



**VNIVERSITAT  
E VALÈNCIA**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**

**METABOLISMO DE LA ARGININA Y DAÑO OXIDATIVO  
EN RATONES ob/ob, UN MODELO GENÉTICO DE  
RIESGO CARDIOVASCULAR**

**PROGRAMA DE DOCTORADO**

**(030E) BIOQUIMICA CLÍNICO-MEDICA E INMUNOLOGÍA**

**TESIS DOCTORAL**

**Doctoranda: D<sup>a</sup>. Giovanna Pulido Núñez**

**Directora: Dra. D<sup>a</sup>. Eulalia Alonso Iglesias**

**Valencia, 2015**



La Doctora **EULALIA ALONSO IGLESIAS**, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

**INFORMA:**

Que la presente Tesis Doctoral titulada “**Metabolismo de la arginina y daño oxidativo en ratones ob/ob, un modelo genético de riesgo cardiovascular**” ha sido realizada bajo su dirección por **Giovanna Pulido Núñez** en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia, y considera que reúne todos los requisitos para su presentación y defensa.

Y para que así conste a los efectos oportunos, expido y firmo el presente informe en Valencia, octubre de 2015.

***Fdo: Dra. Dña. Eulalia Alonso Iglesias***



El trabajo aquí presentado ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

Su realización ha sido aprobada por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

Se ha financiado gracias a las ayudas AP-199/11 y 945/2008 del EVES (Escuela Valenciana de Estudios de la Salud de la Consellería de Sanidad de la Generalitat Valenciana), y CSD 2007-00063 del Programa CONSOLIDER-INGENIO del Ministerio de Educación y Ciencia.



A Dios por iluminar mi camino

A mis padres y hermanos por confiar siempre en mí

A los dos hombres de mi vida; Wilson y Marc por ser mi motor día tras día y entender siempre con una sonrisa el por qué no podía estar con ellos

A toda mi familia y amigos

A todos, simplemente gracias



## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Eulalia Alonso Iglesias, por permitirme trabajar con ella. Gracias a su gran disposición, apoyo y motivación para sacar este trabajo adelante. Siempre estuvo en los momentos más difíciles; cuando sentí que no tenía la fuerza para seguir adelante, con sus palabras me dio la fortaleza y la seguridad para continuar. Fue un pilar de enseñanza que siempre recordaré. Ha sido una gran oportunidad trabajar con ella y nunca tendré las palabras suficientes para decir lo inmensamente agradecida que estoy con sus enseñanzas y todo lo que ha aportado a mi vida, tanto a manera personal como científica.

Al departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia, por permitirme desarrollar esta Tesis. En especial a Sandra por darme todo su apoyo y colaboración para llevar a cabo este trabajo.



**ÍNDICE**





## ÍNDICE DE TABLAS

## ÍNDICE DE FIGURAS

## ABREVIATURAS

## INTRODUCCIÓN

1.1.	ASPECTOS GENERALES DE LA OBESIDAD	23
1.2.	LA OBESIDAD COMO FACTOR DE RIESGO CARDIOVASCULAR	26
1.2.1.	Aspectos generales de la enfermedad cardiovascular	27
1.2.2.	Factores de riesgo de enfermedad cardiovascular	29
1.3.	EL ENDOTELIO VASCULAR: FUNCIONES Y CARACTERÍSTICAS	29
1.4.	ÓXIDO NÍTRICO Y FUNCION ENDOTELIAL	31
1.5.	ESTRÉS OXIDATIVO Y FUNCIÓN ENDOTELIAL	33
1.5.1.	Marcadores de estrés oxidativo	35
1.6.	DISFUNCION ENDOTELIAL	36
1.7.	DISFUNCION ENDOTELIAL Y OBESIDAD	38
1.8.	ARGININA Y OBESIDAD	44
1.8.1.	Arginina: usos terapéuticos y obesidad	48
1.8.2.	Modelos experimentales de la obesidad	50

<b>OBJETIVOS</b>	<b>57</b>
------------------	-----------

## MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.	MATERIAL	61
3.1.1.	Animales y dietas	61
3.1.2.	Obtención y procesamiento de las muestras de sangre, plasma y orina	63
3.1.3.	Obtención y procesamiento de órganos y tejidos	64
3.1.4.	Aparatos y equipos	65
3.2.	METODOLOGÍA	66
3.2.1.	Parámetros bioquímicos generales	66
3.2.1.1.	Determinación de Glucosa	66
3.2.1.2.	Determinación de Colesterol total	66
3.2.1.3.	Determinación de HDL-colesterol (HDLc)	67
3.2.1.4.	Determinación de triglicéridos (TG)	67
3.2.1.5.	Determinación de creatinina	68
3.2.1.6.	Determinación de proteínas	68
3.2.2.	Análisis del metabolismo de la arginina	69
3.2.2.1.	Determinación de nitrato y nitrito	69
3.2.2.2.	Determinación de poliaminas	70
3.2.3.	Evaluación del daño oxidativo	71
3.2.3.1.	Determinación de malondialdehído (MDA; TBARM)	71
3.2.3.2.	Determinación de grupos –SH proteicos	74
3.2.3.3.	Determinación de Productos Avanzados de Oxidación Proteica (AOPPS)	75

3.2.3.4.	Determinación de 8-isoprostanos	76
3.2.4.	Valoración de los niveles plasmáticos de insulina, IL-6, resistina y leptina	78
3.2.5.	Análisis de la expresión de las isoformas de la óxido nítrico sintasa (NOS) en corazón y aorta	81
3.2.5.1.	Extracción y aislamiento de RNA	81
3.2.5.2.	Cuantificación y análisis de la integridad del RNA	82
3.2.5.3.	Obtención del cDNA mediante retrotranscripción	83
3.2.5.4.	Análisis de la expresión génica	83
3.2.6.	Análisis estadístico	85

## RESULTADOS

4.1.	CARACTERÍSTICAS BÁSICAS DEL MODELO ANIMAL UTILIZADO: EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN ORAL DE ARGININA	89
4.1.1.	Parámetros generales	89
4.1.2.	Peso de los órganos y contenido proteico: efecto de la suplementación con arginina	91
4.2.	METABOLISMO DE LA ARGININA: EFECTO DE SU SUPLEMENTACIÓN	96
4.2.1.	Producción de óxido nítrico: niveles de nitrato	96
4.2.2.	Estudio de los niveles de poliaminas	98
4.2.2.1.	Niveles de putrescina	98
4.2.2.2.	Niveles de espermidina	99
4.2.2.3.	Niveles de espermina	102
4.2.2.4.	Cociente espermidina/espermina	104
4.3.	DAÑO OXIDATIVO: EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE ARGININA	106
4.3.1.	Indicadores de peroxidación lipídica	106
4.3.2.	Daño oxidativo a proteínas	111
4.4.	NIVELES DE INSULINA, ADIPOQUINAS Y CITOQUINAS INFLAMATORIAS. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ARGININA	119
4.5.	NIVELES DE EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS DE NOS: EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE ARGININA	121

## DISCUSIÓN

5.1.	PARÁMETROS GENERALES: ADIPOSIDAD Y EFECTO DE LA ARGININA	126
5.2.	METABOLISMO DE LA ARGININA: EFECTO DE SU SUPLEMENTACIÓN	131
5.3.	ESTRÉS OXIDATIVO: EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ARGININA	140
5.4.	ADIPOQUINAS, INFLAMACIÓN Y RESISTENCIA INSULÍNICA: EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE ARGININA	145

## CONCLUSIONES

153

## BIBLIOGRAFIA

157

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1.	Clasificaciones de la obesidad según Garrow	23
Tabla 1.2.	Clasificaciones de la obesidad según The American Heart Association	23
Tabla 1.3.	Factores de riesgo de enfermedad cardiovascular	29
Tabla 1.4.	Funciones del endotelio	30
Tabla 1.5.	Localización y funciones de las NOSs	33
Tabla 1.6.	Formación de ROS	35
Tabla 1.7.	Indicadores de detección precoz de estrés oxidativo	36
Tabla 1.8.	Sistemas antioxidantes intracelulares	38
Tabla 1.9.	Posibles mecanismos por los que la suplementación de arginina podría mejorar la función endotelial	50
Tabla 3.1.	Composición de la dieta estándar de laboratorio utilizada en el estudio	62
Tabla 3.2.	Características de los grupos experimentales del presente estudio	63
Tabla 3.3.	Método de EIA para la determinación de 8-isoprostano	78
Tabla 4.1.	Características generales de los grupos control (lean), control con arginina, obeso (ob/ob) y obeso + arginina	89
Tabla 4.2.	Peso de los órganos estudiados en ratones lean y ob/ob. Efecto de la suplementación con arginina	92
Tabla 4.3.	Contenido proteico de los diferentes órganos de estudio en ratones lean y ob/ob. Efecto de la suplementación con arginina	95
Tabla 4.4.	Niveles plasmáticos y urinarios de nitrato al final del periodo experimental	97
Tabla 4.5.	Niveles de putrescina en sangre, corazón y aorta de ratones lean y ob/ob. Efecto de la suplementación con arginina	98
Tabla 4.6.	Niveles de espermidina en sangre, corazón, aorta, grasa abdominal (GA) y grasa retroperitoneal (GR) de ratones lean y ob/ob. Efecto de la suplementación con arginina	100
Tabla 4.7.	Niveles de espermina en sangre, corazón, aorta, grasa abdominal (GA) y grasa retroperitoneal (GR) de ratones lean y ob/ob. Efecto de la suplementación con arginina	102
Tabla 4.8.	Cociente espermidina/espermina en sangre, corazón, aorta, grasa abdominal y grasa retroperitoneal de ratones lean y ob/ob. Efecto de la suplementación con arginina	104
Tabla 4.9.	Niveles de indicadores de peroxidación lipídica en plasma y orina de ratones lean y ob/ob. Efecto de la suplementación con arginina	106
Tabla 4.10.	Niveles de material reactivo con ácido tiobarbitúrico (TBARM) en los diferentes tejidos estudiados de ratones lean y ob/ob. Efecto de la suplementación con arginina	111

Tabla 4.11.	Niveles de productos avanzados de oxidación proteica (AOPPs) en los diferentes órganos y tejidos estudiados de ratones lean y ob/ob. Efecto de la suplementación con arginina.	112
Tabla 4.12.	Niveles de grupos -SH en los diferentes órganos y tejidos estudiados de ratones lean y ob/ob. Efecto de la suplementación con arginina	115
Tabla 4.13.	Niveles de resistina, leptina, IL-6 e insulina en plasma de ratones lean y ob/ob.	119

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.	Tasas de obesidad 1990–2012	24
Figura 1.2.	Índices de obesidad en España por regiones y sexo	25
Figura 1.3.	Globalización de las enfermedades cardiovasculares	28
Figura 1.4.	Síntesis de óxido nítrico a partir de arginina	32
Figura 1.5.	Formación de especies reactivas de oxígeno	34
Figura 1.6.	Formación de peroxinitrito (ONOO <sup>-</sup> ) a partir de óxido nítrico y anión superóxido	34
Figura 1.7.	Disfunción Endotelial	37
Figura 1.8.	Patologías relacionadas con la obesidad	39
Figura 1.9.	ARGININA: Ácido 2-amino-5-(diaminometilidenoamino) pentanoico	44
Figura 1.10.	Representación esquemática del metabolismo de la L-arginina	45
Figura 1.11.	Estructura química de las principales poliaminas	46
Figura 1.12.	Metabolismo general de las poliaminas	47
Figura 1.13.	Papel de la Leptina	52
Figura 3.1.	Sedación de los ratones con halotano y extracción de sangre por punción intracardiaca.	64
Figura 3.2.	Cuantificación de poliaminas mediante HPLC. Cromatogramas ilustrativos de muestra patrón y muestras de los tejidos analizados	72
Figura 3.3.	Fórmula química del reactivo de Ellman	74
Figura 3.4.	Generación de 8-isoprostanos y malondialdehído (MDA) durante la oxidación aleatoria del ácido araquidónico de los fosfolípidos tisulares por ROS	76
Figura 3.5.	Esquema del EIA utilizado para la determinación de 8-isoprostanos	77
Figura 3.6.	Ensayos Milliplex Map, basados en la tecnología Luminex® xMAP	79
Figura 3.7.	Cuantificación y análisis de la integridad del RNA	82
Figura 3.8.	Esquema del procedimiento utilizado para la obtención del cDNA	83
Figura 3.9.	Esquema del sistema de amplificación por qPCR utilizando la tecnología TaqMan	84
Figura 3.10.	Gráfica ilustrativa del análisis de los resultados de un experimento tipo de expresión génica por qPCR	85
Figura 4.1.	Características metabólicas generales de los grupos control (lean), control con arginina, obeso (ob/ob) y obeso + arginina	90
Figura 4.2.	Peso absoluto y porcentaje respecto al peso corporal de diferentes órganos de los grupos control (lean), control + arginina, obeso (ob/ob), obeso + arginina	93
Figura 4.3.	Niveles de proteínas totales en grasa abdominal y retroperitoneal de los grupos control (lean), control+arginina, obeso (ob/ob) y obeso+arginina	96

Figura 4.4.	Niveles plasmáticos y urinarios de nitrato de los grupos control (lean), control+arginina, obeso (ob/ob) y obeso+arginina	97
Figura 4.5.	Niveles de putrescina en corazón y aorta de los grupos control (lean), control+arginina, obeso (ob/ob) y obeso+arginina	99
Figura 4.6.	Niveles de espermidina en corazón, aorta, grasa abdominal y grasa retroperitoneal de los grupos control (lean), control arginina, obeso (ob/ob) y obeso+arginina	101
Figura 4.7.	Niveles de espermina en corazón, aorta, grasa abdominal y grasa retroperitoneal de los grupos control (lean), control+arginina, obeso (ob/ob) y obeso+arginina	103
Figura 4.8.	Cociente espermidina/espermina en corazón, aorta, grasa abdominal y grasa retroperitoneal de los grupos control (lean), control+ arginina, obeso (ob/ob) y obeso+ arginina	104
Figura 4.9.	Niveles sanguíneos de poliaminas y cociente espermidina/espermina de los grupos control (lean), control+ arginina, obeso (ob/ob) y obeso+ arginina	105
Figura 4.10.	Niveles plasmáticos de TBARM, MDA e isoprostanos de los grupos control (lean), control+arginina, obeso (ob/ob) y obeso+arginina.	107
Figura 4.11.	Niveles urinarios de TBARM e isoprostanos de los grupos control (lean), control+arginina, obeso (ob/ob) y obeso+arginina	108
Figura 4.12.	Niveles de TBARM en los distintos órganos y tejidos estudiados de los grupos control (lean), control+arginina, obeso (ob/ob) y obeso+arginina.	109
Figura 4.13.	Niveles de AOPPs en los distintos órganos y tejidos estudiados de los grupos control (lean), control+arginina, obeso (ob/ob) y obeso+arginina	113
Figura 4.14.	Niveles de grupos -SH en los distintos órganos y tejidos estudiados de los grupos control (lean), control+arginina, obeso (ob/ob) y obeso+arginina	116
Figura 4.15.	Cociente (AOPPs/SH) en los distintos órganos y tejidos estudiados de los grupos control (lean), control+arginina, obeso (ob/ob) y obeso+arginina	118
Figura 4.16.	Niveles de resistina, leptina, IL-6, insulina, glucosa e índice HOMA (calculado) en plasma de ratones lean y ob/ob	120
Figura 4.17.	Niveles relativos de expresión de nNOS, iNOS y eNOS en corazón y aorta de los ratones ob/ob respecto a los lean	121
Figura 4.18.	Efecto de la arginina sobre los niveles relativos de expresión de nNOS, iNOS y eNOS en corazón y aorta de los ratones ob/ob y lean	122
Figura 5. 1.	Integración del papel de la resistina en el contexto de inflamación, RI, estrés oxidativo y deterioro vascular	151

## ABREVIATURAS

AChE	Acetilcolinesterasa
ADMA	Dimetil-arginina asimétrica
AGL	Ácidos grasos libres
Akt	Protein quinasa B
AMPK	Protein quinasa activada por AMP
AMP	Adenosin monofosfato
ANG II	Angiotensina II
ANOVA	Análisis de la varianza
AOPPs	Productos avanzados de oxidación proteica
ATP	Adenosin trifosfato
AT-1	Receptores de angiotensina tipo 1
BH <sub>4</sub>	Tetrahidrobiopterina (THB)
BHT	Hidroxitolueno butilado
BSA	Albúmina de suero bovino
CAT	Catalasa
cDNA	DNA complementario
CE	Células Endoteliales
CI	Cardiopatía isquémica
CIPF	Centro de Investigación Príncipe Felipe
CO	Grupos carbonilo
CPN	Péptido natriurético tipo C
CYS	Cisteína
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis [2-nitrobenzoico]
ECA	Enzima convertidora de Angiotensina
ECV	Enfermedad Cardiovascular
EDHF	Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
EIA	Enzimo-inmuno ensayo
ESM	Error estándar de la media
ET	Endotelina
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FMN	Flavín mononucleótido
GC	Guanilato ciclasa
GLUT4	Transportador de glucosa tipo 4
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
GMPC	Guanosina monofosfato cíclico
GPx	Glutation peroxidasa
GSH	Glutation reducido
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrógeno
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HDLc	HDL-colesterol
HOMA	Modelo Homeostático de resistencia a la insulina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HTA	Hipertensión arterial
IL	Interleuquina
IMC	Índice de masa corporal
INF- γ	Interferón gamma
IOTF	International Obesity Task Force
IRS-1	Sustrato del receptor de la insulina tipo 1
LDH	Lactato deshidrogenasa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad

MAPK	Proteín quinasa activada por mitógenos
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos tipo 1
MDA	Malondialdehído
mRNA	Ácido ribonucléico mensajero
NADP	Nicotinamín-adenin-dinucleótido fosfato (forma oxidada)
NADPH	Nicotinamín-adenin-dinucleótido fosfato (forma reducida)
NF-kB	Factor nuclear kB
NO	Óxido nítrico
NOS	Oxido nítrico sintasa
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
NO <sub>2</sub>	Dióxido de nitrógeno,
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anión superóxido
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos
ODC	Ornitina decarboxilasa
8-OHdG	8-hidroxi-2-desoxiguanosina
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno-1
PCR	Proteína C Reactiva
PG H2	Prostaglandina H2
PG I2	Prostaglandina I2
PI3K	Fosfatidil-inositol 3 quinasa
PTP-1B	Proteína tirosina fosfatasa-1B
RCV	Riesgo cardiovascular
REDOX	Equilibrio óxido-reductor
RI	Resistencia a la insulina
RNA	Ácido ribonucléico
ROS	Especies reactivas del oxígeno
RS	Radical tiil
SCA	Síndrome coronario agudo
SDS	Dodecil sulfato sódico
SNC	Sistema Nervioso Central
SOCS-3	Supresor de la señalización por citoquinas-3
SOD	Superóxido dismutasa
SSAT	Espermidina/espermina acetiltransferasa
TA	Temperatura ambiente
TAG	Triacilgliceroles
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARM	Material reactivo con ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TG	Triglicéridos
TLR4	Receptor Toll-Like-4
TMP	Tetrametoxipropano
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TXA2	Tromboxano A2
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
ZFD	Ratas Zucker

# INTRODUCCIÓN





## 1.1. ASPECTOS GENERALES DE LA OBESIDAD

Se habla de obesidad cuando en la composición corporal de una persona el componente graso excede los valores considerados normales, que son del 12 al 20% en varones y del 20 al 30% en mujeres adultas (Salas-Salvado et al, 2007). Desde el punto de vista epidemiológico y clínico, en la población adulta la obesidad se tipifica como un índice de masa corporal (IMC; peso en kilogramos dividido por la talla en metros al cuadrado) igual o superior a  $30 \text{ kg/m}^2$ , aunque también se han definido valores superiores al percentil 85 (p85) de la distribución de la población de referencia (Salas-Salvado et al, 2007).

Según Garrow, se puede clasificar a los individuos en cuatro grados, de acuerdo al IMC (Tabla 1.1) (Garrow, 1981). Una clasificación alternativa, según la proposición de la American Heart Association, clasifica a los obesos en subgrupos de cinco unidades de IMC, relacionando su grado de obesidad con el riesgo de presentar complicaciones de salud (Tabla 1.2)

	GRADO	IMC
Grado 0:	Normopeso	20 - 24.9
Grado I:	Sobrepeso	25 - 29.9
Grado II:	Obesidad	30 - 39.9
Grado III:	obesidad mórbida	>40

**Tabla 1.1. Clasificaciones de la obesidad según Garrow.** Tomado de Garrow, 1981.

	GRADO	IMC	RIESGO
Clase 0	Normal	20 - 24.9	Muy bajo
Clase I	Obesidad leve	25 - 29.9	Bajo
Clase II	Obesidad moderada	30 - 34.9	Moderado
Clase III	Obesidad severa	35 - 39.9	Alto
Clase IV	Obesidad mórbida	>40	Muy alto

**Tabla 1.2. Clasificaciones de la obesidad según The American Heart Association.** Tomado de Garrow, 1981.

Actualmente la obesidad y el sobrepeso se consideran una epidemia global, son uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial (Kopelman, 2000; Bruder-Nascimento et al, 2011). La obesidad ha sido catalogada por la *International Obesity Task Force* (IOTF) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la epidemia del Siglo XXI (WHO, 2000; WHO, 2003).

Según el informe de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE), cada día crece el número de personas con sobrepeso y obesidad, es una epidemia que continúa extendiéndose, ningún país miembro de la OCDE ha observado una disminución desde que comenzó la epidemia. Las tasas de obesidad, desde la década de 1990, han crecido rápidamente en Australia, Inglaterra y Estados Unidos, y de forma más lenta en países como: Canadá, España, Francia, Italia, Suiza y Corea. (Figura 1.1) (Obesity Update OECD, 2014).

