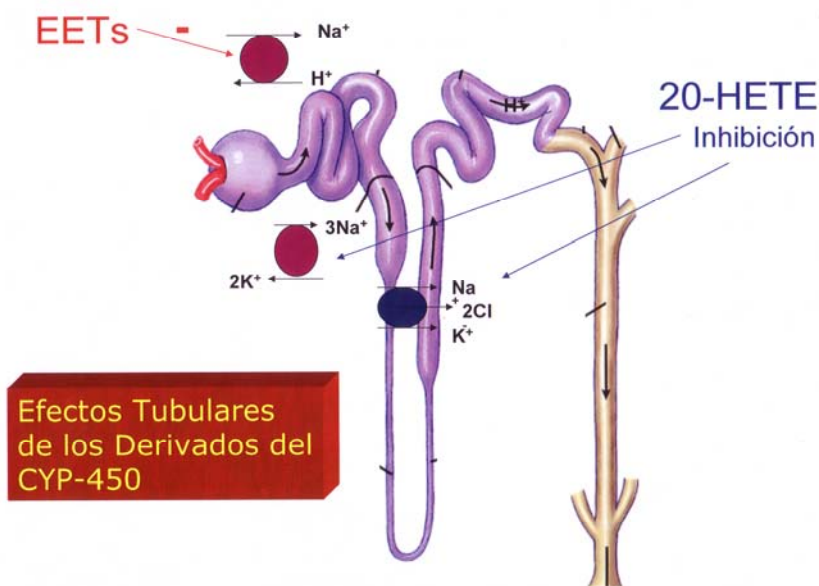


Ilustración 9. Efectos tubulares de los derivados del CYP-450.

El intercambiador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ (NHE, $\text{Na}^+\text{/H}^+$ Exchanger) es un transportador de iones de la membrana muy ubicuo responsable de la salida de iones de hidrógeno intracelulares en intercambio con sodio extracelular (La Pointe, 2002). De las cinco isoformas conocidas de la

familia NHE (NHE 1-5), la NHE-3 está inequívocamente localizada en las membranas apicales de los túbulos proximales y en el TALH. El sodio es reabsorbido activamente por la NHE-3 apical y expulsado a través de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ basolateral (Magyar, 2000).

La atenuación de la retención de sodio producida por el tratamiento con clofibrato estaría vinculada a la disminución hasta niveles normales de la expresión del NHE-3 en la corteza renal. El 20-HETE podría mediar la actividad del NHE-3 en los túbulos proximales (Dos Santos, 2004).

Por otra parte, los EETs inhiben el NHE en las células mensangiales glomerulares y participan, así, en la regulación de la tasa de filtración glomerular (Harris, 1990).

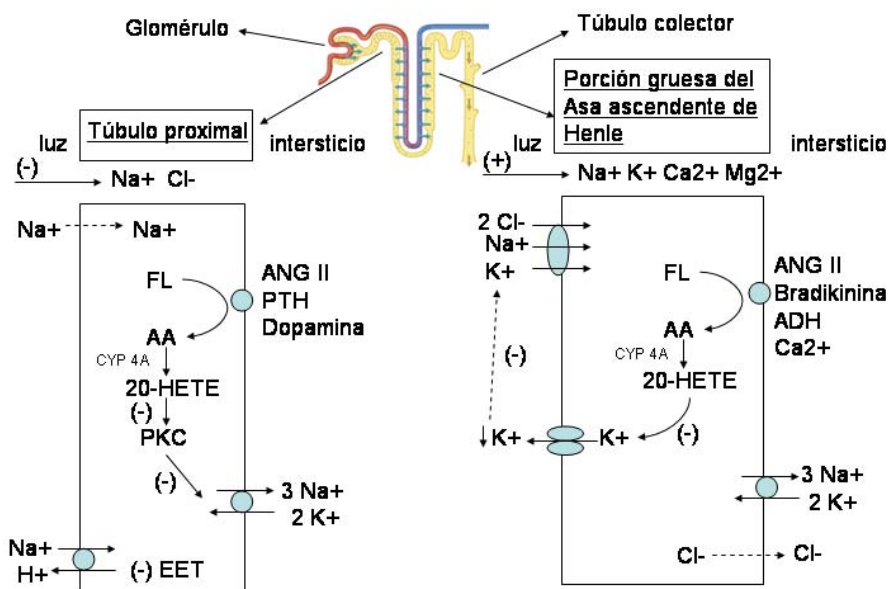


Ilustración 10. Efectos del 20-HETE sobre la reabsorción de sodio en el túbulo proximal y en la porción gruesa del asa ascendente de Henle (TALH).

3.3. Porción Gruesa del Asa Ascendente de Henle (TALH)

Escalante y Carroll et al. fueron los primeros en descubrir al 20-HETE como el principal metabolito del AA producido en las células del TALH y que el 20-HETE disminuye la actividad del cotransportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ en este segmento de la nefrona (Carroll, 1991; Escalante, 1991, 1994; Ito, 2001).

El canal 70-ps de K^+ (ROMK, rat outer medulla K^+ channel), localizado en la membrana apical del TALH, es responsable del reciclaje de potasio hacia el lumen del TALH. El reciclaje de K^+ por el canal ROMK es necesario para el cotransportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ (Wang, 1995).

El bloqueo de este canal de K^+ por el 20-HETE limita la disponibilidad de K^+ para el cotransportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$. Además reduce el potencial transepitelial lumen-positivo que proporciona la fuerza necesaria para la reabsorción pasiva de cationes (Na^+ , K^+ , Ca^{+2} y Mg^{+2}) en esta porción de la nefrona.

3.4. Conducto colector

Los EETs son los principales metabolitos CYP de AA producidos en el túbulo colector (Hirt, 1989). Los EETs bloquean los canales de Na^+ epiteliales (ENaCs) localizados en la membrana apical del túbulo colector de la corteza renal e inhiben el transporte de sodio probablemente mediante la formación de PGE2 (Bickel, 2001).

Efectos de los derivados del CYP450 en la nefroa

- (-) Bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$
- (-) Intercambiador $3\text{Na}^+\text{-H}^+$ (NHE)
- (-) Canal de K^+ de médula externa renal (ROMK)
 - (-) Cotransportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$
 - (↓) Potencial lumen-positivo
- (-) Canales de Na^+ epiteliales (ENaCs)

Ilustración 11. Efectos de los derivados del CYP en la nefrona.

4. EFECTOS DE LOS FIBRATOS SOBRE LA FUNCIÓN TIROIDEA

4.1. Receptores tiroideos (RT)

Las hormonas tiroideas están implicadas en la regulación de muchos procesos fisiológicos y del desarrollo (Forrest, 1994; Freake, 1995; Silva, 1995). La hormona triyodotironina (T_3) y su precursora tiroxina (T_4) también juegan un papel fundamental en el sistema cardiovascular, tal como la regulación de la frecuencia cardíaca, gasto cardíaco y contenido lipídico (Wikström, 1998).

Las hormonas tiroideas actúan a través de receptores nucleares hormonales (RT). En los mamíferos existen dos genes diferentes ($\text{RT}\alpha$ y $\text{RT}\beta$) que codifican cuatro receptores nucleares ($\text{RT}\alpha 1$, $\text{RT}\alpha 2$, $\text{RT}\beta 2$ y $\text{RT}\beta 3$) (Lazar, 1998; Mitsuhashi, 1988). Estos receptores se unen a diferentes ligandos y actúan como factores de transcripción.

Las proteínas del gen $RT\alpha$ tienen distintas propiedades: $RT\alpha1$ se une a las hormonas tiroideas (HT) y regula la expresión de genes diana, mientras que $RT\alpha2$ se une a hormonas desconocidas. Su función no está clara, aunque se ha sugerido que reprime las funciones de $RT\alpha1$ (Koenig, 1989; Katz, 1995). El papel de $RT\beta$ en la mediación de los efectos de las HT está dilucidado en parte. En el síndrome de resistencia generalizada a HT (GRTH, generalized resistance to thyroid hormone) debido a una anomalía genética del gen $RT\beta$, los pacientes sufren una elevación de los niveles de HT con niveles paradójicamente normales de TSH, retardo mental y del crecimiento y déficit de atención/hiperactividad (Refetoff, 1994). Esto indica que los $RT\beta$ participan en la regulación de la expresión de los genes TSH y de la hormona de crecimiento en la glándula pituitaria y son imprescindibles para ciertas funciones neuronales.

Además de por su unión a las HT (ligandos), la actividad de estos receptores nucleares está regulada por la activación de sus genes precursores, su unión con cofactores, su dimerización, su interacción con otros receptores nucleares, la secuencia del elemento de respuesta en el ADN a transcribir y por la fosforilación post-transcripcional. (McClure, 2005; Mynatt, 1994; Hyyti, 2006).

La expresión génica de los RT y de los receptores de ácido retinoico (RAR) puede ser determinada mediante la cuantificación de los niveles de ARNm de las isoformas $RT\alpha1$, $RT\beta1$ y del ARNm de los $RAR\beta$.

El tratamiento con clofibrato reduce la expresión génica de los receptores RT α 1 de las HT en el hígado de ratas (Luci, 2006). Estos hallazgos concuerdan con un estudio en el que el benzafibrato (BZF) inhibe a los RT en el hígado de ratas. Esta inhibición de los RT es debida a la activación de los receptores PPAR α y es concomitante con el incremento de la expresión de los receptores PPAR en el hígado de rata (Bonilla, 2000, 2001).

4.2. Receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR)

La función biológica de los receptores PPAR α fue inicialmente limitada al catabolismo de lípidos y proliferación de peroxisomas en el hígado (Issemann, 1990). El descubrimiento de que los PPAR α están en diferentes tipos de células ha ampliado recientemente sus posibles funciones y efectos biológicos (Bishop-Bailey, 2000).

Los ligandos para los receptores PPAR son de forma natural los ácidos grasos aunque otras sustancias como el clofibrato también pueden actuar como ligandos (Luci, 2006). La activación de los receptores nucleares PPAR produce la expresión de numerosos genes implicados en la β -oxidación, cetogénesis y gluconeogénesis en las mitocondrias y en los peroxisomas (Mandard, 2004). Además los PPAR son reguladores de la diferenciación y proliferación celular (Akiyama, 2004; Di-Poi, 2002; Gupta, 2004; Harman, 2004; Patsouris, 2004; Wang, 2003).

Los PPAR α intervienen en la oxidación de ácidos grasos, hidroxilación de ácidos grasos, lipoproteínas, bilis y aminoácidos, homeostasis de la glucosa, inflamación y otras rutas metabólicas. Numerosas enzimas son reguladas por los PPAR (Way, 2001): proteína de unión a los ácidos grasos (FABP), lipoproteín-lipasa (LPL), piruvato deshidrogenasa kinasa (PDK4), transportador de glucosa sensible a insulina (GLUT4), carnitín palmitoil transferasa muscular (mCPT), acil-CoA deshidrogenasa de cadena media (MCAD), proteína desacoplante (UCP), etc.

El amplio espectro de genes regulados por los PPAR sugiere que estos receptores están integrados con otras rutas de señalización para garantizar respuestas celulares precisas a los estímulos hormonales y nutricionales, y así mantener la homeostasis (Newaz, 2004; Hyyti, 2006). Se han identificado al menos 3 isoformas de PPAR (PPAR α en el cromosoma 22 región 22q12-q13.1, PPAR γ en el cromosoma 3 en posición 3p25, PPAR δ (β) en el cromosoma 6 en posición 6p 21.1-p21.2) (Chawla, 1994; Kliewer, 1994; Marcus, 1993; Mukherjee, 1994; Tontonoz, 1994) que pueden ser activadas por diferentes sustancias proliferadoras de peroxisomas y es posible medir la actividad transcripcional de sus correspondientes genes (Reddy, 1994; Kliewer, 1994). La activación de los PPAR puede ser evaluada mediante la cuantificación del ARNm del PPAR α y del ARNm de la Acil-CoA oxidasa (ACO) (Bonilla, 2001). La ACO es un prototipo de gen regulado por los PPAR y es un buen indicador de la actividad de estos receptores (Roberts, 2000). Las diferentes respuestas a los proliferadores de peroxisomas según el tejido y la especie pueden depender de la farmacocinética, la abundancia de

las isoformas PPAR y de sus proteínas auxiliares, la naturaleza de PPREs en los genes respondedores y, en cierta medida, de los niveles de hormonas.

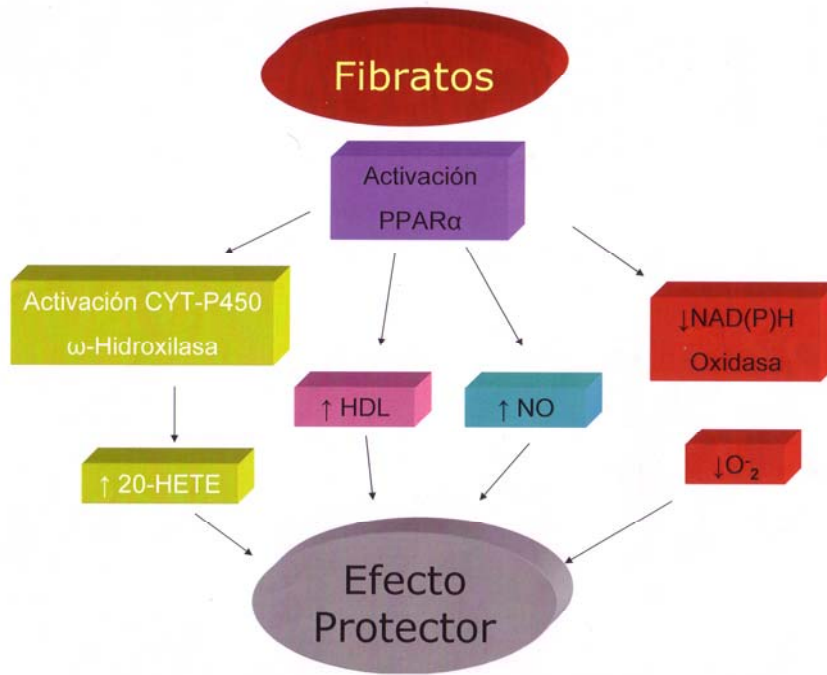


Ilustración 12. Efectos protectores de los fibratos sobre el sistema cardiovascular.

Los PPAR α están altamente expresados en el riñón, especialmente en las células del túbulo proximal (TP). De hecho la β -oxidación mediada por PPAR α de los ácidos grasos de cadena larga ocurre predominantemente en el segmento S3 del TP y representa un importante mecanismo para la producción de energía en la corteza renal. Además, las enzimas de la β -oxidación de ácidos grasos, que se encuentran en las mitocondrias, peroxisomas y microsomas de este segmento de la nefrona son muy

importantes para la preservación de la función renal después de algún daño en el riñón (Bell, 1992; Dreyer, 1992; Lehir, 1982; Portilla, 2000).

Además, los activadores de PPAR α inhiben la sintasa del óxido nítrico inducible (iNOS) en macrófagos y previenen la expresión de la interleukina 6 (IL-6) y de la ciclooxygenasa 2 (COX-2) inducida por interleukina 1 (IL-1) así como la expresión de la endotelina 1 (ET-1) inducida por trombina (Delerive, 1999; Fruchart, 1999).

La activación de los PPAR α también inhibe la proliferación de las células del músculo liso vascular e induce la apoptosis en macrófagos humanos y músculo liso vascular (Staels, 1998; Poynter, 1998; Chinetti, 1998; Terano, 1999; Diep, 2000). La activación de los PPAR α disminuye la expresión de genes miocíticos y proinflamatorios. Estos efectos pleiotrópicos de los activadores de los receptores PPAR α sobre el perfil lipídico plasmático y la inflamación de la pared vascular contribuyen a la inhibición de la aterogénesis.

4.3. Interacción RT-PPAR

Numerosos estudios han examinado la función de los RT y de los PPAR desde que los PPAR fueron descubiertos a principios de los años noventa (Hyyti, 2006). Diferentes estudios describen una atenuación o una potenciación de la actividad de los PPAR α producida por los RT (Bogazzi, 1994; Chu, 1995; Hunter, 1996; Miyamoto, 1997). Ruiyin et al. demostraron que la activación transcripcional mediada por los PPAR de

los genes que codifican las enzimas de la β -oxidación es reprimida por la T_3 y que la acción de los RT puede ser también inhibida por los PPAR (Ruiyin, 1995).

Sobre la base de su homología estructural, esta superfamilia de receptores nucleares de hormonas se ha dividido en dos subfamilias (Issemann, 1990). Una subfamilia incluye receptores para las hormonas esteroideas (glucocorticoides, progesterona, andrógenos, estrógenos y mineralocorticoides) y la otra incluye al receptor de la 3, 3', 5-triyodo-L-tironina (T_3) (RT), receptor del ácido retinoico (RAR), receptor X retinoide (RXR) y receptor de la vitamina D_3 (VDR). Esta subfamilia tipo 2 de la superfamilia de receptores nucleares cuenta con 48 miembros en la especie humana (Kastner, 1995).

Los PPAR, al igual que los RT y los RAR son factores de transcripción inducidos por ligandos lipofílicos (Hyyti, 2006; Bonilla, 2001; Zhou, 2005) y por sustancias proliferadoras de peroxisomas (PP) y tienen la habilidad de formar heterodímeros con los RXR u otros receptores nucleares (Gearing, 1993) y así actuar sobre los elementos de respuesta localizados en las regiones promotoras de los genes diana y regular la expresión de estos genes (Chu, 1995; Simpson, 1997; Gearing, 1993; Kliewer, 1992; Zhou, 2005).

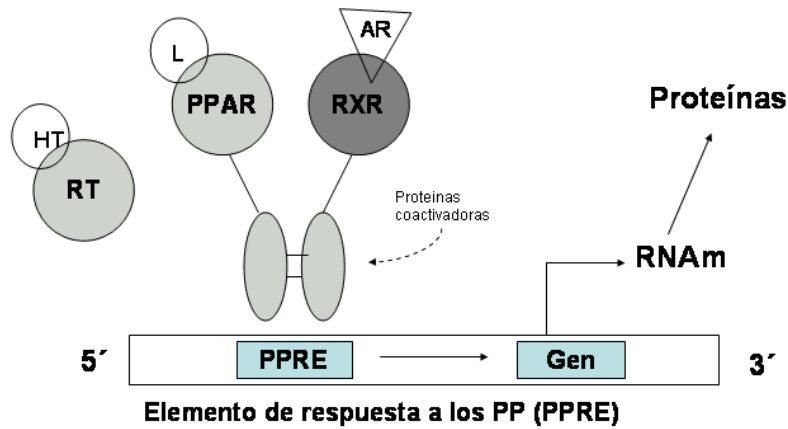


Ilustración 13. Interacción entre los receptores RT, PPAR y RXR sobre la expresión de los genes.

Después de la unión del ligando con su correspondiente receptor (PPAR≡ácidos grasos, fibratos, proliferadores de peroxisomas; RXR≡ácido cis-retinoico; RT≡hormonas tiroideas) se forman dímeros entre estos receptores. Estos complejos heterodiméricos reconocen la repetición de una secuencia específica de 6 pares de bases, (A/G) G G T (C/G/A) A , en el ADN de los genes CYP4A, denominada elementos de respuesta a los proliferadores de peroxisomas (PPREs), que están separadas por 1 o 2 pares de bases (bp) (Kliwer, 1992; Tugwood, 1992; Delerive, 1999; Aldridge, 1995; Muerhoff, 1992). Una vez unidos, los receptores reclutan proteínas coactivadoras, tales como la PPARδ-

coactivador-1 (PGC-1) en el corazón (Hyyti, 2006) y comienza la transcripción de los genes (Zhou, 2005).

La modulación de la acción de los receptores PPAR por otros miembros de la superfamilia de receptores nucleares puede ocurrir a diferentes niveles:

1) Competición por los PPREs:

Existe una competición entre los diferentes receptores nucleares por su unión a los PPREs del ADN que depende de la capacidad de estos receptores para reconocer las secuencias (A/G) G G T (C/G/A) A (Hyyti, 2006).

La unión por competencia de otros receptores nucleares a los PPREs puede impedir la acción de los PPAR en estos sitios o posiblemente permitir a los PPREs servir como elementos de respuesta de otros receptores de esta superfamilia y sus ligandos, por ejemplo, el factor de transcripción promotor de la ovoalbúmina de pollo (COUP-TF) requiere la inducción hormonal de los genes diana de VDR, RT, RAR, y PPAR, a través de su unión competitiva a varios elementos de respuesta hormonal (Cooney, 1992; Miyata, 1993; Chu, 1995).

2) Competición por el RXR:

Una segunda forma de modulación de la transcripción de genes por otros receptores nucleares podría ser a nivel de la heterodimerización con el receptor X retinoide (RXR), la cual es esencial para la acción de los PPAR. La modulación de la activación de los PPAR por los RT, y posiblemente por otros receptores nucleares de hormonas, sugiere que

las respuestas pleiotrópicas inducidas por las sustancias proliferadoras de peroxisomas (PP) como el clofibrato, pueden ser el resultado de una acción integrada de múltiples miembros de la superfamilia de receptores nucleares de hormonas.

Puesto que todos los miembros de la segunda familia de receptores nucleares de hormonas son capaces de formar heterodímeros con RXR, la cantidad y actividad de otras rutas de señalización de los receptores nucleares que utilizan RXR pueden modular la acción de los PPAR controlando así la actividad de los PPAR mediante la biodisponibilidad limitada de la proteína RXR (Bonilla, 2001). Se ha demostrado que existe una competición entre RT, RAR y PPAR para su unión a los RXR (Lehmann, 1993). En estas competiciones, la formación de heterodímeros entre los receptores, o la formación de homodímeros del receptor individual, está controlada por la presencia del ligando a ese receptor. Los RT secuestran los RXR desde los complejos PPAR-RXR (Chu, 1995; Hunter, 1996; Miyamoto, 1997). Similarmente, los PPAR secuestran los RXR desde los complejos RT-RXR (Araki, 2005; Dillmann, 2002; Miyamoto, 1997).

En ausencia de RXR, el receptor PPAR es incapaz de unirse a los PPREs (Gearing, 1993). Así, el RXR juega un papel crucial en la ruta de señalización inducida por los proliferadores de peroxisomas (PP).

Las formas mutantes de receptores RAR (RAR 403) (Imakado, 1995) y de receptores RT no son capaces de inhibir la actividad de los receptores PPAR, lo cual es debido probablemente a su deficiente capacidad para formar heterodímeros con los receptores RXR y su incapacidad para

secuestrar los RXR desde los complejos PPAR-RXR. Esto indica que la heterodimerización con RXR es un factor clave en las interacciones RT-PPAR. Aunque estos mutantes con una heterodimerización defectuosa, tienen también una pobre unión al ADN, la falta de inhibición es más probable que sea debida a las interacciones defectuosas con RXR y otros partners diméricos que a su deficiente unión al ADN (Chu, 1995).

Del mismo modo los PPAR pueden formar un heterodímero con RT en solución y subsecuentemente afectar la homodimerización de los RT sobre los elementos de respuesta de hormonas tiroideas (Bogazzi, 1994) aunque este efecto es improbable que sea cuantitativamente tan importante como el efecto de competición de los PPAR por los RXR (Meier-Heusler, 1995).

3) Competición por cofactores:

Además, el proceso de transcripción está regulado por la interacción entre los diferentes receptores nucleares (RAR, RT, PPAR) mediante una competición para conseguir cofactores (co-activadores y co-represores). Se han descrito numerosos co-factores: co-activador del receptor esteroideo (SRC), proteína de unión CREB (CBP), proteína asociada a RT (TRAP), co-activador de PPAR δ (PGC) represor nCOR (Smith, 2004).

4) Espaciamiento entre los elementos de respuesta:

La activación de los elementos de respuesta de los proliferadores de peroxisomas (PPREs) en el ADN por los RT y por los PPAR está modulada por el espaciamiento entre las repeticiones en la secuencia de ADN (Chu, 1995). Los VDR, RT y RAR regulan su unión a los RXR mediante el reconocimiento directo de repeticiones de las secuencias

(A/G) GGT (C/G/A) A espaciadas por 3, 4 o 5 pares de bases respectivamente (Nagaya, 1992).

5) Regulación por los ligandos:

La T₃ reduce la formación de homodímeros RT y promueve la formación y activación de heterodímeros RT-RXR (Nagaya, 1992, 1993). La inhibición mediada por RT de la acción de los PPAR ocurre en presencia y ausencia de T₃, aunque es mayor cuando el ligando está presente, esto sugiere que alguna potenciación de la heterodimerización RT-RXR puede ocurrir en presencia del ligando.

6) Modulación por PPAR agonistas:

Las drogas proliferadoras de peroxisomas (PP) como el clofibrato, activan la expresión de los genes a través de la potenciación de la formación de heterodímeros PPAR-RXR y su unión a los PPREs presentes en los genes diana (Kliwer, 1992). Ensayos de transfección indican que los complejos PPAR-RXR pueden responder tanto a los PP como al ácido 9-cis-retinoico mediante su interacción con los PPREs.

4.4. Desiodinasas

Además de su efecto potenciador de los receptores PPAR- α , es posible que el clofibrato produzca una inhibición de la desiodinasa tipo-1 yodotironina que cataliza la transformación de T₄ hasta T₃ en los tejidos periféricos (Visser, 1993; Luci, 2006).

La concentración de ARNm producido para la síntesis de desiodinasa tipo-II en el tiroides parece estar reducida en cerdos tratados con

clofibrato. Una actividad reducida de las desiodinasas tipo-II, que convierten la T_4 en T_3 en el tiroides, podría jugar un papel importante en la concentración disminuida de T_3 en el plasma de los animales tratados con clofibrato. En cualquier caso, la glándula tiroides produce menos del 20% de la T_3 total por lo que una actividad reducida de la desiodinasa tipo-II es probable que juegue un papel menor en la concentración reducida de T_3 (Findlay, 2000).

4.5. Proteínas transportadoras

Las concentraciones reducidas de hormonas tiroideas (T_3 y T_4) incrementan la liberación de hormona estimulante del tiroides (TSH) por la glándula adenohipófisis. De hecho los inductores enzimáticos microsomales elevan la concentración de TSH en roedores, lo cual, a su vez, estimula la proliferación de células epiteliales en el tejido tiroideo como resultado del estímulo de la glucuronidación de las hormonas tiroideas (Curran, 1991; De Sandro, 1991; Saito, 1991; Liu, 1995; Klaasen, 2001).

La globulina transportadora de tiroxina (TBG), la transtiretina y la albúmina son importantes proteínas transportadoras en el plasma. Estas proteínas son sintetizadas en el hígado. La expresión de los genes de estas proteínas en el hígado parece estar reducida por el tratamiento con clofibrato (Motojima, 1992, 1997).

En cerdos tratados con clofibrato se ha observado una disminución de las concentraciones hepáticas del ARNm de las proteínas implicadas en

el transporte de hormonas tiroideas, tales como la globulina de unión a la tiroxina (TBG), transtiretina y albúmina, además de una disminución de receptores $\alpha 1$ de estas hormonas tiroideas (RT $\alpha 1$) (Visser, 1993; Brouwer, 1989, 1991; Luci, 2006). En ratas, la transtiretina es la más importante proteína plasmática transportadora de hormonas tiroideas. Se ha observado que el clofibrato disminuye la concentración de ARNm del gen de la transtiretina no peroximal (prealbumina) de forma paralela al incremento de las concentraciones de ARNm de la transtiretina peroximal. El clofibrato puede disminuir la expresión del ARNm de proteínas reguladas por muchas, aunque no todas las hormonas esteroideas.

En ratones, la activación de los receptores PPAR α por los proliferadores de peroxisomas induce la represión transcripcional de los genes para la síntesis de transtiretina y alfa_{2u}-globulinas (Motojima, 1997). Esta represión depende fuertemente de la especie y tipo de ratón y del tipo de proliferador utilizado, y es independiente de los niveles de PPAR α y su partner de heterodimerización, RXR. En ratones PPAR-null, con déficit de receptores PPAR, no se observa esta reducción, lo cual sugiere que la expresión de estos genes puede estar inducida mediante la activación de los PPAR α por el clofibrato. Por tanto, el tratamiento con clofibrato disminuye no solo las concentraciones plasmáticas de hormonas tiroideas sino que también disminuye la capacidad de transporte de las hormonas tiroideas.

4.6. Glucuronidación

La tiroxina (T_4) y la triyodotironina (T_3) son desactivadas por las uridín-difosfato-glucoronil-transferas (UGT) hepáticas (Jemnitz, 2000; Luci, 2006).

La activación de los PPAR α puede modular las enzimas que metabolizan diferentes sustancias (Rushmore, 2002; Zhon, 2005). Se ha demostrado que algunas isoformas de UGT (UGT 1A9 y UGT2B4) son producidas por genes controlados por los PPAR α (Berbier, 2003).

Los fibratos actúan como inductores microsomales para las UGT, así el ciprofibrato estimula la glucuronidación de T_4 y en menor medida de T_3 . La glucuronidación de T_4 es inhibida en ratas defectuosas genéticamente en el gen que codifica las isoenzimas bilirrubín-UGT y fenol-UGT, mientras que la glucuronidación de T_3 no se ve afectada (Barter, 1992; Visser, 1993). Por otra parte, la glucuronidación hepática de T_3 está fuertemente disminuida en ratas defectuosas genéticamente para la síntesis de androsterona-UGT, mientras que la glucuronidación de T_4 es normal (Beetstra, 1991; Visser, 1991, 1993; Van Raaij, 1993). Por tanto, en ratas, la T_4 es un sustrato para la bilirrubín-UGT (UGT 1A1) y fenol-UGT (UGT1A6), mientras que la T_3 es sustrato para la androsterona-UGT. La rT_3 es incluso un mejor sustrato para las mismas isoenzimas UGT que glucuronizan la T_4 (Visser, 1993; Beestra, 1991; Magdalon, 1993; Viollon-Abadie, 1999, 2000; Vansell, 2002).

El tratamiento con clofibrato incrementa la actividad de bilirrubín-UGT en ratones, ratas y cerdos. Sin embargo disminuyó la actividad de la

fenol-UGT. Visser et al. describieron como el tratamiento con clofibrato durante 4 días en cerdos (200mg/kg/día) produjo una disminución del 27% en los niveles plasmáticos de T₃, mientras que la T₄ y FT₄ no disminuyeron significativamente y la TSH no varió. Además el clofibrato produjo un aumento del 20% en la actividad de la bilirrubín-UGT, una disminución del 30% de la actividad de la fenol-UGT y no produjo cambios en la actividad de la androsterona-UGT (Visser, 1993). Al contrario que en las ratas, en ratones el tratamiento con clofibrato no produjo modificaciones de la actividad de T₃-UGT ni de la T₄-UGT, ni de la concentración plasmática de HT. Estos estudios muestran diferencias entre especies en cuanto a los efectos del clofibrato sobre el metabolismo hepático de las HT (Luci, 2006).

Efectos del clofibrato	T ₄	FT ₄	T ₃	TSH
Cerdos	↓	↓	↓↓↓	≈
Ratas	↓	↓	↓↓↓	No determinado

Ilustración 14. Efectos del tratamiento con clofibrato sobre los niveles plasmáticos de hormonas tiroideas.

5. EFECTOS DE LOS FIBRATOS SOBRE EL STRESS OXIDATIVO

5.1. Fibratos y óxido nítrico

La función cardiovascular está regulada por el equilibrio entre el NO y los radicales libres tanto en condiciones fisiológicas (Zou, 2001; Majid, 2002; Wilcox, 2000) como patológicas (Navar, 1996; Haque, 2004). Una disponibilidad baja de NO puede conducir a disfunción endotelial e hipertrofia de las células vasculares (Malo, 2003). De hecho, la producción incrementada de especies reactivas de oxígeno (ROS) especialmente del anión superóxido (O_2^-), contribuye significativamente a las alteraciones funcionales y estructurales en la hipertensión (Beswick, 2001; Cowley, 200; Newaz, 2005).

Los radicales superóxido (O_2^-) y el óxido nítrico (NO) pueden combinarse químicamente para formar peroxinitritos que oxidan el ácido araquidónico (AA) para formar F2-isoprostanos (Huie, 1993). Los F2-isoprostanos ejercen un potente efecto vasoconstrictor y antinatriurético (Takahashi, 1992).

Los efectos beneficiosos sobre la función cardiovascular de los fibratos, prototipo de ligandos PPAR, parecen estar influenciados por el sistema NO/NOS (Taberner, 2002). En efecto, la observación clínica indica que el tratamiento con activadores PPAR α , como los fibratos, disminuye la progresión de lesiones arterioscleróticas (Ericsson, 1996; Frick, 1997), un efecto que podría ser adscrito al incremento de NO, el cual es conocido por ser antiaterogénico y antiinflamatorio (Dandona, 2002).

Sin embargo, los efectos de los ligandos PPAR α sobre la producción de NO no están claros y es tema de investigación con resultados contradictorios entre laboratorios.

El hecho de que el clofibrato, un ligando PPAR α , carece de efectos sobre la actividad NOS en los ratones carentes de receptores PPAR α (PPAR α -KO) pero sí incrementa la actividad NOS en ratones control, apoya la idea de que el PPAR α es necesario para la producción de NO/expresión NOS. Sin embargo, en otros estudios, el clofibrato inhibe la expresión iNOS en ratones PPAR α -KO, lo cual sugiere que el efecto del clofibrato sobre la producción de NO podría ser independiente de la activación de los PPAR α . En este sentido, se ha observado una disminución de la expresión de la iNOS producida por los activadores PPAR α en células astrogiales (Pahan, 2003) y en macrófagos (Delerive, 1999) o bien un aumento de la actividad de la iNOS en células mesangiales estimuladas por citocinas (Cernuda-Morollon, 2002). Por tanto el clofibrato parece tener efectos sobre la iNOS pero no parece tener efectos sobre la expresión de la eNOS ni de la nNOS.

El posible efecto amplificador de la expresión de la iNOS por los activadores PPAR α es consistente con el hecho de que los activadores PPAR α mejoran la vasodilatación por NO mediada por el endotelio (Diep, 2002).

El incremento de la actividad basal de la NOS suele ir acompañado de una disminución de la producción de hidroxiperóxidos lipídicos. El clofibrato produce una disminución de la generación de

hidroxiperoxidasa en ratones control, pero no es capaz de actuar en ratones carentes de receptores PPAR α (PPAR α -KO). La generación de radicales libres disminuye conforme aumenta la actividad de la NOS en ratones tratados con clofibrato.

5.2. Fibratos y stress oxidativo

La NAD(P)H oxidasa es la fuente de producción basal de anión superóxido (O $_2^-$) en las células del músculo liso vascular (Berry, 2000). En los pacientes con hipertensión esencial los ligandos PPAR α disminuyen directamente la expresión de la NAD(P)H oxidasa o bien actúan indirectamente a través de la disminución de la síntesis de agentes hormonales que son estimulantes conocidos de la actividad de la NAD(P)H oxidasa y de la generación de radicales libres (Inouse, 2001; Touyz, 2001; Kanie, 2003).

El modelo de hipertensión animal DOCA/sal (ratas uninefrectomizadas con DOCA subcutánea y dieta salina) (Schiffrin, 1996) se caracteriza por un incremento de la actividad NAD(P)H oxidasa (Beswick, 2001) y una disminución de la actividad y expresión de la NOS (Sullivan, 2002). El benzafibrato (BZF) disminuye la actividad de los 8-isoprostanos y disminuye la expresión de la NAD(P)H oxidasa en el plasma e incrementa la excreción urinaria de NO. Los ligandos PPAR α son capaces de revertir el aumento de presión sanguínea en este modelo, probablemente debido a la disminución de la actividad NAD(P)H oxidasa, al incremento en la producción de NO, a la disminución de

especies reactivas de oxígeno (ROS) y a la disminución de niveles plasmáticos de 8-isoprostanos. Además la estimulación de la actividad de los receptores PPAR α disminuye la producción de endotelina 1 (ET-1) y su actividad prooxidante que también está incrementada en este modelo de hipertensión (Ogata, 2002). La disminución en la actividad NAD(P)H oxidasa producida por la activación de los receptores PPAR α podría derivarse de la disminución de niveles de ET-1 puesto que la ET-1 es un conocido estimulante de la actividad de la NAD(P)H oxidasa y de la generación de radicales libres (Inouse, 2001; Kanie, 2003). Los ligandos PPAR α ejercen una acción antihipertensiva y protectora renal en este modelo animal. Esta observación contrasta con la hipertensión en ratas SHR y la inducida por ANG II, en las cuales, los ligandos PPAR α no atenúan el aumento de presión sanguínea (Iglarz, 2003).

Todos estos estudios experimentales se corresponden con otros datos ya observados anteriormente, tales como: que la activación de los receptores PPAR α da lugar a la inducción de enzimas antioxidantes (Kersten, 2000), que los fibratos aumentan el ARNm para la Cu⁺²/Zn⁺² superóxido dismutasa (SOD), que los fibratos disminuyen el ARNm para la NAD(P)H oxidasa en células endoteliales humanas cultivadas (Inouse, 2001) y que los fibratos disminuyen la expresión de la subunidad p22 phox de NAD(P)H oxidasa vascular en la diabetes (Inoue, 1998).

Por tanto, las interacciones entre receptores PPAR α , NO y NAD(P)H oxidasa juegan un papel importante en la regulación de la función

cardiovascular. Así, aparte de la disminución de ET-1, la activación de los receptores PPAR α por el clofibrato contribuye a la regulación de la presión sanguínea y ejerce un efecto protector en la hipertensión mediante un mecanismo que incluiría un aumento en la producción de óxido nítrico, disminución en la actividad NAD(P)H oxidasa y disminución en la generación de radicales libres. Sin embargo, no está claro que éstos sean los mecanismos primarios para los efectos fisiológicos de los ligandos PPAR α , ni en que medida el efecto mediado por los PPAR α sobre los radicales libres contribuye a la regulación de la presión sanguínea.

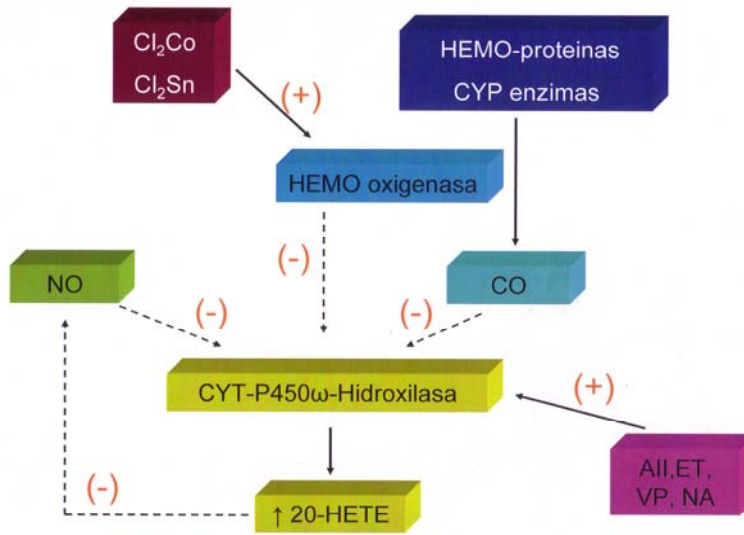


Ilustración 15. Interacción entre 20-HETE, óxido nítrico y monóxido de carbono.

5.3. Óxido nítrico y actividad citocromo P-450

Los genes CYP codifican las hemoenzimas de membrana que catalizan la oxidación dependiente de NAD(P)H de numerosas sustancias (Nelson, 1996; Scarborough, 1999). Estas enzimas CYP requieren NAD(P)H reductasa y CYPb5 (NADH/NADPH oxidasa) como cofactores (Capdevila, 1981). La oxidación de CYPb5 es una gran fuente de aniones superóxido (O_2^-) y esto hace que el metabolismo del AA por las enzimas CYP contribuya al stress oxidativo (Bondy, 1994; Puntarulo, 1998).

Tanto el NO sintetizado en la célula endotelial como el generado a partir de un dador (nitroprusiato sódico), se unen al grupo hemo de la guanilatociclasa soluble (GCs) causando un cambio conformacional en la enzima que la hace activa, con el consiguiente aumento de la concentración intracelular del 3',5'-guanosina monofosfato cíclica (GMPc) (Schmidt, 1993; Ignarro, 1984; Rapoport, 1983). A su vez, este segundo mensajero intracelular, provoca la apertura de canales de K^+ hiperpolarizando la fibra muscular lisa y disminuyendo el contenido intracelular del ión calcio. El NO también podría ejercer efecto directo sobre los canales de KCa de la célula muscular. También se ha demostrado que el NO puede regular la presión sanguínea por otros mecanismos, por ejemplo, la inhibición que puede ejercer sobre la enzima citocromo P-450 (CYP-450). Wink et al., han informado que el NO inhibe a las familias 1A y 2B1 del CYP-450 (Wink, 1993).

Además, Alonso-Galicia et al. observaron como al exponer microsomas renales a compuestos donantes de NO, como el nitroprusiato de sodio (NPS) y el 1-propanamina,3(2-hidroxi-2nitroso-1-propilhidrazino) (papanonoato), la síntesis de 20-HETE es inhibida (Alonso-Galicia, 1997). Por tanto, el NO inhibe al enzima CYP-450, disminuye la formación de 20-HETE y su efecto vasoconstrictor sistémico. En este sentido Tabernerero et al. demostraron que el fenofibrato mejora la vasodilatación mediada por el NO endotelial, mediante un incremento de la actividad antioxidante en los vasos sanguíneos de ratones. Los estudios realizados aun no han caracterizado en su totalidad los efectos producidos por el NO sobre el metabolismo del AA vía CYP, ni la repercusión de esta interacción sobre la regulación de la presión sanguínea (Tabernerero, 2002; Diep, 2002).

5.4. Óxido nítrico y función renal

Newaz et al. observaron que el clofibrato y el fenofibrato incrementan la producción de NO en el riñón y producen un aumento en la correspondiente excreción urinaria de NO y de nitratos y nitritos (Newaz, 2004, 2005).

El NO generado dentro del riñón controla la tasa de filtración glomerular (TFG), el flujo sanguíneo renal (FSR) y medular total, la curva de presión-natriuresis, el transporte epitelial de sodio y la producción de varios factores vasoactivos, como la angiotensina (Kone, 1997; Ito, 1995; Bachmann, 1994).

En el riñón, la infusión de sustancias que inducen la liberación de NO en los vasos renales, como la acetilcolina, incrementa el volumen de orina y la excreción de sodio (Majad, 1993). Por el contrario, la infusión de inhibidores de la producción endógena de NO produce una disminución de la diuresis y la natriuresis (Lahera, 1991). En estos estudios, el efecto diurético y natriurético del NO no estuvo acompañado por cambios proporcionales en la TFG y en el FSR, indicando que el NO regula el transporte de sodio en la nefrona.

El NO inhibe la isoforma $\alpha 1$ de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ en el túbulo proximal (TP) probablemente mediante la activación de la proteín-kinasa C (PKC) o mediante la inhibición de la proteín-kinasa A (PKA) (Ellis, 2000; Fisone, 1995, 1998). Las 3 isoformas de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) se expresan directamente por todo el riñón siendo la isoforma iNOS expresada en el TP la responsable de la producción de NO en este segmento (Morrisey, 1994; Wilcox, 2000; Ahn, 1994).

Por tanto, el NO es un importante regulador endógeno de la actividad de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ en el túbulo proximal (TP). Basándose en la co-expresión de $\text{PPAR}\alpha$ e iNOS en el TP y en el hecho de que la activación de los receptores $\text{PPAR}\alpha$ por sus ligandos modula la producción de NO en células no renales, como el tejido vascular y los macrófagos podemos plantear la hipótesis de que los activadores de $\text{PPAR}\alpha$ regulan el transporte tubular renal de Na^+ mediante un incremento del transporte de iones en el TP a través de una disminución

de la actividad $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ vía producción de NO (Newaz, 2004; Wang, 2002; Wu, 1999; McKee, 1994).

6. OTRAS ACCIONES DE LOS FIBRATOS

6.1. Fibratos-Endotelina

La inhibición de la síntesis de derivados CYP450 del ácido araquidónico (CYP450-AA) reduce grandemente la habilidad de la endotelina (ET-1) para producir vasoconstricción renal y atenúa su respuesta natriurética-diurética (Ebner, 1993). Todo esto sugiere que el 20-HETE u otro metabolito CYP450-AA actúa como segundo mensajero regulando el efecto vasoconstrictor renal y el efecto sobre la reabsorción tubular de la ET-1.

La excreción urinaria de 20-HETE aumenta a la par que la ET-1, sugiriendo que la producción endógena de 20-HETE está en relación con la producción de ET-1. De hecho la liberación de 20-HETE en los vasos renales aumenta tras la inyección de ET-1 en el riñón de rata aislado. Además el 20-HETE es el único producto que tiene un perfil biológico, vasoconstricción y natriuresis, similar al de la ET-1.

Por tanto la respuesta hemodinámica y excretora renal de la ET-1 es dependiente del 20-HETE que actúa como segundo mensajero (Visser, 1993; Wooster, 1991).

6.2. Fibratos-Mitogénesis

Los EETs y multitud de productos del metabolismo CYP450-AA pueden actuar como mitógenos (Visser, 1993). Lin et al, demostraron que el 20-HETE, producido en abundancia por los túbulos proximales renales, es un potente mitógeno y actúa como mediador de la respuesta promotora del crecimiento del túbulo renal al factor de crecimiento epidérmico (FCE) (Lin, 1995). Además la acción mitogénica producida por la norepinefrina en el músculo liso vascular implica la activación por el 20-HETE de la proteína-kinasa activada por mitógenos, mediando los efectos de crecimiento celular del FCE en el túbulo proximal (Saito, 1991; Bock, 1973; Ruegamer, 1969) y células mensangiales (Brouwer, 1991).

El modelo hipertensivo DOCA-sal se caracteriza por marcada hipertrofia del corazón y riñones, debido al efecto mitogénico de la ET-1 (Brouwer, 1989). El 20-HETE actúa como segundo mensajero para el crecimiento celular promovido por la ET-1 en el sistema cardiovascular. Por lo tanto los metabolitos CYP450-AA pueden ser mediadores de lesión e hipertrofia cardíaca y renal en la hipertensión DOCA-sal y en otras situaciones hipertensivas.

Por otra parte cabe la posibilidad de que el 20-HETE pudiera actuar por sí mismo como mitógeno.

II. PLANTEAMIENTOS Y OBJETIVOS

Experimento 1: Efectos del Clofibrato sobre las alteraciones inducidas por el hipertiroidismo

Los fibratos son agonistas sintéticos del receptor alfa activado por los proliferadores de peroxisomas (PPAR α), una subfamilia de la superfamilia de receptores nucleares activados por ligandos tales como ácidos grasos libres y eicosanoides (Mandard, 2004). Los fibratos han sido usados clínicamente como agentes hipolipemiantes durante décadas y más recientemente se han descrito sus efectos beneficiosos sobre la función cardiovascular (Ericsson, 1996; Bishop-Bailey, 2000; Mandard, 2004; Newaz, 2004) y la hipertensión (Sanchez-Mendoza, 2003; Shatar, 2000).

Los receptores de las hormonas tiroideas (RT) pertenecen a una gran superfamilia de receptores hormonales del núcleo que incluyen a los esteroides, la vitamina D, los receptores X retinoides (RXR) y a los PPAR (Yen, 2001).

Se ha observado que existe una interacción entre los RT y los PPAR lo cual indica la existencia de vías metabólicas en las que se produce mutua competición por los RXR (Bonilla, 2001; Chu, 1995; Hyyti, 2006). Los PPAR impiden la unión de los RT con los RXR para formar complejos RT-RXR mediante la formación de complejos PPAR-RXR. Esta competición también sucede para la unión con el ADN entre los RT y los PPAR en sus respectivos sitios de enlace así como para los cofactores que son compartidos entre estos receptores (Hyyti, 2006; Kahaly, 2005; Yen, 2001).

Numerosos estudios han demostrado que los fibratos inducen la actividad de la enzima uridín-difosfato-glucurononil-transferasa (UGT) (Beetstra, 1991; Jemnitz, 2000; Saito, 1991). Las hormonas tiroideas, tiroxina (T_4) y triiodotironina (T_3) son sustratos de las UGTs y la glucuronidación de estas hormonas es la principal ruta metabólica para su desactivación (Jemnitz, 2000).

Los fibratos también interfieren en los mecanismos de transporte, activación y acción de las hormonas tiroideas. El clofibrato reduce la expresión génica de los transportadores (Luci, 2006; Motojima 1992, 1997), la actividad de las desiodinasas (Luci, 2006) y también reduce la expresión génica de los $RT\alpha_1$ en el hígado de ratas (Bonilla, 2001) y cerdos (Luci, 2006).

El mecanismo de interacción entre las hormonas tiroideas y la activación de los $PPAR\alpha$ por el clofibrato ha sido estudiado usando varios modelos experimentales. Todo lo anterior indica que la activación de los $PPAR\alpha$ tiene diferentes efectos antitiroideos. Sin embargo, todavía no se han realizado estudios que comprueben esta interacción en el hipertiroidismo.

Por estas razones, los objetivos planteados en el presente trabajo han sido los siguientes:

- Analizar la hipótesis de que la administración crónica de clofibrato, un agonista de los $PPAR$, puede producir una alteración en la actividad de las hormonas tiroideas y así reducir la hipertensión arterial provocada por el hipertiroidismo.

- Determinar si estos efectos del clofibrato están asociados a una modificación sobre la actividad de las enzimas de la glucuronidación de las hormonas tiroideas en los principales órganos diana del hipertiroidismo, como el hígado, riñón (corteza y médula) y corazón (ventrículos izquierdo y derecho).

Experimento 2: Efectos del Clofibrato sobre la hipertensión provocada por la dieta rica en sal

El PPAR α es expresado en el hígado y en tejidos con una alta actividad metabólica de los ácidos grasos, tales como el corazón, riñón, endotelio y músculo liso vascular, todos ellos relacionados con el control de la presión sanguínea.

Los efectos antihipertensivos de la activación de los PPAR α inducidos por el clofibrato pueden incluir los siguientes: mayor producción de óxido nítrico endotelial (Diep, 2002) y renal (Newaz, 2004), el cual juega un importante papel homeostático en la respuesta a una ingesta salina aumentada (Shultz, 1993); menor producción de especies reactivas de oxígeno y actividad NAD(P)H reducida (Newaz, 2005), las cuales están aumentadas en ratas con dieta salina (Lenda, 2000); y menor producción de ET-1 (Newaz, 2005), también elevada en los modelos salinos de hipertensión experimental (Newaz, 2005; Schiffrin, 2001). Además, el mecanismo responsable de los efectos protectores del clofibrato sobre el desarrollo de la hipertensión puede también estar relacionado con sus acciones antitiroideas, puesto que las drogas antitiroideas han

prevenido la elevación de la presión sanguínea en todos los modelos experimentales de hipertensión en ratas estudiados hasta la fecha (Vargas, 2006). En este sentido nuestro grupo describió (Rodríguez-Gómez, 2008) que el tratamiento crónico con clofibrato prevenía y revertía las características manifestaciones hemodinámicas y el aumento de temperatura del hipertiroidismo en ratas y reducía sus niveles plasmáticos de hormonas tiroideas.

Todos estos datos indican que la activación de los PPAR α puede tener importantes efectos protectores sobre la función cardiovascular e interferir con los efectos prohipertensivos de la ingesta salina aumentada, aunque los mecanismos precisos implicados aún no han sido dilucidados.

Por estas razones, el objetivo planteado en el presente trabajo ha sido analizar el posible papel de los fibratos sobre los diferentes factores que intervienen en la hipertensión salina, centrando la investigación en los efectos antitiroideos del clofibrato.

Experimento 3: Efectos del Clofibrato sobre la hipertensión provocada por L-NAME.

Los efectos beneficiosos en la mejora de la función cardiovascular de los fibratos, prototipo de los ligandos PPAR α , como se refirió anteriormente, no están claros. Se ha sugerido que estos efectos beneficiosos están relacionados con el sistema NO/NOS (Taberner, 2002). En efecto, las observaciones clínicas indican que el tratamiento con activadores de los

PPAR α , por ejemplo los fibratos, disminuye la progresión de las lesiones arterioscleróticas (Ericsson, 1997; Frick, 1997). Este efecto podría deberse al incremento de NO, el cual posee propiedades antiaterogénicas y antiinflamatorias (Dandona, 2002). Estas observaciones están en consonancia con el hecho de que los activadores PPAR α mejoran la vasodilatación endotelial mediada por el NO (Diep, 2002) y amplifican la expresión de la iNOS (Frick, 1987; Fruchart, 1999; Cernuda-Morollon, 2002). Además un reciente estudio demostró mediante la medición de la excreción urinaria de nitratos/nitritos que los ligandos PPAR α clofibrato, WY14643 y fenofibrato incrementan la producción de NO en el riñón (Newaz, 2004)

Todas estas observaciones indican que los ligandos PPAR α incrementan la producción de óxido nítrico (NO) y que la función cardiovascular está controlada por un equilibrio entre el NO y las sustancias vasoconstrictoras. Se ha planteado la hipótesis de que la activación de los PPAR α inclinaría este equilibrio y que éste sería el mecanismo responsable del efecto protector de los ligandos PPAR α sobre el sistema cardiovascular. De acuerdo con esta hipótesis Newaz et al. demostró que el benzafibrato reduce la presión arterial y aumenta la excreción urinaria de NO en ratas normales (Newaz, 2005). Según la hipótesis previamente planteada el efecto antihipertensivo del clofibrato debería estar ausente en la hipertensión inducida por el bloqueo crónico de la síntesis de NO, producido por la administración de L-NAME. Además, teniendo en cuenta el experimento previo que demuestra el importante papel del efecto antitiroideo del clofibrato en el desarrollo de la

hipertensión producida por un aumento de ingesta sódica, también se decidió evaluar el papel de las hormonas tiroideas en los posibles efectos del clofibrato en el desarrollo de la hipertensión L-NAME.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Fármacos e instrumentos utilizados

1.1. Fármacos

Clofibrato (Sigma).

Tiroxina (Merck).

L-NAME (Sigma).

Pentobarbital Sódico (Serva).

PBS (Sigma).

Hepes (Sigma).

EDTA (Roche).

PMSF (Sigma).

NaOH (Sigma).

Suero salino heparinizado.

Eter etílico.

1.2. Instrumentos

Balanza (Sartorius, Pacisa).

Centrífuga (Grigel).

Espectrofotómetro (Beckman-Coulter).

Estufa (Selecta).

Jaulas metabólicas individuales (Tecniplast Gazzada, COD).

Pletismógrafo (Leticia).

Autoanalizador Hitachi 912 (Roche).

Kits de radioinmunoensayo (Diagnostic Products Corporation).

Regulador RTM1 (Cibertec).

Autoanalizador Inmunolite 2000.

Catéter de polietileno (PE-50).

Material de laboratorio (pipetas...).

Morteros de cristal (Omni Internacional, Pais).

Material quirúrgico (hilos de sutura, tijeras, mosquitos, pinzas, catéter...).

Congelador de -80°C.

2. Métodos experimentales

2.1. Animales y distribución

Para los experimentos realizados en la elaboración de esta tesis se emplearon ratas macho de la cepa Wistar, suministradas por el Servicio de Animales de Experimentación de la Comisión de Servicios Técnicos de la Universidad de Granada.

Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo con la guía para cuidados éticos de los animales de la Comunidad Europea.

Los animales fueron distribuidos de la siguiente forma:

Experimento 1. Efectos del Clofibrato sobre las alteraciones inducidas por el hipertiroidismo.

a) Efectos del Clofibrato sobre el desarrollo del hipertiroidismo

Control: Grupo control. (n=8).

Clofibrato: Grupo tratado con clofibrato (240 mg/kg / día). (n=8).

Hipertiroidea: Grupo tratado con Tiroxina (75 µg/rata/día). (n=8).

Hipertiroidea+Clofibrato: Grupo tratado con Tiroxina (75 µg/rata/día) y con clofibrato (240 mg/kg / día). (n=8).

b) Efectos del Clofibrato en la fase establecida del hipertiroidismo

Control T₄: Grupo control tratado con Tiroxina (75 µg/rata/día). (n=8).

T₄+Clofibrato: Grupo tratado con Tiroxina (75 µg/rata/día) y con clofibrato (240 mg/kg / día). (n=8).

Experimento 2. Efectos del Clofibrato sobre la hipertensión provocada por la dieta rica en sal.

Control: Grupo control. (n=8).

Clofibrato: Grupo tratado con clofibrato (240 mg/kg / día). (n=8).

Sal 2%: Grupo tratado con sal% (2g/100 ml en el agua de bebida). (n=8).

Sal 2%+Clofibrato: Grupo tratado con sal% (2g/100 ml en el agua de bebida) y con clofibrato (240 mg/kg / día). (n=8).

Experimento 3. Efectos del Clofibrato sobre la hipertensión provocada por L-NAME.

Control: Grupo control. (n=8).

Clofibrato: Grupo tratado con clofibrato (240 mg/kg / día). (n=8).

L-NAME: Grupo tratado con L-NAME (75mg/100ml en el agua de bebida). (n=8).

L-NAME+Clofibrato: Grupo tratado con L-NAME (75mg/100ml en el agua de bebida) y con clofibrato (240 mg/kg / día). (n=8).

2.2. Determinación de la presión sistólica mediante pletismografía en rabo

Se determina la presión arterial de forma incruenta en el rabo de la rata. El sistema utilizado consta de un manguito de presión conectado a una unidad de insuflado semiautomática y a la unidad transductora del pletismógrafo, a la que también se conecta un sensor neumático. La unidad transductora está conectada con la unidad de registro visual del pletismógrafo (LE 5001, Letica SA, Barcelona).

Se somete al animal a la temperatura de 36°C durante 30 minutos en una estufa ventilada, con objeto de producir la vasodilatación de la arteria del rabo. Alrededor del mismo, y en su extremo proximal, se coloca el manguito de presión. A continuación se coloca el sensor automático adecuado a la medida del grosor del rabo de la rata, de modo que quede ajustado y situado en la cara ventral del rabo junto al manguito.