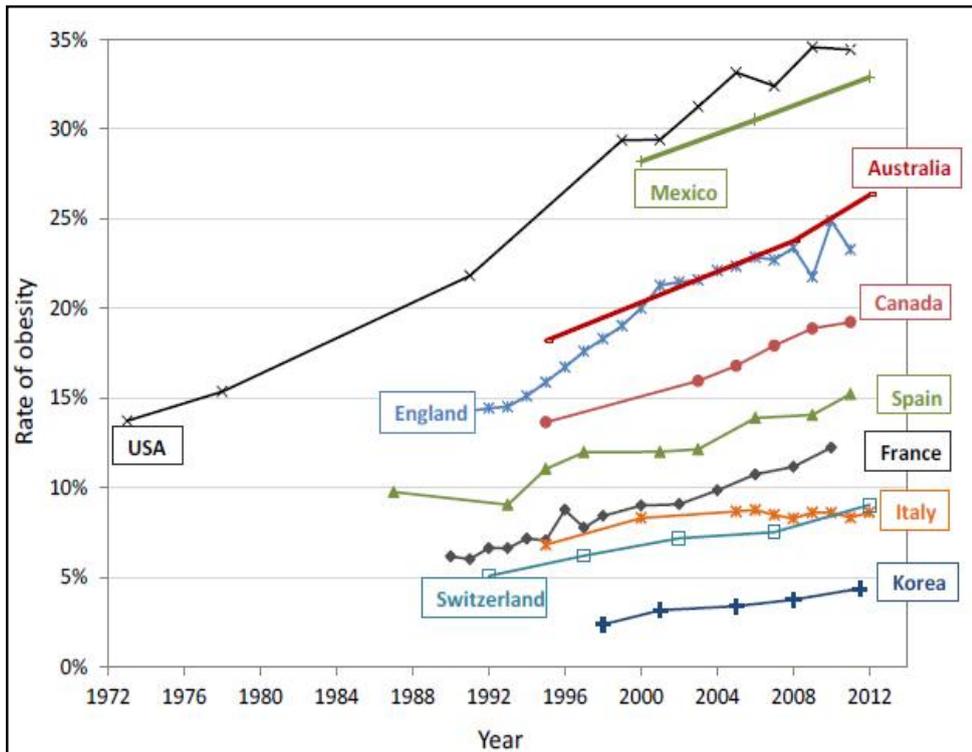
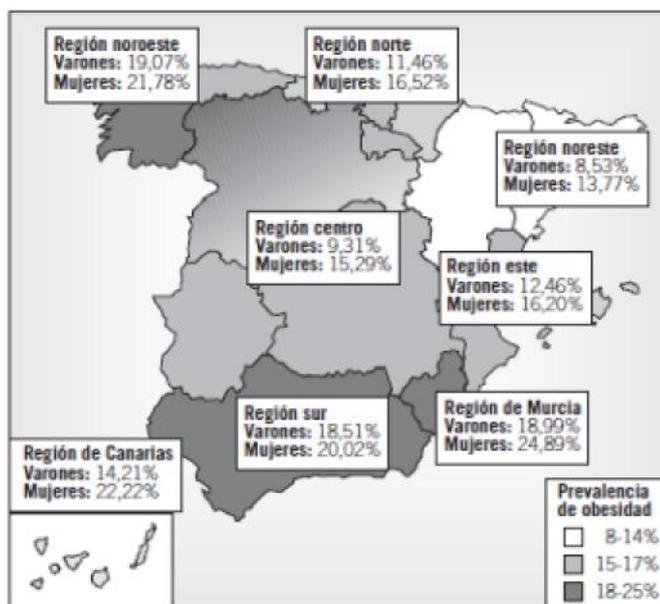


Figura 1.1. Tasas de obesidad 1990–2012. Tomado de “OECD Obesity Update”, 2014. [www.oecd.org/health/obesity-update.htm](http://www.oecd.org/health/obesity-update.htm)

La base de datos del índice de masa corporal (IMC) de la OMS refleja que en la actualidad al menos 300 millones de adultos son clínicamente obesos, y en países como EE.UU y el Reino Unido más del 20% de su población presenta valores del IMC de 30 kg/m<sup>2</sup> o superiores, es decir, más del 20% de sus ciudadanos son obesos ([www.iotf.org](http://www.iotf.org)).

La prevalencia de obesidad en España se sitúa en un punto intermedio entre los países del norte de Europa, Francia y Australia, con las proporciones de obesidad más bajas, y EE.UU y los países del este europeo, que presentan en la actualidad las tasas más elevadas. Hemos de tener en cuenta que nuestro país es uno de los que presenta prevalencias más altas de obesidad en Europa. En la población infantil y juvenil española (2-24 años), la prevalencia de obesidad se estima en un 13,9%. La prevalencia de obesidad en la población adulta de 25 a 64 años se estima en un 15,5% y la de sobrepeso en un 39,2%. Así mismo, se ha producido un incremento del 34,5% en la prevalencia de obesidad desde 1992 a 2006 (Salas-Salvado et al, 2007)

De acuerdo a la ubicación geográfica de las regiones españolas, se han observado diferencias en los índices de obesidad, con mayor número de obesos en el noroeste y sureste del país y en Canarias (Aranceta-Bartrina et al, 2005) (Figura 1.2).



**Figura 1.2. Índices de obesidad en España por regiones y sexo.** Datos del Estudio DORICA. Tomado de Aranceta et al, 2005.

La obesidad y el sobrepeso son el quinto factor de riesgo de mortalidad mundial. Su prevalencia se ha duplicado desde 1980; al menos 2,8 millones de adultos en todo el mundo, mueren cada año a consecuencia de ésta. La obesidad aumenta considerablemente el riesgo de desarrollar desórdenes metabólicos y Enfermedad Cardiovascular (ECV) (Lantorno et al, 2014).

## **1.2. LA OBESIDAD COMO FACTOR DE RIESGO CARDIOVASCULAR**

El exceso de peso y la obesidad son un factor que predispone de forma importante a las enfermedades cardiovasculares y la diabetes del adulto (Mokdad et al, 2003).

En las sociedades occidentales, el peso corporal aumenta con la edad en ambos sexos, pero el ritmo de aumento en la mujer es más acelerado que en los hombres de la misma edad. Dado que este rápido aumento de peso acostumbra a depositarse mayoritariamente en el abdomen, éste es el principal factor contribuyente al deterioro del perfil de riesgo cardiovascular puesto que contribuye en gran manera a la elevación de la presión arterial que, junto con las alteraciones del metabolismo de las grasas, constituye el llamado síndrome metabólico (García-García et al, 2008)

Tanto la obesidad como la arteriosclerosis son procesos multifactoriales entre los que existen numerosos puentes de unión que explican de manera satisfactoria, aunque no del todo completa, la mayor morbimortalidad cardiovascular en el obeso (Hubert et al, 1983; Zugasti Murillo y Moreno Esteban, 2005). De hecho, muchos de los elementos fisiopatológicos que acontecen en el obeso son, a su vez, factores de riesgo para la arteriosclerosis. Por ello, la obesidad puede ser considerada como uno de los factores de riesgo cardiovascular, principalmente porque se ve acompañada de otros factores de riesgo cardiovascular como dislipemia, hipertensión, insulinoresistencia y diabetes (Zugasti-Murillo y Moreno-Esteban, 2005). De hecho estos factores de riesgo están íntimamente ligados a un exceso de tejido adiposo, y más específicamente a una particular distribución corporal del mismo. Así, la distribución visceral o abdominal de la grasa corporal en el obeso se correlaciona mejor con el riesgo de cardiopatía isquémica que la masa adiposa total. Esta forma de distribución de la grasa en el obeso sí está claramente relacionada de manera independiente con la morbimortalidad cardiovascular

a través de un síndrome metabólico aterogénico. Éste es el motivo por el que adquiere especial trascendencia clínica, no sólo la cuantía total de la grasa corporal, sino su distribución; tal distribución tiene más impacto en el riesgo cardiovascular que la obesidad por sí misma.

La arteriosclerosis es frecuente en obesos, como consecuencia, en parte, de las anomalías lipídicas que se desarrollan. El incremento de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) pequeñas y densas que se observa en la obesidad visceral, junto con el descenso del colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (HDL), facilitado por la hipertrigliceridemia, crean las condiciones metabólicas apropiadas para el desarrollo del proceso aterógeno. La gran elevación y persistencia de la lipemia posprandial constituye un factor aterógeno de máxima importancia, por la disminución del cHDL, así como la presencia de LDL en exceso. Además, la aterogénesis en obesos se ve acentuada por un incremento de los procesos oxidativos. Otro factor de riesgo cardiovascular que se halla presente con gran frecuencia en pacientes obesos es la diabetes (Basulto et al, 2008).

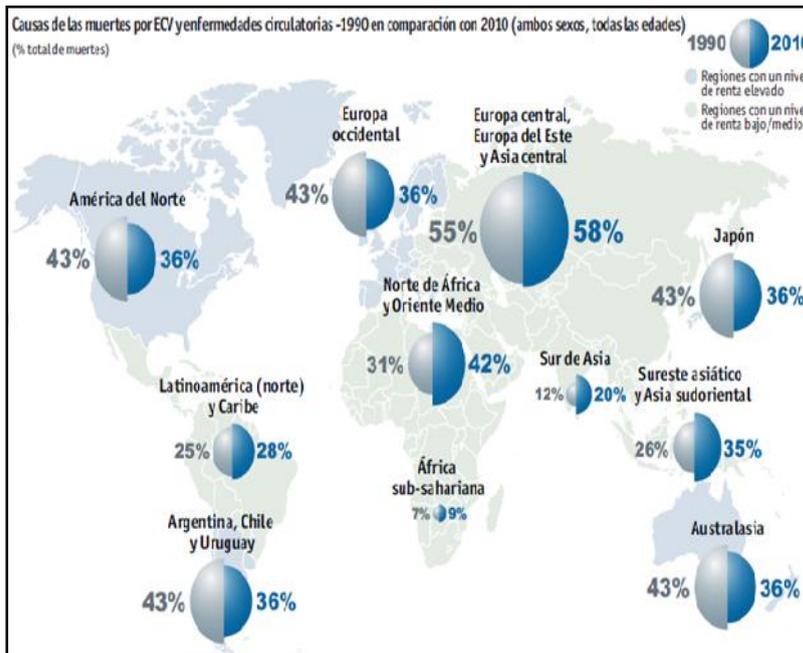
### **1.2.1. Aspectos Generales de Enfermedad de Riesgo Cardiovascular.**

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) constituyen la primera causa de mortalidad en los países occidentales. A principios del siglo XX eran responsables de menos del 10% de las muertes en el mundo; sin embargo, en los inicios del siglo XXI son la causa de casi el 50% de las muertes en los países desarrollados y del 25% en los países en desarrollo. En España, en el año 2000, fueron responsables del 35% del total de defunciones (40% en mujeres y 30% en hombres) (Plaza et al, 2001).

En los países desarrollados las enfermedades cardiovasculares son una de las causas más importantes de mortalidad, representando el 43% de las muertes en el año 2010. Sin embargo, se ha observado algún progreso positivo respecto a las muertes ocasionadas por este mismo factor en el año 1990 (Figura 1.3) (Pearson-Stuttard et al, 2012).

El término “enfermedad cardiovascular” incluye diferentes patologías que afectan al corazón y al sistema circulatorio, siendo las dos más comunes la cardiopatía isquémica (CI) y la enfermedad cerebrovascular. La primera también es conocida como enfermedad

coronaria y suele estar provocada por la acumulación de materia grasa en el sistema circulatorio que obstruye el flujo sanguíneo. También la cardiopatía isquémica puede provocar una angina de pecho o un infarto, que suelen denominarse de forma conjunta como síndrome coronario agudo (SCA) (Bassand et al, 2007).



**Figura 1.3. Globalización de las enfermedades cardiovasculares.** Tomado de: Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). The Economist Intelligence Unit Limited, 2013.

El SCA es una de las principales causas de mortalidad, morbilidad y coste sanitario en España. Se estima que durante el 2013 el número total de casos de SCA ha sido de 115.752, de los cuales alrededor de 30.400 murieron antes de llegar al hospital. De los pacientes hospitalizados por SCA en este último año, el 38,2% padecieron el síndrome con elevación del ST, el 55,8% la manifestaron sin elevación del ST y el 6% se consideran no clasificables. De todos ellos, un 18,7% padeció una angina inestable y un 81,3% sufrió un infarto de miocardio (Dégano et al, 2013).

Las tasas de mortalidad ajustadas por edad para la ECV llevan disminuyendo desde 1975 al 3,1% anual. Un 50% de este descenso podría deberse a la reducción de algunos factores

de riesgo, como el colesterol total y la presión arterial sistólica (Banegas et al, 2011), pese a que su control sigue siendo muy bajo en España (Llisterii et al, 2012; Gutiérrez-Fisac et al, 2012). Sin embargo, las tendencias negativas de otros factores de riesgo, como la obesidad y la diabetes mellitus, la inactividad física en varones y el tabaquismo en mujeres, junto con la mayor supervivencia de los pacientes y el envejecimiento de la población, hace que el impacto de las ECV siga aumentando.

### 1.2.2 Factores de Riesgo de Enfermedad Cardiovascular.

Numerosos estudios clínicos y estadísticos han identificado los factores de riesgo de ECV, entendiendo por factores de riesgo aquellas características biológicas o conductuales cuya presencia confiere una mayor probabilidad de sufrir una enfermedad en el futuro (Kavey et al, 2003). Algunos factores pueden ser modificados, tratados o controlados, mientras que otros no. Así podemos clasificar los distintos factores en varias clases, si bien, independientemente de la clase, cuanto mayor sea el nivel de cada factor, mayor es el riesgo de tener una enfermedad cardiovascular aterosclerosa (Tabla 1.3).

NO MODIFICABLES	MODIFICABLES	OTROS FACTORES
Herencia	Tabaquismo	Diabetes
Sexo	Ingesta de alcohol	Obesidad
Edad	Colesterol elevado	Estrés
	Hipertensión	
	Sedentarismo	

**Tabla 1.3. Factores de riesgo de enfermedad cardiovascular.** Datos tomados de Kavey et al, 2003.

### 1.3. EL ENDOTELIO VASCULAR: FUNCIONES Y CARACTERISTICAS

El endotelio vascular juega un papel importante en el mantenimiento, regulación y control de las funciones cardiovasculares. Tiene acción antitrombogénica y su intervención es fundamental en la regulación vasomotora. El endotelio vascular está constituido por

Células Endoteliales (CE), una capa unicelular que forma parte de la pared de los capilares y cubre la parte interna de los vasos sanguíneos. Es un órgano funcionalmente complejo y está relacionado en una gran variedad de procesos patológicos y fisiológicos (Tabla 1.4) como la fibrinólisis, la angiogénesis, la inflamación, la presión arterial y el metabolismo de las lipoproteínas.

<b>REGULACIÓN DEL TONO VASCULAR</b>	Síntesis de compuestos vasoactivos: NO, EDHF, ET-1, PGI <sub>2</sub> . Presencia de Enzima convertidora de Angiotensina (ECA), Producción de Angiotensina II, Producción de péptido natriurético tipo C (CPN)
<b>FUNCIÓN TRÓFICA PARA CAPAS ÍNTIMA Y MEDIA</b> <b>CONTROL DE INFLAMACIÓN</b>	Producción de colágeno, fibronectina, elastina, laminina, mucopolisacáridos, estimulación de células musculares lisas. Expresión de MCP-1 (Proteína quimiotáctica de monocitos tipo 1) Expresión de moléculas de adhesión (VCAM-1, ICAM-1, selectinas) Producción de TNF alfa, IL-1, IL-6 e IL-8
<b>FUNCIÓN METABÓLICA</b>	Unión de lipoprotein lipasa
<b>FUNCIÓN COAGULANTE/ANTICOAGULANTE</b>	Síntesis y unión de factores hemostáticos: NO, Heparán sulfato, factor von Willebrand, trombomodulina, trombina, proteínas C y S, Inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), sistema activador del plasminógeno uroquinasa (uPA)

**Tabla 1.4. Funciones del endotelio.** Elaborado a partir de datos de Gastón-Fourcade (2008).

Es el órgano más importante en la regulación del tono vascular y de la homeostasis. (Acosta et al, 2006). Gracias a su ubicación estratégica, separa el medio exterior del intersticio tisular y así cumple como defensor del huésped a nivel del tegumento mucocutáneo, el pulmón, el tracto gastrointestinal y el sistema cardiovascular (Gastón-Fourcade M, 2008).

El endotelio juega un papel esencial en la modulación del tono vascular a través de la liberación de factores vasodilatadores como el óxido nítrico (NO), la prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>), el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF), y vasoconstrictores como

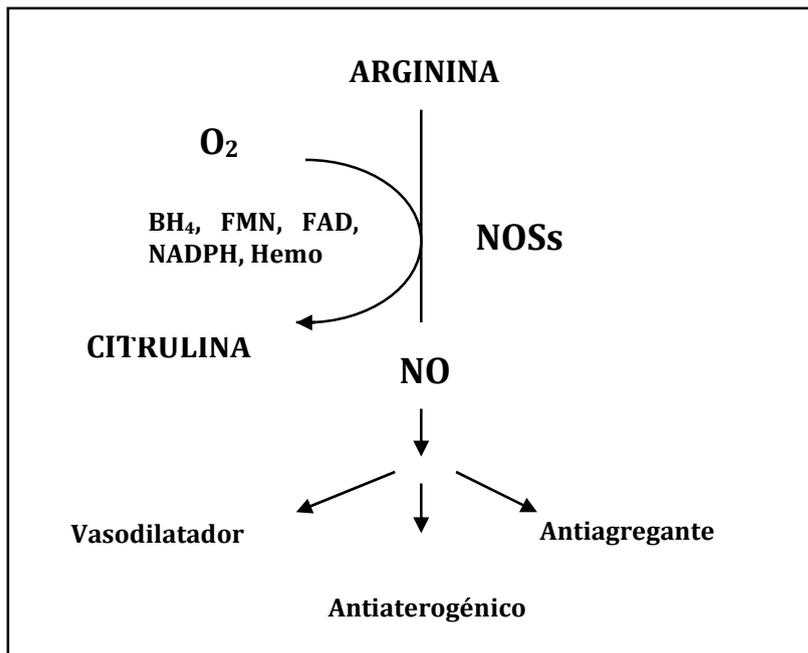
el tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), la prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) y la endotelina (ET). Asimismo, los niveles de especies antioxidantes intracelulares, cisteína (CYS) o glutatión (GSH), y la actividad de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT), contribuyen al mantenimiento del equilibrio óxido-reductor (REDOX), compensando el incremento del estrés oxidativo generado por las especies reactivas del oxígeno (ROS) (Vanhoutte, 2012).

De los factores vasodilatadores mencionados anteriormente, el óxido nítrico (NO), gracias a las múltiples funciones fisiológicas en las que se ha visto implicado, es reconocido como la molécula de los noventa.

#### **1.4. ÓXIDO NITRICO Y FUNCIÓN ENDOTELIAL**

Furchgott y Zawadzki en 1980 demostraron que cuando el endotelio era estimulado, liberaba una sustancia vasoactiva que fue llamada EDRF (Factor Relajante derivado del Endotelio). Al cabo de unos años, el EDRF fue identificado por Ignarro y colaboradores como el óxido nítrico (NO), un compuesto señalado por Ferid Murad en 1977 (Gonçalves-Diaz et al, 2011).

El óxido nítrico es una molécula gaseosa que actúa en la señalización de diferentes procesos biológicos. Es un radical libre que presenta un electrón desapareado en la última capa y tiene una vida media de 4 a 8 segundos en medio acuoso (Gonçalves-Diaz et al, 2011). Es descrito como un gas muy difusible y lábil, y cumple un papel fundamental en la vasodilatación dependiente del endotelio, en el que se sintetiza a partir de la L-arginina por la acción de la enzima NO-sintasa (NOS). La reacción catalizada por la NOS es particularmente compleja ya que requiere oxígeno molecular y diversas coenzimas: tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), NADPH, FAD, FMN, grupo hemo y calmodulina (Martínez-Augustín y Sánchez de Medina, 2004). Cabe destacar que el NO se forma prácticamente en todas las células del organismo, y desempeña diversas funciones. Sin embargo, la síntesis se realiza siempre a partir de la arginina por diferentes isoformas de las NOS (Figura 1.4) (Fontana-Gallego et al, 2006).



**Figura 1.4. Síntesis de óxido nítrico a partir de arginina.** NOS: óxido nítrico sintasa; BH<sub>4</sub>: Tetrahydrobiopterina; FMN: Flavín mononucleótido; FAD: Flavín adenín dinucleótido; NADPH; nicotín adenín dinucleótido fosfato reducido. Modificado de Fontana-Gallego et al, 2006.

Las funciones del óxido nítrico son muy variadas dependiendo del tejido en el que se produce y de las circunstancias fisiológicas o patológicas. Existen tres isoformas de la NOS. La neuronal (nNOS), la endotelial (eNOS) y la inducible (iNOS). La eNOS es la enzima responsable de la formación de NO con funciones vasodilatadoras a nivel del endotelio. En situaciones inflamatorias, tanto en el endotelio como en otras células de la pared vascular, se puede inducir la iNOS, responsable de la síntesis de grandes cantidades de NO con funciones defensivas (Tabla 1.5) (Martínez-Augustín y Sánchez de Medina, 2004).

Sin embargo, a pesar de los beneficios que ofrece el NO para el organismo, se debe tener en cuenta que el NO es una especie reactiva de oxígeno y por este motivo su presencia no controlada constituye un gran peligro para las células que lo producen y las células vecinas (Centelles et al, 2004).

<b>nNOS</b>	<b>eNOS</b>	<b>iNOS</b>
SISTEMA NERVIOSO	SISTEMA CARDIOVASCULAR	INMUNIDAD NO ESPECIFICA
<b>Neurotransmisor/ Neuromodulador del SNC:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Respuestas al glutamato</li> <li>- Plasticidad simpática</li> <li>- Nociocepción</li> </ul>	<b>Relajación del músculo liso vascular:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Regulación del flujo sanguíneo</li> <li>- Regulación de la presión arterial</li> </ul>	<b>Resistencia a:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Bacterias</li> <li>- Hongos</li> <li>- Protozoos</li> </ul>
<b>Función patológica:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Daño isquémico cerebral</li> </ul>	<b>Inhibición de la agregación plaquetaria</b>	<b>Función patológicas:</b> <p>Estados de shock causados por:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Endotoxinas/sepsis</li> <li>- Citoquinas</li> </ul>
<b>Transmisor de nervios periféricos no adrenérgicos no colinérgicos:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Tracto gastrointestinal</li> <li>- Erección</li> <li>- Esfínter de vejiga</li> <li>- Flujo Sanguíneo</li> </ul>		<b>Enfermedad inflamatoria y autoinmune:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Inflamación aguda</li> <li>- Colitis ulcerosa</li> <li>- Rechazo trasplantes</li> <li>- Artritis?</li> <li>- Esclerosis múltiple?</li> <li>- Asma?</li> </ul>

**Tabla 1.5. Localización y funciones de las NOSs.** Modificado de Knowles, 1994.

## 1.5. ESTRÉS OXIDATIVO Y FUNCIÓN ENDOTELIAL

Se denomina estrés oxidativo a aquella situación en la que las células están expuestas a un ambiente prooxidante y los mecanismos defensivos antioxidantes son sobrepasados de forma que se llega a afectar el estado redox celular. Numerosos factores pueden alterar tanto la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) como la biodisponibilidad de

NO (Figura 1.5). En particular el anión superóxido ( $O_2^-$ ) interacciona rápidamente con el NO formando peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (Figura 1.6), disminuyendo la biodisponibilidad del NO y produciendo vasconstricción (Vaziri et al, 2000).

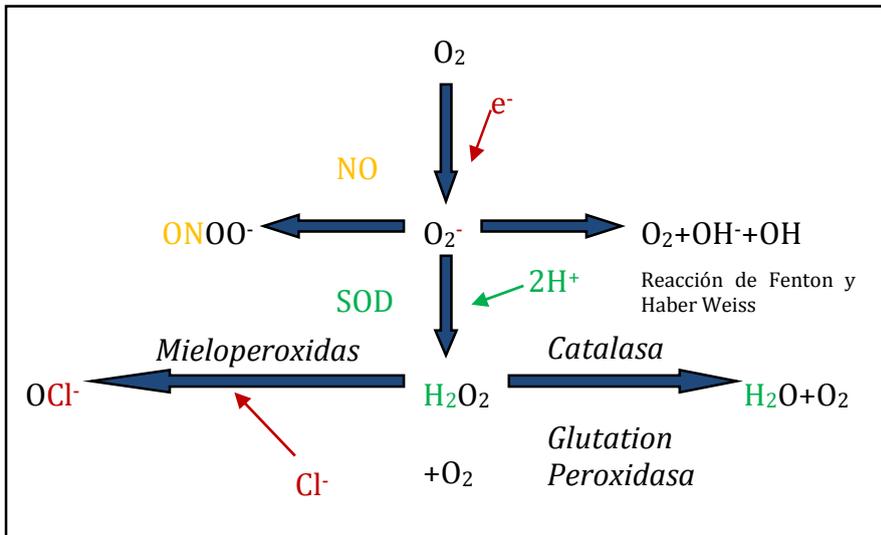


Figura 1.5. Formación de especies reactivas de oxígeno. Tomado de Martín-Garrido, 2007.

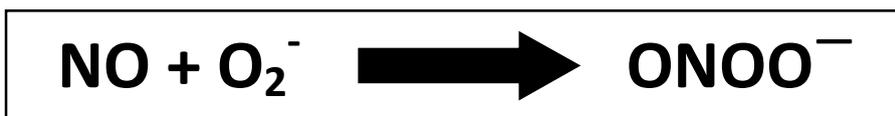


Figura 1.6. Formación de peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) a partir de óxido nítrico y anión superóxido. Modificado de Vaziri et al, 2000.

Bajo condiciones fisiológicas, el sistema de defensa antioxidante es capaz de minimizar los niveles de ROS preservando la biodisponibilidad del NO y manteniendo así el tono vascular normal. La enzima superóxido dismutasa es la responsable de degradar el  $O_2^-$ , reduciendo la formación de  $ONOO^-$ , potente oxidante y vasoconstrictor. Por otro lado, las enzimas antioxidantes glutatión peroxidasa y catalasa degradan los peróxidos, evitando los efectos

deletéreos de los mismos. Finalmente, el glutatión junto con la cisteína son los responsables de mantener el equilibrio REDOX intracelular, permitiendo así el funcionamiento normal de las células.

En los últimos veinte años se ha demostrado que las ROS están involucradas en diferentes patologías entre las que se encuentran enfermedades coronarias, cáncer y envejecimiento. En la Tabla 1.6 se indican algunos de los mecanismos implicados en la generación “in vivo” de algunas ROS (Parada-Díaz, 2010)).

ROS	FORMACIÓN
Superóxido ( $O_2^-$ ) Radical hidroperoxilo ( $HO_2^\bullet$ )	Reducción enzimática y no enzimática del oxígeno por un electrón $O_2 + e^- \rightarrow O_2^- \rightleftharpoons HO_2^\bullet$ (pK=4,8)
Radical hidroxilo ( $HO^\bullet$ )	Radiolisis del agua, descomposición de peróxido de hidrógeno catalizada por metales, interacción de NO y superóxido $NO + O_2^- \longrightarrow ONOO^- \xrightarrow{H^+} HO^\bullet + NO_2$
Complejos hierro-oxígeno (Fe=O)	Hemoglobina, mioglobina, etc.
Hidroperóxidos de lípidos y proteínas	Oxidación de lípidos y proteínas
Dióxido de nitrógeno ( $NO_2$ )	Reacción del radical peroxilo y NO, aire contaminado y humo
Óxido nítrico (NO)	Síntesis de óxido nítrico, tiol nitroso y aire contaminado
Radical tiil (RS)	Transferencia del átomo de hidrógeno de tioles
Radical protein	Transferencia del átomo de hidrógeno de proteínas

Tabla 1.6. Formación de ROS. Tomado de Parada-Díaz, 2010

### 1.5.1. Marcadores de Estrés Oxidativo.

El estrés oxidativo es un suceso temprano en el desarrollo de disfunción endotelial y es considerado una causa de enfermedad cardiovascular. Pero su aumento y su impacto

sobre la disfunción endotelial es reversible y controlable, y se puede identificar y cuantificar gracias a diferentes indicadores. Entre ellos se encuentran la detección de marcadores de daño oxidativo, la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO) y la defensa antioxidante celular (Tabla 1.7) (Masnatta et al, 2003).

MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO	BIODISPONIBILIDAD DE NO	MARCADORES DE DEFENSA ANTIOXIDANTE
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Cuantificación de NO	Glutation (GSH)
TBARS	GMPC	Superóxido dismutasa (SOD)
Isoprostanos	Nitrotirosina (NT)	Glutation peroxidasa (GPx)
NF-Kappa B		

**Tabla 1.7. Indicadores de detección precoz de estrés oxidativo.** Elaborado a partir de datos de Masnatta et al, 2003.

## 1.6. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

Se habla de disfunción endotelial (Figura 1.7) cuando la función del endotelio es inadecuada; ésta es la principal característica de las enfermedades cardiovasculares. La principal causa de la disfunción endotelial es el aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS), la cual puede dañar la producción y actividad del óxido nítrico. Se encuentran cada vez más evidencias de disfunción endotelial relacionadas con hipercolesterolemia, hipertensión, tabaquismo, diabetes y otros factores de riesgo de enfermedad cardiovascular (Deanfield et al, 2005).

A partir de los 30 años se observa un deterioro paulatino de la función endotelial debido a procesos de envejecimiento normal, un incremento de la reactividad endotelial a los factores vasoconstrictores, y un desequilibrio entre las sustancias prooxidantes y antioxidantes en favor de las primeras, generando estrés oxidativo y, consecuentemente, disfunción endotelial. El estrés oxidativo es un hallazgo común y precoz de las patologías cardiovasculares (Masnatta et al, 2003).

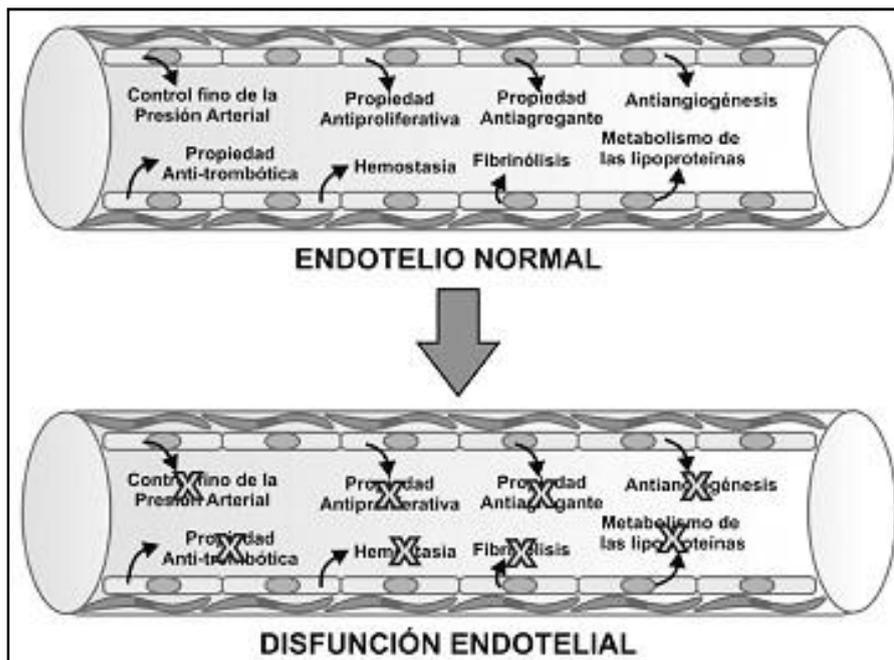


Figura 1.7. Disfunción Endotelial. Tomado de Acosta et al, 2006.

Numerosos estudios experimentales y clínicos indican que el estrés oxidativo es responsable de inactivar rápidamente al NO, formando principalmente  $\text{ONOO}^-$  (Vaziri et al, 2000). Otros estudios indican que el incremento del estrés oxidativo se expresa con un deterioro en la vasodilatación dependiente del endotelio y una mayor sensibilidad del endotelio a la vasoconstricción. Sin embargo, en los estadios tempranos de la enfermedad vascular, no se observan dichas alteraciones porque el endotelio es capaz de contrarrestar los efectos del estrés oxidativo y mantener la función endotelial normal. Por ello, es indispensable estudiar el estrés oxidativo y los mecanismos de defensa antioxidante como marcadores precoces de disfunción endotelial.

Existen numerosas aproximaciones experimentales para la evaluación del estrés oxidativo. En los sistemas “in vitro” es posible la cuantificación de la generación de los propios radicales libres como, por ejemplo, el anión superóxido por quimioluminiscencia (Trolliet et al, 2001). Sin embargo, la aproximación más utilizada tanto “in vitro” como “in vivo” es la determinación de los niveles de los sistemas antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos, Tabla 1.8) y, sobre todo, la cuantificación de diferentes indicadores del daño oxidativo infringido a las moléculas biológicas, particularmente lípidos, proteínas y DNA.

El número y tipo de marcadores de daño oxidativo se eleva continuamente destacando, por su amplia utilización y fiabilidad, el malondialdehído (MDA; producto final de oxidación lipídica) los isoprostanos (medida directa de la formación de lipoperóxidos independiente de ciclooxigenasa), los grupos carbonilo proteicos (indicativos de la oxidación proteica), y la 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG) como producto del daño oxidativo al DNA (Ohkawa et al, 1979; Wang et al, 1995; Delgado et al, 2009).

ENZIMÁTICOS	NO ENZIMÁTICOS
Superóxido dismutasa (SOD)	Glutation (GSH)
Catalasas (CAT)	Vitamina C
Glutation Peroxidasa (GPx)	Vitamina E
Tiorredoxina reductasa (TrxR)	Ácido lipoico
	Ubiquinona
	Metales de transición
	Carotenoides
	Polifenoles
	Tiorredoxina

**Tabla 1.8. Sistemas antioxidantes intracelulares** Tomado de Martin Garrido, 2007.

## 1.7. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL Y OBESIDAD

La obesidad aumenta el riesgo de desarrollar diferentes condiciones patológicas como son dislipidemia, hipertensión, hígado graso no alcohólico, ECV y diabetes tipo 2 (Figura 1.8) (Jung y Choi, 2014). La diabetes tipo 2 se caracteriza por la resistencia periférica a la insulina. En la mayoría de los casos, la resistencia periférica a la insulina, definida como la respuesta atenuada a la insulina en el tejido adiposo, el hígado y el músculo esquelético, aparece mucho antes del desarrollo de la hiperglucemia. La etiología de la resistencia a la insulina es multifactorial, incluyendo la genética y factores externos como el sedentarismo y la obesidad (Stancic et al, 2012).

La acumulación de grasa depende del equilibrio entre la ingesta calórica de la dieta y el gasto corporal de energía. El desequilibrio crónico en el metabolismo energético (más aporte que gasto de energía), debido a complejos factores genéticos y/o ambientales, resulta en un exceso de acumulación de grasa y, finalmente, en obesidad (Hill et al 2003;

Jung y Choi, 2014). El tejido adiposo blanco es el principal responsable del cambio sustancial en la grasa corporal, y juega un papel importante en el equilibrio de energía. La acumulación de grasa en el tejido adiposo depende del equilibrio entre las tasas de acumulación y descomposición de triacilgliceroles (TAG) en los adipocitos, células en las que tiene lugar una oxidación de ácidos grasos y glucosa muy importante (Jankovic et al, 2015).



Figura 1.8. Patologías relacionadas con la obesidad. Modificado de Jung y Choi, 2014.

El tejido adiposo contiene diferentes tipos celulares: preadipocitos, células endoteliales, células inmunes y, principalmente, adipocitos. Cuando el balance de energía es positivo, el tejido adiposo almacena este exceso de energía como triglicéridos en las gotas lipídicas de los adipocitos provocando un aumento en el número de éstos (hiperplasia) o aumentando

su tamaño (hipertrofia). El número de adipocitos se establece durante la infancia/adolescencia, y permanece constante durante la edad adulta, incluso ante una gran pérdida de peso. El aumento de grasa en la edad adulta, principalmente, es debido a hipertrofia, aunque la sobrealimentación también puede dar lugar a hiperplasia del tejido adiposo subcutáneo de la parte inferior del cuerpo (Tchoukalova et al, 2010).

El aumento del tejido adiposo resulta en infiltración de macrófagos y desequilibrio de los factores pro y anti-inflamatorios secretados por este tejido. Las consecuencias son aumento de la inflamación, deterioro de la sensibilidad a la insulina y desregulación del metabolismo lipídico que repercuten negativamente sobre numerosos tejidos, incluidos hígado, corazón y músculo esquelético (Jung y Choi, 2014). El aumento en la liberación de ácidos grasos libres (AGL) a la circulación por los adipocitos es uno de los factores críticos que contribuye al inicio y progreso de las complicaciones metabólicas inducidas por la obesidad, como la resistencia insulínica. En la obesidad, el aumento de AGL circulantes eleva la síntesis de lípidos y la gluconeogénesis a nivel hepático, y promueve la resistencia a la insulina tanto en hígado como en tejidos periféricos. Los AGL son conocidos ligandos de los receptores "Toll-Like-4" (TLR4) y estimulan fuertemente la producción de citoquinas en macrófagos y otros tipos celulares modulando la inflamación del tejido adiposo (Horowitz et al, 1999; Suganami et al, 2005).

El tejido adiposo blanco, además de un órgano de almacenamiento de energía, es un órgano endocrino reconocido y activo. Segrega múltiples mediadores bioactivos o adipoquinas (quimioquinas, citoquinas y hormonas) cuya desregulación en la obesidad contribuye decisivamente al desarrollo de enfermedades metabólicas al promover alteraciones en la homeostasis de lípidos y glucosa, la respuesta inflamatoria, la hemostasia, la presión arterial, la inflamación y la aterosclerosis (Rabe et al, 2008; Jung y Choi, 2014).

La secreción de quimioquinas y citoquinas pro-inflamatorias se eleva en los individuos obesos. Varias de ellas, como la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), o las interleuquinas (IL) 1, 6 y 8, promueven la resistencia a la insulina. El contenido de macrófagos del tejido adiposo se correlaciona directamente con el tamaño de los adipocitos y el índice de masa corporal (IMC), y la

expresión de citoquinas pro-inflamatorias derivada más de macrófagos que de adipocitos. El aumento del número de macrófagos provoca un cambio fenotípico en el estado de polarización de estas células, de anti-inflamatorio (M2) a pro-inflamatorio (M1). Las células M1 contribuyen a la resistencia a la insulina y las M2 a la remodelación del tejido adiposo, aclaramiento de adipocitos muertos, reclutamiento y diferenciación de adipocitos progenitores. La pérdida de peso disminuye la infiltración de macrófagos y la expresión de genes pro-inflamatorios aterosclerosis (Rabe et al, 2008; Jung y Choi, 2014). Entre los factores liberados por el tejido adiposo, y valorados en el presente trabajo, se encuentran TNF- $\alpha$ , IL-6, leptina y la resistina.

El **TNF- $\alpha$**  es una citoquina pro-inflamatoria que contribuye a la patogénesis de la obesidad y a la resistencia a la insulina. Fue el primer factor derivado de adipocitos sugerido como enlace entre inflamación, obesidad y diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Aunque secretado en su mayor parte por macrófagos, sus niveles se elevan en la obesidad y se correlacionan positivamente (aunque de forma débil) con la resistencia a la insulina (RI). Actúa reduciendo la fosforilación de tirosinas estimulada por insulina tanto del receptor de insulina como del sustrato del receptor de la insulina tipo 1 (IRS-1) en músculo y tejido adiposo, pero no en el hígado (Katsareli y Dedoussis, 2014). La delección de TNF- $\alpha$  o de sus receptores mejora la sensibilidad a la insulina en animales obesos inducidos por la dieta y/o deficientes en leptina como ob/ob (Rabe et al, 2008). Sin embargo, no modifica la sensibilidad a la insulina en sujetos sanos con sobrepeso, síndrome metabólico o RI, en los que sí mejora el estado inflamatorio. Estos efectos pueden deberse a la implicación en la RI de otras citoquinas secretadas por el tejido adiposo involucradas en la señalización de la insulina. Además, el propio TNF- $\alpha$  puede controlar la síntesis y expresión de otras citoquinas, hormonas y sus receptores, y sus efectos sobre la RI precisan de la expresión de IL-6 en tejido adiposo (Sultan et al, 2009).

La **IL-6** es una citoquina polifuncional con un papel importante en la RI asociada a la obesidad. Aunque es secretada por numerosos tejidos, la generada en el tejido adiposo representa el 30% de la IL-6 circulante; la hipertrofia de los adipocitos va acompañada de la producción de IL-6. La exposición crónica a esta citoquina se correlaciona directamente con la RI, y sus niveles se elevan en la hiperglucemia. La IL-6 tiene distintas acciones dependiendo del tejido sobre el que actúe. Así, reduce la síntesis hepática de glucógeno

dependiente de insulina y la captación de glucosa en los adipocitos; por el contrario, mejora ambos procesos en los miotubos. El mecanismo propuesto para sus acciones es la reducción del transportador de glucosa 4 (GLUT4) y del IRS-1 (Katsareli y Dedoussis, 2014). Los aumentos sistémicos persistentes de IL-6 en los estados de inflamación crónica, como DM2 y obesidad, pueden provocar RI; sin embargo, los incrementos transitorios pueden afectar simplemente a la homeostasis normal de la glucosa (Rabe et al, 2008). La IL-6 juega, también, un papel anti-inflamatorio ya que reduce el TNF- $\alpha$  y el INF- $\gamma$ , y estimula el receptor antagonista de IL-1.

La **leptina** fue la primera adipoquina caracterizada. Es una hormona peptídica de 16 kDa codificada por el gen *ob* y expresada principalmente en tejido adiposo blanco, específicamente en adipocitos, lo que explica su elevación en individuos obesos. Entre las acciones de la leptina están la regulación de la homeostasis de energía, de la ingesta de alimentos y los niveles de varias hormonas y mediadores inflamatorios. Su función es inhibir el apetito a la vez que estimula el gasto de energía. También juega un papel importante en la homeostasis de la glucosa, mejorando la sensibilidad a la insulina en hígado y músculo esquelético, y regulando la función de las células  $\beta$ -pancreáticas, mientras que perjudica la señalización en adipocitos. La leptina tiene efectos pro-inflamatorios. Tiene una estructura tipo citoquina y su receptor es miembro de la superfamilia de los receptores de citoquinas de clase I (gp130). Además de promover la producción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-2 e INF- $\gamma$ , también inhibe la de citoquinas anti-inflamatorias como IL-4 por células T o mononucleares. Los niveles circulantes de leptina y su expresión en tejido adiposo aumentan en respuesta a citoquinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1) y LPS. Las relaciones entre leptina e inflamación son bidireccionales: las citoquinas pro-inflamatorias aumentan la síntesis y liberación de leptina, la cual contribuye a mantener un estado de inflamación crónica en la obesidad. Además, la leptina promueve la disfunción endotelial, ya que aumenta el estrés oxidativo en células endoteliales, promueve la proliferación y migración de células de músculo liso y la calcificación vascular

El hipotálamo y los núcleos del tronco encefálico juegan un papel crítico en la integración de la información sobre los alimentos absorbidos, cantidad de energía almacenada en forma de grasa y los niveles de glucosa en sangre, para así poder regular la ingesta, el

almacenamiento de energía o el gasto. La activación del receptor de la leptina conduce a la represión de las vías orexigénicas y la inducción de las vías de anorexígenos (Chehab et al, 2004). Los cambios en la ingesta de alimentos y la grasa corporal total afectan a la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos. En el núcleo hipotalámico arqueado, el encargado de regular el hambre y la saciedad, se expresa específicamente el receptor de leptina. Los ratones deficientes en este receptor desarrollan hiperfagia severa y obesidad, aunque la homeostasis de la glucosa sólo sufre una leve alteración que puede ser corregida por restricción calórica (Bates et al, 2005). La leptina también limita la acumulación de triglicéridos en hígado y músculo esquelético a través de una combinación de la activación directa de la AMPK y acciones indirectas a través de las vías nerviosas centrales, mejorando así la sensibilidad a la insulina. La insulina estimula tanto la biosíntesis como la secreción de leptina en el tejido adiposo de manera que se establece un circuito de retroalimentación endocrino, el llamado "eje adipoinsular" (Kieffer y Habener, 2000).