La operación puede repetirse transcurrido al menos un minuto. Se realizan varias determinaciones sucesivas a la misma rata (de 10 a 15 aproximadamente) y se expresa la presión sistólica como la media de cinco determinaciones sucesivas estables, descartando las primeras y las últimas.

La presión arterial se determinó una vez a la semana a todas las ratas que previamente habían sido numeradas y clasificadas por grupos, separándolas en sus correspondientes jaulas.

2.3. Cateterización de la arteria femoral

Tras anestesiar a la rata, se rasura la zona inguinal. Se practica una incisión longitudinal y se disecciona el paquete vasculonervioso, separando con cuidado la arteria del resto de las estructuras. Una vez realizada la disección de la arteria, se pasan por debajo de ella 3 hilos de lino. Se procede entonces a ligar distalmente y se clampa proximalmente la arteria femoral, para después realizar un pequeño corte en la pared arterial por el que se introduce la cánula. Tras hacerla progresar aproximadamente 1 cm por el interior del vaso en dirección al corazón, se inmoviliza anudándola a la pared vascular con el hilo.

2.4. Medida de la presión arterial y frecuencia cardiaca por registro directo

Se determina la presión arterial media y el pulso directamente en la arteria femoral de la rata no sometida a anestesia (veinticuatro horas después de la cateterización). Para ello se introduce la rata en una jaula transparente de metacrilato, se retira el tapón que cierra la cánula de la arteria femoral y se conecta con un transductor mediante un circuito cebado con solución salina isotónica heparinizada.

El sistema está integrado por un transductor electromagnético (MacLab), que convierte en impulsos eléctricos las variaciones de presión ejercidos sobre su membrana. El transductor está conectado con un amplificador (MacLab) conectado a un ordenador donde se recoge el registro gráfico de la onda del pulso y las presiones arteriales sistólica (PAS) y diastólica (PAD), así como la frecuencia cardiaca. El transductor se calibra mediante un manómetro de mercurio en el rango de 0 a 250 mmHg. La Presión Arterial Media (PAM) se obtiene sumando a la presión diastólica un tercio de la Presión Diferencial (P.Dif.).

3. Protocolos experimentales

3.1. Experimento 1. Efectos del Clofibrato sobre las alteraciones inducidas por el hipertiroidismo

a) Efectos del Clofibrato sobre el desarrollo del hipertiroidismo

Se utilizaron ratas Wistar macho con un peso inicial de 280 ± 4 g, que fueron distribuidas al azar en los grupos descritos en el apartado 2.1. Todos los animales tuvieron libre acceso a la comida y al agua de bebida correspondiente para cada grupo de estudio. El estado hipertiroidico fue inducido mediante la administración subcutánea (s.c.) de tiroxina (Merck) de $75 \mu\text{g}/\text{rata}/\text{día}$ disuelta en solución salina isotónica con 0,5 N NaOH (1/100 v/v), amortiguada a un pH de 7. Se administró clofibrato diariamente, $240 \text{ mg}/\text{kg}$, disuelto en 0,5 ml de aceite vegetal por sonda gástrica debido a la baja solubilidad de este compuesto.

El tratamiento fue mantenido durante 3 semanas. Una vez a la semana se midieron el peso corporal (PC), la presión sistólica en el rabo (PAS) y la frecuencia cardiaca (FC). La PAS en el rabo y la FC se midieron en ratas no anestesiadas mediante pletismografía (LE 5001-Pressure Meter, Letica SA, Barcelona, España).

Al final del periodo experimental, se midió la temperatura rectal (Regulador RTM1, Cibertec, España) y todas las ratas se colocaron en jaulas metabólicas (Panlab, Barcelona, España) con libre acceso a agua y comida durante un periodo de cuatro días (dos días para la adaptación + dos días experimentales), durante los cuales la ingesta de agua y

comida fue medida y se recogieron muestras de orina. Se midieron el volumen de orina de veinticuatro horas, la proteinuria, la creatinina y la excreción total de sodio y potasio. Los valores medios de la ingesta y de las variables urinarias obtenidos durante los dos días experimentales se utilizaron para los análisis estadísticos entre grupos.

Tras la finalización del estudio metabólico, las ratas fueron anestesiadas con éter etílico. Se procedió a canular la arteria femoral con un catéter de polietileno (PE-50) que contenía 100 unidades de heparina disuelta en solución salina isotónica estéril (NaCl) para el registro directo de la PS intra-arterial, de la FC y de la presión del pulso (PP) en ratas conscientes y para la extracción de muestras de sangre. El catéter fue insertado subcutáneamente y exteriorizado a través de la piel de la zona dorsal del cuello. Se midió la PS intra-arterial a las 24 h después de la implantación del catéter femoral. La presión arterial (PA) directa y la FC fueron registrados durante 60 minutos con una frecuencia de registro de 400/s (McLab, AD Instruments, Hastings, UK). Se calculó la media de los valores de la PA y de la FC obtenidos durante los últimos 30 minutos para realizar comparaciones entre grupos. Posteriormente, se extrajeron muestras de sangre del catéter femoral para la determinación de las principales variables plasmáticas y niveles de T₃ y T₄. Finalmente, se dejó morir las ratas mediante sangría y se extrajeron y pesaron muestras de los órganos para su estudio morfológico y estudio de la actividad enzimática en estos tejidos. Las muestras de la corteza y médula renal y ambos ventrículos fueron rápidamente separados, limpiados y congelados en nitrógeno líquido, guardándose

posteriormente a -80°C para el posterior estudio de las actividades enzimáticas.

b) Efectos del Clofibrato en la fase establecida del hipertiroidismo

Las ratas tratadas con T_4 durante 3 semanas fueron distribuidas aleatoriamente en dos grupos: ratas control tratadas con T_4 y ratas tratadas con T_4 +clofibrato. En este experimento se midió el peso corporal, la presión sistólica en el rabo, la frecuencia cardíaca y la temperatura rectal una vez a la semana durante 3 semanas.

3.2. Experimento 2. Efectos del Clofibrato sobre la hipertensión provocada por la dieta rica en sal

Se utilizaron ratas Wistar macho con un peso inicial de 280 ± 4 g, que fueron distribuidas al azar en los cuatro grupos descritos en el apartado 2.1. Todas ellas tuvieron libre acceso a la comida y al agua de bebida correspondiente para cada grupo de estudio. El estado hipertensivo fue inducido mediante la administración en el agua de bebida de cloruro sódico a una concentración de 2g/100ml de agua. Se administró clofibrato diariamente, 240 mg/kg, disuelto en 0,5 ml de aceite vegetal por sonda gástrica.

El tratamiento fue mantenido durante 5 semanas. Se midieron el peso corporal (PC), presión sanguínea sistólica en el rabo (PAS) y frecuencia

cardiaca (FC) una vez a la semana. La PAS y FC en la cola se midieron por pletismografía.

Una vez completado el período experimental, todas las ratas fueron colocadas en jaulas metabólicas (Panlab, Barcelona, Spain) con libre acceso a la comida y al agua durante un período de cuatro días (dos días para la adaptación + dos días experimentales) durante el cual se midió la ingesta de agua y comida y se recogieron muestras de orina. Se midieron el volumen de orina de 24 horas, la proteinuria, creatinina, isoprostanos, nitratos-nitritos, endotelina (ET), vasopresina (VP) y excreción total de sodio, potasio y calcio. Los valores medios de todas las variables urinarias y de la ingesta obtenidos durante los dos días experimentales se usaron para el análisis estadístico entre los grupos.

Una vez completado el estudio metabólico, se realizó el registro directo de presión arterial y frecuencia cardiaca durante un periodo de 60 minutos por el método descrito en el apartado 2.4. Los valores obtenidos de los últimos 30 minutos fueron promediados para obtener el valor medio de la PA. Posteriormente se tomaron muestras sanguíneas con el catéter femoral para la determinación de las siguientes variables plasmáticas: urea, creatinina, proteínas totales, electrolitos (sodio y potasio) y hormonas tiroideas (FT₃ y FT₄).

Finalmente las ratas fueron sacrificadas mediante sangría y se extrajeron y pesaron el tiroides, hígado, riñones y corazón. El corazón fue dividido en ventrículo derecho y ventrículo izquierdo más septum y el riñón fue diseccionado para separar corteza y médula. Se midieron los niveles tisulares de FT₃ y FT₄ en el hígado y en la corteza y médula renal.

3.3. Experimento 3. Efectos del Clofibrato sobre la hipertensión provocada por L-NAME

Se utilizaron ratas Wistar macho con un peso inicial de 340-350 gr., que fueron distribuidas al azar en los cuatro grupos descritos en el apartado 2.1. Todas ellas tuvieron libre acceso a la comida y al agua de bebida. El estado hipertensivo fue inducido mediante la administración en el agua de bebida de L-NAME a una concentración de 75mg/100ml de agua. Se administró clofibrato diariamente, 240 mg/kg, disuelto en 0,5 ml de aceite vegetal por sonda gástrica.

El tratamiento fue mantenido durante 5 semanas. El peso corporal (PC) y la presión arterial sistólica (PAS) y la frecuencia cardiaca (FC) fueron medidas una vez por semana durante el curso del experimento, mediante pletismografía según el método descrito en el apartado 2.2.

Se realizó el registro directo de presión arterial y frecuencia cardiaca por el método descrito en el apartado 2.4.

Se obtuvo una muestra de sangre heparinizada que fue centrifugada para la obtención del plasma utilizado para la determinación de las siguientes variables plasmáticas: electrolitos, creatinina, urea, perfil lipídico y hormonas tiroideas.

Finalmente los animales fueron sacrificados.

Para el estudio morfológico se extrajeron y pesaron corazón y riñones.

4. Procedimientos analíticos

4.1. Determinación de proteínas, electrolitos, urea, creatinina, lípidos y hormonas tiroideas

Se midió la proteinuria mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Para la medición de los electrolitos en plasma y orina, de lípidos plasmáticos, y de creatinina se utilizó un autoanalizador (Hitachi-912, Roche, España).

Los niveles plasmáticos de hormonas tiroideas se determinaron usando un kit de radioinmunoensayo según las instrucciones del fabricante (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA). La TSH plasmática se determinó mediante enzimoimmunoanálisis con quimioluminiscencia usando el autoanalizador Immunolite 2000 (Euro/dpc, Llanberis, Gwynedd, UK).

4.2. Actividad de la UGT

Al ser las UGTs las principales enzimas responsables de la desactivación de las hormonas tiroideas, consideramos necesario medir la actividad de la fenol-UGT para analizar su posible papel en los efectos antitiroideos del clofibrato. Escogimos esta isoforma de la UGT porque su actividad es relevante en el hígado, riñón y corazón tanto en ratas controles como en ratas hiper e hipotiroideas. La actividad de la fenol-UGT fue medida en el hígado, riñón y corazón.

Los órganos fueron extraídos y rápidamente congelados en suero salino 0.9% (NaCl). Posteriormente se homogeneizaron en una solución amortiguadora helada (250 mM sucrosa, 10 mM HEPES-Tris a un pH de 8.0 y 1 mM DTT) con la ayuda de un mortero para tejidos (Omni International, Pais). Los tejidos homogeneizados se mezclaron con 1 ml de la misma solución amortiguadora y sonicados (10 sec x 6). El homogeneizado crudo se centrifugó 5 min a 3000 g., se hicieron alícuotas del sobrenadante y se congelaron -20°C para la posterior determinación de los niveles de proteínas totales; otras alícuotas se usaron para la determinación inmediata de la actividad de la fenol-UGT. El test para la enzima fenol-UGT se realizó según la técnica descrita por Beetstra (Beetstra, 1991). Brevemente, los homogeneizados (100 µl con una concentración de proteínas de 1 mg/ml) fueron incubados con 1 mM pNP en un volumen total de 200 µl de medio de incubación (en una concentración final de 100 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 0.05% Brij56 a un pH de 7.4) tanto en presencia como en ausencia de 5 mM UDPGA (Uridine Diphosphate Glucuronic Acid) (30 minutos a 37 °C). La reacción fue potenciada añadiendo 3.8 ml 0.1 M de NaOH helado y se midió la absorbancia del pNP no conjugado a 405 nm. La actividad específica de la fenol-UGT fue expresada en mol pNP/µg por minuto.

4.3. Determinación de isoprostanos F2 en orina

Para la determinación total de isoprostanos F2, las muestras de orina se hidrolizaron por incubación a 40 °C durante 90 min con NaOH 10 N. Las

muestras se llevaron a frío y se neutralizaron con HCl 2 N. Después de la centrifugación, el sobrenadante se recogió para el análisis. Los isoprostanos F2 totales se midieron por ensayo inmunoenzimático competitivo. Se utilizó un kit enzimático de inmunoensayo (8-isoprostane EIA Kit, Cayman Ann Arbor, MI, USA) para medir los niveles urinarios de 8-isoprostanos, con muestras previamente purificadas usando el kit de purificación Affinity (Cayman).

4.4. Determinación de nitratos y nitritos (NOx) en orina

Las concentraciones de NO₂ y NO₃ (NOx) fueron medidas usando la reacción de nitrato reductasa y Griess (Granger, 1996). Este método requiere que los nitratos presentes en la muestra sean previamente reducidos a nitritos, utilizando la enzima nitrato reductasa, para su posterior determinación espectrofotométrica mediante la reacción de Griess.

Reactivos:

- 1.-Solución enzimática de nitrato reductasa. La nitrato reductasa se obtiene a partir de un liofilizado procedente de *Aspergillus*, que se disuelve en agua destilada hasta obtener una concentración de 10 U/ml. De esta solución se obtienen alícuotas que se congelan a -80°C hasta su utilización.
- 2.-HEPES: ácido (N-[2-hidroxietil] piperazina-N'-[2-etanol sulfónico] 0,5 M pH = 7,4.

- 3.-Solución de flavín adenín dinucleótido (FAD) 0,05 mM.
- 4.-Solución de P-NADPH 1 mM.
- 5.-Solución enzimática de lactato deshidrogenasa (LDH) de músculo bovino 150 U/ml.
- 6.-Solución de ácido pirúvico 0,1 M.
- 7.-Reactivo de Griess: compuesto por partes iguales de una solución de N1-naftil-etilen-diamina 0,1 % (p/v) en agua destilada y una solución de sulfonilamida 1 % (p/v) en ácido ortofosfórico 5 % (v/v).
- 8.-Solución patrón de NaNO₂ 100 p.M en agua destilada.

Técnica:

Para realizar el ensayo se adiciona una alícuota de 10 µl de muestra a cada pocillo de una placa de Elisa. A continuación se añaden 5 µl de nitrato reductasa, 5 µl de HEPES, 5 µl de FAD, 5 µl de NADPH y 20 µl de agua destilada. Se incuba la mezcla de reacción a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente se adicionan 5 µl de LDH y 5µl de ácido pirúvico, con el objeto de regenerar el NADPH que ha consumido la nitrato reductasa, incubando nuevamente, durante 10 minutos, a 37°C. Finalmente se añaden 100 µl de reactivo de Griess y se incuba 10 minutos a temperatura ambiente, realizando la determinación espectrofotométrica a 543 nm en el Microplate Reader de Benchmark. La concentración de NO_x en orina se obtiene por interpolación de los valores en la recta patrón. Los resultados se expresan como concentración µ (M) de NO_x en orina.

4.5. Determinación de endotelina y vasopresina

Los niveles de ET y VP urinarias inmunoreactivos fueron medidos con un kit de radioinmunoensayo de Assay Designs (Ann Arbor, MI, USA).

4.6. Concentración de hormonas tiroideas en los tejidos

Para medir la concentración tisular de hormonas tiroideas se extrajeron muestras de hígado, corteza renal y médula renal. Las muestras fueron homogeneizadas usando un mortero de vidrio en un tampón de lisis (agua destilada, PBS, HEPES 25 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, PMSF 0.1 mmol/L) manteniendo siempre el tejido en frío. Tras la centrifugación del homogeneizado a 6000g durante 5 minutos a 4°C, el sobrenadante fue separado en alícuotas, congelado en N₂ líquido y almacenado a -80°C para su posterior uso. La medición de FT₃ y FT₄ se realizó mediante un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia en un analizador Roche Elecsys Modular Analytics E170.

5. Análisis estadístico

Se realizaron comparaciones de cada variable al final del experimento mediante el test ANOVA de una vía. Cuando los resultados del test ANOVA fueron significativos se realizaron comparaciones pareadas usando el método de Bonferroni. Se consideraron diferencias significativas aquellas con una $p < 0.05$.

IV. RESULTADOS

Experimento 1: Efectos del Clofibrato sobre las alteraciones inducidas por el hipertiroidismo

1.1. Variables morfológicas

La tabla 1.1. muestra el peso corporal final (PCF), ratio peso del riñón versus peso corporal (PR/PC), ratio peso del ventrículo izquierdo versus peso corporal (PVI/PC), ratio peso del ventrículo izquierdo versus peso ventricular del corazón (PVI/PVC), al final del periodo experimental en los diferentes grupos.

Tabla 1.1.- Variables morfológicas en los grupos experimentales.				
Grupos	PCF (g)	PR/PC (mg/g)	PVI/PC (mg/g)	PVI/PVC
Control	325.1±12.4	2.32±0.08	1.86±0.06	0.80±0.01
Clofibrato	313.7±13.2	2.48±0.12	1.99±0.03	0.81±0.01
T₄	286.7±4.3*	3.09±0.09**	2.60±0.07**	0.80±0.01
T₄+Clofibrato	295.6±7.7	3.24±0.12**	2.43±0.06**	0.80±0.01

Datos expresados como media ± error estándar. * P<0.05; ** P<0.01 versus grupo control. + P<0.05; ++ P<0.01 versus grupo T₄.

El peso corporal (PCF) al final del periodo experimental fue significativamente más bajo en el grupo T₄ que en los controles.

El peso de los riñones y del ventrículo izquierdo en relación al peso corporal fue significativamente más alto en el grupo T₄ que en los controles.

El peso del ventrículo izquierdo en relación al peso total del corazón no se modificó significativamente con ningún tratamiento.

En las ratas normales, el tratamiento con clofibrato no cambió significativamente ninguna de las variables morfológicas cardíacas ni renales.

En las ratas hipertiroideas tratadas con clofibrato no se modificaron la hipertrofia cardíaca ni renal propia del hipertiroidismo. El clofibrato no tuvo efecto sobre ninguna de estas variables morfológicas ni en ratas normales ni en ratas tratadas con T₄.

1.2. Variables plasmáticas

Valores plasmáticos medios de sodio, potasio y creatinina medidos al final del periodo experimental en los diferentes grupos.

Tabla 1.2.- Sodio, potasio y creatinina plasmáticos en los grupos experimentales.			
Grupos	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Creatinina (mg/dL)
Control	143.3±1.29	5.02±0.42	0.34±0.05
Clofibrato	146.1±0.52	5.44±0.24	0.46±0.02*
T₄	144.9±0.74	4.83±0.10	0.37±0.02
T₄+Clofibrato	147.4±1.21	4.89±0.14	0.32±0.02

Datos expresados como media ± error estándar. * P<0.05; ** P<0.01 versus grupo control. + P<0.05; ++ P<0.01 versus grupo T₄.

No encontramos diferencias significativas en los niveles plasmáticos de sodio ni de potasio entre los diferentes grupos.

La creatinina plasmática se incrementó solo en el grupo con clofibrato pero no en el resto de los grupos.

1.3. Perfil lipídico en plasma

Valores plasmáticos medios de colesterol LDL, colesterol HDL, colesterol total y triglicéridos medidos al final del periodo experimental en los diferentes grupos.

Tabla 1.3.- Perfil lipídico en plasma en los grupos experimentales.				
Grupos	LDL (mg/dL)	HDL (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)	Trigliceridos (mg/dL)
Control	7.36±0.31	56.01±2.44	68.80±2.38	27.23±4.90
Clofibrato	5.35±0.48*	40.54±4.33*	53.19±1.12*	35.24±1.35
T ₄	3.91±1.06**	41.23±3.75*	51.28±5.33*	37.89±4.03
T ₄ + Clofibrato	4.03±1.03*	33.55±3.38**	42.74±3.57**	35.88±3.04

Datos expresados como media ± error estándar. * P<0.05; ** P<0.01 versus grupo control.. + P<0.05; ++ P<0.01 versus grupo T₄.

La administración de T₄ produjo una reducción significativa de la LDL colesterol y HDL colesterol mientras que los triglicéridos no variaron significativamente.

En ratas normales, el tratamiento con clofibrato produjo una reducción significativa de estas variables excepto para los triglicéridos.

En ratas hipertiroideas, el tratamiento con clofibrato no produjo ninguna reducción significativa de estas variables.

1.4. Variables metabólicas

Valores medios de ingesta de agua y comida por cada 100 g de peso del animal durante 24 horas, medidos al final del periodo experimental en los diferentes grupos.

Tabla 1.4.- Ingesta de comida y agua en los grupos experimentales.		
Grupos	Comida (g/100g·24h)	Agua (mL/100g·24h)
Control	6.08±0.37	6.86±0.71
Clofibrato	5.30±0.38	7.05±0.66
T ₄	9.13±0.61*	12.51±1.77*
T ₄ +Clofibrato	8.62±0.32*	11.91±1.24*

Datos expresados como media ± error estándar. * P<0.05; ** P<0.01 versus grupo control. + P<0.05; ++ P<0.01 versus grupo T₄.

Los estudios metabólicos al final del tratamiento mostraron un aumento en la ingesta de comida (g/100 g peso corporal) y fluidos (mL/100 g peso corporal) en el grupo tratado con T₄ en comparación con los controles.

El tratamiento con clofibrato no afectó a la ingesta de comida y fluidos en las ratas normales ni en las ratas tratadas con T₄.

El tratamiento con clofibrato no modificó la polifagia ni la polidipsia de las ratas hipertiroideas. El clofibrato no modificó las alteraciones metabólicas en ratas hipertiroideas.

1.5. Variables urinarias

Balances de agua y sodio expresados por cada 100 g de peso del animal durante 24 horas, tasa de excreción de proteínas por mg de creatinina y aclaramiento de creatinina (ACr) por gramo de riñón, medidos al final del periodo experimental.

Tabla 1.5.- Balances de agua y sodio, proteinuria y aclaramiento de creatinina en los grupos experimentales.				
Grupos	Balance Agua (mL/100g·24h)	Balance Sodio (mmol/100g·24h)	Excrec. Proteínas (mg/mg creatinina)	ACr (mL/min.g riñón)
Control	3.11±0.36	0.19±0.06	6.35±0.67	0.78±0.07
Clofibrato	2.70±0.40	0.16±0.02	7.54±0.95	0.67±0.06
T₄	9.15±1.43*	0.30±0.04*	19.06±0.89*	0.64±0.04
T₄+ Clofibrato	9.35±1.04*	0.25±0.03*	17.19±1.18*	0.54±0.06*

Datos expresados como media ± error estándar. * P<0.05; ** P<0.01 versus grupo control. + P<0.05; ++ P<0.01 versus grupo T₄.

Los balances de agua y sodio y la proteinuria se incrementaron significativamente en el grupo tratado con T₄.

Ninguna de estas variables fue modificada significativamente por el clofibrato en ratas normales.

Ninguna de estas variables fue tampoco modificada significativamente por el clofibrato en ratas hipertiroideas. El clofibrato no impidió la proteinuria de las ratas hipertiroideas. Por tanto, la administración de clofibrato no modificó las alteraciones renales propias del hipertiroidismo.

El aclaramiento de creatinina (normalizado por gramo de peso del riñón) fue significativamente disminuido en el grupo T₄+clofibrato comparado con los controles y no se modificó significativamente en los otros grupos.

1.6. Presión arterial sistólica y presión del pulso

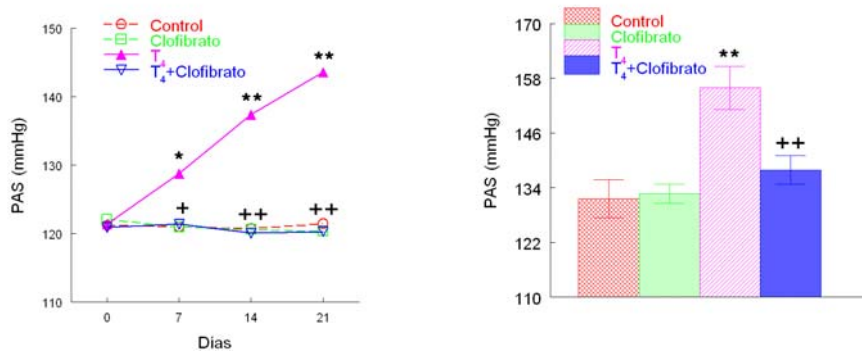


Figura 1.6.A: Presión arterial sistólica a lo largo del tiempo (PAS) medida por pletismografía en la cola (figura izquierda) y PAS final medida por registro directo (arteria femoral) en ratas conscientes (figura derecha). Los datos son la media ± error

estándar. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, comparados con los controles. + $p < 0.05$; ++ $p < 0.01$, comparados con el grupo T_4 .

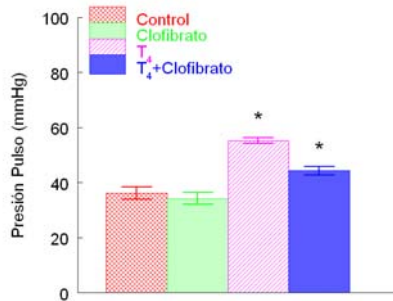


Figura 1.6.B: PP final medida por registro directo (arteria femoral) en ratas conscientes. Los datos son la media \pm error estándar. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, comparados con los controles.. + $p < 0.05$; ++ $p < 0.01$, comparados con el grupo T_4 .

Los valores de la presión arterial se resumen en la Figura 1.6.A. Los gráficos del lado izquierdo en la Figura 1.6.A muestran la variación a lo largo del tiempo de la PAS en el rabo y los gráficos del lado derecho muestran las PAS finales medidas mediante monitorización directa en los diferentes grupos experimentales.

Los valores de la presión del pulso se resumen en la Figura 1.6.B. El gráfico muestra las PP finales medidas mediante monitorización directa en los diferentes grupos experimentales.

Los valores de la PAS en los diferentes grupos fueron: controles, 132 ± 4.2 ; clofibrato, 133 ± 2.1 ; T_4 , $156 \pm 4.7^{**}$; T_4 +clofibrato, $++138 \pm 3.1$.

Los valores de la PP en los diferentes grupos fueron: controles, 36.2 ± 2.2 ; clofibrato, 34.2 ± 2.2 ; T_4 $55.3 \pm 1.0^*$; T_4 +clofibrato, $44.3 \pm 1.5+^*$.

La administración de T₄ produjo un incremento muy significativo de la PAS a lo largo del tiempo y de la PAS y PP finales en comparación con las ratas controles.

En las ratas normales, el tratamiento con clofibrato a la dosis usada en este experimento no modificó significativamente a lo largo de tiempo la PAS, ni la PAS final ni la PP final, es decir, no cambió ninguna de las variables hemodinámicas.

Sin embargo, el grupo T₄+clofibrato mostró valores similares a las ratas control en la evolución a lo largo del tiempo de la PAS, de la PAS final y de la PP final. Es decir, la administración crónica de clofibrato a las ratas hipertiroideas impidió el aumento de los valores de todas las variables hemodinámicas que suelen estar aumentadas en el hipertiroidismo. El clofibrato disminuye la hipertensión provocada por el hipertiroidismo.

1.7. Frecuencia cardiaca

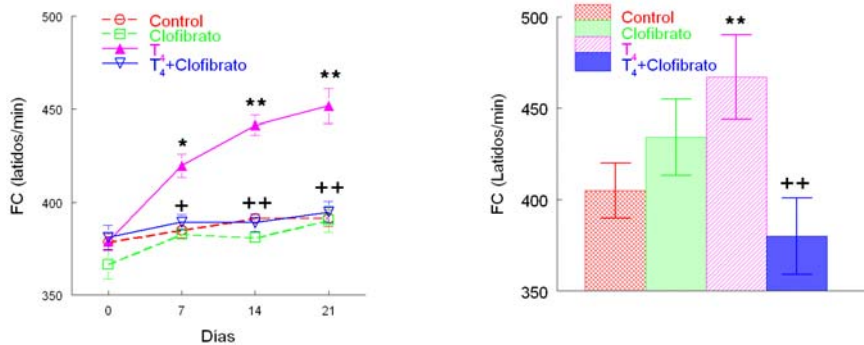


Figura 1.7: Frecuencia cardiaca (FC) medida a lo largo del tiempo (figura izquierda) y FC final medida por registro directo (arteria femoral) en ratas conscientes (figura

derecha).. Los datos son la media \pm error estándar. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, comparados con los controles. + $p < 0.05$; ++ $p < 0.01$, comparados con el grupo T₄.

Los valores de la frecuencia cardiaca se resumen en la Figura 1.7. La figura del lado izquierdo muestra la evolución de la FC y la figura del lado derecho muestra la FC final medida mediante monitorización directa en los diferentes grupos experimentales.

Los valores de la FC en los diferentes grupos fueron: controles, 405 ± 15 ; clofibrato, 434 ± 21 ; T₄, $467 \pm 23^{**}$; T₄+clofibrato, $++380 \pm 21$.

La administración de T₄ produjo un incremento muy significativo de la FC a lo largo del tiempo y de la FC final en comparación con las ratas control.

La administración de clofibrato a las ratas normales a la dosis usada en este experimento no cambió significativamente la FC a lo largo de tiempo, ni la FC final.

Sin embargo, la administración de clofibrato a las ratas hipertiroides redujo los valores de la FC muy significativamente. Es decir, el grupo T₄+clofibrato mostró valores similares a las ratas control en la evolución de la FC y en la FC final. El clofibrato impidió el aumento de la FC producido por la administración de T₄.

1.8. Temperatura corporal

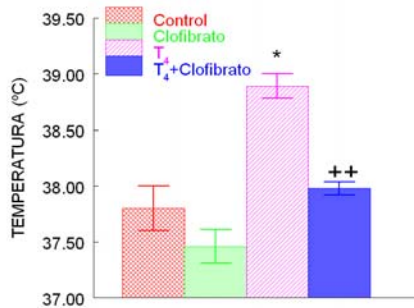


Figura 1.8: Temperatura corporal (TC) medida en el recto en los diferentes grupos experimentales al final del experimento. Los datos son la media \pm error estándar. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, comparados con los controles. + $p < 0.05$; ++ $p < 0.01$, comparados con el grupo T₄.

La Figura 1.8 muestra los valores de la temperatura rectal en los diferentes grupos experimentales.

Los valores de la temperatura en los diferentes grupos al final del periodo experimental fueron: controles, 37.80 ± 0.2 ; clofibrato, 37.46 ± 0.15 ; T₄, 38.89 ± 0.11 *; T₄+clofibrato, 37.98 ± 0.06 .

La T₄ produjo un aumento significativo de la temperatura rectal en comparación con las ratas control.

El tratamiento con clofibrato produjo una ligera disminución no significativa de la temperatura rectal en relación a los controles.

En las ratas tratadas con T₄, la administración de clofibrato produjo una marcada disminución de la temperatura rectal. La temperatura rectal fue similar entre el grupo T₄+clofibrato y los controles. El tratamiento

crónico con clofibrato suprimió el aumento de temperatura característico del hipertiroidismo.

1.9. Actividad enzimática

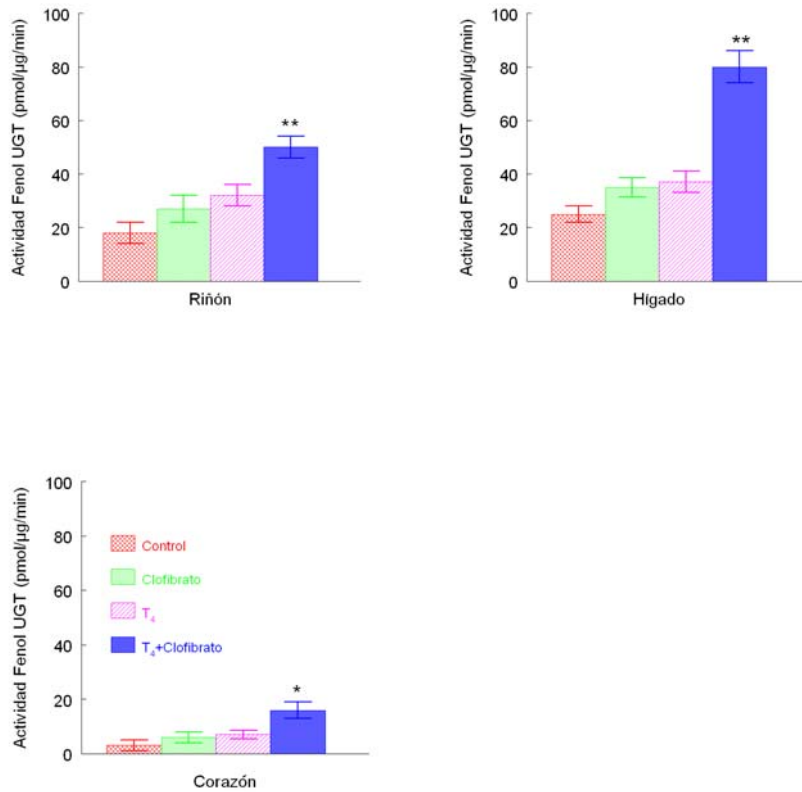


Figura 1.9: Actividad hepática, renal y cardíaca de la enzima Fenol-UGT en los grupos experimentales al final del experimento. Los datos son la media \pm error estándar. * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$, comparados con los controles. + $p < 0.05$; ++ $p < 0.01$, comparados con el grupo T₄.

Los valores de la actividad enzimática de la fenol-UGT expresados en pmol/ μ g/min se resumen en la Figura 1.9.

Los valores de la actividad enzimática en los diferentes grupos fueron:
 hígado: controles, 25 ± 3 ; clofibrato, 35 ± 3.5 ; T_4 , 37 ± 4 ; T_4 +clofibrato, $80 \pm 6^{**}$;
 riñón: controles, 18 ± 4 ; clofibrato, 27 ± 5 ; T_4 , 32 ± 4 ; T_4 +clofibrato, $50 \pm 4^{**}$;
 corazón: controles, 3 ± 2 ; clofibrato, 6 ± 2 ; T_4 , 7 ± 1.5 ; T_4 +clofibrato, $16 \pm 3^*$;

La actividad de la fenol-UGT se incrementó ligeramente y de forma poco significativa en los tejidos del grupo T_4 y del grupo clofibrato respecto del grupo control.

Sin embargo, la actividad de la fenol-UGT fue notablemente aumentada en los órganos (hígado, riñón y corazón) obtenidos del grupo tratado con T_4 +clofibrato.

1.10. Niveles de hormonas tiroideas en plasma

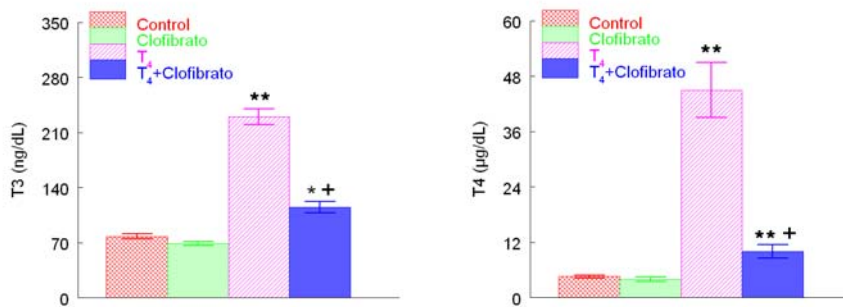


Figura 1.10.A: Niveles plasmáticos de hormonas tiroideas (T_3 y T_4) medidos al final del periodo experimental. Los datos son la media \pm error estándar. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, comparados con los controles. + $p < 0.05$; ++ $p < 0.01$, comparados con el grupo T_4 .

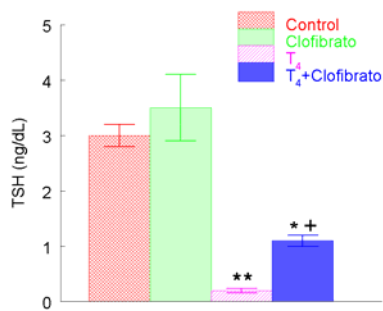


Figura 1.10.B: Niveles plasmáticos de TSH medidos al final del periodo experimental. Los datos son la media \pm error estándar. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, comparados con los controles. + $p < 0.05$; ++ $p < 0.01$, comparados con el grupo T₄.

Los niveles plasmáticos de las hormonas tiroideas se resumen en la Figura 1.10. La figura de la parte superior en la Figura 1.10 muestran los niveles de T₃ y T₄ y la figura de la parte inferior muestra los niveles de TSH en los diferentes grupos experimentales.

Los valores de las concentraciones plasmáticas de hormonas tiroideas fueron: control: TSH 3.0 ± 0.2 ng/dL, T₄ 4.6 ± 0.3 μ g/dL, T₃ 78 ± 3.2 ng/dL; clofibrato: TSH 3.5 ± 0.6 ng/dL, T₄ 4.0 ± 0.5 μ g/dL, T₃ 69 ± 2.5 ng/dL; T₄: TSH $0.2 \pm 0.04^{**}$ ng/dL, T₄ $45 \pm 6^{**}$ μ g/dL, T₃ $230 \pm 10^{**}$ ng/dL; T₄+clofibrato: TSH $1.1 \pm 0.01^*$ ng/dL, T₄ $10 \pm 1.5^{**}$ μ g/dL, T₃ $115 \pm 7^*$ ng/dL

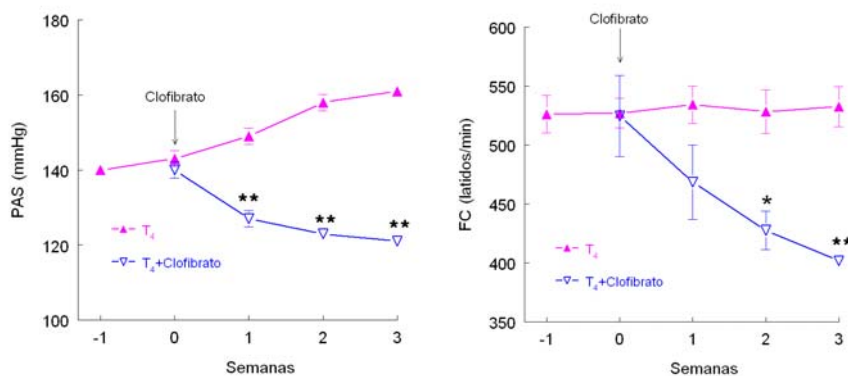
En ratas tratadas con T₄ se produjo un aumento significativo de hormonas tiroideas y disminución significativa de la TSH.

En las ratas normales, el tratamiento con clofibrato no cambió significativamente los niveles plasmáticos de hormonas tiroideas.

El clofibrato produjo una marcada reducción de los niveles plasmáticos de hormonas tiroideas en ratas tratadas con T_4 . El incremento en los niveles de hormonas tiroideas (T_4 y T_3) en ratas tratadas con T_4 fue notablemente reducido por el tratamiento con clofibrato, aunque estos niveles siguieran siendo más altos que en ratas controles.

Los valores de TSH plasmáticos disminuyeron en ambos grupos tratados con T_4 , aunque esta reducción fue más atenuada en el grupo T_4 +clofibrato, encontrando diferencias significativas entre ambos grupos tratados con T_4 .

1.11. Efectos del Clofibrato durante la fase establecida del hipertiroidismo



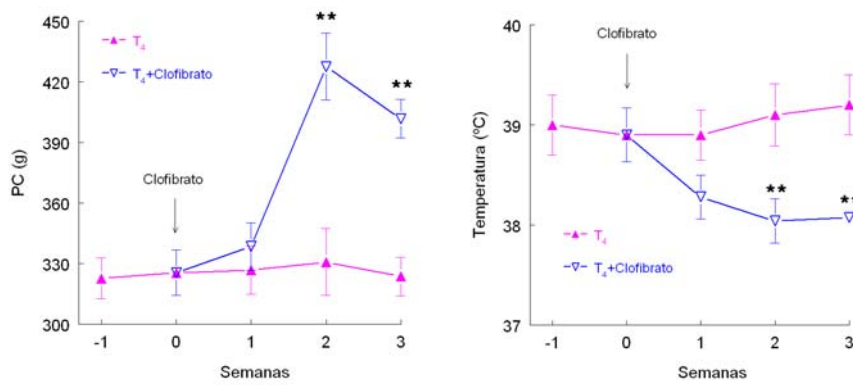


Figura 1.11: Evolución de la presión arterial sistólica (PAS), frecuencia cardiaca (FC), peso corporal (PC) y temperatura durante el periodo experimental. Los datos son la media \pm error estándar. * $p<0.05$; ** $p<0.01$, comparados con el grupo T₄.

La administración de clofibrato, 6 semanas después de la inducción del hipertiroidismo, produjo un progresivo aumento del peso corporal y una reducción significativa de la PAS, FC y temperatura rectal.

Experimento 2: Efectos del Clofibrato sobre la hipertensión provocada por la dieta rica en sal

2.1. Variables morfológicas

Tabla 2.1.- Variables morfológicas en los grupos experimentales.				
Grupos	Control	Clofibrato	Sal	Sal+ Clofibrato
PCF (g)	381±9	368±7	325±5*	+284±4*
PR/PC (mg/g)	2.93±0.03	3.31±0.09*	3.92±0.24*	++5.04±0.22**
PVI/PC (mg/g)	1.98±0.06	1.98±0.05	2.13±0.11	2.30±0.11
PVI/PVD	3.71±0.41	4.24±0.52	4.66±0.79	3.44±0.55
PHI/PC (mg/g)	29.97±0.75	37.52±1.01*	30.86±1.39	33.34±1.58
PTI/PC (mg/g)	1.82±0.07	2.05±0.14	1.60±0.09	1.69±0.06

Datos expresados como media ± error estándar. * P<0.05; ** P<0.01 versus grupo control. + P<0.05; ++ P<0.01 versus grupo sal.

Peso corporal final (PCF), ratio peso del riñón versus peso corporal (PR/PC), ratio peso del ventrículo izquierdo versus peso corporal (PVI/PC), ratio peso del ventrículo izquierdo versus peso del ventrículo

derecho (PVI/PVD), ratio peso del hígado versus peso corporal (PHI/PC), ratio peso de la glándula tiroides versus peso corporal (PTI/PC), al final del periodo experimental en los diferentes grupos.

El peso corporal al final del periodo de estudio de cinco semanas fue significativamente más bajo en los grupos sal y sal+clofibrato que en los controles.

El ratio entre el peso del riñón y el peso corporal estaba significativamente aumentado en los grupos clofibrato y sal y marcadamente aumentado en el grupo sal+clofibrato.

El peso del ventrículo izquierdo en relación al peso corporal y el peso del ventrículo izquierdo en relación al ventrículo derecho, ambos índices de hipertrofia cardiaca, no estaban significativamente modificados por los tratamientos.

El ratio entre el peso del hígado y el peso corporal estaba significativamente aumentado en el grupo clofibrato pero el aumento en el grupo sal+clofibrato no alcanzó significación estadística. El ratio entre el peso del tiroides y el peso corporal no fue significativamente modificado en los grupos.

2.2. Variables plasmáticas

Valores plasmáticos medios de sodio, potasio, urea, creatinina, proteínas totales y de T₃ y T₄ libres medidos al final del periodo experimental en los diferentes grupos.

Tabla 2.2.- Sodio, potasio, urea, creatinina, proteínas totales y hormonas tiroideas plasmáticos en los grupos experimentales.				
Grupos	Control	Clofibrato	Sal	Sal+ Clofibrato
Na (mEq/L)	143.00±0.87	141.43±0.69	144.83±1.62	+155.00±3.72*
K (mEq/L)	4.23±0.08	4.43±0.10	4.12±0.19	+3.35±0.18*
Urea (mg/dL)	44.29±1.54	49.54±2.00	54.05±9.34	47.92±3.05
Creatinina (mg/dL)	0.54±0.02	0.51±0.01	0.44±0.04	0.53±0.02
Prot. Totales (g/dL)	6.12±0.08	5.81±0.11	5.80±0.24	5.81±0.44
FT ₃ (pg/mL)	2.78±0.08	2.73±0.06	2.85±0.17	+2.06±0.13*
FT ₄ (ng/dL)	3.23±0.16	1.67±0.11*	2.22±0.19*	++1.29±0.21*

Datos expresados como media ± error estándar. * P<0.05; ** P<0.01 versus grupo control. + P<0.05; ++ P<0.01 versus grupo sal.

Los niveles de sodio y potasio plasmáticos fueron similares entre los

grupos control, clofibrato y sal, pero en plasma el sodio estaba aumentado y el potasio disminuido en el grupo sal+clofibrato.

La urea y creatinina en plasma fueron similares en todos los grupos, y las proteínas plasmáticas, un índice del volumen plasmático, también fueron similares en todos los grupos.

Los valores de FT₃ estaban significativamente disminuidos en el grupo sal+clofibrato pero no diferían entre los otros grupos. Sin embargo los niveles de FT₄ estaban significativamente disminuidos en los grupos clofibrato, sal y especialmente en el grupo sal+clofibrato.

2.3. Variables metabólicas

Tabla 2.3.- Ingesta de comida y agua y balances de agua y sodio en 24horas.				
Grupos	Comida (g/100g)	Agua (mL/100g)	Balance Agua (mL/100g)	Balance Sodio (mmol/100g)
Control	3.17±0.32	7.30±0.74	4.71±0.59	0.13±0.02
Clofib.	2.78±0.46	6.84±1.59	2.56±0.68	0.12±0.04
Sal	5.44±0.44*	23.55±4.48**	11.59±1.39**	5.81±0.93**
Sal +Clofib.	++3.15±0.14	18.04±2.48**	++2.20±0.44*	++0.70±0.42

Datos expresados como media ± error estándar. * P<0.05; ** P<0.01 versus grupo control. + P<0.05; ++ P<0.01 versus grupo sal.

Valores medios de ingesta de comida y agua y balances de agua y sodio expresados por cada 100 g de peso del animal durante 24 horas medidos al final del periodo experimental en los diferentes grupos.

Los estudios metabólicos al final del tratamiento mostraron aumento en la ingesta de comida y fluidos (g/ 100 g de peso corporal) en el grupo tratado con sal en comparación con los controles.

El tratamiento con clofibrato no afectó a la ingesta de comida ni fluidos en ratas normales pero redujo la ingesta de comida en ratas con sobrecarga salina. Los balances de agua y sodio aumentaron en el grupo sal.

El clofibrato redujo los balances de agua y sodio en ratas con sobrecarga salina.

2.4. Variables urinarias

Valores medios de diuresis (U_V), excreción total de sodio ($U_{Na}V$), potasio (U_KV) y calcio ($U_{Ca}V$), aclaramiento de creatinina (ACr), excreción total de creatinina ($U_{Cr}V$), proteinuria ($U_{proteinas}V$), excreción total de isoprostanos ($U_{isoprostanos}V$), excreción total de nitratos y nitritos ($U_{NOx}V$), excreción total de endotelina ($U_{ET}V$) y excreción total de vasopresina ($U_{VP}V$) expresados por cada 100 g de peso del animal medidos al final del periodo experimental en los diferentes grupos.

Tabla 2.4.- Diuresis, natriuresis, kaliuresis, calciuresis, aclaramiento de creatinina, excreción total de creatinina, proteinuria, excreción total de isoprostanos, excreción total de nitratos y nitritos, excreción total de endotelina y excreción total de vasopresina en los grupos experimentales.				
Grupos	Control	Clofibrato	Sal	Sal+ Clofibrato
U _v (mL/100g)	2.60±0.33	3.20±0.43	10.01±1.00**	+15.06±1.11**
U _{Na} V (mEq/100g)	0.15±0.01	0.16±0.02	2.76±0.42*	+7.85±1.04*
U _K V (mEq/100g)	0.34±0.03	0.35±0.03	0.47±0.06	+0.77±0.08*
U _{Ca} V (g/100g)	0.58±0.26	0.73±0.16	9.10±1.52*	+5.85±0.15*
ACr (mL/min.100g)	0.42±0.02	0.43±0.02	0.52±0.03*	0.41±0.03
U _{Cr} V (mg/100g)	3.28±0.13	3.15±0.18	3.54±0.07	3.26±0.19
U _{proteínas} V (mg/100g)	33.51±2.25	22.74±1.60*	61.20±4.76*	+43.22±2.30*
U _{isoprostanos} V (µg/100g)	3.85±0.68	3.57±1.3	7.40±0.72*	8.22±3.18*
U _{NOx} V (nM/100g)	20.5±1.4	22±1.5	45±1.6**	40±1.0**
U _{ET} V (pg/100g)	2.41±1.17	2.19±0.48	19.60±7.31**	16.09±3.28**
U _{VP} V (pg/100g)	123.44±7.06	121.75±8.09	181.04±8.36*	172.05±10.71*

Datos expresados como media ± error estándar. * P<0.05; ** P<0.01 versus grupo control. + P<0.05; ++ P<0.01 versus grupo sal.

El grupo sal mostró un aumento de la diuresis, natriuresis, kaliuresis y de la calciuresis. El clofibrato no modificó significativamente estas variables en las ratas control pero aumentó la diuresis, natriuresis y kaliuresis y redujo la calciuresis en las ratas con sobrecarga salina.

La excreción de creatinina total y el aclaramiento de creatinina fueron similares en todos los grupos.

La proteinuria fue aumentada en el grupo sal y el clofibrato redujo esta

variable en las ratas control y ratas sal.

La excreción total de isoprostanos y NOx fueron aumentadas en el grupo sal y el clofibrato no modificó significativamente estas variables entre las ratas control ni las tratadas con sal.

La excreción total de ET y VP fue aumentada en el grupo sal y el clofibrato no modificó estas variables en las ratas control ni en las tratadas con sal.

2.5. Presión sanguínea y frecuencia cardiaca

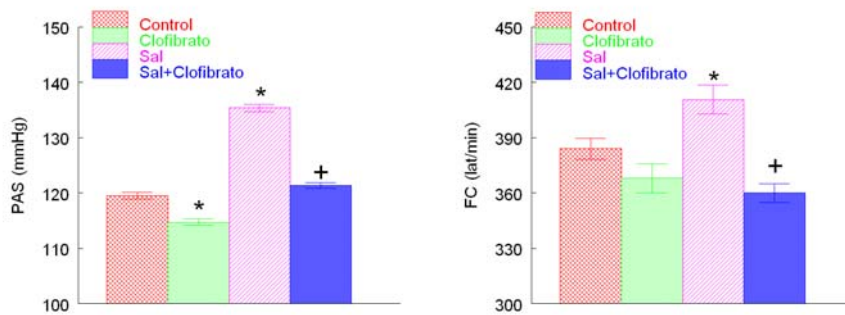


Figura 2.5: Presión arterial sistólica final (PAS) y frecuencia cardiaca (FC) medida por registro directo (arteria femoral) en ratas conscientes en los diferentes grupos experimentales. Los datos son la media \pm error estándar. * p<0.05; ** p<0.01, comparados con los controles. + p<0.05; ++ p<0.01, comparados con el grupo sal.

Los valores de la PAS y FC quedan resumidos en la Figura 2.5. La figura de la izquierda en la Figura 2.5 muestra la PAS final y la figura de la derecha muestra la FC medida mediante registro directo en los grupos experimentales.

Los valores de la presión arterial sistólica registrados al final del periodo experimental fueron: controles, 119 ± 0.6 ; clofibrato, $115 \pm 0.6^*$; sal, $135 \pm 0.7^*$; sal+clofibrato, $+121 \pm 0.5$.

Los valores de la FC en los diferentes grupos fueron: controles, 384 ± 5.7 ; clofibrato, 368 ± 7.86 ; sal, $410 \pm 7.9^*$; sal+clofibrato, $+360 \pm 51$.

La sobrecarga salina produjo un aumento en la PSA, la FC y la PP (presión del pulso) comparado con las ratas control.

La administración de clofibrato a ratas normales a la dosis y tiempo usado en este experimento produjo una modesta pero significativa disminución de la PAS y de la FC. La administración de clofibrato a ratas con sobrecarga salina redujo los valores de la PAS, FC y PP. Así pues el grupo sal+clofibrato mostró valores finales de PAS, FC y PP similares a los de las ratas control.

Los valores de la PP en los grupos fueron: control, 136.2 ± 1.2 ; clofibrato, 31.2 ± 2.2 ; sal, $45.3 \pm 1.2^*$; sal+clofibrato, $+37.3 \pm 1.5$.

2.6. Niveles de hormonas tiroideas en los tejidos

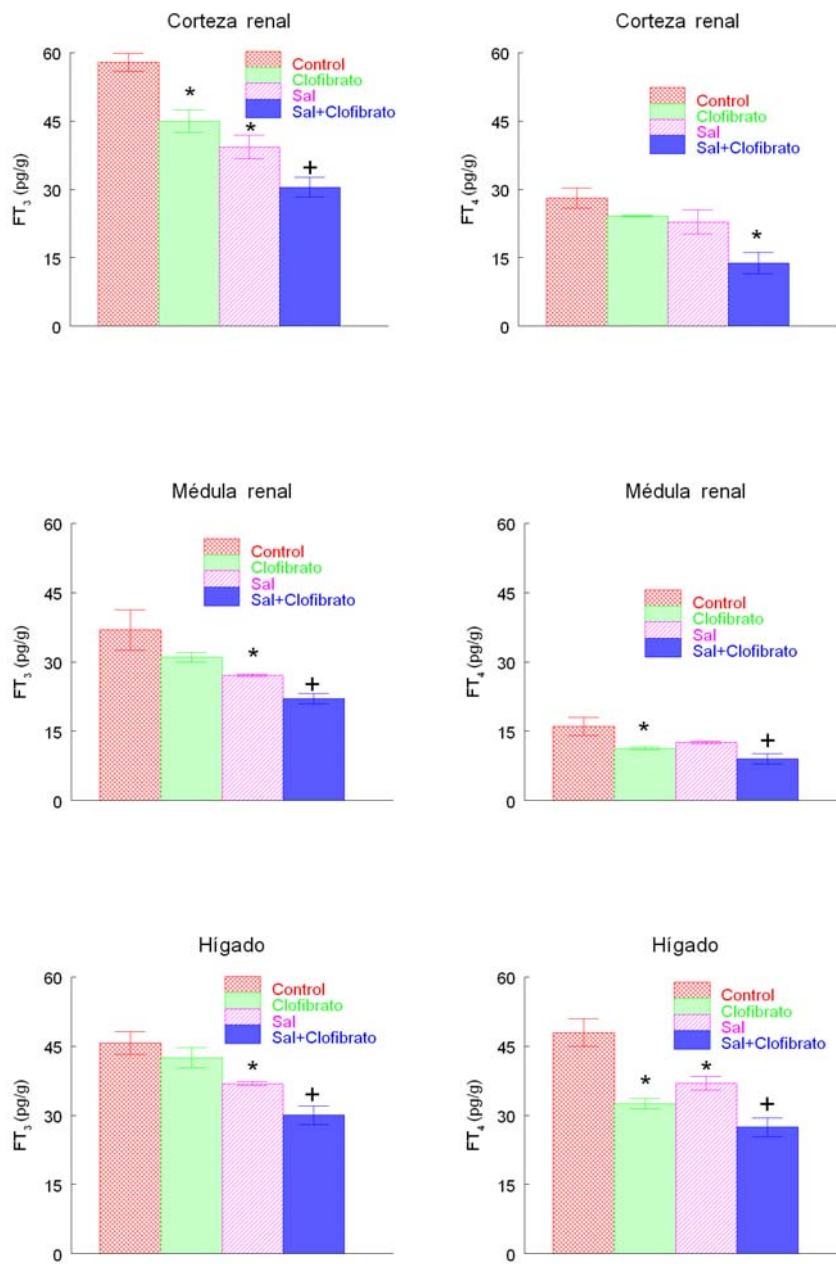


Figura 2.6: Niveles titulares de T₃ y T₄ libres (FT₃ y FT₄) en los diferentes grupos experimentales.

Los datos son la media \pm error estándar. * p<0.05; ** p<0.01, comparados con los controles. + p<0.05; ++ p<0.01, comparados con el grupo sal.

En la corteza renal sólo se observó una reducción significativa de la FT₄ en el grupo sal+clofibrato mientras que la FT₃ fue disminuida en todos los grupos, especialmente en el grupo sal+clofibrato.

En la médula renal, la FT₄ y la FT₃ fueron disminuidas en el grupo tratado con sal y más marcadamente disminuida en el grupo sal+clofibrato.

Excepto para la FT₃ en el grupo clofibrato, los valores de FT₄ y FT₃ fueron significativamente reducidos en el hígado en todos los grupos con respecto a los controles, siendo la mayor reducción en el grupo sal+clofibrato.

El grupo sal+clofibrato y el grupo sal mostraron diferencias significativas de los valores de FT₄ y FT₃ en todos los tejidos.

Experimento 3: Efectos del Clofibrato sobre la hipertensión provocada por L-NAME

3.1. Variables morfológicas

Peso corporal final (PCF), ratio peso del riñón versus peso corporal (PR/PC), ratio peso del ventrículo izquierdo versus peso corporal (PVI/PC), ratio peso del ventrículo izquierdo versus peso ventricular del corazón (PVI/PVC), al final del periodo experimental en los diferentes grupos.

Tabla 3.1.- Variables morfológicas en los grupos experimentales.				
Grupos	PCF (g)	PR/PC (mg/g)	PVI/PC (mg/g)	PVI/PVC
Control	389.00±4.05	2.38±0.09	1.91±0.03	0.80±0.01
Clofibrato	352.50±8.08*	2.91±0.38	2.10±0.05	0.80±0.01
L-NAME	337.20±7.88*	3.33±0.11*	2.05±0.09	0.82±0.01
L-NAME+ Clofibrato	321.33±8.07*	3.15±0.02*	2.31±0.06*	+0.84±0.003*

Datos expresados como media ± error estándar. * P<0.05; ** P<0.01 versus grupo control. + P<0.05; ++ P<0.01 versus grupo L-NAME.