La **resistina** es una adipoquina peptídica de 12,5 kDa miembro de la familia de "moléculas tipo resistina" de proteínas ricas en cisteína. Estructuralmente es muy similar a la adiponectina y parece haber un efecto recíproco entre ellas (Katsareli y Dedoussis, 2014). Al igual que la leptina, es secretada específicamente por adipocitos y promueve tanto la inflamación como la RI en modelos murinos. En humanos es producida y secretada por las células mononucleares de la sangre periférica, su secreción está estimulada por citoquinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-6 y, a su vez, la resistina induce la secreción de estas moléculas por parte del tejido adiposo blanco y de las células mononucleares periféricas (Rabe et al, 2008). Los niveles de resistina circulante están aumentados en ratones obesos y ésto se correlaciona con la RI. Según Banerjee et al, 2004, la deficiencia de resistina protege a los ratones de la hiperglucemia inducida por la dieta a través del aumento de AMPK y disminución de la expresión de enzimas gluconeogénicas en hígado. Además, la resistina inhibe la vía de señalización de la insulina en varios pasos e induce la expresión SOCS-3, un factor inhibidor de esta señalización. La resistina interfiere tanto en la cascada de señalización de la glucosa como en las vías de inflamación, por lo que se puede considerar un enlace entre la inflamación y las señales metabólicas (Rabe et al, 2008).

## 1.8. ARGININA Y OBESIDAD

La L-arginina (Ácido 2-amino-5-diaminometilidenoamino pentanoico; o Ácido 2-amino-5-guanidino pentanoico; Figura 1.9) es un aminoácido básico, semiesencial. Su presencia en proteínas de mamíferos fue descubierta por Hedin en 1895, aunque ya se conocía como una molécula de origen natural cuyo aislamiento comenzó de las plántulas de lupino (altramuz) en 1886.

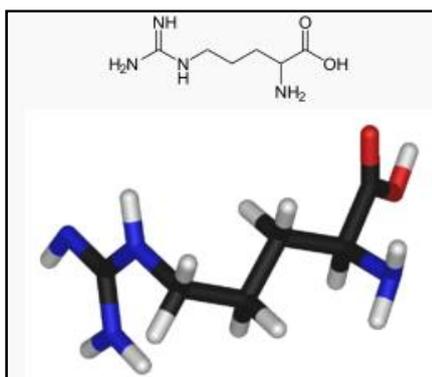
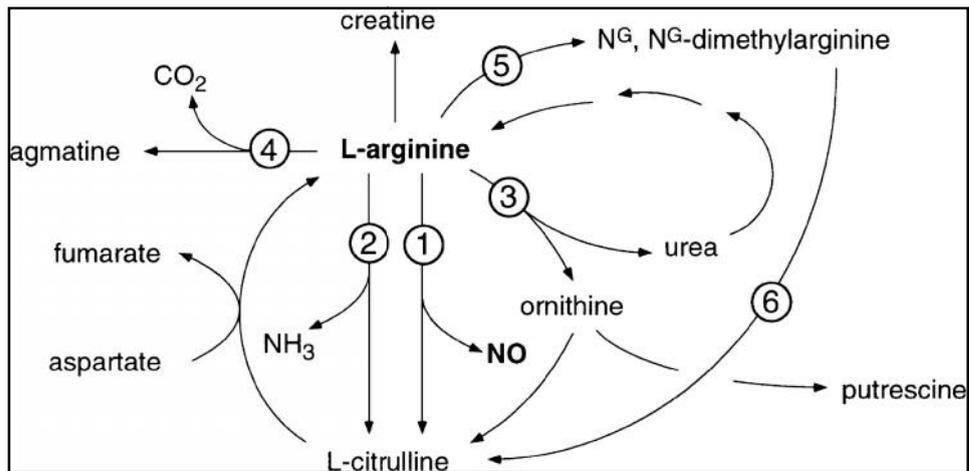


Figura 1.9. ARGININA: Ácido 2-amino-5-(diaminometilidenoamino) pentanoico.

El conocimiento actual de la participación de la arginina en diferentes vías metabólicas (Figura 1.10) es el resultado de los descubrimientos acumulados en los últimos años, y que han despertado un renovado interés por este aminoácido y sus implicaciones fisiopatológicas (Böger y Bode-Böger, 2001; Stancic et al, 2012).

Uno de estos descubrimientos ha sido la síntesis de la arginina y su posterior hidrólisis en urea y ornitina, catalizada por la actividad de la arginasa. En 1932, Krebs y Henseleit en su hallazgo informaron de que la arginina es un componente esencial en el ciclo de la urea, vía hepática que permite la eliminación de los excedentes de nitrógeno (amonio; altamente tóxico en su forma libre) del organismo. Sin embargo, la arginasa es una enzima ubicua y el "subproducto" de la reacción que cataliza, la ornitina, es un precursor para la síntesis de poliaminas, moléculas estas esenciales para la proliferación y la diferenciación celular. En 1939, Foster y su grupo de investigación descubrieron que la arginina también se requiere para la síntesis de creatina. En su forma fosforilada (fosfato de creatina), la

creatina es una fuente de energía esencial para la contracción muscular. Su producto de degradación, la creatinina, se elimina por filtración glomerular en el riñón. En la década de los 80 se descubrió que el aminoácido arginina es el precursor de óxido nítrico (NO). Y en los años 90 fue descubierta la presencia en células de mamífero de arginina decarboxilasa, enzima que convierte la arginina en agmatina, una molécula cuya función fisiológica sigue siendo objeto de análisis en la actualidad (Böger y Bode-Böger, 2001).

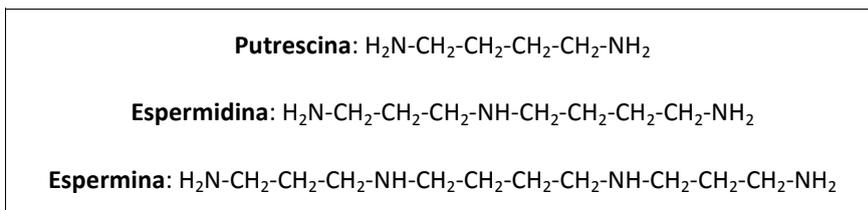


**Figura 1.10. Representación esquemática del metabolismo de la L-arginina.** Vías enzimáticas indicadas por números; 1, biosíntesis de óxido nítrico (NO) a partir de arginina por las NOS; 2, síntesis de citrulina a partir de arginina por la arginina deaminasa; 3, conversión de arginina a urea y ornitina por la arginasa (parte del ciclo de la urea); 4, decarboxilación de la arginina a agmatina por la arginina decarboxilasa; 5, metilación de arginina (incorporada a proteínas) por la proteína arginina N-metiltransferasa; 6, metabolización de la dimetilarginina a citrulina por la dimetilarginina dimetilaminohidrolasa. Tomado de Böger y Bode-Böger, 2001.

La arginina es un aminoácido muy versátil desde el punto de vista metabólico y fisiológico. Tiene múltiples funciones conocidas, tales como: sustrato de la biosíntesis de proteínas y de péptidos bioactivos, participación en la detoxificación de amonio, liberación de hormonas, y biosíntesis de poliaminas y creatina. Actualmente las funciones de la arginina se han visto incrementadas debido al descubrimiento de su papel como sustrato precursor del óxido nítrico, un efector multifuncional implicado en la vasodilatación, neurotransmisión, y con actividad antimicrobiana y antitumoral (Teixeira et al, 2003).

Como se ha mencionado anteriormente, el metabolismo de la arginina incluye su utilización en la vía que conduce a la síntesis de las poliaminas putrescina, espermidina y espermina (Teixeira et al, 2003). Las poliaminas son un grupo de sustancias básicas de bajo peso molecular que están presentes en prácticamente todas las células con muy pocas excepciones. Desempeñan múltiples funciones esenciales tanto en la biosíntesis de ácidos nucleicos y proteínas, como en la proliferación y diferenciación celular (Wallace 1998; Wallace et al 2003; Algranati et al, 2006; Guasco-Herrera et al, 2014).

Su flexible esqueleto alifático y su naturaleza policatiónica con cargas positivas distanciadas entre sí (Figura 1.11), les permiten interactuar con diferentes regiones de macromoléculas o estructuras cargadas negativamente como DNA y RNA, nucleoproteínas, fosfolípidos, partículas ribosomales y membranas, lo que explica su participación en procesos tan diversos como la replicación del DNA, transcripción, síntesis proteica y multiplicación celular. La determinación de los niveles de poliaminas y de la enzima que cataliza el primer paso de su biosíntesis durante el ciclo celular ha mostrado que aumentan significativamente en la interfase G1/S y durante G2 antes del comienzo de la mitosis. Estos resultados confirman la importancia de las poliaminas en la proliferación celular (Igarashi y Kashiwagi, 2000; Minois et al, 2011).



**Figura 1.11. Estructura química de las principales poliaminas.** Tomado de Algranati et al, 2006.

La síntesis de poliaminas en células eucarióticas se inicia con la descarboxilación de ornitina para producir putrescina en una reacción catalizada por la enzima ornitina descarboxilasa (ODC) (Figura 1.12). La putrescina, a su vez, puede aceptar sucesivamente uno o dos grupos aminopropilo formando espermidina o espermina, respectivamente. En estos casos el dador de grupos aminopropilo es el compuesto S-adenosil metionina descarboxilada que se forma a partir de S-adenosil metionina. La degradación intracelular

de poliaminas se inicia por un proceso de reconversión que consiste en dos etapas: acetilación y posterior oxidación, o una reacción directa de oxidación (Pegg, 1986; Bolkenius y Seiler, 1981; Minois et al, 2011)

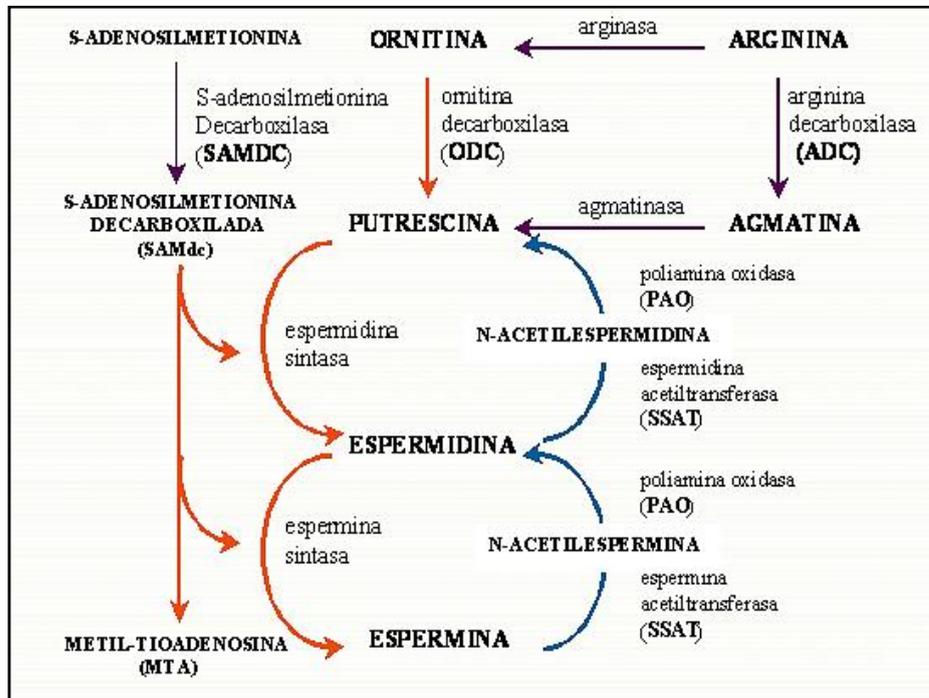


Figura 1.12: Metabolismo general de las poliaminas. Tomado de Algranati et al, 2006.

Al igual que ocurre con el NO, para las poliaminas se han propuesto múltiples funciones, algunas de ellas relacionadas con sus efectos pro-proliferativos y antioxidantes que serían, en cierto modo, opuestos a los del NO. Puesto que la arginina es el sustrato precursor tanto para la síntesis de poliaminas como para la síntesis de NO, la disponibilidad de arginina en condiciones fisiológicas, patológicas o clínicamente manipuladas podría condicionar la funcionalidad de ambas vías. De hecho existen evidencias experimentales que apoyan un control simultáneo (e inverso) de ambas vías, e incluso del propio transporte celular de arginina (Durante et al, 1997; Guasco-Herrera et al, 2014).

Sin embargo, y a pesar de la evidente relación mencionada a nivel biosintético y funcional entre poliaminas y NO, el interés investigador por las poliaminas se encuentra relegado a un segundo plano. Creemos que este hecho viene motivado por el descubrimiento relativamente reciente del NO (Moncada y Higgs, 1993) y, sobre todo, por la dificultad para esclarecer los mecanismos bioquímicos por los que realizan las poliaminas sus múltiples funciones. De hecho, desconocemos actualmente el posible significado que tendrían los cambios en los niveles circulantes de poliaminas en relación a la patología vascular.

Como ya se ha indicado, las poliaminas se elevan en situaciones de proliferación celular. En relación a las patologías de riesgo vascular, el estudio de las alteraciones del metabolismo de las poliaminas se ha circunscrito, hasta el momento, a la diabetes y, en menor medida, a la HTA. La idea que ha surgido de los escasos estudios de que disponemos es la de que los niveles circulantes de poliaminas podrían reflejar, en cierta medida, el daño vascular o la tendencia de las células endoteliales hacia la hipertrofia y la proliferación que acompaña a las complicaciones vasculares de la diabetes y la Hipertensión Arterial (HTA) (Seghieri et al, 1992; Seghieri et al, 1997) y, en este sentido, podrían ser marcadores de daño vascular, proliferación celular o reparación endotelial activa por la existencia de vasos lesionados.

Ante la falta de datos acerca del nivel de las poliaminas sanguíneas en las patologías de riesgo cardiovascular (RCV) y, por lo tanto, de su posible relación con la aparición de complicaciones vasculares en estas patologías, nuestro grupo de trabajo ha centrado parte de sus objetivos en la obtención de los mismos, y en el estudio de su relación con ciertos marcadores de daño vascular, daño oxidativo y otros metabolitos de la arginina.

### **1.8.1. Arginina. Usos terapéuticos y obesidad.**

La obesidad es un trastorno metabólico caracterizado por un aumento en la ingesta calórica y una disminución del gasto de energía en relación con el peso corporal. Está asociada, en particular la obesidad severa, con trastornos crónicos como el hígado graso no-alcohólico y diferentes patologías como la diabetes, la enfermedad cardiovascular, la hiperlipidemia, resistencia a la insulina y esteatosis hepática, entre otras (Hassan S, 2013).

La suplementación dietética con arginina puede ser necesaria en condiciones especiales tales como la desnutrición, la excesiva producción de amoníaco, quemaduras, infecciones, diálisis peritoneal, etapas de rápido crecimiento, trastornos de la síntesis de urea, y/o sepsis. La arginina representa una nueva estrategia para la gestión de la obesidad y la diabetes. La suplementación oral con arginina puede ayudar a los individuos a tratar factores de riesgo tales como la aterosclerosis, hipercolesterolemia, hipertensión, diabetes mellitus, insuficiencia renal o hiperhomocisteinemia (Hassan S, 2013).

Diferentes estudios en animales y humanos indican que la suplementación con arginina puede ser una nueva terapia para la obesidad y el síndrome metabólico actuando a través de la disminución de los niveles plasmáticos de glucosa, homocisteína, ácidos grasos, dimetilargininas y triglicéridos (McKnight et al, 2010). Además juega un papel básico en la detoxificación del amoníaco, y en la producción de óxido nítrico y creatina. La administración de suplementos de arginina es un elemento esencial para el tratamiento en los defectos del ciclo de la urea, pero actualmente se han planteado algunas ideas, respecto a las dosis utilizadas en estos tratamientos (Coman et al, 2008). En los últimos años, la suplementación o restricción de arginina se ha propuesto y se ha puesto a prueba en varios trastornos incluyendo enfermedades vasculares, asma, encefalopatía mitocondrial con acidosis láctica, aciduria glutárica tipo 1 y trastornos del metabolismo del sistema creatina-creatinina (Coman et al, 2008).

Diferentes investigadores han indicado que un procedimiento por el cual se puede aumentar el flujo de óxido nítrico bioactivo en las células endoteliales es proporcionar una suplementación del sustrato para su síntesis, es decir, de arginina (Loscalzo, 2004). Esta opción terapéutica fue propuesta en 1992 por Creager y colaboradores que observaron en individuos hipercolesterolémicos que ingerían suplementos de arginina, una mejoría de la respuesta vasodilatadora dependiente del endotelio mediada por óxido nítrico. También Dubois-Randé et al demostraron que la inyección de arginina en arteria coronaria mejoraba la respuesta vasomotora inducida por óxido nítrico. A partir de estas observaciones iniciales, diferentes estudios han demostrado que el suplemento con arginina mejora la bioactividad del óxido nítrico en individuos con factores de riesgo cardiovascular como hipercolesterolemia, diabetes mellitus e hipertensión, así como en individuos con enfermedad aterotrombótica establecida (Revisado en Loscalzo, 2004)

Los posibles mecanismos por los que el suplemento de L-arginina mejora la función endotelial son muy variados (Tabla 1.9).

- Aumento del transporte intracelular
- Aumento de los niveles intracelulares
- Antagonista competitivo del ADMA
- Efecto antioxidante
- Estimulación de la liberación de histamina de los mastocitos
- Disminución de la actividad de norepinefrina
- Aumento de la secreción de insulina
- Alteración en el pH intracelular y la señalización dependiente del pH

**Tabla 1.9. Posibles mecanismos por los que la suplementación de arginina podría mejorar la función endotelial.** Tomado de Loscalzo, 2004.

### 1.8.2. Modelos Experimentales de Obesidad.

La obesidad surge de un desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético, y constituye uno de los principales problemas de salud pública. Aunque su etiología es muy compleja, diversos factores están vinculados a su desarrollo, especialmente el exceso de ingesta calórica (Bruder-Nascimento et al, 2011). Actualmente se continúa investigando la composición adecuada de grasas, carbohidratos y proteínas en regímenes dietéticos para prevenir y tratar la obesidad (Clemmensen et al, 2012). Las dietas con un alto contenido proteico aumentan la termogénesis y la saciedad, comparadas con dietas ricas en carbohidratos. Recientemente se ha demostrado que las dietas ricas en proteínas son esenciales para la pérdida de peso en los seres humanos (Larsen et al, 2010).

Numerosos nutrientes, además de actuar como una simple fuente de energía, actúan en diferentes procesos celulares. Este es el caso de la arginina, un aminoácido condicionalmente esencial y constituyente natural de las proteínas de la dieta. En este sentido, existen diferentes modelos experimentales de obesidad, pero la obesidad inducida por dieta es el modelo experimental más relevante con relación a la obesidad humana (Bruder-Nascimento et al, 2011; Clemmensen et al, 2012).

En diferentes estudios realizados con ratas Zucker (ZFD), un modelo animal de diabetes tipo 2, que presentan un defecto en el receptor de la leptina y son genéticamente obesas,

se ha observado que la suplementación dietética con arginina reducía la adiposidad y mejoraba la sensibilidad a la insulina. Estos efectos han sido reproducidos en otros modelos animales y en individuos diabéticos (Jobgen et al, 2009; McKnight et al, 2010; Stancic et al, 2012). De acuerdo con estos datos, la administración de suplementos de arginina en la dieta podría reducir el aumento de grasa y mejorar la tolerancia a la glucosa en ratas con obesidad inducida por la dieta (Jobgen et al, 2009).

En este estudio se han utilizado ratones ob/ob. Estos ratones fueron descubiertos como una mutación espontánea en 1949 (Linsdtröm, 2012; Nilsson et al 2012) y han sido utilizados como modelo para más de mil estudios en diabetes y obesidad (Linsdtröm, 2012). Los ratones ob/ob son un modelo de riesgo cardiovascular caracterizado por portar de forma autosómica recesiva la mutación Lep<sup>ob</sup> localizada en el codón 105 del gen de la leptina, en el cromosoma 6. La leptina fue descubierta en 1994 y abrió un nuevo campo de investigación en estudios relacionados con el tejido adiposo, como un órgano significativo para la producción de hormonas, la regulación del consumo de alimentos y de eventos metabólicos, y también para la regulación del crecimiento del tejido, inflamación y función reproductiva (Linsdtröm, 2012).

Cuando hay una mayor ingesta, el exceso de energía se acumula en el tejido adiposo produciendo un aumento de la masa grasa y, por lo tanto, a un aumento de la secreción de leptina. La elevación de leptina actúa sobre el hipotálamo disminuyendo el apetito, y sobre el sistema nervioso autónomo estimulando el gasto energético (Figura 1.13; Granado al 2012).

La mutación Lep<sup>ob</sup> conduce a la síntesis de leptina no funcional. Dado que la leptina actúa como factor saciante impidiendo la síntesis del neuropéptido Y, cuya función es aumentar la sensación de hambre, los ratones ob/ob manifiestan hiperfagia, obesidad, hiperinsulinemia e hiperglucemia. La elevada ingesta, que lleva a los ratones ob/ob a padecer obesidad, es una consecuencia directa de la ausencia de leptina funcional, al igual que el bajo gasto energético que disminuye su actividad física. Además, tienen dañada la termorregulación y el sistema inmune y son infértiles (Trayhurn et al, 1977; Linsdtröm, 2007). Estas características fenotípicas son reversibles completamente por el aporte

exógeno de leptina o por transfección del gen de la leptina. A diferencia de los ratones, en humanos obesos la presencia de esta mutación es poco común (Lindström, 2007).