El peso corporal (PCF) al final del periodo experimental fue significativamente más bajo en el grupo tratado con clofibrato, en el

grupo tratado con L-NAME y en el grupo tratado con L-NAME+clofibrato.

El peso del riñón aumentó de forma significativa en los grupos tratados con L-NAME (grupo L-NAME y grupo L-NAME+clofibrato) pero no produjo variaciones en el grupo tratado con clofibrato respecto a las ratas control.

El clofibrato produjo un ligero aumento del peso del ventrículo izquierdo en relación al peso corporal respecto a las ratas control y en el grupo L-NAME+clofibrato respecto a las ratas tratadas con L-NAME.

El peso del ventrículo izquierdo en relación al peso ventricular del corazón aumentó en las ratas tratadas con L-NAME+clofibrato respecto al grupo L-NAME y al grupo control. No se observaron variaciones significativas en el resto de los grupos. Por tanto el clofibrato no tuvo efecto sobre la variación del peso del riñón aunque sí influyó ligeramente sobre el peso del ventrículo izquierdo.

3.2. Variables plasmáticas

Valores plasmáticos medios de sodio, potasio, creatinina y urea medidos al final del periodo experimental en los diferentes grupos.

Tabla 3.2.- Sodio, potasio, creatinina y urea plasmáticos en los grupos experimentales.				
Grupos	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Creatinina (mg/dL)	Urea (mg/dL)
Control	145.33±0.68	6.23±0.21	0.36±0.01	44.60±3.42
Clofibrato	147.00±0.63	4.00±0.28*	0.31±0.03	37.96±5.78
L-NAME	146.00±0.82	4.51±0.10*	0.34±0.03	32.60±4.72
L-NAME +Clofib	143.33±4.82	3.27±0.76*	0.20±0.08	22.70±1.57*

Datos expresados como media \pm error estándar. * P<0.05; ** P<0.01 versus grupo control. + P<0.05; ++ P<0.01 versus grupo L-NAME.

No encontramos diferencias significativas en los niveles plasmáticos de sodio entre los diferentes grupos. El potasio en plasma disminuyó de forma poco significativa en todos los grupos tratados respecto al grupo control.

La administración crónica de clofibrato no modificó significativamente los niveles plasmáticos de creatinina en ninguno de los grupos.

La urea en plasma tan solo disminuyó significativamente en el grupo L-NAME+clofibrato respecto al grupo control.

3.3. Perfil lipídico en plasma

Valores plasmáticos medios de colesterol LDL, colesterol HDL, colesterol total y triglicéridos medidos al final del periodo experimental en los diferentes grupos.

Tabla 3.3.- Perfil lipídico en plasma en los grupos experimentales.				
Grupos	LDL (mg/dL)	HDL (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)	Trigliceridos (mg/dL)
Control	10.00±2.45	67.88±2.76	78.80±6.00	36.60±5.05
Clofibrato	6.04±0.73	27.76±8.13**	31.20±8.56**	24.40±1.47
L-NAME	14.78±3.57	58.62±6.06	64.20±7.75	20.40±4.25
L-NAME+ Clof	4.60±2.33	++22.15±3.64*	41.00±4.67**	23.50±3.48

Datos expresados como media ± error estándar. * P<0.05; ** P<0.01 versus grupo control. + P<0.05; ++ P<0.01 versus grupo L-NAME.

En las ratas normales el tratamiento con clofibrato a la dosis usada en este experimento disminuyó significativamente los niveles de HDL y colesterol y en menor medida de LDL respecto al grupo control. No modificó significativamente los niveles de triglicéridos.

El grupo L-NAME+clofibrato mostró una disminución significativa de HDL y en menor medida de LDL y colesterol respecto del grupo L-

NAME. El clofibrato no modificó significativamente los niveles de TG en el grupo L-NAME+clofibrato respecto del grupo L-NAME.

3.4. Presión arterial media

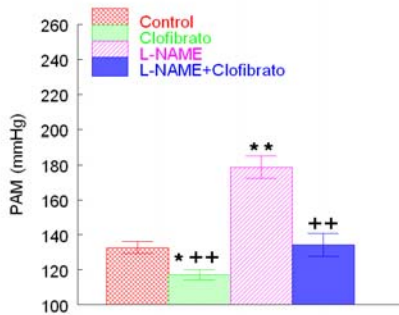


Figura 3.4: Presión arterial media (PAM) final medida por registro directo (arteria femoral) en ratas conscientes en los diferentes grupos experimentales. Los datos son la media \pm error estándar. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, comparados con los controles. + $p < 0.05$; ++ $p < 0.01$, comparados con el grupo L-NAME.

La figura 3.4 muestra la PAM en los diferentes grupos experimentales al final del periodo experimental.

Los valores de la presión arterial fueron: control, 132 ± 3.5 ; clofibrato, $117 \pm 2.9^*$; L-NAME, $179 \pm 6.3^{**}$; L-NAME+clofibrato, 134 ± 6.5 .

En las ratas normales, el tratamiento con clofibrato a la dosis usada en este experimento disminuyó significativamente la PAM.

La administración de L-NAME produjo un incremento estadísticamente significativo de la PAM final en comparación con las ratas control.

El grupo L-NAME+clofibrato mostró valores similares de PAM respecto a las ratas control. Es decir, la administración crónica de clofibrato disminuyó la presión arterial tanto respecto a las ratas control como respecto a las ratas hipertensas tratadas con L-NAME.

3.5. Frecuencia cardiaca

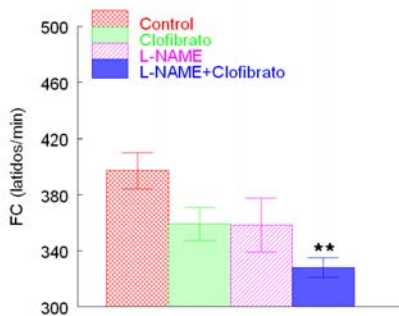


Figura 3.5: Frecuencia cardiaca final (FC) medida por registro directo (arteria femoral) en ratas conscientes en los diferentes grupos experimentales. Los datos son la media \pm error estándar. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, comparados con los controles. + $p < 0.05$; ++ $p < 0.01$, comparados con el grupo L-NAME.

Los valores de la frecuencia cardiaca medida mediante monitorización directa en los diferentes grupos experimentales al final del periodo de tratamiento se resumen en la Figura 3.5.

Los valores de la FC en los diferentes grupos fueron: control, 397 ± 13 ; clofibrato, 359 ± 12 ; L-NAME, 358 ± 19 ; L-NAME+clofibrato, $328 \pm 7^{**}$.

En las ratas normales, el tratamiento con clofibrato a la dosis usada en este experimento disminuyó la FC final en comparación con las ratas control.

La administración de L-NAME produjo una disminución de la FC final similar a la producida por el clofibrato.

El grupo L-NAME+clofibrato mostró valores de la FC inferiores a los valores del resto de los grupos. La disminución de la FC producida por el L-NAME se sumó a la disminución producida por el clofibrato.

3.6. Presión del pulso

La figura 3.6 muestra la PP medida al final del periodo experimental en los diferentes grupos.

Los valores de la presión del pulso fueron: control, 34.4 ± 3.7 ; clofibrato, 29.4 ± 3.7 ; L-NAME, 43.7 ± 2.3 ; L-NAME+clofibrato, 31.9 ± 1.04 .

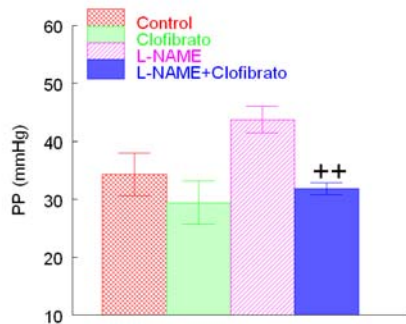


Figura 3.6: PP final medida por registro directo (arteria femoral) en ratas conscientes en los diferentes grupos experimentales. Los datos son la media \pm error estándar. * $p < 0.05$; **

$p < 0.01$, comparados con los controles. + $p < 0.05$; ++ $p < 0.01$, comparados con el grupo L-NAME.

En las ratas normales, el tratamiento con clofibrato a la dosis usada en este experimento disminuyó la PP.

La administración de L-NAME produjo un incremento de la PP en comparación con las ratas control.

El grupo L-NAME+clofibrato mostró valores similares a las ratas control de la PP. Es decir, la administración crónica de clofibrato disminuyó la hipertensión tanto respecto a las ratas control como respecto a las ratas hipertensas tratadas con L-NAME.

3.7. Niveles plasmáticos de hormonas tiroideas

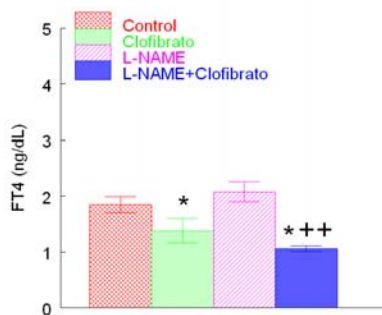


Figura 3.7: Niveles plasmáticos de FT₄ medidos al final del periodo experimental en los diferentes grupos experimentales. Los datos son la media \pm error estándar. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, comparados con los controles. + $p < 0.05$; ++ $p < 0.01$, comparados con el grupo L-NAME.

La figura 3.7 muestra los niveles plasmáticos de hormonas tiroideas en los diferentes grupos experimentales al final del periodo experimental.

Los valores fueron: control, 1.85 ± 0.14 ; clofibrato, $1.38 \pm 0.22^*$; L-NAME, 2.08 ± 0.18 ; L-NAME+clofibrato, $1.06 \pm 0.05^*$.

En las ratas normales el tratamiento con clofibrato a la dosis usada en este experimento disminuyó significativamente los niveles de FT₄.

La administración de L-NAME no produjo una modificación estadísticamente significativa de los niveles de FT₄ en comparación con las ratas control.

Sin embargo, la administración crónica de clofibrato disminuyó significativamente los niveles de FT₄ respecto al grupo control y de forma aun más significativa respecto al grupo tratado con L-NAME.

Es decir, la administración de clofibrato tanto a ratas control como a ratas hipertensas L-NAME produjo una disminución de la concentración de hormonas tiroideas.

V. DISCUSIÓN

Experimento 1: Efectos del Clofibrato sobre las alteraciones inducidas por el hipertiroidismo

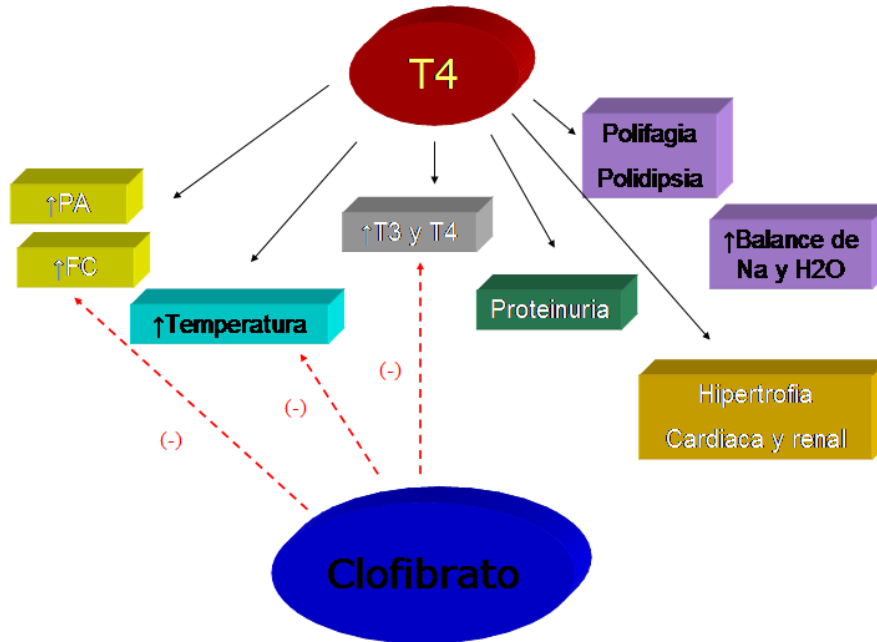


Ilustración 16. Efectos fisiológicos del clofibrato sobre el hipertiroidismo.

El principal hallazgo de este estudio fue que la administración crónica de clofibrato a ratas tratadas con T₄ prevenía y revertía las manifestaciones hemodinámicas y el aumento de temperatura del hipertiroidismo. Estos efectos pueden estar mediados por las acciones antitiroideas de los fibratos descritas en la introducción, tales como el aumento de la desactivación de las hormonas tiroideas (Jemnitz, 2000) y la disminución del transporte y acción de las hormonas (Bonilla, 2001; Hyyti, 2006; Kahaly, 2005; Luci, 2006; Motojima, 1992, 1997; Yen, 2001).

Así pues, en el presente estudio, el tratamiento con clofibrato disminuyó notablemente los niveles de hormona tiroidea plasmática e incrementó la actividad tisular de la enzima fenol-UGT en ratas hipertiroideas.

Las UGTs son las enzimas responsables de la glucuronidación de las hormonas tiroideas. Se conocen tres isoformas de la UGT que participan en la glucuronidación de las iodotironinas: fenol-UGT (UGT1A9), bilirrubina-UGT (UGT1A1) y androsterona-UGT (UGT2B7) (Mackenzie, 1997). De entre estas isoenzimas, en este trabajo, decidimos medir la actividad de la enzima fenol-UGT, al ser esta isoforma la principal enzima para la desactivación de la hormona tiroidea en ratas (Van der Heide, 2004). Los resultados indican que el clofibrato tiene mayor capacidad para estimular a esta enzima en ratas hipertiroideas, lo cual puede contribuir a su efecto antihipertensivo.

La activación de los PPAR α también tiene importantes efectos protectores sobre la función cardiovascular que pueden interferir con los efectos prohipertensivos de las hormonas tiroideas. El PPAR α se expresa en el hígado y en tejidos con un activo metabolismo de los ácidos grasos, tales como el corazón, riñón, endotelio y músculo liso vascular, todos relacionados directamente con el control de la presión arterial (PA). Los efectos antihipertensivos de la activación de los PPAR α inducida por el clofibrato pueden incluir: mayor producción de óxido nítrico endotelial (Diep, 2002) y renal (Newaz, 2004), lo cual juega un importante papel homeostático en el control de la PA en el

hipertiroidismo (Rodríguez-Gómez, 2003); menor producción de especies reactivas de oxígeno y disminución de la actividad de la NAD(P)H oxidasa (Newaz, 2005), las cuales están aumentadas en ratas hipertiroideas (Moreno, 2005); y menor producción de ET-1 (Newaz, 2005), también elevada en ratas hipertiroideas (Rebello, 1993).

Además, los fibratos también actúan como inductores de las enzimas citocromo P-450 (Roman, 2001). El ácido araquidónico puede ser metabolizado por una familia de enzimas citocromo P-450 que catalizan la formación de ácido epoxieicosatrienoico (5 y 6-EET) y ácido 20-hidroieicosatrienoico (20-HETE), entre otros. El 20-HETE y los EETs actúan como segundos mensajeros en la función vascular y renal (Moreno, 2001; Roman, 2001) y por tanto podrían participar en el efecto antihipertensivo del clofibrato.

En cualquier caso, el mecanismo responsable de los efectos protectores del clofibrato sobre las manifestaciones cardiovasculares del hipertiroidismo parece estar ligado a sus acciones antitiroideas, tal como se mencionó anteriormente, quedando aún por investigar el posible beneficio de las actividades extratiroideas del clofibrato.

A pesar de la capacidad para disminuir la PA del clofibrato, descrita anteriormente, en este trabajo se encontró que el tratamiento con este compuesto no tenía efectos significativos sobre ninguna de las variables hemodinámicas ni morfológicas en ratas normotiroideas; esta ausencia de efectos fue consistente con los cambios no significativos de los niveles

de hormonas tiroideas y de la actividad de la fenol-UGT en estos animales, sugiriendo que los efectos del clofibrato sobre las UGTs están relacionados con el nivel de hormonas tiroideas. En consonancia con estos hallazgos algunos investigadores han demostrado que existe interacción o competición entre los RT y los PPAR α , la cual es dependiente de la concentración de T₃ en el medio (Chu, 1995) y que los efectos del ácido 9-cis-retinoico sobre la expresión de las isoformas de la UGT están influenciados por el estatus tiroideo.

Nuestras observaciones, en cualquier caso, contrastan con la reducción de la PA producida por el tratamiento de una semana con benzafibrato (30 mg/kg i.p.) en ratas Sprague-Dawley (Newaz, 2005). Además, estudios previos han demostrado que los fibratos aumentan la actividad de la UGT y reducen los niveles de hormonas tiroideas en varias especies. En ratas Wistar, una dosis de 800 mg clofibrato/kg de peso corporal/día redujo la concentración de T₃ en un 27% pero no redujo las concentraciones plasmáticas de T₄ total ni T₄ libre (Visser, 1993). En ratones, una dosis de 300 mg clofibrato/kg peso corporal/día redujo la concentración plasmática de T₄ libre en un 13% pero no redujo los niveles de T₃ libre plasmática (Viollon-Abadie, 1999). En cerdos tratados con clofibrato (220 mg/kg/día durante 28 días) la reducción en las concentraciones plasmáticas de T₃ total (en un 47% vs. control), T₄ libre (en un 32% vs. control) y de T₄ total (en un 35% vs. control) es incluso mayor que las observadas en ratas (Luci, 2006). Las razones de estas discrepancias no están claras, aunque un periodo de tratamiento más largo puede ser necesario para la aparición de los efectos antitiroideos

del clofibrato a la dosis usada en nuestro estudio como podrá observarse en el siguiente apartado de la tesis.

A pesar de la disminución de los niveles de hormonas tiroideas, el tratamiento con clofibrato no evitó la hipertrofia cardiaca ni renal, la ingesta aumentada de comida y fluidos, ni la proteinuria en las ratas hipertiroideas. Aunque los mecanismos responsables de estas observaciones no han sido investigados, el clofibrato puede tener diferentes efectos sobre las desiodinasas o sobre las isoformas de los receptores tiroideos que varían en los diferentes tejidos (Yen, 2001). En este contexto, se ha descrito que cuando la hormona T_3 se une específicamente al receptor tiroideo beta de la rata, no es desplazado por los agonistas del PPAR α , ciprofibrato o benzafibrato (Castelein, 1993), permitiendo la actividad de la hormona tiroidea por medio del receptor tiroideo beta. Por tanto, la caracterización de los receptores tiroideos responsables de los diferentes efectos tiroideos podría explicar la especificidad de los efectos del clofibrato en este estudio y proporcionaría datos sobre su función biológica en futuras investigaciones. En este sentido, los ratones carentes de los receptores RT α 1 -/- mostraron una disminución de la frecuencia cardiaca, intervalo Q-T prolongado en el ECG y descenso de la temperatura (Wikstrom, 1998), manifestaciones que se asemejan a nuestros hallazgos con el clofibrato en ratas hipertiroideas. Además, se ha descrito que las hormonas tiroideas inducen la hipertrofia de los miocitos cardiacos como resultado directo de su unión a la isoforma RT α 1 a través de una

ruta no genómica que depende de la activación de la kinasa TAK1 por la proteína p38 (Kinugawa, 2005), mecanismo que podría diferir del usado para alterar la frecuencia cardíaca y la contractilidad. Finalmente, la incapacidad del clofibrato para impedir la hipertrofia cardíaca y la proteinuria en ratas tratadas con T_4 , a pesar de que sí es capaz de disminuir la hipertensión, está de acuerdo con estudios previos de nuestro laboratorio que demuestran que ambas variables no están relacionadas con los niveles de la presión arterial en ratas hipertiroideas (Vargas, 2006).

En resumen, el presente estudio muestra como el tratamiento crónico con clofibrato suprime el aumento de temperatura y las manifestaciones hemodinámicas características del hipertiroidismo. Estos efectos estuvieron asociados con una marcada reducción de los niveles plasmáticos de hormonas tiroideas. En cualquier caso, la administración de clofibrato no modificó la hipertrofia cardíaca ni renal, la proteinuria, la polifagia, ni la polidipsia de las ratas hipertiroideas.

Perspectivas

Este trabajo muestra que el tratamiento crónico con clofibrato previene las manifestaciones hemodinámicas y otras manifestaciones características del hipertiroidismo mediante un mecanismo que puede estar relacionado con un efecto antitiroideo específico. Según nuestro conocimiento, este es el primer trabajo que estudia la interacción

fisiológica entre las hormonas tiroideas y la activación PPAR α en el hipertiroidismo. Los resultados indican que existen patrones de interacción variables entre los RT y los PPAR, lo cual sugiere que intervienen múltiples mecanismos activados por diferentes genes y abre nuevas líneas de investigación de las alteraciones cardiovasculares en los trastornos tiroideos. Además, este estudio también sugiere que el clofibrato puede ser una potencial herramienta terapéutica en el hipertiroidismo.

Experimento 2: Efectos del Clofibrato sobre la hipertensión provocada por la dieta rica en sal

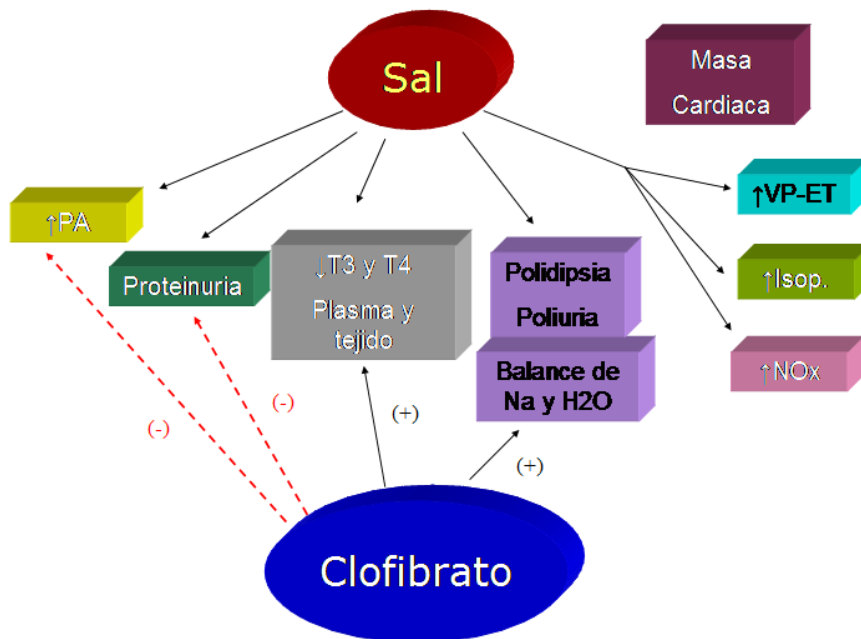


Ilustración 17. Efectos fisiológicos del clofibrato sobre la hipertensión salina.

Los principales hallazgos de este estudio fueron que la administración crónica de clofibrato a ratas tratadas con una sobrecarga de sal disminuía el aumento de la presión arterial (PA) en estos animales y que este efecto puede ser mediado por la acción antitiroidea de los fibratos. El tratamiento con clofibrato redujo marcadamente los niveles de hormonas tiroideas en plasma y tejidos en ratas tratadas con sal. Estos hallazgos están en consonancia con observaciones previas de nuestro grupo en ratas hipertiroideas hipertensas (Rodríguez-Gómez, 2008). Una reducción de los niveles de hormonas tiroideas inducida por los fibratos

puede ejercer un papel protector contra la hipertensión en las ratas con sobrecarga salina ya que es conocido que las drogas antitiroideas previenen el desarrollo de hipertensión en las ratas (Vargas, 2006).

También encontramos que el clofibrato redujo el balance de agua y sodio en ratas tratadas con sal lo cual puede también contribuir a sus efectos antihipertensivos.

En cualquier caso el clofibrato no modificó significativamente los niveles de nitratos/nitritos, isoprostanos, ET ni VP, lo cual sugiere que estas variables no juegan ningún papel en la prevención de la hipertensión por sobrecarga salina inducida por este agente.

El aumento de la PA en respuesta a la dieta rica en sodio (sensibilidad a la sal) está bien documentado en humanos y se considera un factor importante en la patogénesis de la hipertensión (Campese, 1994). En el presente estudio la sobrecarga crónica de NaCl al 2% en el agua de bebida produjo un aumento moderado de la PA (15 mmHg) en ratas Wistar machos, en consonancia con numerosos estudios de un incremento moderado de la PA arterial en ratas Sprague-Dawley con una ingesta alta de sal (Miyajima, 1985; Newaz, 2005, Ni, 2001; Wang, 1996). Sin embargo otros autores no encontraron cambios significativos en la PA con la sobrecarga de sal en ratas Sprague-Dawley (Debinski, 1990; Osborn, 1998). Estas discrepancias pueden reflejar diferencias en la duración de la sobrecarga salina o en la ruta de administración (con la ingesta de comida o de bebida).

El efecto antihipertensivo del clofibrato en las ratas con sobrecarga

salina está de acuerdo con estudios previos sobre la atenuación producida por los fibratos de la elevación de la PA en modelos genéticos de hipertensión (Shatara, 2000), ratas hipertiroideas hipertensas y ratones y ratas hipertensos deficientes en óxido nítrico ó tratados con DOCA-sal (Newaz, 2005).

En nuestro estudio el clofibrato produjo una modesta pero significativa reducción de la PA en ratas no tratadas la cual estuvo también asociada con una reducción de los niveles plasmáticos de FT₄ y una significativa disminución de los niveles de hormonas tiroideas en los tejidos. Estos datos contrastan con la PA normal y los niveles plasmáticos normales de hormonas tiroideas observados en ratas normales tratadas con clofibrato a la misma dosis durante tres semanas (Rodríguez-Gómez, 2008), pero sí están de acuerdo con estudios previos en los cuales los fibratos redujeron los niveles de hormonas tiroideas en varias especies (Luci, 2006; Viollon-Abadie, 1999; Visser, 1993). La discrepancia con nuestros resultados anteriores sugieren que un período mayor de tres semanas es necesario para observar los efectos antitiroideos del clofibrato a la dosis usada en nuestro estudio.

Las ratas tratadas con sal mostraron unos niveles reducidos de hormonas tiroideas en el plasma y los tejidos en consonancia con la disminución de los niveles de hormonas tiroideas descritas en los modelos salinos de hipertensión (MacParland, 1982; Vargas, 1988). Esta actividad tiroidea reducida que aparece en la hipertensión con renina baja parece ser que es mediada por la acción de una sustancia no

identificada denominada “thyroid-depressing factor” por Threatte et al. (Threatte, 1982). Esta sustancia reduce la captación y unión del I^{131} por la glándula tiroidea y bloquea la captación del I^{131} estimulada por la TSH (Fregly, 1982) y se encontró que estaba más aumentada en la sangre de las ratas hipertensas que en las ratas normotensas (Fregly, 1982). Más recientemente, varios autores han observado que los niveles plasmáticos bajos de hormonas tiroideas son expresión de un estado de inflamación en pacientes con enfermedad crónica renal (Zoccali, 2005) y que los niveles plasmáticos y el contenido hepático de hormonas tiroideas están reducidos en las ratas urémicas con una masa renal reducida (Lim, 1980).

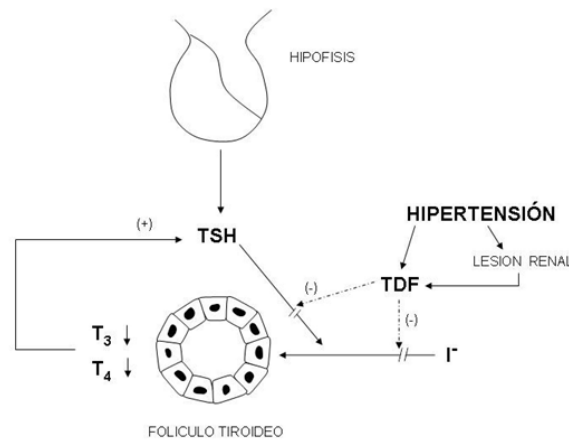


Ilustración 18. Mecanismos de acción propuestos para el factor depresor del tiroides (TDF).

El óxido nítrico (NO) juega un importante papel en la función renal y en la excreción de sodio y regula la respuesta homeostática a una ingesta aumentada de sodio (Shultz, 1993). Así, Shultz y Tolins (Shultz, 1993)

demonstraron que una ingesta alta de sal en ratas durante dos semanas producía un aumento en la concentración sérica y excreción urinaria de los productos de la descomposición del NO (NOx) y más recientemente la sobrecarga de sal ha sido usada incluso como un activador de la producción de NO (Newaz, 2004). En consonancia con esto, el presente estudio confirma que la producción renal aumentada de NOx aparece tras una dieta alta en sal. También se sabe que los activadores de los PPAR α aumentan la producción renal de NO tal como indica la medición de la excreción urinaria de nitratos/nitritos (Newaz, 2004). Sin embargo, nuestro estudio muestra que el clofibrato por sí solo no aumentó la producción de NOx y que la administración combinada de clofibrato y NaCl produjo un aumento en la excreción de nitritos que no fue mayor que la producida por la sal, mientras que la excreción de Na⁺ fue incrementada en comparación con el grupo NaCl.