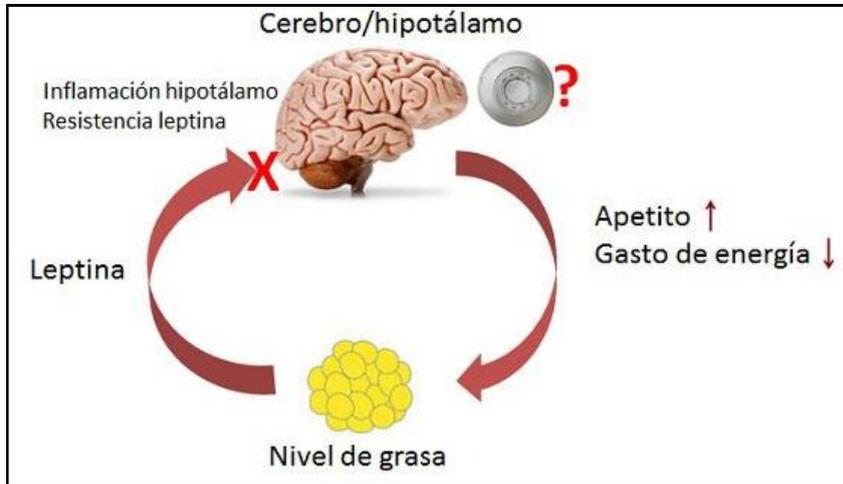


Figura 1.13. Papel de la Leptina. Tomado de Granado et al, 2012.

Los ratones ob/ob presentan hiperplasia de los islotes pancreáticos e incremento de células beta productoras de insulina. La causa directa no es la deficiencia de leptina, sino la elevada demanda de insulina generada por la gran ingesta de comida y su consecuente hiperglucemia, la cual es persistente a pesar de la hiperinsulinemia. A nivel bioquímico, la RI de los ratones ob/ob es debida a la disminución de las vías de señalización dependientes de PI3K que conduce a la desinhibición de la liberación de insulina inducida por glucosa y al aumento de la actividad de la enzima gluconeogénica glucosa-6-fosfatasa (Lindström, 2007; Lindström, 2012).

Dado que las mitocondrias juegan un papel fundamental en el metabolismo energético, muchos estudios sobre la función de la leptina en ratones ob/ob y otros modelos se han centrado en ello. La leptina se encarga de regular el equilibrio entre el almacenamiento de los lípidos y la oxidación de los mismos en las mitocondrias (Lindström, 2012). Inhibe la gluconeogénesis en hepatocitos aislados y aumenta la oxidación de la glucosa; también interviene en la regulación de la termogénesis y otros procesos en los que intervienen proteínas de desacoplamiento mitocondrial. La producción de especies reactivas de oxígeno por las mitocondrias también está influenciada por leptina (Lindström, 2012).

En este modelo de obesidad, la importancia del componente dietario ha sido escasamente estudiado (Young-Sil et al, 2010; Linsdtröm, 2012). Entre los componentes de la dieta cuya ingesta parece afectar el riesgo cardiovascular se encuentra el aminoácido arginina. En los últimos años, numerosos estudios relacionan a la arginina y sus metabolitos con el desarrollo, aparición y progresión de la enfermedad cardiovascular, tanto en humanos como en animales de experimentación. De hecho, se propone la arterioesclerosis como una enfermedad inflamatoria (Lahoz y Mostaza, 2007; Clemmensen et al, 2012) caracterizada por la disfunción de las células endoteliales vasculares y una disminución de la producción de óxido nítrico (Sydow y Münzel, 2003). De acuerdo con el hecho de que la arginina es el sustrato precursor de, entre otras muchas sustancias, el óxido nítrico, su administración a animales (Palm et al, 2007; Oliveira et al, 2007) y humanos (Lucotti et al, 2006; Costopoulos et al, 2007) ha demostrado enlentecer la progresión de la arterioesclerosis o de los procesos que la componen. Estos efectos en la respuesta arterioesclerótica mejoran, además, en presencia de antioxidantes. De hecho, tanto las alteraciones del metabolismo de la arginina como el estrés oxidativo (procesos por otra parte, estrechamente conectados) son observaciones experimentales ampliamente constatadas en las patologías de riesgo cardiovascular.



**OBJETIVOS**





Los objetivos concretos de nuestro trabajo han sido, utilizando como modelo experimental de obesidad ratones ob/ob sometidos a alimentación paralela con sus controles lean, valorar:

1. Las posibles alteraciones en diferentes vías metabólicas que comparten la arginina como sustrato, concretamente, la síntesis de óxido nítrico y poliaminas.
2. El daño oxidativo a lípidos y proteínas, tanto a nivel sistémico como tisular, mediante diferentes aproximaciones experimentales.
3. El perfil glucídico y lipídico y la resistencia insulínica.
4. El grado de inflamación y los niveles circulantes de adipoquinas.
5. Las relaciones existentes entre estos parámetros y su correlación con diferentes marcadores de riesgo cardiovascular.
6. Los efectos de la administración oral moderada de arginina sobre los parámetros y procesos anteriores.



# MATERIAL Y MÉTODOS





### 3.1. MATERIAL

#### 3.1.1. Animales y dietas

El presente estudio experimental está basado en el empleo de ratones obesos genéticamente seleccionados (cepa C57BL/6) portadores de forma autosómica recesiva de la mutación *Lep<sup>ob</sup>* localizada en el codón 105 del gen de la leptina, en el cromosoma 6. Esta mutación les confiere una serie de características como hiperfagia, hiperinsulinismo, hiperglucemia moderada, expresión de obesidad a las cuatro semanas de edad, hiperlipemia, insulínorresistencia, regulación defectuosa de la temperatura corporal, hiperplasia de adipocitos y deficiencia de leptina, que los hacen especialmente útiles para el estudio de la obesidad, diabetes mellitus y metabolismo. En el estudio se han utilizado ratones homocigóticos (*ob/ob*) y controles *Lean* (-/+), ambos suministrados por Harlan Interfauna Ibérica (Barcelona, España). El número total de animales (tamaño muestral) utilizados en este estudio ha sido de 60 ratones. De ellos, 30 pertenecían al grupo obeso (*ob/ob*) y 30 al fenotipo delgado (*Lean*).

Los ratones, todos ellos machos de 4-5 semanas de edad, tenían pesos comprendidos entre 20-25 g para el grupo *Lean* y 28-32 g para el grupo *ob/ob*, al inicio del experimento. Los animales, tras su recepción y aclimatación a las condiciones del estabulario, fueron marcados y separados de forma aleatoria en jaulas metabólicas (Tecniplast, modelo 1700, Leticia, Barcelona) en grupos de 5 ratones. Durante todo el periodo experimental los ratones estuvieron sometidos a periodos alternantes de luz/oscuridad de 12 horas en una atmósfera controlada del 60% de humedad y 22-24 °C de temperatura. Desde su recepción en el estabulario, y hasta el final del periodo experimental, los animales fueron alimentados con dieta estándar de laboratorio (Dieta A04, Panlab S.L, Barcelona) cuya composición detallada se muestra en la Tabla 3.1.

El acceso a la dieta se mantuvo “ad libitum” durante la primera semana de adaptación a las condiciones de las jaulas metabólicas. Tras este periodo, a cada grupo se le asignó suplementación o no con arginina (1% en el agua de bebida) dando lugar a los siguientes cuatro grupos experimentales en los que se basa el presente estudio (Tabla 3.2):

CONTROL DE LA CALIDAD NUTRITIVA		%	
Humedad		12,0	
Proteína		15,4	
Grasa		2,9	
Glúcidos		60,5	
- Azúcares totales		2,5	
- Almidon		41,0	
Fibra		3,9	
Minerales		5,3	
ENERGÍA ESTIMADA		Kcal/Kg	
- Según análisis		3173	
- Según fórmula		3100	
AMINOÁCIDOS	mg/ Kg		
Lisina	7700		
Metionina	2800		
Treonina	5400	ÁCIDOS GRASOS	mg/Kg
Triptófano	1900	Ácido Palmítico	4600
Arginina	9100	Ácido Palmitoleico	390
Metionina + Cistina	5900	Ácido Esteárico	1300
VITAMINAS	/Kg	Ácido Oleico	6500
Vitamina A (U.I.)	15000	Ácido Linoleico	13900
Vitamina D3 (U.I.)	1500	Ácido Linolénico	1300
Vitamina E (mg)	20		
Vitamina K (mg)	2		
Vitamina B1-Tiamina (mg)	1		
Vitamina B2-Riboflavina (mg)	4		
Vitamina B3-Niacina (mg)	20	MINERALES	mg/Kg
Vitamina B5-Ácido Pantoténico (mg)	15	Calcio	8800
Vitamina B6-Piridoxina (mg)	4	Fósforo	5900
Vitamina B8-Biotina (mg)	0,1	Cloro	3100
Vitamina B9-Folacina(mg)	1	Sodio	2500
Vitamina B12-Cobalamina (mg)	20	Potasio	6250
Colina (mg)	500	Magnesio	1400

**Tabla 3.1. Composición de la dieta estándar de laboratorio utilizada en el estudio** (Dieta A04, Panlab S.L, Barcelona). Datos suministrados por el fabricante.

- Grupo 1 (Control): Ratones *lean* alimentados con dieta estándar.
- Grupo 2 (Control + Arg): Ratones *lean* con dieta estándar y 1% de arginina añadida en el agua de bebida.
- Grupo 3 (*ob/ob*): Ratones *ob/ob* alimentados con dieta estándar.
- Grupo 4 (*ob/ob* + Arg): Ratones *ob/ob* con dieta estándar y arginina al 1% añadida en el agua de bebida.

<b>Grupo experimental</b>	<b>Fenotipo</b>	<b>Arginina 1%</b>
<b>Control</b>	Lean	NO
<b>Control + Arg</b>	Lean	SI
<b>Ob/ob</b>	ob/ob	NO
<b>Ob/ob + Arg</b>	ob/ob	SI

**Tabla 3.2. Características de los grupos experimentales del presente estudio.** La Arginina (Arg) se administró como una solución al 1% (L-Arginina monohydrocloruro, Fluka) disuelta en el agua de bebida.

A los ratones se les mantuvo con esta dieta durante cuatro semanas, ajustando diariamente la cantidad de comida a la del grupo de menor ingesta (alimentación “pair-fed” por grupos) con el fin de disminuir la influencia debida a la ingesta. La disponibilidad de agua se mantuvo “ad libitum”. Se controlaron diariamente la ingesta de agua, comida y la excreción de orina. Semanalmente se determinó el peso de los ratones para comprobar la evolución del peso corporal y se tomaron muestras colectivas de orina de cada grupo para su análisis ulterior.

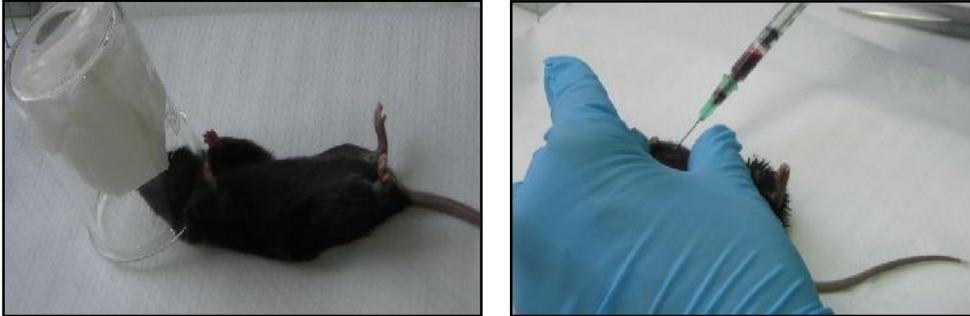
A las cuatro semanas de tratamiento se procedió al sacrificio de los animales por exanguinación, previa sedación con halotano, en orden aleatorio para evitar las interferencias ocasionadas por las diferencias en el tiempo transcurrido hasta el sacrificio.

### **3.1.2. Obtención y procesamiento de las muestras de sangre, plasma y orina**

Las muestras de sangre (habitualmente  $\geq 1$  mL) se obtuvieron en el momento del sacrificio por punción intracardiaca utilizando jeringuillas tratadas con heparina de litio (Figura 3.1). El plasma se obtuvo a partir de la sangre total heparinizada por centrifugación a 600xg 10 min a TA, e inmediatamente se transfirió a tubos eppendorf que se mantuvieron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta los correspondientes análisis.

El precipitado de células sanguíneas obtenido tras la centrifugación se mezcló con un volumen de ácido perclórico 1M igual al del plasma recogido. La mezcla se agitó vigorosamente en vórtex y, tras 15 minutos a  $0-4^{\circ}\text{C}$  para precipitar las proteínas, se

centrifugó a 15000xg 10 min. El sobrenadante ácido así obtenido se transfirió a otro tubo eppendorf que se mantuvo a -80°C hasta la determinación de poliaminas.



**Figura 3.1.** Sedación de los ratones con halotano y extracción de sangre por punción intracardiaca.

**Las muestras de orina de 24 h se recogieron semanalmente, se centrifugaron (1500xg, 5 min) y se conservaron a -80°C hasta la determinación de los parámetros urinarios.**

### **3.1.3. Obtención y procesamiento de órganos y tejidos**

En la extracción y procesamiento de los tejidos participaron 3 personas, lo que permite completar el proceso en un tiempo máximo estimado de 10 min/animal. Una de ellas anestesió al animal, procedió a la extracción de la sangre por punción intracardiaca, seccionó la pared abdominal y extrajo los tejidos en el siguiente orden: páncreas, hígado, corazón, riñones, grasa abdominal, testículos, grasa retroperitoneal, aorta torácica, corazón y músculo de las extremidades posteriores (muestra).

Mientras tanto, una segunda persona procesó la sangre, pesó y fraccionó los tejidos, y distribuyó las muestras tisulares en tubos adecuados para su procesamiento en función de los diferentes análisis a realizar. La tercera persona se encargó de dicho procesamiento. Así, para la obtención posterior de RNA, las muestras de tejido ( $\leq 100$  mg) se homogeneizaron inmediatamente en 1 mL de Trizol (solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina; Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) con un homogeneizador

Ultra-Turrax a máxima velocidad, se transfirieron a tubos eppendorf, y se congelaron rápidamente a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Para la determinación de proteínas y marcadores de daño oxidativo las muestras de tejido se homogeneizaron en tampón fosfato potásico 0,1 M pH 7,5 (2 volúmenes para la grasa y 5 volúmenes para el resto de tejidos) a  $4^{\circ}\text{C}$  con un homogeneizador Ultra-Turrax a máxima velocidad. Los extractos obtenidos se centrifugaron ( $4^{\circ}\text{C}$ , 15000xg, 5 min) y el sobrenadante neutro se transfirió a tubos eppendorf para su almacenamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta los correspondientes análisis.

Paralelamente, las muestras destinadas al análisis de poliaminas se homogeneizaron a  $0-4^{\circ}\text{C}$  en 4 volúmenes de  $\text{HClO}_4$  0,4 M (volumen mínimo 0,5 mL) con un homogeneizador Ultra-Turrax a máxima velocidad. Los extractos se mantuvieron un mínimo de 15 min a  $0-4^{\circ}\text{C}$  para precipitar las proteínas y se centrifugaron a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 10 min a 15000xg. El sobrenadante ácido resultante se transfirió a tubos eppendorf que se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta los análisis de poliaminas mediante HPLC.

#### 3.1.4. Aparatos y Equipos

- **Espectrofotómetros:** Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech); LK Ultra Plus 4054 (Pharmacia Biotech), Shimadzu UV-160 (Shimadzu GMBH).
- **Centrífugas:** Centrífuga refrigerada Heraeus, modelo Megafuge 10R; Centrífuga de mesa Eppendorf Hettich, modelo EBA12/12R; Centrífuga de mesa ALC, modelo 4206.
- **Balanzas:** Balanza electrónica Mettler, modelo PJ 360; Balanza electrónica Sartorius, modelo BP 610; Balanza de precisión Pacisa, modelo Precisa; Balanza de precisión AND, modelo GR-200.
- **Sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC):** Compuesto por una bomba binaria 1525, un detector de fluorescencia multicanal 2475, y un detector de absorbancia multi- $\lambda$  486, en interfaz con el programa informático EmpowerTM/Millennium32 (Waters, Milford, MA, USA).

- **Termociclador:** Thermal Cycler 2720 de Applied Biosystems (Carlsbad, CA, USA).
- **Sistema de PCR en tiempo real:** Fast Real-Time PCR system 7900HT de Applied Biosystems (Carlsbad, CA, USA).
- **Otros materiales/equipos:** Sistema de concentración/secado bajo centrifugación y vacío Eppendorf Concentrator Plus; Homogeneizador-dispersador Ultra-Turrax IKA, modelo T25; Sistema de tratamiento de agua Mili-RO/Mili-Q de Millipore para la obtención de agua de calidad reactivo; Baños termostáticos de temperatura regulable de Selecta, modelos JP, Precistern, Unitronic S320-100 y Unitronic 6320-100; pHmetro Crison, modelo 2001; Agitadores magnéticos con calefacción Bibby, modelo HB 502; Agitadores manuales de tubos vortex IKA, modelo MS 1; Congelador vertical Liebherr, modelo GSD-3005-11 SN; Refrigerador Liebherr, modelo KS-3610-11 SN-T; Material habitual de laboratorio.

## **3.2. METODOLOGÍA**

### **3.2.1. Parámetros bioquímicos generales**

#### **3.2.1.1. Determinación de Glucosa**

La determinación de este parámetro se llevó a cabo empleando el kit comercial para química clínica Glucose-TRc de SPINREACT S.A. (Girona, España). Se trata de un ensayo enzimático-colorimétrico basado en la oxidación de la glucosa a ácido glucónico por acción de la glucosa oxidasa. En la reacción se genera peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) que es detectado mediante un aceptor cromogénico de oxígeno (fenol-ampirona), en presencia de peroxidasa. La intensidad del color formado a 505 nm es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra ensayada. En nuestras determinaciones, el volumen final del ensayo se redujo a 1 mL y el de muestra a 5  $\mu$ L.

#### **3.2.1.2. Determinación de Colesterol total**

Se determinó mediante el kit comercial para química clínica Colesterol-LQ de SPINREACT S.A. Se trata de un ensayo colorimétrico basado en tres reacciones enzimáticas

secuenciales. La primera de ellas, catalizada por la colestrol esterasa, hidroliza los ésteres de colesterol a colesterol y ácidos grasos libres. En la siguiente reacción la colestrol oxidasa oxida el colesterol a 4-colestenona y peróxido de hidrógeno el cual es detectado, en presencia de peroxidasa, gracias al aceptor cromogénico de oxígeno 4-aminofenazona y fenol. La absorción del cromóforo quinoneimida formado se determinó a 505 nm. El volumen final del ensayo se redujo a 1 mL y el de muestra a 5  $\mu$ L.

#### **3.2.1.3. Determinación de HDL-colesterol (HDLc)**

Para su determinación se utilizó el kit comercial para química analítica HDLc-D de SPINREACT S.A. que permite la determinación directa del colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad sin necesidad de precipitación o centrifugado de la muestra. El método se basa en las propiedades de un detergente que solubiliza sólo la fracción HDL, de forma que el HDLc se libera reaccionando con la colestrol esterasa, la colestrol oxidasa y el cromógeno (4-aminoantipirina). Las lipoproteínas LDL, VLDL y quilomicrones son inhibidas debido a la adsorción del detergente en sus superficies, haciéndolas resistentes a las enzimas. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de HDLc en la muestra ensayada. En nuestras determinaciones, el volumen final del ensayo se redujo a 0,8 mL y el de muestra a 5  $\mu$ L, y se determinó la absorción a 600 nm (rango óptimo 600-700 nm).

#### **3.2.1.4. Determinación de triglicéridos (TG)**

Este parámetro se determinó empleando el kit enzimático-colorimétrico comercial para química analítica Triglycerides-LQ de SPINREACT S.A. El procedimiento está basado en la liberación de glicerol y ácidos grasos libres a partir de los triglicéridos por la lipoprotein lipasa, la fosforilación subsiguiente del glicerol por la glicerol quinasa y, finalmente, la formación por la peroxidasa de un cromóforo rojizo (quinoneimida) a partir del  $H_2O_2$  generado en la reacción anterior y en presencia de p-clorofenol y 4-aminofenazona. En nuestras determinaciones el volumen final del ensayo se redujo a 1 mL y el de muestra a 5  $\mu$ L, determinándose la absorción a 505 nm.

### **3.2.1.5. Determinación de creatinina**

En la determinación de creatinina en orina se empleó el kit comercial para química clínica Creatinine-Je de SPINREACT S.A. El método está basado en la reacción de la creatinina con el picrato en medio alcalino descrita por Jaffé, en la que se genera un complejo coloreado cuya intensidad es proporcional a la concentración de creatinina en la muestra (Dubnoff, 1957). En nuestras determinaciones se utilizó la modalidad a punto final del procedimiento con un volumen de muestra de 5  $\mu$ L, un volumen total de ensayo de 1,25 mL, 20 min de incubación a 25°C y registro de la absorción óptica a 520 nm.

### **3.2.1.6. Determinación de proteínas**

La determinación del contenido proteico de las muestras se realizó por el clásico procedimiento de Lowry (Lowry et al, 1951). Este método combina el color generado por la unión de iones  $\text{Cu}^{2+}$  a los grupos amino de los enlaces peptídicos con el obtenido de la reducción en medio básico de los grupos fenólicos de la tirosina por el reactivo de Folin-Ciocalteu (ácido fosfomolibdotúngstico). En el procedimiento, la adición de un detergente permite incrementar la exposición de los grupos reactivos y los iones  $\text{Cu}^{2+}$  son mantenidos en solución alcalina en forma de complejos con tartrato.

Se determinaron proteínas solubles en los sobrenadantes neutros de las muestras (véase apartado 3.1.3. sobre obtención de órganos y tejidos). Para el ensayo se utilizaron habitualmente 10  $\mu$ L de una dilución 1/10 de los extractos, excepto para aorta y corazón en los que se emplearon directamente 40 y 10  $\mu$ L, respectivamente. Las muestras se llevaron con agua hasta un volumen de 400  $\mu$ L y se les añadieron 1,2 mL de una solución de carbonato sódico (20 g/L), hidróxido sódico (4 g/L), SDS (10 g/L) y sulfato de cobre (0,4 g/L) preparada inmediatamente antes de su uso. Tras 45 min a TA, se adicionó el reactivo de Folin (60  $\mu$ L), y se continuó la incubación durante 45 min adicionales. Finalmente se procedió a la lectura de la absorbancia a 660 nm, interpolándose los valores obtenidos en una curva patrón de BSA (0-100  $\mu$ g) procesada paralelamente con las muestras experimentales. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

### 3.2.2. Análisis del metabolismo de la arginina

#### 3.2.2.1. Determinación de nitrato y nitrito.

La cuantificación de la producción de óxido nítrico se valoró por los niveles plasmáticos y urinarios de nitrato + nitrito (NO<sub>x</sub>), de acuerdo con el procedimiento descrito por Moshage et al (1995). Se trata de un método colorimétrico basado en la reacción del nitrito con el reactivo de Griess, y que requiere de la transformación previa del nitrato en nitrito (química o enzimáticamente). En nuestro procedimiento hemos seguido la modalidad enzimática utilizando nitrato reductasa de *Aspergillus spp* (cristalina; Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania). Este enzima requiere para su funcionamiento diferentes cofactores como FAD y NADPH, y el exceso de este último interfiere con el desarrollo posterior del color. Para eliminar esta interferencia, tras la conversión del nitrato en nitrito, se añadieron al medio de reacción lactato deshidrogenasa (LDH) y piruvato que permiten la conversión del piruvato a lactato en presencia de NADPH. Finalmente, el nitrito reacciona con los componentes del reactivo de Griess (ácido sulfanílico y naftiletilendiamina en medio ácido) generando un cromóforo diazoico (p-sulfobenceno-azo- $\alpha$ -naftil-amina) que absorbe fuertemente a 540 nm ( $\epsilon = 39,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

Para evitar interferencias, todo el procedimiento se realizó con material de plástico lavado cuidadosamente con agua Milli-Q de grado reactivo. Las determinaciones se realizaron utilizando 50  $\mu\text{L}$  de plasma o 10  $\mu\text{L}$  de orina que se incubaron en tubos eppendorf, en un volumen final de 510  $\mu\text{L}$ , con NADPH, FAD y nitrato reductasa (50  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  y 0,16 U/mL concentración final, respectivamente) en tampón fosfato potásico 50 mM pH 7,5. Las muestras se incubaron 20 min a 37°C, añadiéndose a continuación 30  $\mu\text{L}$  de lactato deshidrogenasa (0,2 mg/mL en tampón fosfato potásico 0,15 M pH 7,5) y 30  $\mu\text{L}$  de piruvato sódico 0,2 M, continuándose con la incubación durante 5 min en las mismas condiciones. Seguidamente se procedió a la eliminación de las proteínas de las muestras mediante precipitación (adición de 30  $\mu\text{L}$  de sulfato de zinc; 300 g/L) y centrifugación (15000xg, 5 min) tras 15 min a 0-4°C. Finalmente, se recuperaron 500  $\mu\text{L}$  del sobrenadante que se transfirieron a otro tubo eppendorf conteniendo 500  $\mu\text{L}$  del reactivo de Griess (1 g/L de sulfanilamida, 0,1 g/L de N-(1-naftil)-etilendiamina y 25 g/L de ácido fosfórico; preparación inmediata antes del ensayo). La absorbancia a 540 nm de la mezcla se

determinó tras 15 min a TA, y los valores se interpolaron en curvas patrón construidas con cantidades conocidas de nitrato para el cálculo de las concentraciones de nitrato en las muestras procesadas. El límite de detección del ensayo fue del orden de 1,5  $\mu\text{M}$ .

### **3.2.2.2. Determinación de poliaminas**

El procedimiento utilizado es el descrito previamente (Brachet et al, 1996; Teixeira et al, 2002) con ligeras modificaciones. Este método se basa en la reacción de los grupos amino de las poliaminas (y de otros compuestos que los contengan) con el cloruro de dansilo en medio alcalino (pH 9-11) para generar derivados dansilados fluorescentes que pueden ser identificados y cuantificados posteriormente mediante HPLC de fase reversa y detección fluorescente. La reacción se realiza en presencia de un exceso de cloruro de dansilo que finalmente es eliminado mediante adición de un exceso de L-prolina. Previamente a su análisis mediante HPLC, los derivados dansilados de las poliaminas son extraídos con tolueno aprovechando su alta solubilidad en solventes orgánicos. Todos los reactivos utilizados en nuestras determinaciones fueron de la más alta pureza comercialmente disponible de Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA) y Riedel-de-Haën (Seelze, Alemania).

En las determinaciones se utilizaron 100  $\mu\text{L}$  del sobrenadante ácido de los órganos y tejidos seleccionados (corazón, aorta, grasa abdominal y retroperitoneal; ver obtención de órganos y tejidos, apartado 3.1.3) o de sangre total acidificada (ver obtención de sangre y plasma, apartado 3.1.2). Estas muestras se alcalinizaron con 200  $\mu\text{L}$  de carbonato sódico saturado y, seguidamente, se derivatizaron con 400  $\mu\text{L}$  de cloruro de dansilo (10 mg/mL en acetona) mediante incubación durante 90 min a 55°C en oscuridad y con agitación ocasional (vórtex). Transcurrido este tiempo se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de solución de L-prolina (100 mg/mL) y se prosiguió con la incubación otros 30 min en las mismas condiciones. La extracción de las poliaminas dansiladas se realizó con tolueno (800  $\mu\text{L}$  totales en dos pasos de 500 y 300  $\mu\text{L}$ ) bajo agitación vigorosa y ulterior centrifugación (100xg, 5 min). Las fracciones de tolueno se recuperaron, se secaron bajo vacío y se guardaron en oscuridad a -80°C hasta el momento de su análisis cromatográfico.

Para el análisis mediante HPLC, el residuo se disolvió en acetonitrilo (50  $\mu\text{L}$  en el caso de órganos y tejidos y 100  $\mu\text{L}$  para la sangre total), se centrifugó (15000xg, 3 min), y se inyectaron 20  $\mu\text{L}$  del sobrenadante en el sistema cromatográfico. En cada análisis se

procesó paralelamente una muestra patrón con cantidades conocidas de las tres poliaminas a determinar.

En los análisis de las poliaminas mediante HPLC se utilizó un sistema cromatográfico Waters equipado con columna (Nova-Pack C<sub>18</sub> (3,9 × 150 mm, 4 μm) y precolumna (Nova-Pack C<sub>18</sub>; 3,9 × 20 mm, 4 μm) de fase reversa. Para la elución se utilizó un gradiente lineal de 40 min entre 100% de acetonitrilo-agua (60:40) y 100% acetonitrilo a 1,5 mL/min y TA. Las poliaminas dansiladas se detectaron fluorimétricamente (excitación y emisión 338 y 510 nm, respectivamente) y se identificaron por sus tiempos de retención. En la cuantificación se utilizó el área de los picos, relativa a la de los patrones procesados paralelamente con las muestras experimentales. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. En la Figura 3.2. se muestran cromatogramas representativos de los resultados obtenidos mediante el procedimiento descrito.

### **3.2.3. Evaluación del daño oxidativo**

#### **3.2.3.1. Determinación de malondialdehído (MDA; TBARM)**

El MDA es uno de los productos finales del daño oxidativo inferido a los lípidos por su exposición a radicales libres, y uno de los marcadores más fiables y utilizados para valorar el estrés oxidativo (Karatas et al, 2002).

Su cuantificación se realiza habitualmente de forma espectrofotométrica a través del complejo coloreado que se forma entre el MDA y el ácido tiobarbitúrico (TBA<sub>2</sub>-MDA), y que absorbe fuertemente a 532 nm ( $\epsilon=1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Sin embargo, dado que esta reacción no es específica para el MDA, la simple determinación espectrofotométrica tras la reacción con el TBA no cuantifica específicamente el MDA, sino el conocido como "material reactivo con TBA" (TBARM). Para la determinación específica del complejo TBA<sub>2</sub>-MDA se requiere su ulterior separación mediante HPLC, técnica utilizada en este estudio para la valoración de los niveles plasmáticos de MDA (Mateos et al, 2005). La cuantificación de MDA mediante HPLC está recomendada debido a su elevada sensibilidad analítica y especificidad (Karatas et al, 2002). En el presente trabajo hemos determinado los niveles tanto de TBARM como los de MDA. Para la determinación del TBARM en las

muestras tisulares se utilizaron las condiciones de Santos et al (1980). En orina se siguió el procedimiento de L'Abbé et al (1991) y Wander et al (1996).

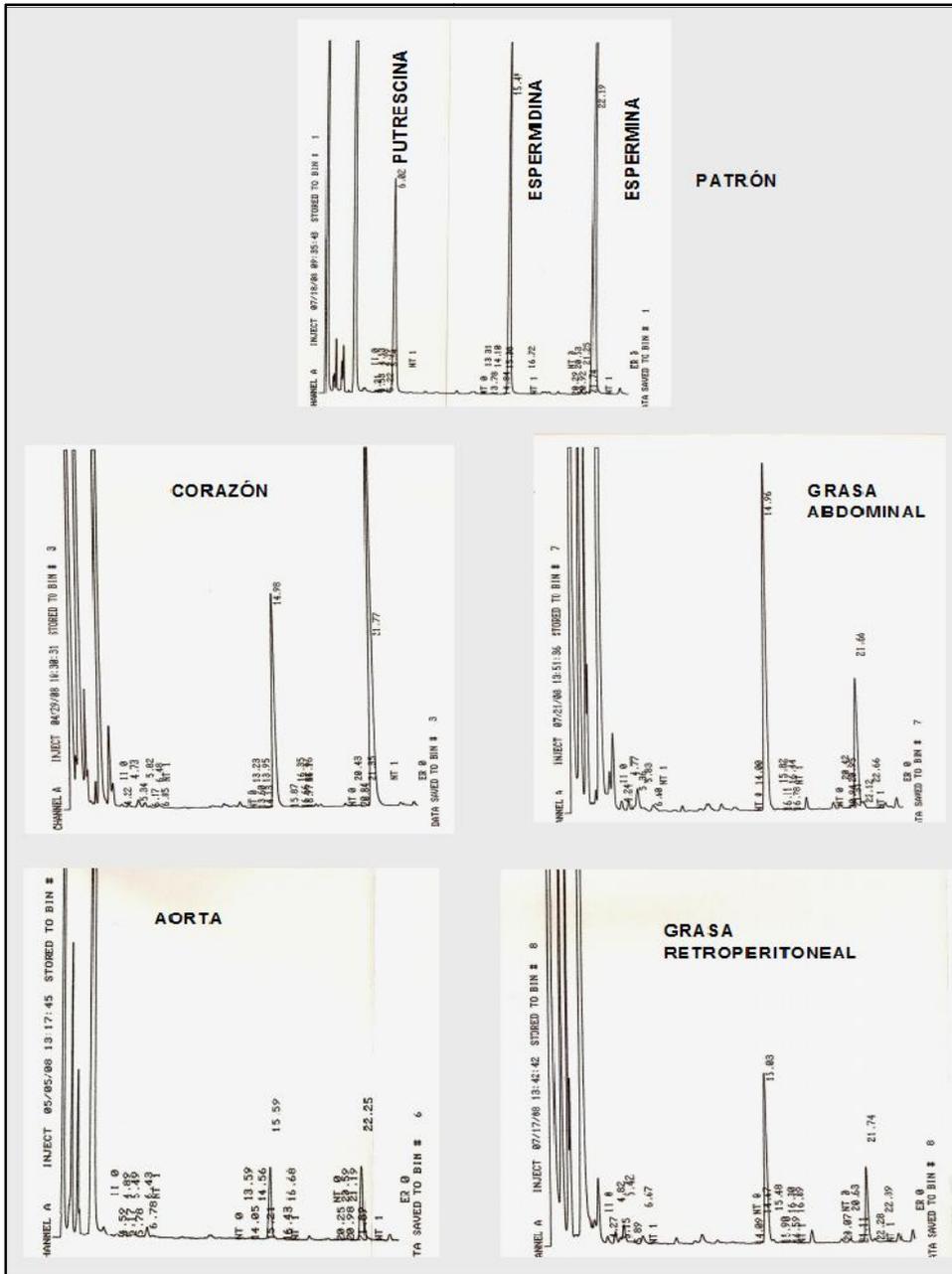


Figura 3.2. Cuantificación de poliaminas mediante HPLC. Cromatogramas ilustrativos de muestra patrón y muestras de los tejidos analizados. Se indican los tiempos de retención (min) de cada poliamina y su nombre correspondiente. La cantidad de putrescina, espermidina y espermina inyectadas en la muestra patrón fue de 0,25 nmoles.

Para las determinaciones en tejidos (homogeneizados neutros, ver obtención de órganos y tejidos apartado 3.1.3) se tomaron 50  $\mu\text{L}$  de la muestra a ensayar o de patrón (Tetrametoxipropano; TMP 0-200  $\mu\text{M}$ ) y se mezclaron con 0,25 mL de suero fisiológico, 0,5 mL de TCA 100% (p/v; en HCl 0,6 M) y 0,1 mL de TBA 0,12 M (en Tris-HCl 0,26 M, pH 7,0). Las muestras se incubaron 30 min a 100°C, se enfriaron en agua (5-10 min), se diluyeron con 1,1 mL de agua, y se centrifugaron a 900xg durante 5 min. A continuación se determinó la absorbancia a 532 nm del sobrenadante a partir de la cual se calculó la concentración de TBARM por interpolación en la curva patrón de TMP realizada paralelamente.

Para las determinaciones en orina se tomaron 0,1 mL de orina o patrón (TMP) que se mezclaron con 0,2 mL de SDS 0,3 M, 1,5 mL de ácido acético 3,5 M (pH ajustado 3,5 con NaOH), 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico 60 mM y 25  $\mu\text{L}$  de hidroxitolueno butilado (BHT 2 mM; en metanol). El volumen final se ajustó a 5 mL con agua. Las muestras se incubaron durante 1h a 100°C, se enfriaron en agua (5-10 min) y centrifugaron (900xg, 5 min), tras lo que se midió la absorbancia del sobrenadante a 532 nm. Los cálculos se realizaron, al igual que en las muestras de plasma y tejidos, a partir de la curva patrón de TMP realizada paralelamente al ensayo.

Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. En todos los casos, la concentración de TBARM se calculó como equivalentes de malondialdehído usando el coeficiente de extinción indicado para el complejo MDA-TBA<sub>2</sub>, comprobado bajo nuestras condiciones experimentales con curvas de calibración (0-100  $\mu\text{M}$ ) realizadas paralelamente con TMP.

**Determinación específica de MDA en plasma mediante HPLC:** Para la obtención del complejo TBA<sub>2</sub>-MDA 50  $\mu\text{L}$  de plasma o estándar (1-50  $\mu\text{M}$  MDA) se mezclaron con 500  $\mu\text{L}$  de tampón acetato sódico 2 M pH 3.5 conteniendo TBA 0,2% (p/v), y se incubaron durante 60 min a 95°C. En este paso se produce la hidrólisis de los lipoperóxidos y la consiguiente liberación de MDA, que se conjuga con el TBA. A continuación se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato potásico 50 mM pH 6.8 a cada muestra y, tras agitar, se centrifugaron durante 5 min a 10000xg a 4°C. A continuación, 200  $\mu\text{L}$  del sobrenadante obtenido se mezclaron con 200  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato potásico 50 mM pH 3.5, se agitaron y

centrifugaron nuevamente durante 5 min a 10000xg y 4°C. Se inyectaron 25 µL del sobrenadante obtenido en el sistema cromatográfico para realizar la cuantificación del complejo TBA<sub>2</sub>-MDA por HPLC. En cada análisis se realizó paralelamente una curva patrón con cantidades conocidas de MDA.

En la determinación cromatográfica (HPLC) del MDA se utilizó una columna de fase reversa Spherisorb C<sub>18</sub> (4,6 × 250 mm, 5 µm; Waters) lavada y acondicionada con una mezcla de acetonitrilo/agua (80/20). Tras la inyección, se aplicó una elución isocrática con tampón fosfato potásico 50 mM pH 6.8/acetonitrilo (90/10) a una velocidad de flujo de 1,2 mL/min y TA. El complejo TBA<sub>2</sub>-MDA se detectó espectrofotométricamente a 532 nm y se identificó por su tiempo de retención (2-2,2 min), determinado en las muestras patrón procesadas paralelamente, y corroborado por co-elución del pico tras la inyección de muestras mixtas (patrones-muestras experimentales). Para la cuantificación se utilizó el área del pico, relativa a la de los patrones.

### 3.2.3.2. Determinación de grupos –SH proteicos

Las proteínas constituyen el mayor acervo celular de grupos –SH y, en su forma reducida, resultan esenciales para la funcionalidad proteica. Sin embargo, son muy sensibles a la oxidación en presencia de ROS por lo que su cuantificación constituye un marcador establecido de daño oxidativo a las proteínas. El procedimiento más ampliamente utilizado para su cuantificación es el de Ellman (1959). Se trata de un método espectrofotométrico basado en la oxidación de los grupos SH con un disulfuro simétrico (ácido 5-5'-ditiobis [2-nitrobenzoico]; DTNB; reactivo de Ellman) que, al reducirse, genera un disulfuro mixto y un anión tiolato (5-tio-2-nitrobenzoato; TNB) que absorbe fuertemente a 412 nm ( $\epsilon=13,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

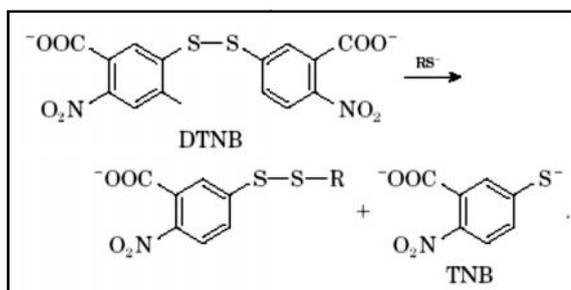


Figura 3.3. Fórmula química del reactivo de Ellman: Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB).

Nuestras determinaciones de grupos SH en proteínas tisulares se realizaron utilizando 20-50  $\mu$ L de los sobrenadantes de los homogeneizados neutros de los diferentes órganos y tejidos (véase apartado 3.1.3), en un volumen final de ensayo de 1 mL, conteniendo tampón Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 y DTNB 0,25 mM. La absorción de la muestra a 412 nm se registró, tras 30 min a TA, frente a un blanco de tampón de ensayo (Tris-HCl 0,1 M pH 8,0). La absorción inespecífica de las muestras de plasma se eliminó procesando paralelamente duplicados de las mismas sin DTNB. La solución de DTNB (10 mM) se preparó diariamente antes del uso en tampón Tris-HCl 0,1 M pH 8,0

Todas las determinaciones se realizaron por duplicado y directamente en cubetas de espectrofotómetro de 1 mL. Los cálculos se realizaron a partir de las absorbancias netas utilizando el coeficiente de extinción molar del TNB a 412 nm y pH 8,0 (Gergel y Cederbaum, 1997).

### **3.2.3.3. Determinación de Productos Avanzados de Oxidación Proteica (AOPPS)**

El término “productos avanzados de oxidación proteica” (AOPPs) fue introducido por Witko-Sarsat en 1998 para designar a la mezcla de productos de oxidación, fragmentación, entrecruzamiento y agregación de las proteínas producidos como consecuencia de su ataque por radicales libres. El componente mayoritario de los AOPPs son proteínas con un contenido incrementado de grupos carbonilo (-CO), uno de los parámetros más ampliamente utilizados de oxidación proteica (Levine et al, 1990).

El rasgo químico diferencial de los AOPPs es su capacidad para reaccionar con el yoduro potásico en medio ácido generando yodo diatómico. Esta reacción va acompañada de un aumento de la absorción a 340 nm que puede ser utilizado para su cuantificación (Witko-Sarsat et al, 1998).

Para las determinaciones, 10-50  $\mu$ L de los sobrenadantes de los homogeneizados neutros de los diferentes órganos y tejidos (véase apartado 3.1.3) se llevaron con tampón fosfato sódico 10 mM pH 7,4 hasta un volumen final de 1 mL, y se le añadieron 100  $\mu$ L de ácido acético glacial. La mezcla se agitó vigorosamente en vortex y se leyó su absorbancia a 340 nm. Una nueva lectura de la absorción a 340 nm se realizó inmediatamente tras la adición

a la mezcla de 50 µL de yoduro potásico y agitación vigorosa en vortex. Todas las determinaciones se realizaron directamente en cubetas de espectrofotómetro de 1 mL.

El cálculo de la concentración de AOPPs se realizó interpolando los valores netos de absorbancia (diferencia de la lectura después y antes de la adición del yoduro potásico) en una curva patrón de cloramina T (0-500 µM) realizada paralelamente al desarrollo de las muestras y en las mismas condiciones.

### 3.2.3.4 Determinación de 8-isoprostano

Los isoprostanos son una familia de eicosanoides de origen no enzimático producidos por la oxidación aleatoria del ácido araquidónico de los fosfolípidos por ROS (Figura 3.4). Son cuantificables en plasma y orina y sus niveles se elevan en condiciones de estrés oxidativo. Uno de los isoprostanos, el 8-isoprostano (8-iso-prostaglandina F<sub>2α</sub>), ha demostrado tener actividad biológica, siendo un potente vasoconstrictor pulmonar y renal. Sus niveles se han propuesto como un marcador de deficiencia antioxidante y estrés oxidativo, elevándose en fumadores muy asiduos (Janicka et al, 2010).

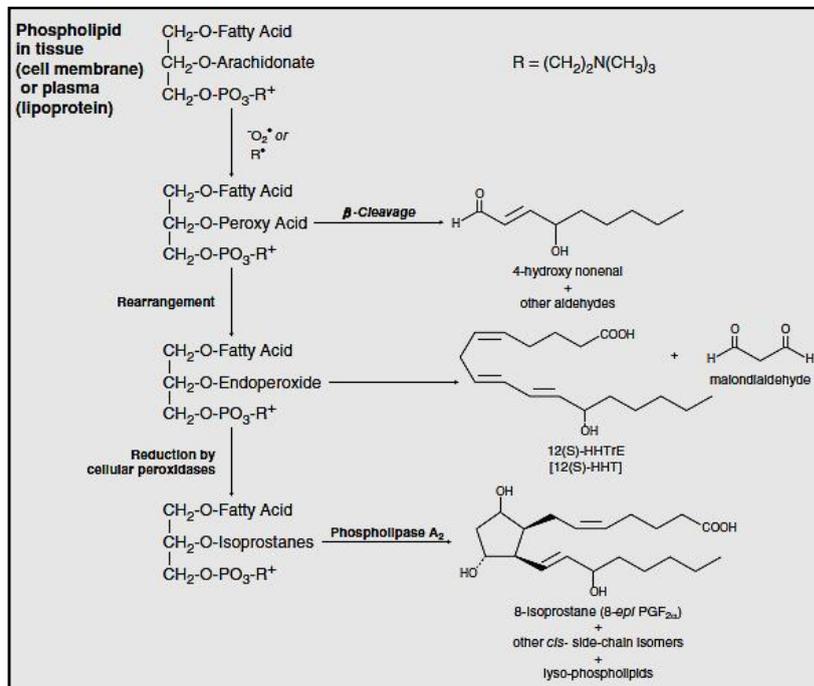


Figura 3.4. Generación de 8-isoprostano y malondialdehído (MDA) durante la oxidación aleatoria del ácido araquidónico de los fosfolípidos tisulares por ROS. Tomado de 8-isoprostane EIA, Cayman.