El marcado aumento de la natriuresis en el grupo sal+clofibrato está de acuerdo con la disminución del balance de sodio y agua en estas ratas y puede ser debido a la estimulación por el clofibrato del ácido 20-hidroxieicosatrienoico (20-HETE) y los ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs) que poseen propiedades natriuréticas (Roman, 2001). Esto es debido a que los fibratos actúan como inductores de las enzimas citocromo P-450 (Roman, 2001), las cuales catalizan el ácido araquidónico para la formación de 20-HETE y 5- y 6-EET entre otros.

Es interesante que las ratas tratadas con sal+clofibrato mostraran una natriuresis y kaliuresis aumentadas y un balance de agua y sodio

reducido, con niveles de sodio plasmático mayores y niveles de potasio plasmático más bajos. Todas estas observaciones se asemejan a la “natriuresis exagerada” y a las anomalías plasmáticas electrolíticas observadas en las ratas tratadas con DOCA-sal, lo cual sugiere que el clofibrato puede producir un modelo de interacción positiva entre los receptores mineralocorticoides y los PPAR α a nivel renal. Así, los PPAR α pertenecen a una gran superfamilia de receptores hormonales nucleares que incluye a los receptores X retinoides (RXR), de los esteroides, de las hormonas tiroideas y de la vitamina D (Chu, 1995; Hyyti, 2006). Los receptores esteroideos y de otras hormonas nucleares pueden modular su actividad transcripcional entre ellos. Esta interacción puede resultar en la inhibición de la actividad, tal como se observa con las hormonas tiroideas, o bien en su potenciación, como sugieren las alteraciones en su actividad mineralocorticoide en las ratas tratadas con sal+clofibrato.

Nuestro hallazgo de una excreción urinaria aumentada de isoprostanos en el grupo con sobrecarga salina está de acuerdo con estudios previos en los cuales una ingesta salina aumentada produce un aumento de la actividad de la NAD(P)H oxidasa (Lenda, 2000). Además, estudios experimentales han demostrado una reducción del stress oxidativo mediada por los activadores de los PPAR α (Newaz, 2005). Así, el benzafibrato redujo el aumento de los niveles plasmáticos de 8-isoprostanos inducido por el L-NAME y el clofibrato disminuyó el aumento de la actividad NAD(P)H oxidasa en ratas DOCA-sal (Newaz,

2005). Sin embargo el tratamiento con clofibrato fue incapaz de reducir los niveles de isoprostanos en nuestras ratas con sobrecarga salina, lo cual sugiere que el clofibrato carece de las propiedades antioxidantes bajo estas condiciones, probablemente porque el stress oxidativo es menor que el observado en la hipertensión por L-NAME o DOCA-sal.

Nuestros datos muestran que las ratas con sobrecarga salina han incrementado los niveles de ET y VP inmunoreactivas. Se ha sugerido que la ET y la VP son estimuladas de forma compensatoria cuando es frenado el sistema renina-angiotensina (Letizia, 1997). Además, tanto la ET como la VP participan en el desarrollo y mantenimiento de una presión sanguínea elevada y en el daño renal en los modelos de hipertensión con renina baja (Schiffrin, 2001) y se ha descrito una interacción positiva entre ambas (Imai, 1992). La ET urinaria, que predominantemente refleja la producción local de ET renal (Benigni, 1991) es producida en varias células del riñón y juega un importante papel en la hemodinámica renal y en la excreción urinaria de sal y agua (Schiffrin, 2001).

Diferentes estudios evidencian la importancia de la ET tubular en la regulación de la excreción de sal en sujetos normales e hipertensos. Así, hay una correlación positiva entre los cambios en la natriuresis y la ET urinaria producida por la sobrecarga de sal (Cuzzola, 2001). Nuestros datos y estas observaciones sugieren la participación de este péptido en la regulación del balance de sal. Además, Newaz et al. (Newaz, 2005) observó que el clofibrato redujo la producción de ET plasmática en ratas

hipertensas DOCA-sal con renina baja (Newaz, 2005). Sin embargo nuestros datos muestran que la activación PPAR α fue incapaz de modificar los niveles urinarios de ET y VP en la hipertensión por sobrecarga salina.

En resumen, el presente estudio muestra que el tratamiento crónico con clofibrato previene la presión sanguínea aumentada en las ratas tratadas con sal. Este efecto estuvo asociado con una marcada reducción en los niveles plasmáticos y tisulares de hormonas tiroideas y con una disminución del balance de agua y sodio. Sin embargo, el tratamiento con clofibrato no afectó a las variables relacionadas con el óxido nítrico, el stress oxidativo ni la producción de ET o VP. Además el clofibrato no modificó la masa cardiaca pero si redujo la proteinuria en estos animales.

Perspectivas

Este estudio valora la interacción fisiológica entre las hormonas tiroideas y la activación PPAR α en enfermedades no tiroideas. Los resultados demuestran que el tratamiento crónico con clofibrato previene las manifestaciones hemodinámicas de la sobrecarga de sal en ratas por un mecanismo que puede estar relacionado con su efecto antitiroideo y sugieren un patrón de interacción negativa entre los RT y los PPAR α en el control de la presión sanguínea.

Además, basándose en los datos presentes, el impacto antihipertensivo del clofibrato en diferentes modelos de hipertensión experimental

debería ser reinterpretado teniendo en cuenta sus efectos antitiroideos, ya que las drogas antitiroideas han prevenido la elevación de la presión sanguínea en todos los modelos experimentales de hipertensión en ratas estudiados hasta la fecha. También puede especularse que el clofibrato produce un modelo de interacción positiva entre los receptores mineralocorticoides y los PPAR α a nivel renal.

Experimento 3: Efectos del Clofibrato sobre la hipertensión provocada por L-NAME

El principal hallazgo de este apartado es que el clofibrato reduce las manifestaciones hemodinámicas de la hipertensión L-NAME produciendo simultáneamente una reducción en los niveles de FT₄, lo cual sugiere que el efecto antitiroideo del clofibrato podría participar en el efecto antihipertensivo de esta droga. Estas observaciones están claramente en consonancia con los efectos del clofibrato en la hipertensión del hipertiroidismo y del aumento de ingesta de sal previamente descritos en los apartados anteriores de la tesis. Además, estos datos sugieren que el efecto antitiroideo del clofibrato podría ser el mecanismo común por el cual los fibratos ejercen su efecto antihipertensivo independientemente del factor etiológico de la hipertensión. En consonancia con esta observación estaría el hecho de que la administración de metimazol o la tiroidectomía son capaces de prevenir el desarrollo de hipertensión en los diversos modelos como se refirió anteriormente (Vargas, 2006).

Los efectos de los ligandos PPAR α sobre la producción de NO son objeto de investigación pero todavía no han sido esclarecidos debido a los datos contradictorios entre diferentes laboratorios. Nuestros datos demuestran que el clofibrato previene la hipertensión L-NAME y que por consiguiente puede actuar por mecanismos NO-independientes como sería el anteriormente citado. El modelo de hipertensión L-NAME cursa con niveles normales de hormonas tiroideas lo que contrasta con los

niveles reducidos en el modelo de hipertensión inducida por sal (apartado 2) y con otros modelos de hipertensión con renina baja. Además, estos resultados están en consonancia con los niveles normales de hormonas tiroideas en plasma observados en las ratas hipertensas Goldblatt dos riñones-un clip (Vargas, 2006), lo que sugiere que el TDF anteriormente citado no se activa cuando el sistema renina angiotensina no está suprimido.

VI. CONCLUSIONES

1. El tratamiento crónico con clofibrato suprimió las manifestaciones hemodinámicas y el aumento de temperatura característicos del hipertiroidismo, acciones que pueden estar producidas por un efecto directo antitiroideo. Sin embargo, la administración de clofibrato no modificó las alteraciones morfológicas, metabólicas ni renales (hipertrofia cardiaca, hipertrofia renal, proteinuria, polifagia y polidipsia) en ratas hipertiroides, lo cual indica que existe especificidad en las acciones antitiroideas del clofibrato.
2. La administración crónica de clofibrato a ratas con sobrecarga salina impidió el aumento de la presión sanguínea en estos animales y este efecto puede ser mediado por la acción antitiroidea de los fibratos. Sin embargo, la administración de clofibrato no modificó las variables relacionadas con el óxido nítrico, el estrés oxidativo ni la producción de ET o vasopresina. Además, el clofibrato no cambió la masa cardiaca de estos animales pero sí atenuó su proteinuria.
3. El clofibrato redujo las manifestaciones hemodinámicas de la hipertensión L-NAME produciendo simultáneamente una reducción en los niveles de FT₄, lo cual sugiere que el efecto antitiroideo de esta droga podría participar en su efecto antihipertensivo.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Agrawal B, Kopecký J, Kränzlin B, Rohmeiss P, Pill J, Gretz N. Acute effects of bezafibrate on blood pressure and renal haemodynamics in SHR and WKY rats. *Nephrol Dial Transplant* 13: 333-339, 1998.

Ahn KY, Mohaupt MG, Madsen KM, Kone BC. *In situ* hybridization localization of mRNA encoding inducible nitric oxide synthase in rat kidney. *Am J Physiol* 36: F748-F757, 1994.

Akiyama TE, Lambert G, Nicol CJ, Matsusue K, Peters JM, Brewer HB Jr. Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta regulates very low density lipoprotein production and catabolism in mice on a Western diet. *J Biol Chem* 279: 20874-81, 2004.

Alkayed NJ, Narayanan J, Gebremedhin D, Medhora M, Roman RJ, Harder DR. Molecular characterization of an arachidonic acid epoxygenase in rat brain astrocytes. *Stroke* 27: 971-979, 1996.

Alonso-Galicia M, Drummond HA, Reddy KK, Falck JR, and Roman RJ. Inhibition of 20-HETE production contributes to the vascular responses to nitric oxide. *Hypertension* 29: 320-325, 1997.

Alonso-Galicia M, Sun CW, Falck JR, Harder DR, Roman RJ. Contribution of 20-HETE to the vasodilator actions of nitric oxide in renal arteries. *Am J Physiol Renal Physiol* 275: F370-F378, 1998.

Alvarez-Guerra M, Hannaert P, Hider H, Chiavaroli C, Garay RP. Vascular permeabilization by intravenous arachidonate in the rat peritoneal cavity: antagonism by antioxidants. *European Journal of Pharmacology* 466: 199-205, 2003.

Aoyama T, Hardwick JP, Amici S, Funae Y, Gelboin HV, Gonzalez FJ. Clofibrate-inducible rat hepatic IVA1 and IVA3 catalyze the ν - and (ν -1)-hydroxylation of fatty acids and the ν -hydroxylation of prostaglandin E1 and F2. *J Lipid Res* 31: 1477-1482, 1990.

Aperia A, Eklöf AC, Holtback U, Nowicki S, Sundelo FM, Greengard P. The renal dopamine system. *Adv Pharmacol* 42: 870-873, 1998.

Araki O, Ying H, Furuya F, Zhu X, Cheng SY. Thyroid hormone receptor beta mutants: Dominant negative regulators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma action. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 16251-6, 2005.

Asayama K, Dobashi K, Hayashibe H, Kato K. Effects of beta adrenergic blockers with different ancillary properties on lipid peroxidation in hyperthyroid rat cardiac muscle. *Endocrinologia Japonica* 36: 687-694, 1989.

Barter RA, Klaassen CD. Rat liver microsomal UDP-glucuronosyltransferase activity toward thyroxine: characterization, induction and form specificity. *Toxicol Appl Pharmacol* 115: 261-267, 1992.

Bastomsky CH, Murthy PVN, Banovac H. Alterations in thyroxine metabolism produced by cutaneous application of micro-scope immersion oil: effects due to polychlorinated biphenyls. *Endocrinology* 98: 1309-1314, 1976.

Baylis C, Mitruka B, Deng A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest* 90(1): 278-81, 1992.

Baylis C, Vallance P. Nitric oxide and blood pressure: effects of nitric oxide deficiency. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 5: 80-88, 1996.

Bednar MM, Gross CE, Balazy MK, Belosludtsev Y, Colella DT, Falck JR, Balazy M. 16(R)-hydroxy-5,8,11,14 eicosatetraenoic acid, a new arachidonate metabolite in human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Pharmacol* 60: 447-455, 2000.

Bednar MM, Gross CE, Russell SR, Fuller SP, Ahern TP, Howard DB, Falck JR, Reddy KM, Balazy M. 16(R) hydroxyeicosatetraenoic acid, a novel cytochrome P-450 product of arachidonic acid, suppresses activation of human polymorphonuclear leukocyte and reduces intracranial pressure in a rabbit model of thromboembolic stroke. *Neurosurgery* 47: 1410-1418, 2000.

Beetstra JB, van Engelen JG, Karels P, van der Hoek HJ, de Jong M, Docter R, Krenning EP, Hennemann G, Brouwer A, Visser TJ. Thyroxine and 3,3',5-triiodothyronine are glucuronidated in rat liver by different uridine diphosphate-glucuronyltransferases. *Endocrinol* 128: 741-746, 1991.

Bell DR, Bars RG, Elcombe CR. Differential tissue specific expression and induction of cytochrome P450IVA1 and acyl-CoA oxidase. *Eur J Biochem* 206: 979-986, 1992.

Bell DR, Plant NJ, Rider CG, Na L, Brown S, Ateitalla I, Acharya SK, Davies MH, Elias E, Jenkins NA. Species-specific induction of cytochrome P-450 4A RNAs: PCR cloning of partial guinea-pig, human and mouse CYP4A cDNAs. *Biochem J* 294: 173-180, 1993.

Benigni A, Perico N, Gaspari F, Zoja C, Bellizzi L, Gabanelli M, Remuzzi G. Increased renal endothelin production in rats with renal mass reduction. *Am J Physiol* 260:F331–339, 1991.

Benter LM, Francis I, Cojocel C, Juggi JS, Yousif MHM, Canatan H. Contribution of cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid to hypertension and end-organ damage in spontaneously hypertensive rats treated with L-NAME. *Pharmacology* 25: 143-154, 2005.

Berry C, Hamilton CA, Brosnan MJ, Magill FG, Berg GA, McMurray JJV, and Dominiczak AF. Investigation into the sources of superoxide in human vessels: angiotensin II increases superoxide production in human internal mammary arteries. *Circulation* 101: 2206–2212, 2000.

Beswick RA, Dorrance AM, Leite R, Webb RC. NADH/NADPH oxidase and enhanced superoxide production in the mineralocorticoid hypertensive rat. *Hypertension* 38: 1107-1111, 2001.

Bilezikian JP, Loeb JN. Mechanisms of altered beta-adrenergic responsiveness in the hyperthyroid and hypothyroid turkey erythrocyte. *Life Science* 30: 663-674, 1982.

Bilezikian JP, Loeb JN. The influence of hyperthyroidism and hypothyroidism on a- and b-adrenergic receptor systems and adrenergic responsiveness. *Endocrine Reviews* 4: 378-396, 1983.

Bishop-Bailey D. Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol* 129(5): 823-834, 2000.

Bock KW, FrGhling W, Remmer H, Rexer B. Effects of phenobarbital and 3 methylcholanthrene on substrate specificity of rat liver microsomal UDP glucuronyltransferase. *Biochim Biophys Acta* 327: 46-56, 1973.

Bogazzi F, Hudson LD, Nikodem VM. A novel heterodimerization partner for thyroid hormone receptor. Peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem* 269: 11683-6, 1994.

Bondy SC and Naderi S. Contribution of hepatic cytochrome P-450 systems to the generation of reactive oxygen species. *Biochem Pharmacol* 48: 155-159, 1994.

Bonilla S, Redonnet A, Noel-Suberville C, Groubet R, Pallet V, Higuieret P. Effect of a pharmacological activation of PPAR on the expression of RAR and TR in rat liver. *J Physiol Biochem* 57: 1-8, 2001.

Bonilla S, Redonnet A, Noël-Suberville C, V. Pallet, Garcin H, Higuere P. High-fat diets affect the expression of nuclear retinoic acid receptor in rat liver. *Br J Nutr* 83: 665-671, 2000.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976.

Bradley SE, Stephan F, Coelho JB, Reville P. The thyroid and the kidney. *Kidney International* 6: 346-365, 1972.

Brandes RP, Schmitz-Winnenthal FH, Feletou M, Godecke A, Huang PL, Vanhoutte PM, Fleming I, Busse R. An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild-type and endothelial NO synthase knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 9747-9752, 2000.

Brash AR, Boeglin WE, Capdevila JH, Yeola S, Blair IA. 7-HETE, 10-HETE, and 13-HETE are major products of NADPH-dependent arachidonic acid metabolism in rat liver microsomes: analysis of their stereochemistry, and the stereochemistry of their acid-catalyzed rearrangement. *Arch Biochem Biophys* 321: 485-492, 1995.

Brouwer A. Inhibition of thyroid hormone transport in plasma of rats by polychlorinated biphenyls. *Arch Toxicol [Suppl]* 13: 440-445, 1989.

Brouwer A. The role of biotransformation in PCB-induced alterations in vitamin A and thyroid hormone metabolism. *Biochem Soc Transact* 19: 731-737, 1991.

Busse R, Edwards G, Feletou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH. EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci* 23: 374-380, 2002.

Büssemaker E, Popp R, Fissithaler B, Larson CM, Fleming I, Busse R, Brandes RP. Hyperthyroidism enhances endothelium-dependent relaxation in the rat renal artery. *Cardiovascular Research* 59: 181-188, 2003.

Campese VM. Salt sensitivity in hypertension. Renal and cardiovascular implications. *Hypertension* 23:531-550, 1994.

Capdevila J, Chocos N, Werringloer J, Prough RA, Estabrook RW. Liver microsomal cytochrome P-450 and the oxidative metabolism of arachidonic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 5362-5366, 1981.

Capdevila J, Parkhill L, Chacos N, Okita R, Masters BS, and Estabrook RW. The oxidative metabolism of arachidonic acid by purified P-450. *Biochem Biophys Res Commun* 101: 1357-1363, 1981.

Capdevila JH, Wei S, Yan J, Karara A, Jacobson HR, Falck JR, Guengerich FP, Dubois RN. Cytochrome P-450 arachidonic acid epoxygenase. Regulatory control of the renal epoxygenase by dietary salt loading. *J Biol Chem* 267: 21720-21726, 1992.

Carroll MA, Balazy M, Huang DD, Rybalova S, Falck RJ, McGiff JC. Cytochrome P-450-derived renal HETEs: storage and release. *Kidney Int* 51: 1696-1702, 1997.

Carroll MA, Balazy M, Margiotta P, Huang DD, Falck JR, McGiff JC. Cytochrome P-450-dependent HETEs: profile of biological activity and stimulation by vasoactive peptides. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 271: R863-R869, 1996.

Carroll MA, Sala A, Dunn CE, McGiff JC, Murphy RC. Structural identification of cytochrome P450-dependent arachidonate metabolites formed by rabbit medullary thick ascending limb cells. *J Biol Chem* 266: 12306-12312, 1991.

Castelein H, Declercq PE, Mannaerts GP, Baes MI. Peroxisome proliferators and T3 operate by way of distinct receptors. *Federation of European Biochemical Societies* 332: 24-26, 1993.

Cernuda-Morollon E, Rodriguez-Pascual F, Klatt P, Lamas S, Perez-Sala D. PPAR agonists amplify iNOS expression while inhibiting NFkB: implications for mesangial cell activation by cytokines. *Am. Soc. Nephrol.* 13: 2223-2231, 2002.

Chakrabarti N, Ray AK. Rise of intrasynaptosomal Ca²⁺ level and activation of nitric oxide synthase in adult rat cerebral cortex pretreated with 3-5-3'-L-triiodothyronine. *Neuropsychopharmacology* 22(7): 36-41, 2000.

Chang KC, Figueredoredo VM, Schreur JH, Kariya K, Weiner MW, Simpson PC, Camacho SA. Thyroid hormone improves function and Ca²⁺ handling in pressure overload hypertrophy. Association with increased sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and alpha-myosin heavy chain in rat hearts. *Journal of Clinical Investigation* 100(1): 1742-9, 1997.

Chawla A, Schwarz EJ, Dimaculangan DD, Lazar MA. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology* 135: 798-800, 1994.

Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Torra IP, Delerive P, Majd Z, Fruchart JC, Chapman J, Najib J, Staels B. Activation of proliferator activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem* 273: 25573-25580, 1998.

Chu R, Madison LD, Lin Y, Kopp P, Rao MS, Jameson JL, Reddy JK. Thyroid hormone (T3) inhibits ciprofibrate-induced transcription of genes encoding β -oxidation enzymes: Cross talk between peroxisome proliferator and T3 signaling pathways. *Biochemistry* 92: 11593-11597, 1995.

Cooney AJ, Tsai SY, O'Malley BW, Tsai, M. Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF) dimers bind to different GGTC A response elements, allowing COUP-TF to repress hormonal induction of the vitamin D3, thyroid hormone, and retinoic acid receptors. *Mol Cell Biol* 12: 4153-63, 1992.

Cowley AW, Mori T, Mattson D, Zou AP. Role of renal NO production in the regulation of medullary blood flow. *Am. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 284: R1355-R1369, 2003.

Croft KD, McGiff JC, Sanchez-Mendoza A, Carroll MA. Angiotensin II releases 20-HETE from rat renal microvessels. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F544-F551, 2000.

Cui X, Kawashima H, Barclay TB, Peters JM, Gonzalez FJ, Morgan ET, Strobel HW. Molecular cloning and regulation of expression of two novel mouse CYP4F genes: expression in peroxisome proliferator-activated receptor α -deficient mice upon lipopolysaccharide and clofibrate challenges. *J Pharmacol Exp Ther* 296: 542-550, 2001.

Cuzzola F, Mallamaci F, Tripepi G, Parlongo S, Cutrupi S, Cataliotti A, Stancanelli B, Malatino L, Bellanuova I, Ferri C, Galletti F, Filigheddu F, Glorioso N, Strazzullo P, Zoccali C. Urinary adrenomedullin is related to ET-1 and salt intake in patients with mild essential hypertension. *Am J Hypertens* 14: 224-230, 2001.

Dandona P. Endothelium, inflammation, and diabetes. *Curr. Diab. Res.* 2: 311-315, 2002.

Davis PJ, Davis FB, Lawrence WD. Thyroid hormone regulation of membrane activity Ca^{2+} -ATPase. *Endocrine Research* 15(4): 651-682, 1989.

Davis PJ, Davis FB. Nongenomic actions of thyroid hormone. *Thyroid* 6(5): 491-50, 1996.

Debinski W, Kuchel O, Buu NT, Nemer M, Tremblay J, Hamet P. Effect of prolonged high salt diet on atrial natriuretic factor in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 194:251-257, 1990.

Delerive P, De Bosscher K, Besnard Vanden Berghe SW, Peters JM, Gonzalez FJ, Tedgui A, Haegman G, Staels B. Peroxisome proliferator activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factor NFkB and AP-1. *J. Biol. Chem* 274: 32048-32054, 1999.

Delerive P, Martin-Nizard F, Chinetti G, Trottein F, Fruchart JC, Najib J, Duriez P, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway. *Circ Res* 85: 394-402, 1999.

Diep QN, Amiri F, Touys RM, Cohn JS, Endemann D, Neves MF, Schiffrin EL. PPAR α activator effects on Ang II-induced vascular oxidative stress and inflammation. *Hypertension* 40: 866-871, 2002.

Diep QN, Touyz RM, Schiffrin EL. Docosahexaenoic acid, a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha ligand, induces apoptosis in vascular smooth muscle cells by stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Hypertension* 36: 851-855, 2000.

Dillmann WH. Cellular action of thyroid hormone on the heart. *Thyroid* 12: 447-52, 2002.

Di-Poi N, Tan NS, Michalik L, Wahli W, Desvergne B. Antiapoptotic role of PPARbeta in keratinocytes via transcriptional control of the Akt1 signaling pathway. *Mol Cell* 10: 721-33, 2002.

Dratman MB, Goldman M, Crutchfield FL, Gordon JT. Nervous system role of iodocompounds in blood pressure regulation. *Life Science* 30: 611-622, 1982.

Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* 68: 879-887, 1992.

Ebner T, Burchell B. Substrate specificities of two stably expressed human liver UDP glucuronosyltransferases of the UGT1 gene family. *Drug Metab Dispos* 21: 50-55, 1993.

Ellis DZ, Nathanson JA, Sweadner KJ. Carbachol inhibits Na⁺-K⁺-ATPase activity in choroid plexus via stimulation of the NO/ cGMP pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C1685-C1693, 2000.

Emmanuel DS, Lindheimer MD, Katz IA. Mechanism of impaired water excretion in the hypothyroid rat. *Journal of Clinical Investigation* 54: 926-934, 1974.

Ericsson C, Hansten A, Nilsson J, Grip L, Svane B, de Faire U. Angiographic assessment of effects of bezafibrate on progression of coronary artery disease in young male postinfarction patients, *Lancet* 347: 849-853, 1996.

Escalante B, Erlj D, Falck JR, McGiff JC. Cytochrome P-450 arachidonate metabolites affect ion fluxes in rabbit medullary thick ascending limb. *Am J Physiol Cell Physiol* 266: C1775-C1782, 1994.

Escalante B, Erlj D, Falck JR, McGiff JC. Effect of cytochrome P-450 arachidonate metabolites on ion transport in rabbit kidney loop of Henle. *Science* 251: 799-802, 1991.

Escalante B, Sacerdoti D, Davidian MM, Laniado-Schwartzman M, McGiff JC. Chronic treatment with tin normalizes blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 17: 776-779, 1991.

Feldman EC, Nelson RW. The thyroid gland. In *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*: 67-185, 1995.

Feraille E, Carranza ML, Gonin S. Insulin-induced stimulation of Na⁺-K⁺-ATPase activity in kidney proximal tubule cells depends on phosphorylation of the alpha-subunit of Tyr-10. *Mol Biol Cell* 10(9): 2847-2859, 1999.

Feraille E, Doucet A. Sodium-potassium-adenosine triphosphate- dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. *Physiol Rev* 81(1): 345-418, 2001.

Fisone G, Cheng SX, Nairn AC. Identification of the phosphorylation site for cAMP-dependent protein kinase on Na⁺- K⁺-ATPase and effects of site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 269(12): 9368-9373, 1994.

Fisone G, Snyder GL, Aperia A, Grengard P. Na⁺-K⁺-ATPase phosphorylation in the choroid plexus: synergistic regulation by serotonin/protein kinase C and isoproterenol/cAMP-PK/PP-1 pathways. *Mol Med* 4(4): 258-265, 1998.

Fisone G, Snyder GL, Fryckstedt J, Caplan MJ, Aperia A, Grengard P. Na⁺-K⁺-ATPase in the choroid plexus. Regulation by serotonin/ protein kinase C pathway. *J Biol Chem* 270(6): 2427-2430, 1995.

Fleming I. Cytochrome P450 epoxygenases as EDHF synthase(s). *Pharmacol Res* 49: 525-533, 2004.

Fregly MJ, Brimhall RL, Galindo OJ. Effect of the antithyroid drug propylthiouracil on the sodium balance of rats. *Endocrinology* 71: 693-700, 1962.

Fregly MJ, Threatte RM. Renal-thyroid interrelationship in normotensive and hypertensive rats. *Life Sci* 30:589-599, 1982.

Frick MH, Elo O, Haapa K, Heinonen OP, Heinsalmi P, Helo P, Huttunen JK, Kaitaniemi P, KoskineN, Manninen V. Helsinki heart study: primary-prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. Safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease, *N. Engl. J. Med.* 317: 1237-1245, 1987.

Frick MH, Syvanne M, Nieminen MS, Kauma H, Majahalme S, Virtanen V, Kesaniemi YA, Pasternak A, Taskinen MR. Prevention of the angiographic progression of coronary and vein-graft atherosclerosis by gemfibrozil after coronary bypass surgery in men with low levels of HDL cholesterol. *Circulation* 96: 2137-2143, 1997.

Fruchart JC, Duriez P, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators regulate genes governing lipoprotein metabolism, vascular inflammation and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 10: 245-257, 1999.

Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB Journal* 3: 2007-2018, 1998.

Ganong WF. Thyroid hormones and renin secretion. *Life Science* 30: 577-584, 1982.

García-Estañ J, Atucha N, Quesada T, Vargas F. Involvement of the renin-angiotensin system in the reduced pressure-natriuresis response of hyperthyroid rats. *American Journal of Physiology* 268: 897-901, 1995.

Garland JG, McPherson GA. Evidence that nitric oxide does not mediate the hyperpolarization and relaxation to acetylcholine in the rat small mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 105: 429-435, 1992.

Gearing KL, Gottlicher M, Teboul M, Widmark E, Gustafsson JA. Interaction of the peroxisome-proliferator-activated receptor and retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 1440–4, 1993.

Giavarotti S, Rodrigues L, Rodrigues T, Junqueira VB, Videla LA. Liver microsomal parameters related to oxidative stress and antioxidant systems in hyperthyroid rats subjected to acute lindane treatment. *Free Radical Research* 29: 35-42, 1998.

Gibson GC. Comparative aspects of the mammalian cytochrome P-450 IVA gene family. *Xenobiotica* 19: 1123-1148, 1989.

Godecke A, Decking UK, Ding Z, Hirchenhain J, Bidmon HJ, Godecke S, Schrader J. Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice. *Circ Res* 82: 186-194, 1998.

Goudonnet H, Magdalou J, Mounie J, Naoumi A, Viriot ML, Escousse A, Siest G, Truchot R. Differential action of thyroid hormones and chemically related compounds on the activity of UDP-glucuronosyltransferases and cytochrome P-450 isozymes in rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta* 1035: 12-19, 1990.

Granger DL, Taintor RR, Boockvar KS, Hibbs JB. Measurement of nitrate and nitrite in biochemical samples using nitrate reductase and Griess reaction. *Method Enzymol* 268:142-151, 1996.

Green S. PPAR: a mediator of peroxisome proliferator action. *Mutat Res* 333: 101-109, 1995.

Grieve DJ, Fletcher S, Pitsillides AA, Botham KM, Elliott J. Effects of oral propylthiouracil treatment on nitric oxide production in rat aorta. *British Journal of Pharmacology* 127: 1–8, 1999.

Guéraud F, Paris A. Glucuronidation: a dual control. *Gen Pharmac* 31(5): 683-688, 1998.

Gupta RA, Wang D, Katkuri S, Wang H, Dey SK, DuBois RN. Activation of nuclear hormone receptor peroxisome proliferator-activated receptor-delta accelerates intestinal adenoma growth. *Nat Med* 10: 245-7, 2004.

Guyton AC. *Arterial Pressure and Hypertension*, 1980.

Haberkorn V, Oziol L, Goudonnet H. 9-cis-retinoic acid regulation of four UGT Isoforms in hepatocytes from rats with various thyroid status. *Pharmaceutical Research* 20(10), 2003.

Haque MZ, Majid DS. Assessment of renal functional phenotype in mice lacking gp91phox subunit of NAD(P)H oxidase. *Hypertension* 43: 335-340, 2004.

Harding D, Fournel-Gigleux S, Jackson MR, Burchell B. Cloning and substrate specificity of a human phenol UDP-glucuronosyltransferase expressed in COS-7 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 8381-8385, 1988.

Hardwick JP, Song BJ, Huberman E, Gonzalez FJ. Isolation, complementary DNA sequence and regulation of rat hepatic lauric acid α -hydroxylase (cytochrome P450Lw): Identification of a new cytochrome P-450 gene family. *J Biol Chem* 262: 801-810, 1987.

Harman FS, Nicol CJ, Marin HE, Ward JM, Gonzalez FJ, Peters JM. Peroxisome proliferator-activated receptor- δ attenuates colon carcinogenesis. *Nat Med* 10: 481-3, 2004.

Harris RC, Homma T, Jacobson HR, Capdevila J. Epoxyeicosatrienoic acids activate Na⁺/H⁺ exchange and are mitogenic in cultured rat glomerular mesangial cells. *J Cell Physiol* 144: 429-437, 1990.

Harrison TS, Siegel JH, Wilson WS, Weber WJ. Adrenergic reactivity in hyperthyroidism. *Archives of Surgery* 94: 396-402, 1967.

Heirwegh KPM, Van de Vijver M, Fevery J. Assay and properties of digitonin-activated bilirubin uridine diphosphate glucuronyltransferase from rat liver. *Biochem J* 129: 605-618, 1972.

Herrera VLM, Cova T, Sassoon D. Developmental cell specific regulation of Na⁺-K⁺-ATPase α 1-, α 2-, and α 3-isoform gene expression. *Am J Physiol* 266: C1301-1312, 1994.

Hirt DL, Capdevila J, Falck JR, Breyer MD, Jacobson HR. Cytochrome P-450 metabolites of arachidonic acid are potent inhibitors of vasopressin action on rabbit cortical collecting duct. *J Clin Invest* 84(6): 1805-1812, 1989.

Hoebel BG, Steyrer E, Graier WF. Origin and function of epoxyeicosatrienoic acids in vascular endothelial cells: more than just endothelium-derived hyperpolarizing factor? *Clin Exp Pharmacol Physiol* 25: 826-830, 1998.

Hoger JH, Iiyin VI, Forsyth S, Hoger A. Shear stress regulates the endothelial Kir2.1 ion channel. *PNAS* 99: 7780-7785, 2005.

Holla VR, Makita K, Zaphiropoulos PG, Capdevila JH. The kidney cytochrome P-450 2C23 arachidonic acid epoxygenase is upregulated during dietary salt loading. *J Clin Invest* 104: 751-760, 1999.

Huang H, Zhou Y, Raju VT, Du J, Chang HH, Wang CY, Brands MW, Falck JR, and Wang MH. Renal 20-HETE inhibition attenuates changes in renal hemodynamics induced by L-NAME treatment in pregnant rats. *Am J Physiol* 289: F1116-F1122, 2005.

Huh K, Kwon TH, Kim JS, Park JM. Role of the hepatic xantine oxidase in thyroid dysfunction: effect of thyroid hormones in oxidative stress in rat liver. *Arch Pharmacol Res (Seoul)* 21: 236-240, 1998.

Huie RE, Padmaja S. The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res Commun* 18: 195-199, 1993.

Hunter J, Kassam A, Winrow CJ, Rachubinski RA, Capone JP. Crosstalk between the thyroid hormone and peroxisome proliferator-activated receptors in regulating peroxisome proliferator-responsive genes. *Mol Cell Endocrinol* 116: 213-21, 1996.

Hyyti OM, Portman MA. Molecular mechanisms of cross-talk between thyroid hormone and peroxisome proliferator activated receptors: focus on the heart. *Cardiovasc Drugs Ther* 20: 463-469, 2006.

Iglarz M, Touyz RM, Armini F, Lavoie MF, Diep QN, Schiffrin EL. Effect of peroxisome proliferator-activated receptor- α and γ activators on vascular remodeling in endothelin-dependent hypertension. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23: 45-51, 2003.

Iglarz M, Touyz RM, Viel EC, Paradis P, Amiri F, Diep QN, Schiffrin EL. Peroxisome proliferator-activated receptor- α and receptor- γ activators prevent cardiac fibrosis in mineralocorticoid-dependent hypertension. *Hypertension* 42: 737-743, 2003.

Imai T, Hirata Y, Emori T, Yanagisawa M, Masaki, Marumo F. Induction of endothelin-1 gene by angiotensin and vasopressin in endothelial cells. *Hypertension* 19:753-757, 1992.

Imakado S, Bickenbach JR, Bundmand AF, Rothnagel JA, Attar P S, Wang X, Walczak VR, Wisniewski S, Pote J, Gordon JS, Heyman RA, Evans RM, Roop DR. Targeting expression of a dominant-negative retinoic acid receptor mutant in the

epidermis of transgenic mice results in loss of barrier function. *Genes Dev* 9: 317-329, 1995.

Imig JD, Pham BT, Leblanc EA, Reddy KM, Falck JR, Inscho EW. Cytochrome P-450 and cyclooxygenase metabolites contribute to the endothelin-1 afferent arteriolar vasoconstrictor and calcium responses. *Hypertension* 35: 307-312, 2000.

Inoue I, Noji S, Awata T, Takahashi K, Nakajima T, Sonoda M, Komada T, Katayama S. Bezafibrate has an antioxidant effect: peroxisome proliferator-activated receptor α is associated with $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ -superoxide dismutase in the liver. *Life Science* 63: 135-144, 1998.

Inouse I, Goto S, Matsunaga T, Nakajima T, Awata T, Hokari S, Komada T, Katayama S. The ligands/activators for peroxisomal proliferator-activated receptor α (PPAR α) and PPAR γ increase Cu^{2+} , Zn^{2+} -superoxide dismutase and decrease p22phox message expressions in primary endothelial cells. *Metabolism* 50: 3-11, 2001.

Inscho EW, Leblanc EA, Pham BT, White SM, Imig JD. Purinoceptor-mediated calcium signaling in preglomerular smooth muscle cells. *Hypertension* 33: 195-200, 1999.

Ishikawa T, Chijiwa T, Hagiwara M, Mamiya S, Hidaka H. Thyroid hormones directly interact with vascular smooth muscle strips. *Molecular Pharmacology* 35:760-765, 1989.

Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347: 645-650, 1990.

Ito O, Omata K, Ito S, Roman RJ. Effects of converting enzyme inhibitors on renal P-450 metabolism of arachidonic acid. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 280: R822-R830, 2001.

Iwai N, Inagami T. Isolation of preferentially expressed genes in the kidneys of hypertensive rats. *Hypertension* 17: 161-169, 1991.

Iwata T, Honda H. Acute hyperthyroidism alters adrenoceptor and muscarinic receptor mediated responses in isolated rat renal and femoral arteries. *European Journal of Pharmacology* 493: 191-199, 2004.

Jackson EK, Herzer WA. Angiotensin II/Prostaglandin I₂ interactions in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 22: 688-698, 1993.

Jacobson HR, Corona S, Capdevila J, Falck J. Effects of epoxyeicosatrienoic acids on ion transport in the rabbit cortical collecting duct. *Prostaglandins and Membrane Ion Transport* 311-318, 1985.

Jemnitz K, Veres Z, Monostory K, Vereczkey L. Glucuronidation of thyroxine in primary monolayer cultures of rat hepatocytes: in vitro induction of UDP glucuronosyltransferases by methylcholanthrene, clofibrate, and dexamethasone alone and in combination. *Drug Metab Dispos* 28:34-37, 2000.

Jiménez E, Montiel M, Narvéez JA, Morel M. Effects of hyper and hypothyroidism on the basal levels of angiotensin I and kinetic parameters of renin angiotensin system in male rats. *Revista Española de Fisiología* 38: 149-154, 1982.

Kahaly GJ, Dillmann WH. Thyroid hormone action in the heart. *Endocrine Rev* 26: 704-728, 2005.

Kanie N, Matsumoto T, Kobayashi T, Kamata K. Relationship between peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR α and PPAR γ) and endothelium-dependent relaxation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.* 40: 23-32, 2003.

Kapitola J, Vilimovska D. Inhibition of the early circulatory effects of triiodothyronine in rats by propranolol. *Physiologia* 30: 347-351, 1981.

Kastner P, Mark M, Chambon P. Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell* 83: 859-869, 1995.

Katusic ZS. Back to the salt mines-endothelial dysfunction in hypertension and compensatory role of endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF). *J Physiol* 543: 1, 2002.

Katz IA, LindheimerMD. Renal sodium- and potassium-activated adenosine triphosphatase and sodium reabsorption. *Journal of Clinical Investigation* 53: 796-804, 1973.

Kersten S, Desvergne B, Wahli W. Role of PPAR in health and diseases. *Nature* 405: 421-424, 2000.

Kinugawa K, Jeong MY, Bristow MR and Long CS. Thyroid hormone induces cardiac myocyte hypertrophy in a thyroid hormone receptor α 1-specific manner that requires TAK1 and p38 mitogen-activated protein kinase. *Mol Endocrinol* 19:1618-28, 2005.

Klein I , Ojamaa K. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *New England Journal of Medicine* 344: 501-509, 2001.

Klein I, Ojamaa K. Thyroid hormone and blood pressure regulation in hypertension. *Pathophysiology, Diagnosis and Management:* 2247-2262, 1995.

Klein I. Ojamaa K. Thyroid hormone. Targeting the vascular smooth muscle cell. *Circulation Research* 88: 260-261, 2001.

Klemperer JD, Ojamaa K, Klein I. Thyroid hormone therapy in cardiovascular disease. *Prog Cardiovasc Dis* 38(4): 329-336, 1996.

Kliwer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, et al. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 7355-9, 1994.

Kliwer SA, Umesono K, Noonan DJ, Heyman RA, Evans RM. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* 358: 771-4, 1992.

Knickle LC, Bend JR. Dose-dependent, mechanism-based inactivation of cytochrome P-450 monooxygenases in vivo by 1 aminobenzotriazole in liver, lung, and kidney of untreated, phenobarbital-treated, and b-naphthoflavone-treated guinea pigs. *Can J Physiol Pharmacol* 70: 1610-1617, 1992.

Kohno M, Murakawa K, Yasunary K, Nishizawa Y, Morii H, Takeda T. Circulating atrial natriuretic peptides in hyperthyroidism and hypothyroidism. *American Journal of Medicine* 83: 648-652, 1987.

Kohno M, Takaori K, Matsuura T, Murakawa K, Kanayama Y, Takeda T. Atrial natriuretic polypeptide in atria and plasma in experimental hyperthyroidism and hypothyroidism. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 134: 178-183, 1986.

Koichiro Kinugawa, Mark Y. Jeong, Michael R. Bristow, and Carlin S. Long. Thyroid hormone induces cardiac myocyte hypertrophy in a thyroid hormone receptor $\alpha 1$ -specific manner that requires TAK1 and p38 mitogen-activated protein kinase. *Molecular Endocrinology* 19(6): 1618-1628, 2004.

Kroetz DL, Yook P, Costet P, Bianchi P, Pineau T. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha controls hepatic CYP4A induction adaptive response to starvation and diabetes. *J Biol Chem* 273: 31581-31589, 1998.

Lahera V, Salom MG, Miranda-Guardiola F, Moncada S, Romero JC. Effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester on renal function and blood pressure. *Am J Physiol Renal Physiol* 261: F1033-F1037, 1991.

Landsberg L. Catecholamines and hyperthyroidism. *Clinics in Endocrinology and Metabolism* 6: 697-718, 1977.

Laniado-Schwartzman M, Abraham NG, Sacerdoti D, Escalante B, McGiff JC. Effect of acute and chronic treatment of tin on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Tonoku J Exp Med* 166(1): 85-91, 1992.

Laniado-Schwartzman M, Abraham NG. The renal cytochrome P-450 arachidonic acid system. *Pediatr Nephrol* 6(5): 490-498, 1992.

Lapuerta L, Chacos N, Falck JR, Jacobson H, Capdevila JH. Renal microsomal cytochrome P-450 and the oxidative metabolism of arachidonic acid. *Am J Med Sci* 295: 275-279, 1988.

Larsen PR, Davis TF, Hay ID. The thyroid gland. *Williams Textbook of Endocrinology*: 389-515, 1998.

Lehir M, Dubach UC. Peroxisomal and mitochondrial β -oxidation in the rat kidney: Distribution of fatty acyl-coenzyme A oxidase and 3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase activities along the nephron. *J Histochem Cytochem* 30: 441-444, 1982.

Lehmann JM, Zhang X, Graupner G, Lee MO, Hermann T, Hoffmann B, Pfahl M. Formation of retinoid X receptor homodimers leads to repression of T3 response: hormonal cross talk by ligand-induced squelching. *Mol Cell Biol* 13: 7698-7707, 1993.

Lenda DM, Sauls BA, Boegehold MA. Reactive oxygen species may contribute to reduced endothelium-dependent dilation in rats fed high salt. *Am J Physiol* 279:H7-H14, 2000.

Letizia C, Cerci S, De Toma G, D'Ambrosio C, De Ciocchis A, Coassin S, Scavo D. High plasma endothelin-1 levels in hypertensive patients with low-renin essential hypertension. *J Hum Hypertens* 11:447-451, 1997.

Levere RD, Martasek P, Escalante B, Schwartzman ML, Abraham NG. Effect of heme arginate administration on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Clin Invest* 86: 213-219, 1990.

Levey GS. Catecholamine sensitivity, thyroid hormone and the heart. *American Journal of Medicine* 50: 413-420, 1971.

Li D, Belusa R, Nowicki S, Aperia A. Arachidonic acid metabolic pathways regulating activity of renal Na⁺-K⁺-ATPase are age dependent. *Am J Physiol Renal Physiol* 278: F823-F829, 2000.

Lim VS, Henriquez C, Seo H, Refetoff S, Martino E. Thyroid function in a uremic rats model. *J Clin Invest* 66:946-954, 1980.

Lin F, Rios A, Falck JR, Belosludtsev Y, Schwartzman ML. 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid is formed in response to EGF and is a mitogen in rat proximal tubule. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 269: F806-F816, 1995.

Luci S, Kluge H, Hirche F, Eder K. Clofibrate increases hepatic triiodothyronine (T₃)- and thyroxine (T₄)- glucuronosyltransferase activities and lowers plasma T₃ and T₄ concentrations in pigs. *Drug Metab Dispos* 34:1887-1892, 2006.

Ma J, Qu W, Scarborough PE, Tomer KB, Moomaw CR, Maronpot R, Davis LS, Breyer MD, Zeldin DC. Molecular cloning, enzymatic characterization, developmental expression, and cellular localization of a mouse cytochrome P-450 highly expressed in kidney. *J Biol Chem* 274: 17777-17788, 1999.

Mackenzie PI, Owens IS, Burchell B, Bock KW, Bairoch A, Bélanger A, Fournel-Gigleux S, Green M, Hum DW, Iyanagi T, Lancet D, Louisot P, Magdalou J, Chowdhury JR, Ritter JK, Schachter H, Tephly TR, Tipton KF, Nebert DW. The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics* 7: 255–269, 1997.

MacParland RP, Rapp JP. (Na⁺-K⁺) activated adenosine triphosphatase and hypertension in Dahl salt-sensitive and salt-resistant rats. *Clin Exp Hypertens* 4:379-385, 1982.

Madhun ZT, Goldthwait DA, McKay D, Hopfer U, Douglas JG. An epoxygenase metabolite of arachidonic acid mediates angiotensin II-induced rises in cytosolic calcium in rabbit proximal tubule epithelial cells. *J Clin Invest* 88: 456-461, 1991.

Maier KG, Henderson L, Narayanan J, Alonso-Galicia M, Falck JR, Roman RJ. Fluorescent HPLC assay for 20-HETE and other P-450 metabolites of arachidonic acid. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H863-871, 2000.

Majid DSA, Nishiyama A. Nitric oxide blockade enhances renal responses to superoxide dismutase inhibition in dogs. *Hypertension* 39: 293-297, 2002.

Makino A, Skelton MM, Zou AP, Roman RJ, Cowley AW. Increased renal medullary oxidative stress produces hypertension. *Hypertension* 39: 667-472, 2002.

Makita K, Takahashi K, Karara A, Jacobson HR, Falck JR, Capdevila JH. Experimental and/or genetically controlled alterations of the renal microsomal cytochrome P-450 epoxygenase induce hypertension in rats fed a high salt diet. *J Clin Invest* 94: 2414-2420, 1994.

Malo O, Desjardins F, Tanguay JF, Tardif JC, Carrier M, Perrault LP. Tetrahydrobiopterin and antioxidant reverse the coronary endothelial dysfunction associated with left ventricular hypertrophy in porcine model. *Cardiovasc. Res.* 59: 501-511, 2003.

Mandard S, Müller M, and Kersten S. Peroxisome proliferator-activated receptor α target genes. *Cell Mol Life Sci* 61: 393-416, 2004.

Marchant C, Brown L, Sernia C. Renin-angiotensin system in thyroid dysfunction in rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 22: 449-455, 1993.

Marcus SL, Miyata KS, Zhang B, Subramani S, Rachubinski RA, Capone JP. Diverse peroxisome proliferator-activated receptors bind to the peroxisome proliferator-responsive elements of the rat hydratase/dehydrogenase and fatty acyl-CoA oxidase genes but differentially induce expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 5723-7, 1993.

Masters BSS, Clark JE, Roman LJ, McCabe TJ, Helm CB, Johnson EF, Ma YH, Harder DR, Roman RJ. Structure-function studies and physiological roles of eicosanoids metabolized by cytochrome P-450 ν -hydroxylases. *Prostaglandin, Leukotrienes, Lipoxins, and PAF* 59-66, 1991.

Mathews JM, Dostal LA, Bend JR. Inactivation of rabbit pulmonary cytochrome P-450 in microsomes and isolated perfused lungs by the suicide substrate 1-aminobenzotriazole. *J Pharmacol Exp Ther* 235: 186-190, 1985.

Matsui M, Hakozaki M. Discontinuous variation in hepatic uridine diphosphate glucuronyltransferase toward androsterone in Wistar rats. *Biochem Pharmacol* 28: 411-415, 1979.

McAllister RM, Albarracin I, Jasperse JL, Price EM. Thyroid status and endothelium-dependent vasodilation in skeletal muscle. *Am J Physiol* 288(1): 284-291, 2005.

McAllister RM, Grossenburg VD, Delp MD, Laughlin MH. Effects of hyperthyroidism on vascular contractile and relaxation responses. *American Journal of Physiology* 257: 946-953, 1998.

McClure TD, Young ME, Taegtmeier H, Ning XH, Buroker NE, Lopez-Guisa J. Thyroid hormone interacts with PPARalpha and PGC-1 during mitochondrial maturation in sheep heart. *Am J Physiol, Heart Circ Physiol* 289: H2258-64, 2005.

McGiff A, Balazy M, McGiff JC. Renal oxygenases: differential contribution to vasoconstriction induced by ET-1 and ANG II. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 273: R293-R300, 1997.

McGiff JC, Quilley J. 20-HETE and the kidney: resolution of old problems and new beginnings. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 277: R607-R623, 1999.

McKee M, Scavone C, Nathanson JA. Nitric Oxide, cGMP, and hormone regulation of active sodium transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(25): 12056-12060, 1994.

Meier-Heusler SC, Zhu X, Juge-Aubry C, Pernin A, Burger AG, Cheng SY, Meijer CA. Modulation of thyroid hormone action by mutant thyroid hormone receptors, c-erbA alpha 2 and peroxisome proliferator-activated receptor: evidence for different mechanisms of inhibition. *Mol Cell Endocrinol* 107: 55-66, 1995.

Meschter CL, Mico BA, Mortillo M, Feldman D, Garland WA, Riley JA, Kaufman LS. A 13-week toxicologic and pathologic evaluation of prolonged cytochromes P-450 inhibition by 1-aminobenzotriazole in male rats. *Fundam Appl Toxicol* 22: 369-381, 1994.

Michael UF, Barenberg RL, Chavez R, Vaamonde CA, Paper S. Renal handling of sodium and water in the hypothyroid rat. *Journal of Clinical Investigation* 51: 1405-1412, 1972.

Miyajima, E, Bunag R. Dietary salt loading produces baroreflex impairment and mild hypertension in rats. *Am J Physiol* 249: H278-H284, 1985.

Miyamoto T, Kaneko A, Kakizawa T, Yajima H, Kamijo K, Sekine R, et al. Inhibition of peroxisome proliferator signaling pathways by thyroid hormone receptor. Competitive binding to the response element. *J Biol Chem* 272: 7752-8, 1997.

Miyata KS, Zhang B, Marcus SL, Capone JP, Rachubinski RA. Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF) binds to a peroxisome proliferator-responsive element and antagonizes peroxisome proliferator-mediated signaling. *J Biol Chem* 268: 19169-72, 1993.

Mol JA, Dotter R, Hennemann G, Visser TJ. Modification of rat liver iodothyronine 5'-deiodinase activity with diethylpyrocarbonate and rose bengal; evidence for an active site histidine residue. *Biochem Biophys Res Commun* 120: 28-36, 1984.

Mombouli JV, Ntsikoussalabongui B, Ballard K, Orskiszewski R, Taylor AA, Vanhoutte PM. Phospholipid-derived epoxyeicosatrienoic acids mediate the relaxations attributed to endothelium-derived hyperpolarizing factor. In: *Endothelium-Dependent Hyperpolarizing 2C: molecular origin of the specific inhibitory effects of Factors*, edited by Vanhoutte PM. Amsterdam: Harwood, 61-67, 1999.

Mombouli JV, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factors(s): updating the unknown. *Trends Pharmacol Sci* 18: 252-256, 1997.

Moreno C, Maier KG, Hoagland KM, Yu M, and Roman RJ. Abnormal pressure-natriuresis in hypertension: Role of cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid. *Am J Hypertens* 14: 90S-97S, 2001.

Moreno JM, Rodríguez Gómez I, Wangenstein R, Osuna A, Bueno P, Vargas F. Cardiac and renal antioxidant enzymes and effects of tempol in hyperthyroid rats. *Am J Physiol Endocrine Meta* 289: 776-783, 2005.

Moreno JM. Papel de los Mediadores Endoteliales y del Estrés Oxidativo en las Alteraciones Cardiovasculares de la Disfunción Tiroidea. *Tesis doctoral*, Granada, 2005.

Mori T, Cowley AW Jr. Renal oxidative stress in medullary thick ascending limbs produced by elevated NaCl and glucose. *Hypertension* 43: 341-346, 2004.

Morrissey JJ, McCracken R, Kaneto H, Vehaskari M, Montani D, Klahr S. Location of an inducible nitric oxide synthase mRNA in the normal kidney. *Kidney Int* 45: 998-1005, 1994.

Morrison AR, Pascoe N. Metabolism of arachidonate through NADPH-dependent oxygenase of renal cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 7375-7378, 1981.

Motojima K, Goto S, Imanaka T. Specific repression of transthyretin gene expression in rat liver by a peroxisome proliferator clofibrate. *Biochem Biophys Res Commun* 188:799-806, 1992.

Motojima K, Peters JM, Gonzalez FJ. PPAR alpha mediates peroxisome proliferator-induced transcriptional repression of nonperoxisomal gene expression in mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 230: 155-158, 1997.

Mukherjee R, Jow L, Noonan D, McDonnell DP. Human and rat peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) demonstrate similar tissue distribution but different responsiveness to PPAR activators. *J Steroid Biochem Mol Biol* 51: 157-66, 1994.

Muthalif MM, Benter IF, Karzoun N, Fatima S, Harper J, Uddin MR, Malik KU. 20-HETE mediates calcium/calmodulin dependent protein kinase II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 12701-12706, 1998.

Mynatt RL, Park EA, Thorngate FE, Das HK, Cook GA. Changes in carnitine palmitoyltransferase-I mRNA abundance produced by hyperthyroidism and hypothyroidism parallel changes in activity. *Biochem Biophys Res Commun* 201: 932-7, 1994.

Nagaya T, Jameson LJ. Thyroid hormone receptor dimerization is required for dominant negative inhibition by mutations that cause thyroid hormone resistance. *J Biol Chem* 268: 15766-71, 1993.

Nagaya T, Madison LD, Jameson LJ. Thyroid hormone receptor mutants that cause resistance to thyroid hormone. Evidence for receptor competition for DNA sequences in target genes. *J Biol Chem* 267: 13014-19, 1992.

Needleman P, Turk J, Jakschick BA, Morrison AR, Lefkowitz JB. Arachidonic acid metabolism. *Ann Rev Biochem* 55: 69-102, 1986.

Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW. P-450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6: 1-42, 1996.

Newaz MA, Blanton A, Fidelis P, Oyekan AO. NAD(P)H oxidase/nitric oxide interaction in peroxisome proliferators activated receptor α (PPAR α)-mediated cardiovascular effects. *Mutat Res* 579: 163-171, 2005.

Newaz MA, Ranganna K, Oyekan AO. Relationship between PPAR α activation and NO on proximal tubular Na⁺ transport in the rat. *BMC Pharmacology* 4(1): 1-9, 2004.

Ni Z, Vaziri ND. Effect of salt loading on nitric oxide synthase expression in normotensive rats. *Am J Hypertens* 14:155-163, 2001.

Nowicki S, Chen SL, Aizman O, Cheng XJ, Li D, Nowicki C, Nairn A, Greengard P, Aperia A. 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid (20- HETE) activates protein kinase C. Role in regulation of rat renal Na⁺ K⁺-ATPase. *J Clin Invest* 99: 1224-1230, 1997.

O'Donnell MP, Katz SA, Kasiske BL, Schmitz PG, Keane WF. Effect of lovastatin on plasma lipids, glomerular injury and blood pressure in Dahl S rats, (abstract) *C Un Res* 37: 859, 1991.

Ogata T, Miyauchi T, Sakai S, Irukayama-Tomobe Y, Goto K. Stimulation of Peroxisome-proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) attenuates cardiac fibrosis and endothelin-1 production in pressure-overloaded rat hearts. *Clin. Sci. (Lond.)* 103 (Suppl 48): 284S-288S, 2002.

Ojamaa K, Balkman C, Klein IL. Acute effects of triiodothyronine on arterial smooth muscle cells. *Annals of Thoracic Surgery* 56: 61-67, 1993.

Ojamaa K, Klemperer JD, Klein I. Acute effects of thyroid hormone on vascular smooth muscle. *Thyroid* 6(5): 505-512, 1996.

Ojamaa K, Sabet A, Kenessey A, Shenoy R, Klein I. Regulation of rat cardiac Kv1.5 gene expression by thyroid hormone is rapid and chamber specific. *Endocrinology* 140: 3170-3176, 1999.

Oliveira M, Antunes E, De Nucci G, Lovisolato Sm, Zatz R. Chronic Inhibition of nitric oxide synthesis: a new model of arterial hypertension. *Hypertension* 20(3): 298-303, 1992.