En nuestro estudio, los niveles plasmáticos y urinarios de 8-Isoprostano se cuantificaron mediante enzimo-inmuno ensayo (EIA) competitivo (Cayman Chemical Company; Ann Arbor, MI, USA) en placas de 96 pocillos. Este ensayo se basa (Figura 3.5) en la competencia entre el 8-isoprostano de la muestra y un conjugado de 8-isoprostano-acetilcolinesterasa (AChE; Tracer) por un número limitado de sitios de unión para 8-isoprostano (antisuero de conejo para 8-isoprostano)

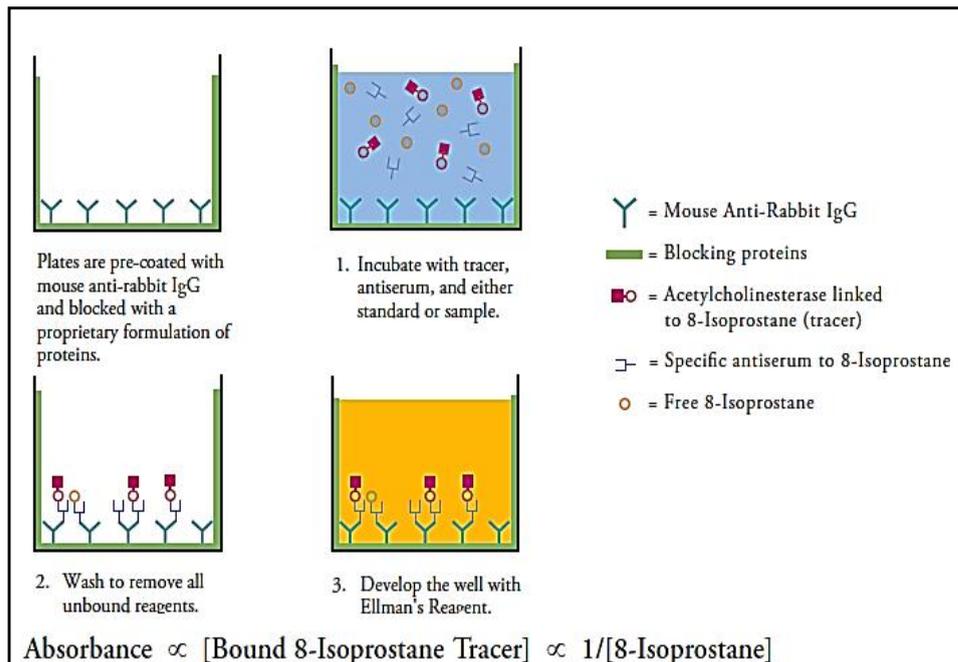


Figura 3.5. Esquema del EIA utilizado para la determinación de 8-isoprostano. Tomado de 8-isoprostane EIA kit, Cayman.

Dado que la concentración de 8-isoprostano Tracer en el ensayo es constante, su unión al antisuero de conejo será inversamente proporcional a la concentración de 8-isoprostano de la muestra. El complejo antisuero-8-isoprostano (libre o Tracer) se une al anticuerpo monoclonal IgG de ratón previamente anclada a la placa y, tras lavado, se hace reaccionar con el reactivo de Ellman que contiene el sustrato de la AChE. El producto de esta reacción enzimática genera un cromóforo con fuerte absorción a 412 nm. La intensidad del color, determinada espectrofotométricamente, es directamente proporcional a la cantidad de 8-isoprostano Tracer unida a la placa, e inversamente proporcional a la de 8-isoprostano de

la muestra analizada durante la incubación. El procesamiento paralelo con las muestras de soluciones estándar de 8-isoprostano (0,8-500 pg/mL) permite establecer la relación cuantitativa entre absorbancia y concentración de 8-isoprostano. El límite de detección del ensayo es de 3 pg/mL.

Para las determinaciones se siguieron estrictamente las instrucciones del fabricante para placas de 96 pocillos. Las muestras de orina y plasma se diluyeron previamente (1/40 y 1/30, respectivamente) en tampón de ensayo, y 50 µL se distribuyeron en la placa junto con estándares y reactivos tal y como se indica en la Tabla. 3.3.

Well	EIA BUffer	Standard/Sample	Tracer	Antibody
Blk	-	-	-	-
TA	-	-	5 µl	-
NSB	100µl	-	50µl	-
B <sub>0</sub>	50µl	-	50µl	50µl
Std/Sample	-	50µl	50µl	50µl

**Tabla 3.3. Método de EIA para la determinación de 8-isoprostano**

Tras incubar 18 h a 4°C, la placa se lavó 5 veces con 200 µL de tampón de lavado, y se añadieron 5 µL de Tracer al pocillo TA (actividad total). A continuación se dispensaron 200 µL del reactivo de Ellman a todos los pocillos, se incubó a temperatura ambiente durante 90-120 min en oscuridad bajo agitación suave, y se procedió a la lectura de la absorbancia a 405 nm en un lector de placas Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA)

### 3.2.4. Valoración de los niveles plasmáticos de insulina, IL-6, resistina y leptina

Su determinación se llevó a cabo mediante ensayos Milliplex Map. Estos ensayos están basados en la tecnología Luminex® xMAP®, una de las tecnologías multiplex más respetadas y que más rápidamente está creciendo debido a sus múltiples aplicaciones y a su capacidad para llevar a cabo gran variedad de bio-ensayos, incluyendo inmuno-ensayos, en la superficie de microesferas magnéticas que se conocen como microesferas

MagPlex™. Entre sus ventajas se encuentran su alta sensibilidad (permite utilizar cantidades muy pequeñas de muestra) y la posibilidad de cuantificar simultáneamente multitud de moléculas (analitos) en un único ensayo. El fundamento de ésta tecnología puede ser resumido de la siguiente forma (Figura 3.6):

1. La muestra a analizar (plasma en nuestro estudio) se añade a una mezcla de microesferas (codificadas en colores) recubiertas con anticuerpos específicos contra los analitos que se desean cuantificar. Los anticuerpos “de captura” se unirán a los analitos de interés (Figura 3.6 {1}).

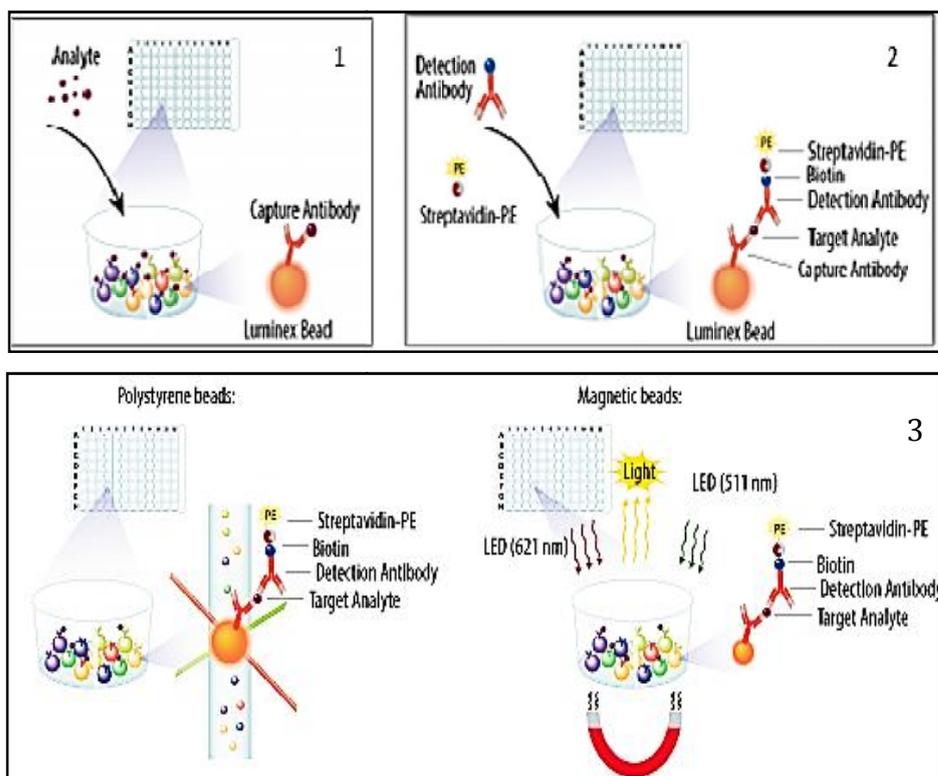


Figura 3.6. Ensayos Milliplex Map, basados en la tecnología Luminex® xMAP®.

2. A esta mezcla se añaden a continuación anticuerpos biotinilados específicos “de detección” de los diferentes analitos de interés. El resultado es la formación de un “sándwich” anticuerpo-antígeno-anticuerpo, anclado a la microesfera, y en el cual el antígeno es el analito a cuantificar. El sistema se completa con la adición del conjugado de

ficoeritrina-streptavidina que se une a los anticuerpos de detección biotinilados (Figura 3.6 {2}).

Finalmente, las microesferas de poliestireno se leen en un aparato de doble láser basado en la detección de flujo. Un láser clasifica las microesferas y determina el analito que está siendo detectado, y el segundo determina la magnitud de la señal derivada de la ficoeritrina, la cual está en proporción directa con la cantidad de analito unida.

En el caso de microesferas magnéticas un imán en el analizador las captura y mantiene en una monocapa, mientras dos diodos (LEDs) que emiten luz en dos espectros distintos iluminan las microesferas. Un LED identifica el analito que está siendo detectado y el segundo LED determina la magnitud de la señal de la ficoeritrina. En cualquiera de los casos, la interpolación de la señal de la muestra en la curva patrón obtenida por el procesamiento simultáneo de estándares adecuados de cada analito permitirá la cuantificación del mismo (Figura 3.6 {3}).

En nuestro estudio se ha utilizado el kit MADKMAG-71K-05 basado en microesferas magnéticas diseñado y suministrado por Merck Millipore (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) para la cuantificación en plasma de insulina, IL-6, TNF- $\alpha$ , resistina y leptina. Los niveles de TNF- $\alpha$  estuvieron en todas las muestras por debajo del límite de detección (12 pg/mL) por lo que no se han podido incluir entre los resultados. Los análisis se han realizado en placas de 96 pocillos en el Laboratorio de Citómica del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), utilizándose para la cuantificación un Luminex 200 IS (Luminex Corp, Austin, TX, USA).

En las determinaciones se han seguido estrictamente las condiciones especificadas por el fabricante. En términos generales el procedimiento consistió en la adición de 200  $\mu$ L de tampón de ensayo a cada pocillo, seguido de su decantación tras 10 min en agitación a TA. A continuación se añadieron, a los pocillos adecuados, 25  $\mu$ L de estándar o control, 25  $\mu$ L de tampón de ensayo a los pocillos background, estándar, control y muestra, 25  $\mu$ L de muestra convenientemente diluida (1/2) a los pocillos correspondientes a las muestras, y 25  $\mu$ L de microesferas a cada pocillo. Tras incubar 16-18 h a 4°C, se eliminó el contenido de los pocillos y se procedió a su lavado (3X) con 200  $\mu$ L de tampón de lavado. Seguidamente se añadieron 50  $\mu$ L de anticuerpos de detección a cada pocillo, se incubó 1 h a TA, y se

dispensaron 50  $\mu$ L del conjugado streptavidina-ficoeritrina a cada pocillo. Tras incubar 30 min a TA, se retiró el contenido de los pocillos y se lavó nuevamente (3X) con 200  $\mu$ L de tampón de lavado. Finalmente, se añadieron 100  $\mu$ L de líquido de transmisión a cada pocillo y se procedió a la lectura en el Luminex 200 IS.

### **3.2.5. Análisis de la expresión de las isoformas de la óxido nítrico sintasa (NOS) en corazón y aorta**

La expresión en corazón y aorta de las isoformas endotelial, neuronal e inducible de la NOS se determinó a nivel de mRNA mediante PCR a tiempo real precedida de retrotranscripción (RT-qPCR). En nuestros análisis se utilizó un procedimiento de cuantificación relativo comparando la relación entre la cantidad de mRNA de cada uno de los genes de las tres isoformas de la NOS, y la cantidad de mRNA de la GAPDH como control endógeno (gen constitutivo cuya expresión no varía en las diferentes condiciones experimentales).

#### **3.2.5.1. Extracción y aislamiento de RNA**

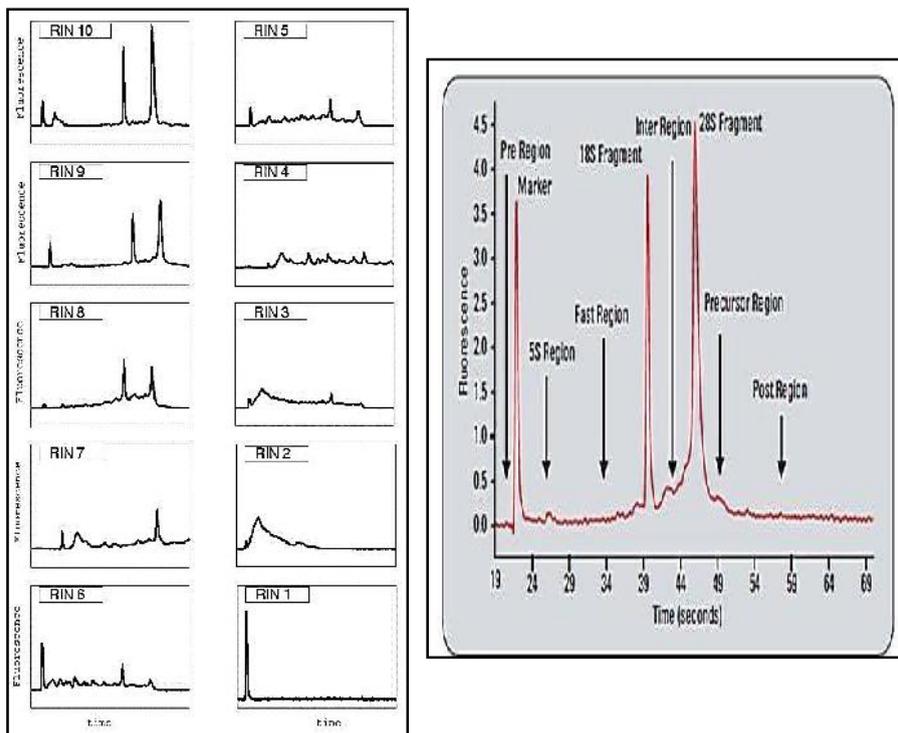
Se realizó a partir de los homogenados de los tejidos en Trizol mantenidos a  $-80^{\circ}\text{C}$  (véase apartado 3.1.3. sobre obtención de órganos y tejidos), mediante extracción con solventes (cloroformo/isopropanol/etanol). Tanto el procedimiento como las condiciones utilizadas son los descritos por Pineda (2011).

En resumen, el procedimiento de extracción se inició con la adición de 200  $\mu$ L de cloroformo a los homogenados descongelados ( $V=1$  mL). La mezcla se agitó en vórtex y, tras 3 min a TA, se centrifugó a  $4^{\circ}\text{C}$  (12000xg 15 min). La fase acuosa de los tubos centrifugados se recuperó, se mezcló con 500  $\mu$ L de isopropanol y, tras 10 min a TA, se centrifugó nuevamente a 12000xg 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Tras eliminar el sobrenadante por decantación, el precipitado se lavó con 1 mL de etanol frío al 75% (en agua estéril con DEPC) y se centrifugó a 7500xg 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . El precipitado obtenido, en el que se encuentra el RNA, se llevó hasta sequedad mediante evaporación a TA, y se resuspendió en 50  $\mu$ L de agua-DEPC previamente a su almacenamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior utilización.

### 3.2.5.2. Cuantificación y análisis de la integridad del RNA

La integridad del RNA obtenido es un factor crítico en el análisis de la expresión génica. En nuestro estudio, la cuantificación y análisis de dicha integridad se realizó mediante electroforesis acoplada a detección fluorescente en un bioanalizador Agilent 2100 utilizando Nano Kits Agilent RNA 6000 (Referencia 5067-1511 de Agilent Technologies; Santa Clara, CA, USA).

El electroferograma generado por el bioanalizador permite establecer la concentración y la integridad del RNA en la muestra determinada, ésta última, por la relación entre los picos de los rRNAs 28s y 18s (RIN) (Figura 3.7). En nuestros ensayos sólo se utilizaron muestras con una concentración de RNA  $\geq 100$  ng/ $\mu$ L y relación 28s/18s  $\geq 1,2$ .



**Figura 3.7. Cuantificación y análisis de la integridad del RNA.** Electroferograma detallado de las regiones que son indicativas de la calidad del RNA, y representación típica de las 10 categorías de integridad. El rango de valores del número de integridad del RNA (RIN) va desde 10 (intacto) a 1 (totalmente degradado). La degradación gradual del rRNA se muestra como un desplazamiento continuo hacia fragmentos de menor tamaño. Tomado de Schroeder et al (2006).

### 3.2.5.3. Obtención del cDNA mediante retrotranscripción

La síntesis de DNA complementario (cDNA) de cadena simple se realizó a partir de 2 µg del RNA total obtenido en la fase anterior utilizando el kit ThermoScript™ RT-PCR system for first strand cDNA synthesis de Invitrogen™ (Life technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). La Figura 3.8 resume las diferentes etapas del procedimiento empleado en el que se cumplieron escrupulosamente las indicaciones del fabricante. En nuestras condiciones particulares, el primer utilizado fue una mezcla de random hexamers y oligo (dT)<sub>20</sub>, y el volumen final de la reacción fue de 20 µL.

En cada retrotranscripción se procesó paralelamente una muestra control sin RNA con el objeto de utilizarla como blanco en los experimentos de expresión (qPCR). Hasta dichos análisis, tanto el blanco como el resto de las muestras se conservaron a -20°C.

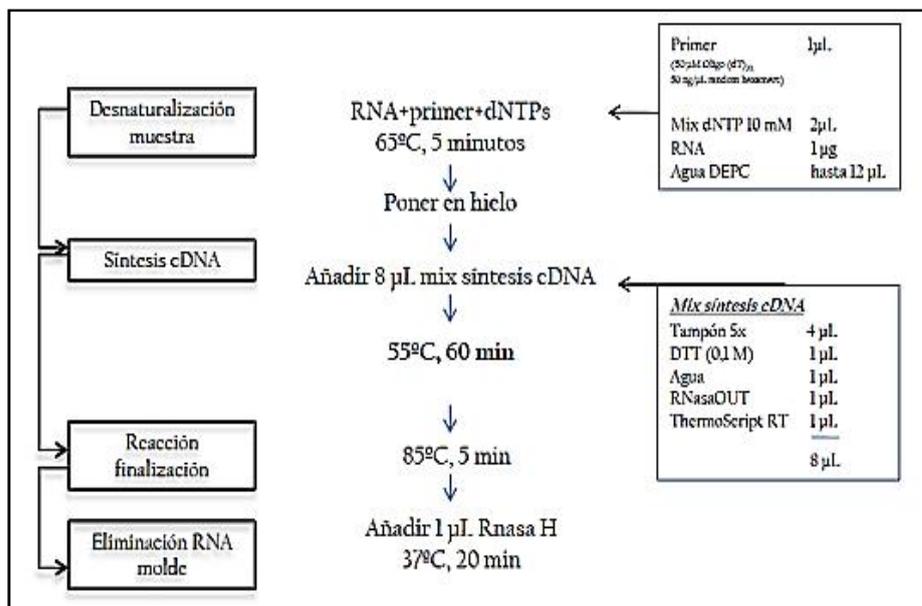


Figura 3.8. Esquema del procedimiento utilizado para la obtención del cDNA

### 3.2.5.4. Análisis de la expresión génica

Se realizó mediante amplificación del cDNA obtenido en la fase anterior por PCR a tiempo real (qPCR) utilizando la tecnología de sondas TaqMan®. Dicha tecnología (Figura 3.9) está basada en introducir en el sistema de amplificación sondas específicas de secuencia del

cDNA de interés, provistas de un doble marcaje, y cuya emisión fluorescente sólo es detectable cuando la sonda es degradada por la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq-polimerasa durante el proceso de amplificación. De esta forma el sistema permite la cuantificación específica del cDNA de interés, incluso en presencia de amplificación inespecífica.