Oliw EH, Lawson JA, Brash AR, Oates JA. Arachidonic acid metabolism in rabbit renal cortex. Formation of two novel dihydroxyeicosatrienoic acids. *J Biol Chem* 256: 9924-9931, 1981.

Omata K, Abraham NG, Escalante B, Schwartzman ML. Age related changes in renal cytochrome P-450 arachidonic acid metabolism in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 262: 8-16, 1992.

Omata K, Abraham NG, Schwartzman ML. Renal cytochrome P-450 arachidonic acid metabolism: intrarenal localization and hormonal regulation in SHR. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 262: 591-599, 1992.

Ominato M, Satoh T, Katz AI. Regulation of Na-K-ATPase activity in the proximal tubule: role of the protein kinase C pathway and of eicosanoids. *J Membr Biol* 152: 235-243, 1996.

Osborn JW, Hornfeldt BJ. Arterial baroreceptor denervation impairs long-term regulation of arterial pressure during dietary salt loading. *Am J Physiol* 275:H1558-1599, 1998.

Owens IS, Ritter JK. The novel bilirubin/phenol UDP-glucuronosyltransferase UGT1 gene locus: implications for multiple nonhemolytic familial hyperbilirubinemia phenotypes. *Pharmacogenetics* 2: 93-108, 1992.

Oyekan AO, McAward K, Conneta J, Rosenfeld L, McGiff JC. Endothelin-1 and CYP450 arachidonate metabolites interact to promote tissue injury in DOCA-salt hypertension. *American Journal of Physiology* 276: 766-775, 1999.

Oyekan AO, McGiff JC. Cytochrome P-450-derived eicosanoids participate in the renal functional effects of ET-1 in the anesthetized rat. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 274: R52-R61, 1998.

Pachuki J, Burmeister LA, Larsen PR. Thyroid hormone regulates hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel (HCN2) mRNA in the rat heart. *Circulation Research* 85: 498-503, 1999.

Pahan K, Jana M, Liu X, Taylor BS, Wood C, Fischer SM. Gemfibrozil, a lipid-lowering drug, inhibits the induction of Nitric-oxide synthase in human astrocytes. *J. Biol. Chem.* 277: 45984-45991, 2003.

Park KW, Dai HB, Ojamaa K, Lowenstein E, Klein I, Sellke FW. The direct vasomotor effect of thyroid hormones on rat skeletal muscle resistance arteries. *Anesth Analg* 85:734-738, 1997.

Parry CH. Collections from the unpublished papers of the late Caleb Hilliel Parry. *Diseases of the Heart* 2: 111-165, 1825.

Patsouris D, Mandard S, Voshol PJ, Escher P, Tan NS, Havekes LM, et al. PPARalpha governs glycerol metabolism. *J Clin Invest* 114: 94-103, 2004.

Pedemonte CH, Bertorello AM. Short-term regulation of the proximal tubule Na⁺-K⁺-ATPase: increased/decreased Na⁺-K⁺-ATPase activity mediated by protein kinase C isoforms. *J Bioenerg Biomembr* 33(5): 439-447, 2001.

Polikar R, Kennedy B, Ziegler M, O'Connor T, Smith J, Nicod P. Plasma norepinephrine kinetics, dopamine-b-hydroxylase and chromogranin A in hypothyroid patients before and following replacement therapy. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 70: 277-281, 1970.

Portilla D, Dai G, Peters JM, Gonzalez FJ, Crew MD, Proia AD. Etomoxir-induced PPARalpha-modulated enzymes protect during acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 278(4): F667-675, 2000.

Poynter ME, Daynes RA. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation modulates cellular redox status, represses nuclear factor-kappaB signaling, and reduces inflammatory cytokine production in aging. *J Biol Chem* 273: 3283-84, 1998.

Puntarulo S, Cederbaum AI. Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P-450 enzymes. *Free Radical Biol Med* 24: 1324-1330, 1998.

Quigley R, Baum M, Reddy KM, Griener JC, Falck JR. Effects of 20-HETE and 19(S)-HETE on rabbit proximal straight tubule volume transport. *Am J Physiol Renal Physiol* 278: F949-F953, 2000.

Rahman M, Wright JT, Douglas JG. The role of the cytochrome P-450-dependent metabolites of arachidonic acid in blood pressure regulation and renal function: a review. *Am J Hypertens* 10: 356-365, 1997.

Rebello S, Thompson EB, and Gulati A. Endothelin mechanism is altered in thyroid states in the rat. *Eur J Pharmacol* 237: 9-16, 1993.

Reddy JK, Mannaerts GP. Peroxisomal lipid metabolism. (*Annu. Rev Nutr* 14: 343-370, 1994.

Ribeiro CM, Dubay GR, Falck JR, Mandel LJ. Parathyroid hormone inhibits Na⁺-K⁺-ATPase through a cytochrome P-450 pathway. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 266: F497-F505, 1994.

Ribello CP, Mandel J. Parathyroid hormone Na⁺-K⁺-ATPase through a cytochrome P450 pathway. *Am J Physiol* 266: F4Y7-F505, 1994.

Roberts CK, Vaziri ND, Wang XQ, Barnard RJ. Enhanced NO inactivation induced by a high fat, refined-carbohydrate diet. *Hypertension* 36: 423-429, 2000.

Roberts RA, James NH, Hasmall SC, Holden PR, Lambe K, MacDonald N, West D, Woodyatt NJ, Whitecome D. Apoptosis and proliferation in nongenotoxic carcinogenesis: species differences and role of PPAR α . *Toxicol Lett* 112: 49-57, 2000.

Rodriguez-Gómez I, Cruz A, Moreno JM, Soler A, Osuna A, Vargas F. Clofibrate prevents and reverses the hemodynamic manifestations of hyperthyroidism in rats. *American Journal of Hypertension* 21(3): 341-347, 2008.

Rodriguez-Gómez I, Sainz J, Wangensteen R, Moreno JM, Duarte J, Osuna A, Vargas F. Increased pressor sensitivity to chronic nitric oxide deficiency in hyperthyroid rats. *Hypertension* 42: 220-225, 2003.

Rodriguez-Gómez I, Wangensteen R, Moreno JM, Chamorro V, Osuna A, Vargas F. Effects of chronic inhibition of inducible nitric oxide synthase in hyperthyroid rats. *American Journal of Physiology* 288: 1252-1257, 2005.

Rodriguez-Iturbe B, Vaziri ND, Herrera-Acosta J, Jonson RJ. Oxidative stress, renal infiltration of immune cells, and salt-sensitive hypertension: for one and one for all. Invited Review. *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 286: 606-616, 2004.

Roman RJ. P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol Rev* 82: 131-185, 2001

Roman RJ, Ma YH, Frohlich B, Markham B. Clofibrate prevents the development of hypertension in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension* 21: 985-988, 1993.

Roman RJ, Palmer CN, Clark JE, Muerhoff AF, Griffin KJ, Johnson EF, Masters BS. Expression of rabbit cytochromes P-450A which catalyze the omega-hydroxylation of arachidonic acid, fatty acids and prostaglandins. *Arch Biochem Biophys* 307: 57-65, 1993.

Romero MF, Madhun ZT, Hopfer U, Douglas JG. An epoxygenase metabolite of arachidonic acid 5,6 epoxy-eicosatrienoic acid mediates angiotensin-induced natriuresis in proximal tubular epithelium. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res* 21: 205-208, 1991.

Rosolowski M, Falck JR, Willerson JT, Campbell WB. Synthesis of lipoxygenase and epoxygenase products of arachidonic acid by normal and stenosed canine coronary arteries. *Circ Res* 66: 608-621, 1990.

Rubins HB, Robins SJ, Collins D, Fye CL, Anderson JW, Elam MB, Faas FH, Linares E, Schaefer EJ, Schectman G, Wilt TJ, Wittes J. Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group. *N. Engl. J. Med.* 341: 410-418, 1999.

Ruegamer WR, Ryan NT, Richert DA, Westerfeld WW. The effects of p chlorophenoxyisobutyrate on the turnover rate and distribution of thyroid hormone in the rat. *Biochem Pharmacol* 18: 613-624, 1969.

Sacerdoti D, Abraham NG, McGiff JC, Schwartzman ML. Renal cytochrome P-450-dependent metabolism of arachidonic acid in spontaneously hypertensive rats. *Biochem Pharmacol* 37: 521-527, 1988.

Sacerdoti D, Escalante B, Abraham NG, McGiff JC, Levere RD, Schwartzman ML. Treatment with tin prevents the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Science* 243: 388-390, 1989.

Sainz J, Wangensteen R, Rodríguez-Gómez I, Moreno JM, Chamorro V, Osuna A, Bueno P, Vargas F. Antioxidant enzymes and effects of tempol, a membrane permeable radical scavenger, on the development of NO inhibition induced hypertension. *Am J Hypertens* 18: 871-877, 2005.

Saito K, Kaneko H, Sato K, Yoshitake A, and Yamada H. Hepatic UDP glucuronyltransferase(s) activity toward thyroid hormones in rats: induction and effects on serum thyroid hormone levels following treatment with various enzyme inducers. *Toxicol Appl Pharmacol* 111: 99-106, 1991.

Sakairi Y, Jacobson HR, Noland DT, Capdevila JH, Falck JR, Breyer MD. 5, 6-EET inhibits ion transport in collecting duct by stimulating endogenous prostaglandin synthesis. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 268: F931-F939, 1995. 26-412.

Sanada H, Yatabe J, Midorikawa S, Hashimoto S, Watanabe T, Moore JH, Ritchie MD, Williams SM, Pezzullo JC, Sasaki M, Eisner GM, Jose PA, Felder RA. Single-nucleotide polymorphisms for diagnosis of salt-sensitive hypertension. *Clinical Chemistry* 52(3): 352-360, 2006.

Sánchez-Mendoza A, Hong E, Escalante B. The role of nitric oxide in angiotensin II-induced renal vasoconstriction in renovascular hypertension. *J Hypertension* 16(5): 697-703, 1998.

Sanchez-Mendoza A, Lopez-Sanchez P, Vazquez-Cruz B, Rios A, Martinez-Ayala S, Escalante B. Angiotensin II modulates ion transport in rat proximal tubules through CYP metabolites. *Biochem Biophys Res Commun* 272: 423-430, 2000.

Sanchez-Mendoza MA, Martinez-Ayala SO, Hernandez-Hernandez JA, Zuñiga-Sosa L, Pastelin-Hernandez G, Escalante-Acosta BA. Participation of nitric oxide and arachidonic acid metabolites via cytochrome P-450 in the regulation of arterial blood pressure. *Arch Cardiol Mex* 73: 98-104, 2003.

Sankaralingam S, Desai KM, Wilson TW. Clofibrate acutely reverses saline-induced endothelial dysfunction: role of calcium-activated potassium channels. *American Journal of Hypertension* 19:1167–1173, 2006.

Satoh T, Cohen HT, Katz AI. Intracellular signaling in the regulation of renal Na-K-ATPase. I. Role of cyclic AMP and phospholipase A2. *J Clin Invest* 89: 1496-1500, 1992.

Savineau JP, Marthan R. Effect of cromakalim on KCl-, noradrenaline- and angiotensin II-induced contractions in the rat pulmonary artery. *Pulmonary Pharmacology* 6: 41-48, 1993.

Sawant BU, Nadkarni GD, Thakare UR, Joseph LJ, Rajan MG. Changes in lipid peroxidation and free radical scavengers in kidney of hypothyroid and hyperthyroid rats. *Indian Journal of Experimental Biology* 41: 1334-1337, 2003.

Scarborough PE, Ma J, Qu W, and Zeldin DC. P-450 subfamily CYP2J and their role in the bioactivation of arachidonic acid in extrahepatic tissues. *Drug Metab Rev* 31: 205-234, 1999.

Schiffrin EL, Lariviere R, Li JS, Sventek P. Enhanced expression of the endothelin-1 gene in blood vessels of DOCA-salt hypertensive rats: correlation with vascular structure. *J. Vas. Res.* 33: 235-248, 1996.

Schiffrin EL. Role of endothelin-1 in hypertension and vascular disease. *Am J Hypertens* 14:83S-89S, 2001.

Schmitz PG, Kasiske BL, O'Donnell MP, Kasper SA, Keane WF. Contrasting effects of lovastatin and enalapril on albuminuria in Dahl S rats, (abstract) *C Un Res* 37: 400, 1991.

Schwartzman M, Falck JR, Yadagiri P, Escalante BA. Metabolism of 20-HETE by cyclooxygenase, formation and identification of novel endothelium dependent vasoconstrictor metabolites. *J Biol Chem* 264: 1165-1172, 1989.

Schwartzman ML, Ferreri NR, Carroll MA, Songu-Mize E, McGiff JC. Renal cytochrome P-450-related arachidonate metabolite inhibits Na₁K₁ ATPase. *Nature* 314: 620-622, 1985.

Seymen HO, Civelek S, Seven A, Yigit G, Hatemi H, Burkak G. Iron supplementation in experimental hyperthyroidism: effects of oxidative stress in skeletal muscle tissue. *Yonsei Medical Journal* 45: 413-418, 2004.

Seymen HO, Seven A, Civelek S, Yigit G, Hatemi H, Burkak G. Evaluation of antioxidant status in liver tissues: effects of iron supplementation in experimental hyperthyroidism. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology* 10: 315-325, 1999.

Sharma RK, Lake BG, Makowsld R, Bradshaw T, Eamshaw D, Dale JW, Gibson GC. Differential induction of peroxisomal and microsomal fatty acid oxidizing enzymes by peroxisomal proliferators in rat liver and kidney: Characterization of a renal cytochrome P 450 and implications for peroxisome proliferation. *Eur J Biochem* 184: 69-78, 1989.

Shatarar RK, Quest DW, and Wilson TW. Fenofibrate lowers blood pressure in two genetic model of hypertension. *Can J Physiol Pharmacol* 78: 367-371, 2000.

Shultz PJ, Tolins JP. Adaptation to increased dietary salt intake in the rat: role of endogenous nitric oxide. *J Clin Invest* 91:642-650, 1993.

Silverstein DM, Barac-Nieto M, Falck JR, Spitzer A. 20-HETE mediates the effect of parathyroid hormone and protein kinase C on renal phosphate transport. *Prostaglandins Leukotrienes Essent Fatty Acids* 58: 209-213, 1998.

Simpson AE. The cytochrome P-4504 (CYP4) family. *Gen Pharmacol* 28: 351-359, 1997.

Singh G, Thompson EB, Gulati A. Altered endothelin 1 concentration in the brain and peripheral regions during thyroid dysfunction. *Pharmacology* 49: 184-191, 1994.

Smith CL, O'Malley BW. Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr Rev* 25: 45-71, 2004.

Smith WL. Prostanoid biosynthesis and mechanism of action. *Am J Physiol* 263: 181-191, 1992.

Sofola OA, Knill A, Hainsworth R, Drinkhill M. Change in endothelial function in mesenteric arteries of Sprague-Dawley rats fed a high salt diet. *J Physiol* 543: 255-260, 2002.

Staels B, Koenig W, Habib A, Merval R, Lebret M, Torra IP, Delerive P, Fadel A, Chinetti G, Fruchart JC, Najib J, Maclouf J, Tedgui A. Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature* 393: 790-793, 1998.

Sterling K, Brenner MA. Free thyroxine in human serum: simplified measurement with the aid of magnesium precipitation. *J Clin Invest* 45: 153-163, 1966.

Straudinger R, Escalante BA, Schwartzman ML, Abraham NG. Effects of EETs on ⁸⁶Rb uptake in renal epithelial cells. *J Cell Physiol* 160: 69-74, 1994.

Su P, Kaushal KM, Kroetz DL. Inhibition of renal arachidonic acid omega-hydroxylase activity with ABT reduces blood pressure in the SHR. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 275: R426-R438, 1998.

Sullivan JC, Pollock DM, Pollock JS. Altered nitric oxide synthase 3 distribution in mesenteric arteries of hypertensive rats. *Hypertension* 39: 597-602, 2002.

Tabernero A, Schoonjans C, Jesel L, Carpusca I, Auwerx J, Andriantsitohaina R. Activation of the peroxisome proliferator activated receptor α protects against myocardial ischemic injury and improves endothelial vasodilatation. *BMC Pharmacol.* 2: 1-10, 2002.

Takahashi K, Nammour TM, Fukunga Ebert JM, Morrow JD, Roberts LJII, Hoover RL, Badr KF. Glomerular actions of free radical-generated novel prostaglandin, 8-epi-prostaglandin F₂ in the rat. *J Clin Invest* 90: 136-141, 1992.

Tanwani LK, Lohano V, Broadstone VL, Mokshagundam SP. Minimal change nephropathy and Graves' disease: report of a case and review of the literature. *Endocrine Practice* 8: 40-43, 2002.

Taylor RE, Fregly MJ. Renal response of propylthiouracil-treated rats to injected mineralocorticoids. *Endocrinology* 75: 33-41, 1964.

Terano T, Tanaka T, Tamura Y, Kitagawa M, Higashi H, Saito Y, Hirai A. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid inhibit vascular smooth muscle cell proliferation by inhibiting phosphorylation of Cdk2- cyclinE complex. *Biochem Biophys Res Commun* 254: 502-506, 1999.

Threatte RM, Fregly MJ, Field FP. Interrelationship among blood pressure, renal function, thyroid activity and renal thyroid depressing factor in renal hypertensive rats. *Pharmacology* 24:201-210, 1982.

Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. mPPAR γ 2: tissue specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev* 8: 1224-34, 1994.

Török J. Participation of nitric oxide in different models of experimental hypertension. (Review). *Physiol Res* 57: 813-825, 2008.

Touyz RM, Schiffrin EL. Increased generation of superoxide by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients: role of phospholipase D-dependent NAD(H)P oxidasesensitive pathways. *J Hypertens* 19: 1245–1254, 2001.

Tugwood JD, Issemann I, Anderson RG, Bundell KR, McPheat WL, Green S. The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *EMBO J* 11(2): 433-439, 1992.

Umans JG, Levi R. Nitric Oxide in the Regulation of Blood Flow and Arterial Pressure. *Annual Review of Physiology* 57: 771-790, 1995.

Van der Heide SM, Joosten BJLJ, Everts ME, Klaren PHM. Activities of UDP-glucuronyltransferase, β -glucuronidase and deiodinase types I and II in hyper- and hypothyroid rats. *J Endocrinol.* 181:393-400, 2004

Van Raaij JAGM, Kaptein E, Visser TJ, Van den Berg KJ. Increased glucuronidation of thyroid hormone in hexachlorobenzene-treated rats. *Biochem Pharmacol* 45: 627-631, 1993.

Vansell NR, Klaassen CD. Increase in rat liver UDP-glucuronyltransferase mRNA by microsomal enzyme inducers that enhance thyroid hormone glucuronidation. *Drug Metab Dispos* 30: 240-246, 2002.

Vargas F, Atucha N, Sabio JM, Quesada T, García-Estañ J. Pressure-diuresis-natriuresis response in hyper- and hypothyroid rats. *Clinical Science* 87: 323-328. 1994.

Vargas F, Baz MJ, Luna JD, Andrade J, Jodar E, Haro JM. Urinary excretion of digoxin-like immunoreactive factor and argininevasopressin in hyper- and hypothyroid rats. *Clinical Science* 81: 471-476, 1991.

Vargas F, Fernandez-Rivas A, García-Estañ J, García del Rio C. Endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilation in hyperthyroid and hypothyroid rats. *Pharmacology* 51: 308-314, 1995.

Vargas F, García del Rio C, Luna JD, Haro JM, Osorio C. Studies on thyroid activity in deoxycorticosterone-salt and Goldblatt two-kidney, one-clip hypertensive rats. *Acta Endocrinol* 118:22-30, 1988.

Vargas F, Moreno JM, Rodríguez-Gómez I, Wangenstein R, Alvarez-Guerra M, Osuna A, García-Estañ J. Vascular and renal function in experimental thyroid disorders. *Eur J Endocrinol* 154: 197-212, 2006.

Vazquez B, Rios A, Escalante B. Arachidonic acid metabolism modulates vasopressin-induced renal vasoconstriction. *Life Sci* 56: 1455-1466, 1995.

Venditti P, Balestrieri M, Di Meo S, De Leo T. Effect of thyroid state on lipid peroxidation, antioxidant defences, and susceptibility to oxidative stress in rat tissues. *J Endocrinol* 155: 151-157, 1997.

Viollon-Abadie C, Lassere D, Debruyne E, Nicod L, Carmichael N, Richert L. Phenobarbital, β -Naphthoflavone, clofibrate and pregnenolone-16 α -carbonitrile do not affect hepatic thyroid hormone UDP-glucuronosyl transferase activity, and thyroid gland function in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 155:1-12, 1999.

Visser TJ, Kaptein E, van der Toor H, van Raaij JA, van den Berg KJ, Joe CT, van Encelen JG, and Brouwer A. Glucuronidation of thyroid hormone in rat liver: effects of in vivo treatment with microsomal enzyme inducers and in vitro assay conditions. *Endocrinol* 133: 2177-2187, 1993.

Visser TJ, Kaptein E, Harpur ES. Effects of ciprofibrate on the glucuronidation of thyroid hormone in Fischer rats. In: Gordon A, Gross J, Hennemann G (eds) *Progress in Thyroid Research*. Balkema, Rotterdam, 729-731, 1991.

Visser TJ, Kaptein E, Van Raaij JAGM, Tjong Tjin JC, Ebner T, Burchell B. Multiple UDP-glucuronyltransferases for the glucuronidation of thyroid hormone with preference for 3,3',5'- triiodothyronine (reverse T3). *Febs Lett* 315: 65-68, 1993.

Visser TJ, Kaptein E, van Toor H, Jeroen, van Raaij JAGM, van Den Berg KJ, Joe CTT, van Engelen JGM, Brouwer A. Glucuronidation of thyroid hormone in rat liver: Effects of in vivo treatment with microsomal enzyme inducers and in vitro assay conditions. *Endocrinology* 133(5), 1993.

Waldron GJ, Ding H, Lovren F, Kubes P, Triggle CR. Acetylcholine- induced relaxation of peripheral arteries isolated from mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol* 128: 653-658, 1999.

Walker JD, Crawford FA, Mukherjee R, Zile MR, Spinale FG. Direct effects of acute administration of 3,5,3' triiodo-L-thyronine on myocyte function. *European Journal of Endocrinology* 130(2): 171-179, 1994.

Wang C, Chao C, Chen LM, Chao L, Chao J. High salt diet upregulates kininogen and down-regulates tissue kallikrein expression in Dahl-SS and SHR rats. *Am J Physiol* 271:F824-830, 1996.

Wang T: Role of iNOS and eNOS in modulating proximal tubule transport and acid-base balance. *Am J Physiol Renal Physiol* 283: F658-F662, 2002.

Wang YX, Lee CH, Tiep S, Yu RT, Ham J, Kang H, et al. Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* 113: 159-70, 2003.

Wangenstein R, Moreno JM, Sainz J, Rodriguez-Gómez I, Chamorro V, Luna JD, Osuna A, Vargas F. Gender difference in the role of endothelium-derived relaxing factors modulating renal vascular reactivity. *European Journal of Pharmacology* 486: 281-288, 2004.

Way JM, Harrington WW, Brown KK, Gottschalk WK, Sundseth SS, Mansfield TA, et al. Comprehensive messenger ribonucleic acid profiling reveals that peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation has coordinate effects on gene expression in multiple insulin-sensitive tissues. *Endocrinology* 142: 1269-77, 2001.

Weetman AP, Tomlinson K, Amos N, Lazarus JH, Hall R, McGregor AM. Proteinuria in autoimmune thyroid disease. *Acta Endocrinologica* 109: 341-347, 1965.

Weintraub NL, Fang X, Kaduce TL, Vanrollins M, Chatterjee P, Spector AA. Potentiation of endothelium-dependent relaxation by epoxyeicosatrienoic acids. *Circ Res* 81: 258-267, 1997.

Wikstrom L, Johansson L, Salto C, Barlow C, Campos Barros A, Baas F, Forrest D, Thoren P and Vennstrom B. Abnormal heart rate and body temperature in mice lacking thyroid hormone receptor alpha1. *EMBO J* 17: 455-461, 1998.

Wilcox CS. Reactive oxygen species: roles in blood pressure and kidney function. *Curr Hypertens Rep* 4: 160-166, 2002.

Wilcox CS, Welch WJ. Interaction between nitric oxide and oxygen radicals in regulation of tubuloglomerular feedback. *Acta Physiol. Scand.* 168: 119-124, 2000.

Wilcox CS, Welch WJ. Oxidative stress: cause or consequence of hypertension. *Exp Biol Med* 226: 619-620, 2001.

Wilson TW, Alonso-Galicia M, Roman RJ. Effects of lipid lowering agents in the Dahl Salt-sensitive rats. *Hypertension* 31: 225-231, 1998.

Wink DA, Osawa Y, Darbyshire JF, Jones CR, Eshenaur SC, Nims RW. Inhibition of cytochromes P450 by nitric oxide and a nitric oxide-releasing agent. *Arch Biochem Biophys* 300: 115-123, 1993.

Wong NL, Huang D, Guo NS, Wong EF, Hu DC. Effects of thyroid status on atrial natriuretic peptide release from isolated atria. *American Journal of Physiology* 256: 64-67, 1989.

Wooster R, Sutherland L, Ebner T, Clarke D, Da Cruz e Silva O, Burchell B. Cloning and stable expression of a new member of the human liver phenol/bilirubin UDP-glucuronosyltransferase cDNA family. *Biochem J* 278: 465-469, 1991.

Wu S, Moomaw CR, Tomer KB, Falck JR, Zeldin DC. Molecular cloning and expression of CYP2J2, a human cytochrome P-450 arachidonic acid epoxygenase highly expressed in heart. *J Biol Chem* 271: 3460-3468, 1996.

Wu XC, Harris PJ, John EJ. Nitric oxide and renal nerve-mediated proximal tubular reabsorption in normotensive and hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 277: F560-F566, 1999.

Yaziri ND, Dicus M, Ho N, Sindhu RK. Oxidative stress, and dysregulation of superoxide dismutase, NAD(P)H oxidase and xanthine oxidase in chronic renal insufficiency. *Kidney Int* 63: 179-185, 2003.

Yaziri ND, Liang K, and Ding Y. Increased nitric oxide inactivation by reactive oxygen species in lead-induced hypertension. *Kidney Int* 56: 1492-1498, 1999.

Yaziri ND, Ni Z, Oveisi F, and Trnavsky-Hobbs DL. Effect of antioxidant therapy on blood pressure, and NO synthase expression in hypertensive rats. *Hypertension* 36: 957-964, 2000.

Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action *Physiol Rev* 81: 1097-1142, 2001.

Zeldin DC, Foley J, Goldsworthy SM, Cook ME, Boyle JE, Ma J, Moomaw CR, Tomer KB, Steenbergen C, Wu S. CYP2J subfamily cytochrome P-450s in the gastrointestinal tract: expression, localization, and potential functional significance. *Mol Pharmacol* 51: 931-943, 1997.

Zeldin DC, Foley J, Ma J, Boyle JE, Pascual JM, Moomaw CR, Tomer KB, Steenbergen C, Wu S. CYP2J subfamily P-450s in the lung: expression, localization, and potential functional significance. *Mol Pharmacol* 50: 1111-1117, 1996.

Zeldin DC, Moomaw CR, Jesse N, Tomer KB, Beetham J, Hammock BD, Wu S. Biochemical characterization of the human liver cytochrome P-450 arachidonic acid epoxygenase pathway. *Arch Biochem Biophys* 330: 87-96, 1996.

Zeldin DC, Plitman JD, Kobayashi J, Miller RF, Snapper JR, Falck JR, Szarek JL, Philpot RM, Capdevila JH. The rabbit pulmonary cytochrome P-450 arachidonic acid metabolic pathway: characterization and significance. *J Clin Invest* 95: 2150-2160, 1995.

Zhang QY, Raner G, Ding X, Dunbar D, Coon MJ, Kaminsky LS. Characterization of the cytochrome P-450 CYP2J4: expression in rat small intestine and role in retinoic acid biotransformation from retinal. *Arch Biochem Biophys* 353: 257-264, 1998.

Zhou Y, Huang H, Chang H, Du J, Wu JF, Wang C, Wang M. Induction of renal 20-hydroxyeicosatetraenoic acid by clofibrate attenuates high-fat-diet induced hypertension in rats. *Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2005.

Zoccali C, Tripepi G, Cutrupi S, Pizzini P, Mallamaci F. Low triiodothyronine: a new facet of inflammation in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 16:2789-2795, 2005.

Zou AP, Imig JD, Ortiz de Montellano PR, Sui Z, Falck JR, Roman RJ. Effect of P450 omega-hydroxylase metabolites of arachidonic acid on tubuloglomerular feedback. *Am J Physiol* 266: F934-F941, 1994.

Zou AP, Li N, Cowley AW Jr. Production and action of superoxide in renal medulla. *Hypertension* 37: 547-553, 2001.

Zwaveling J, Pfaffendorf M, van Zwieten PA. The direct effects of thyroid hormones on rat mesenteric resistance arteries. *Fundam Clin Pharmacol.* 11(1): 41-46, 1997.