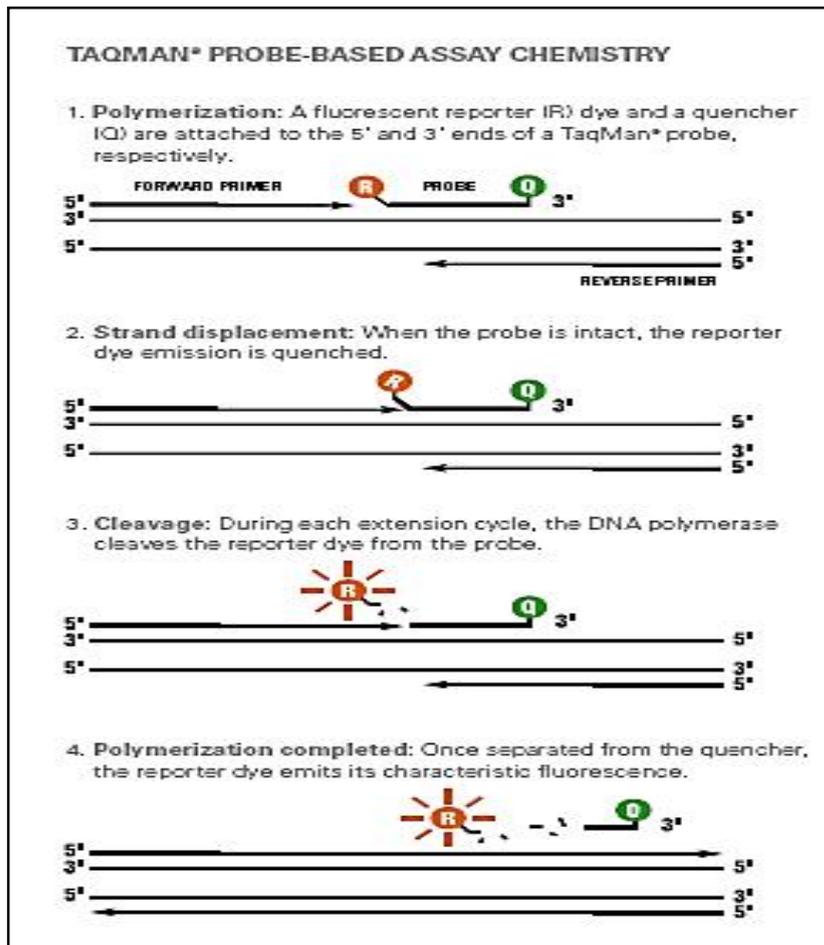
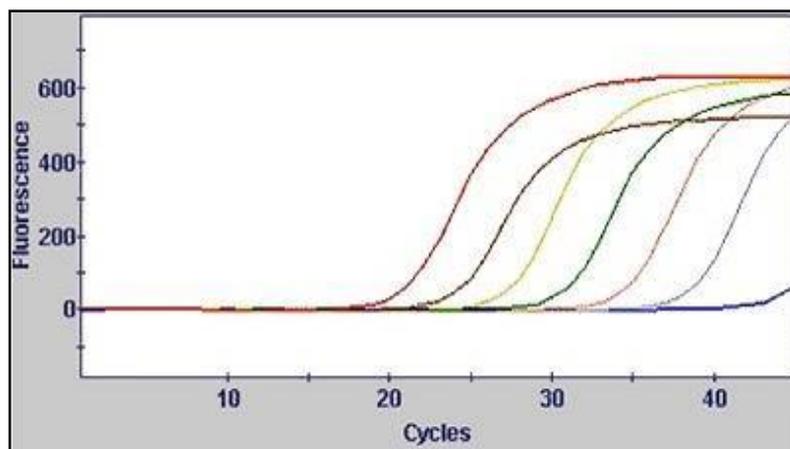


Figura 3.9. Esquema del sistema de amplificación por qPCR utilizando la tecnología TaqMan®.

En el presente trabajo, las sondas utilizadas correspondían a las diferentes isoformas de las óxido nítrico sintasas (Mm 00435188\_m1 para la nNOS/NOS1; Mm 01309891\_m1 para la iNOS/NOS2; y Mm 01164908\_m1 para la eNOS/NOS3), y a la GAPDH (Mouse GAPD Endogenous control, FAM/MGB probe), como control interno de normalización. Se realizaron 40 ciclos de amplificación (95°C/15 s, 60°C/1 min) tras incubación previa de las

muestras 2 min a 50°C y 10 min a 95°C. Tanto las sondas como el resto de productos utilizados en la amplificación (TaqMan Gene Expression Assay; TaqMan Universal Master Mix), análisis y cuantificación de los resultados (analizador 7900HT Fast Real-Time PCR system) fueron suministrados por Applied Biosystems (Carlsbad, CA, USA).

Los datos obtenidos, una vez finalizada la reacción de amplificación, se guardaron y procesaron mediante el programa 7900 HT (versión 2.2.2). Para la cuantificación (Figura 3.10), los sistemas de qPCR se basan en el análisis de la cantidad de fluorescencia emitida en cada ciclo de amplificación, así como en la relación de proporcionalidad entre la abundancia inicial del RNA (cDNA) y el número de ciclos de PCR necesarios para detectar analíticamente su amplificación (Pfaffl et al, 2001). Así, cuanto mayor sea la expresión de un gen concreto, la emisión de fluorescencia asociada a su amplificación será registrada más tempranamente, es decir, a menor número de ciclos de PCR (Figura 3.10).



**Figura 3.10.** Gráfica ilustrativa del análisis de los resultados de un experimento tipo de expresión génica por qPCR. El eje vertical representa la cantidad de fluorescencia normalizada y el eje horizontal el número de ciclos.

### 3.2.6. Análisis estadístico.

Los resultados de este trabajo han sido procesados con el paquete estadístico SPSS 22.0 para Windows. Los datos se describen en forma de intervalo centrado en la media

aritmética (estadístico indicativo de la tendencia central) y con el error estándar de la media (ESM; estadístico de dispersión).

Como en el presente trabajo se han estudiado comparativamente cuatro grupos de ratones, se ha aplicado el análisis de la varianza (ANOVA) para la comparación de las medias de más de dos poblaciones. Cuando el resultado del ANOVA ha sido significativo ( $p \leq 0,05$ ), al concluir que no todas las medias son iguales, se procede a la comparación a posteriori de las parejas de medias mediante el test LSD (diferencias mínimas significativas), considerándose significativa la probabilidad  $p \leq 0,05$ . La normalidad de las variables se comprobó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Las variables no distribuidas normalmente se transformaron logarítmicamente previamente a los análisis. Para las correlaciones bi-paramétricas se ha utilizado el coeficiente de Pearson ( $r$ ).

# RESULTADOS





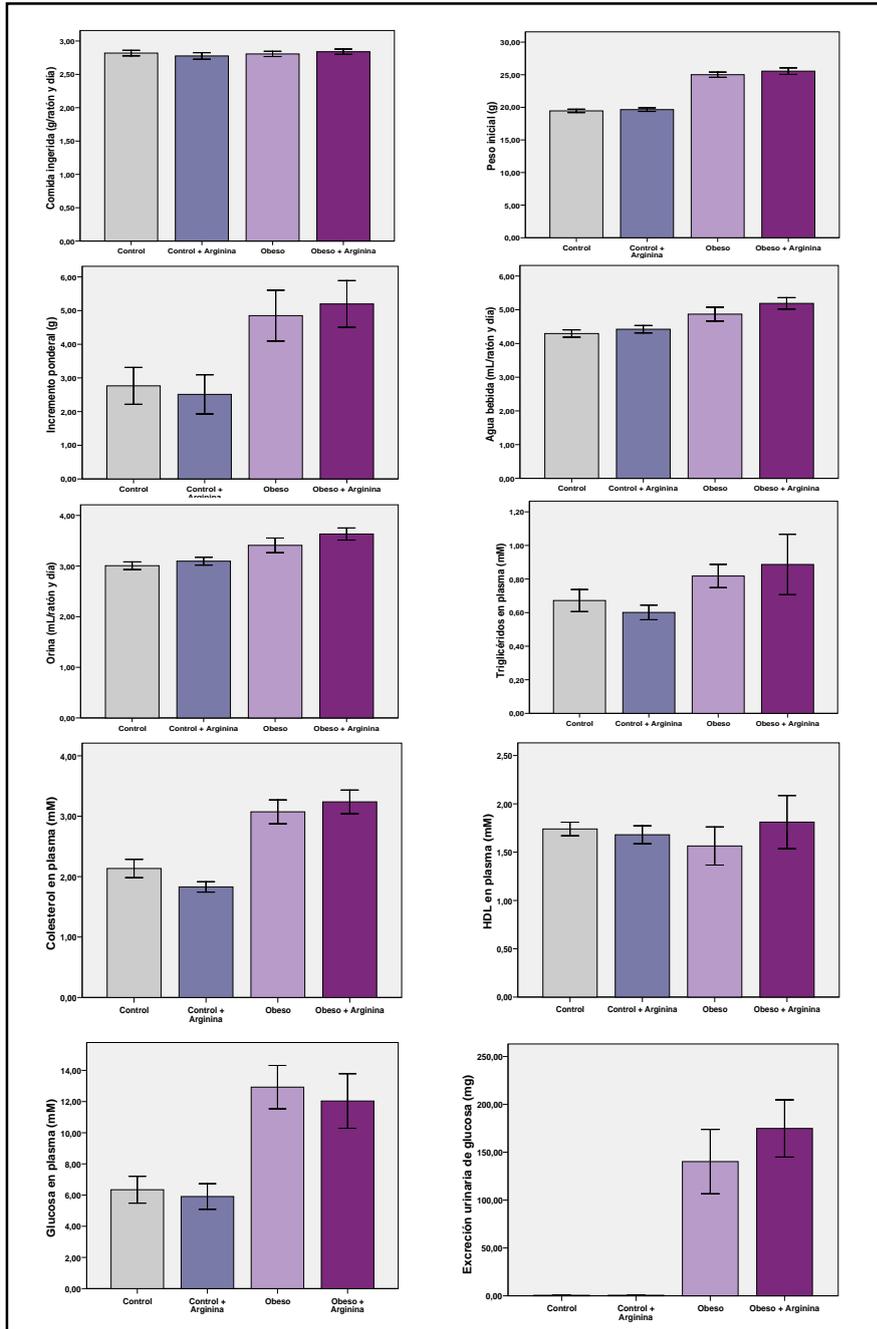
#### 4.1. CARACTERÍSTICAS BÁSICAS DEL MODELO ANIMAL UTILIZADO: EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN ORAL DE ARGININA

##### 4.1.1. Parámetros generales

Las características generales de los ratones lean (control) y ob/ob, así como el efecto de la suplementación de arginina al 1% en el agua de bebida, se resumen en la Tabla 4.1 y en la Figura 4.1. Como se puede observar en ellas, incluso bajo nuestras condiciones experimentales de restricción dietaria y reducido contenido graso de la dieta, los ratones ob/ob mantienen las características metabólicas generales que les configuran como un modelo de riesgo de enfermedad cardiovascular. La suplementación de arginina no tiene efectos significativos sobre ninguno de los parámetros generales analizados.

	Lean	Lean+Arg	Obeso	Obeso+Arg	ANOVA
Peso inicial (g)	19,5±0,3 <sup>b</sup>	19,7±0,3 <sup>b</sup>	25,0±0,4 <sup>a</sup>	25,6±0,5 <sup>a</sup>	<0,001
Comida ingerida (g/ratón/día)	2,82±0,04	2,78±0,05	2,81±0,04	2,84±0,04	ns
Incremento peso (g)	2,76±0,55 <sup>b</sup>	2,51±0,58 <sup>b</sup>	4,85±0,75 <sup>a</sup>	5,20±0,69 <sup>a</sup>	0,006
Agua ingerida (mL/ratón/día)	4,30±0,11 <sup>b</sup>	4,42±0,11 <sup>b</sup>	4,87±0,21 <sup>a</sup>	5,19±0,17 <sup>a</sup>	<0,001
Orina (mL/ratón/día)	3,01±0,08 <sup>b</sup>	3,10±0,08 <sup>b</sup>	3,41±0,15 <sup>a</sup>	3,63±0,12 <sup>a</sup>	<0,001
Glucosa (mM)	6,24±0,65 <sup>b</sup>	5,29±0,61 <sup>b</sup>	12,35±1,17 <sup>a</sup>	11,20±1,23 <sup>a</sup>	<0,001
Colesterol (mM)	2,23±0,11 <sup>b</sup>	2,11±0,14 <sup>b</sup>	3,47±0,21 <sup>a</sup>	3,51±0,17 <sup>a</sup>	<0,001
cHDL (mM)	1,54±0,09	1,51±0,09	1,46±0,14	1,71±0,18	ns
Triglicéridos (mM)	0,58±0,06 <sup>b,c</sup>	0,51±0,05 <sup>c</sup>	0,72±0,06 <sup>a,b</sup>	0,82±0,12 <sup>a</sup>	0,023
Glucosa orina (mg totales)	0,57±0,11 <sup>b</sup>	0,59±0,12 <sup>b</sup>	140±34 <sup>a</sup>	175±30 <sup>a</sup>	<0,001

**Tabla 4.1. Características generales de los grupos control (lean), control con arginina, obeso (ob/ob) y obeso + arginina.** Los datos están indicados como media ± error estándar de la media (ESM; n≥15). Letras minúsculas diferentes indican diferencias mínimas significativas entre los grupos, con p<0,05.



**Figura 4.1.** Características metabólicas generales de los grupos control (lean), control con arginina, obeso (*ob/ob*) y obeso + arginina. Los datos están indicados como media  $\pm$  error estándar de la media (ESM;  $n \geq 15$ ).

Como muestran los resultados, la diferencia significativa en el peso inicial entre los ratones del grupo control y los ratones obesos se incrementa también significativamente a lo largo de nuestro periodo experimental de un mes, con una ganancia ponderal que no alcanza los 3 g en el grupo control mientras que incluso supera los 5 g en el grupo obeso, sin diferencia atribuibles a la suplementación de arginina. La ingesta hídrica es también significativamente mayor en los grupos obesos y se acompaña, como era de esperar, de una mayor eliminación de orina en estos grupos que en los controles lean.

Respecto a los parámetros metabólicos analizados, los grupos obesos se caracterizan por presentar elevaciones significativas, respecto a los grupos control, de los niveles plasmáticos de glucosa, colesterol y triglicéridos. Los niveles de HDL colesterol no presentan diferencias significativas entre los diferentes grupos. La hiperglucemia descrita para los grupos obesos se acompaña, en nuestro estudio, de una marcada glucosuria (prácticamente indetectable en los grupos control), que llega a suponer una pérdida urinaria de glucosa de 175 mg por ratón y día en el grupo obeso suplementado con arginina. La suplementación de arginina disminuye ligeramente los niveles de colesterol, triglicéridos y glucosa de los ratones lean, sin alcanzar en ningún caso significación estadística.

#### **4.1.2. Peso de los órganos y contenido proteico: efecto de la suplementación con arginina.**

Las características de los ratones lean y ob/ob respecto al peso absoluto de los diferentes órganos y tejidos analizados en este estudio, así como el porcentaje que estos representan del peso corporal, y el efecto sobre los mismos de la suplementación oral de arginina se resumen en la Tabla 4.2 y la Figura 4.2.

Debemos recordar que nuestros animales habían superado ya, al inicio del experimento, las etapas principales del desarrollo orgánico y que, en el periodo analizado, la ganancia ponderal total debe hacerse fundamentalmente a expensas de los tejidos que conforman las estructuras corporales básicas (músculo y tejido adiposo, principalmente). En este contexto se incluyen nuestros resultados experimentales.

En términos de peso absoluto, nuestro estudio no muestra diferencias significativas para el peso del corazón, riñón, testículos ni páncreas entre los diferentes grupos experimentales. Sin embargo, cuando el peso de estos órganos se expresa como porcentaje del peso corporal, la reducción de este parámetro en los grupos obesos es clara y significativa.

A diferencia de lo referido para el corazón, la cantidad de tejido procedente de la aorta torácica fue, tanto en términos absolutos como relativos, muy superior para los grupos ob/ob que para los ratones lean, y no disminuyó (efecto que sí se observa clara y significativamente en los ratones lean) por la suplementación de arginina.

Peso	Lean	Lean + Arg	Obeso	Obeso + Arg	ANOVA
Hígado (g)	0,87±0,03 <sup>b</sup>	0,86±0,03 <sup>b</sup>	1,70±0,06 <sup>a</sup>	1,67±0,10 <sup>a</sup>	<0,001
Hígado (%)	3,84±0,14 <sup>b</sup>	3,74±0,20 <sup>b</sup>	5,56±0,22 <sup>a</sup>	5,38±0,34 <sup>a</sup>	<0,001
Riñón (g)	0,30±0,01	0,29±0,01	0,28±0,01	0,29±0,01	ns
Riñón (%)	1,33±0,04 <sup>a</sup>	1,27±0,05 <sup>a</sup>	0,92±0,04 <sup>b</sup>	0,93±0,03 <sup>b</sup>	<0,001
Testículos (g)	0,16±0,02	0,15±0,01	0,14±0,01	0,12±0,01	ns
Testículos (%)	0,71±0,05 <sup>a</sup>	0,63±0,04 <sup>a</sup>	0,45±0,02 <sup>b</sup>	0,39±0,03 <sup>b</sup>	<0,001
Páncreas (g)	0,13±0,01	0,13±0,01	0,13±0,01	0,13±0,01	ns
Páncreas (%)	0,56±0,02 <sup>a</sup>	0,55±0,05 <sup>a</sup>	0,43±0,05 <sup>b</sup>	0,43±0,03 <sup>b</sup>	0,028
Corazón (mg)	92±3	89±4	80±4	80±4	ns
Corazón (%)	0.43±0.02 <sup>a</sup>	0.44±0.02 <sup>a</sup>	0.28±0.01 <sup>b</sup>	0.27±0.02 <sup>b</sup>	<0.001
Aorta (mg)	11.3±0.9 <sup>a</sup>	7.0±0.6 <sup>b</sup>	21.7±3.2 <sup>c</sup>	21.0±3.0 <sup>c</sup>	0.004
Aorta (%)	0.053±0.003 <sup>a</sup>	0.035±0.003 <sup>b</sup>	0.079±0.128 <sup>c</sup>	0.073±0.011 <sup>c</sup>	0.028
Grasa AB (mg)	192±28 <sup>a</sup>	147± 25 <sup>a</sup>	1721±97 <sup>b</sup>	1867±72 <sup>b</sup>	<0.001
Grasa AB (%)	0.90±0.13 <sup>a</sup>	0.69±0.10 <sup>a</sup>	6.01±0.27 <sup>b</sup>	6.19±0.19 <sup>b</sup>	<0.001
Grasa RP (mg)	45.9±5.2 <sup>a</sup>	29.0±2.5 <sup>a</sup>	780±68 <sup>b</sup>	779±63 <sup>b</sup>	<0.001
Grasa RP (%)	0.22±0.02 <sup>a</sup>	0.14±0.01 <sup>a</sup>	2.71±0.20 <sup>b</sup>	2.60±0.22 <sup>b</sup>	<0.001

**Tabla 4.2. Peso de los órganos estudiados en ratones lean y ob/ob. Efecto de la suplementación con arginina.** Los datos están indicados como media ± error estándar de la media (ESM; n=15). Letras minúsculas diferentes indican diferencias mínimas significativas entre los grupos, con p<0,05. (%): % en peso respecto al peso corporal; Grasa AB: grasa abdominal; Grasa RP: grasa retroperitoneal

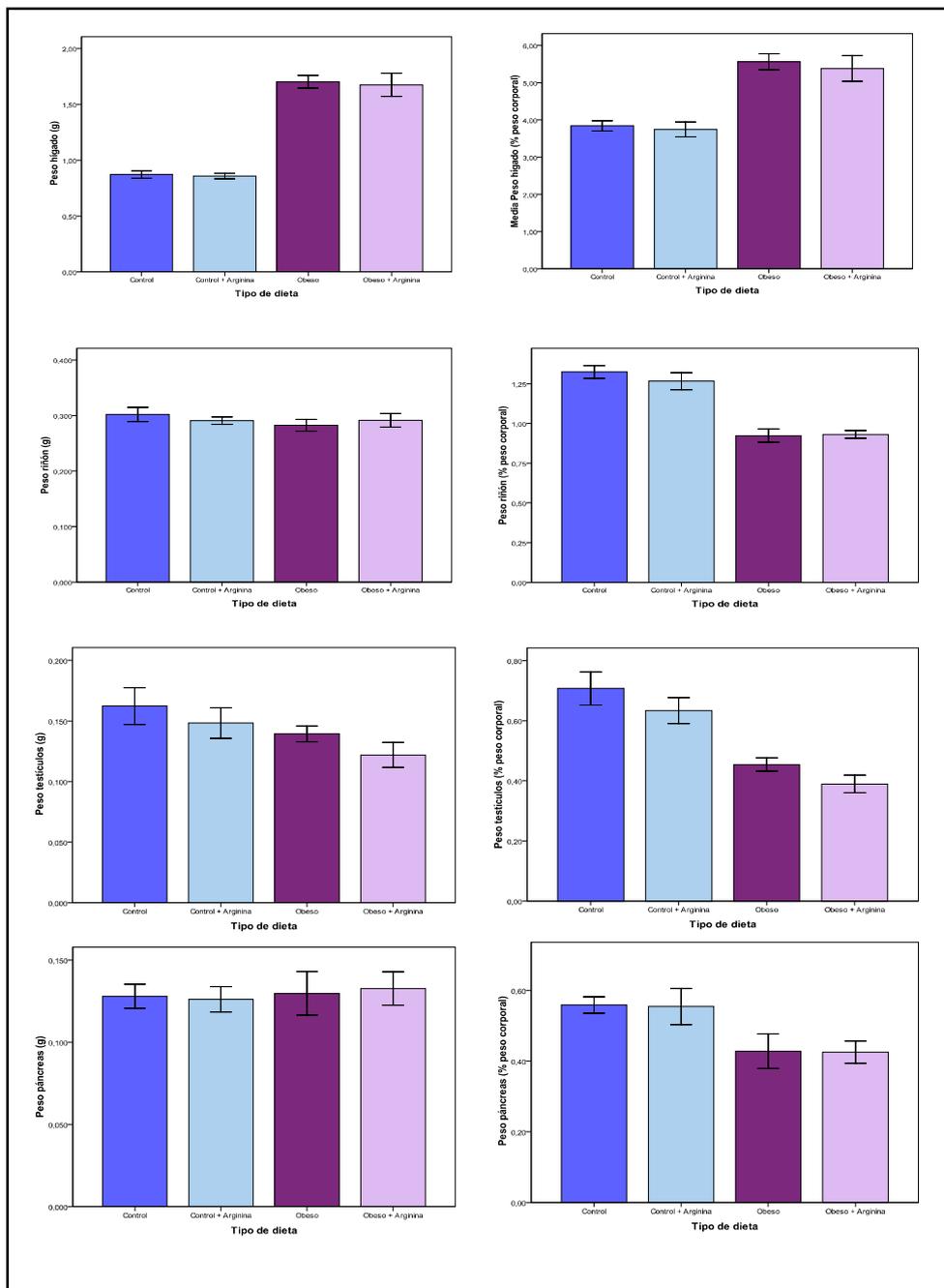


Figura 4.2. Peso absoluto y porcentaje respecto al peso corporal de diferentes órganos de los grupos control (lean), control + arginina, obeso (ob/ob), obeso + arginina. Los datos están indicados como media  $\pm$  error estándar de la media (ESM; n=15)

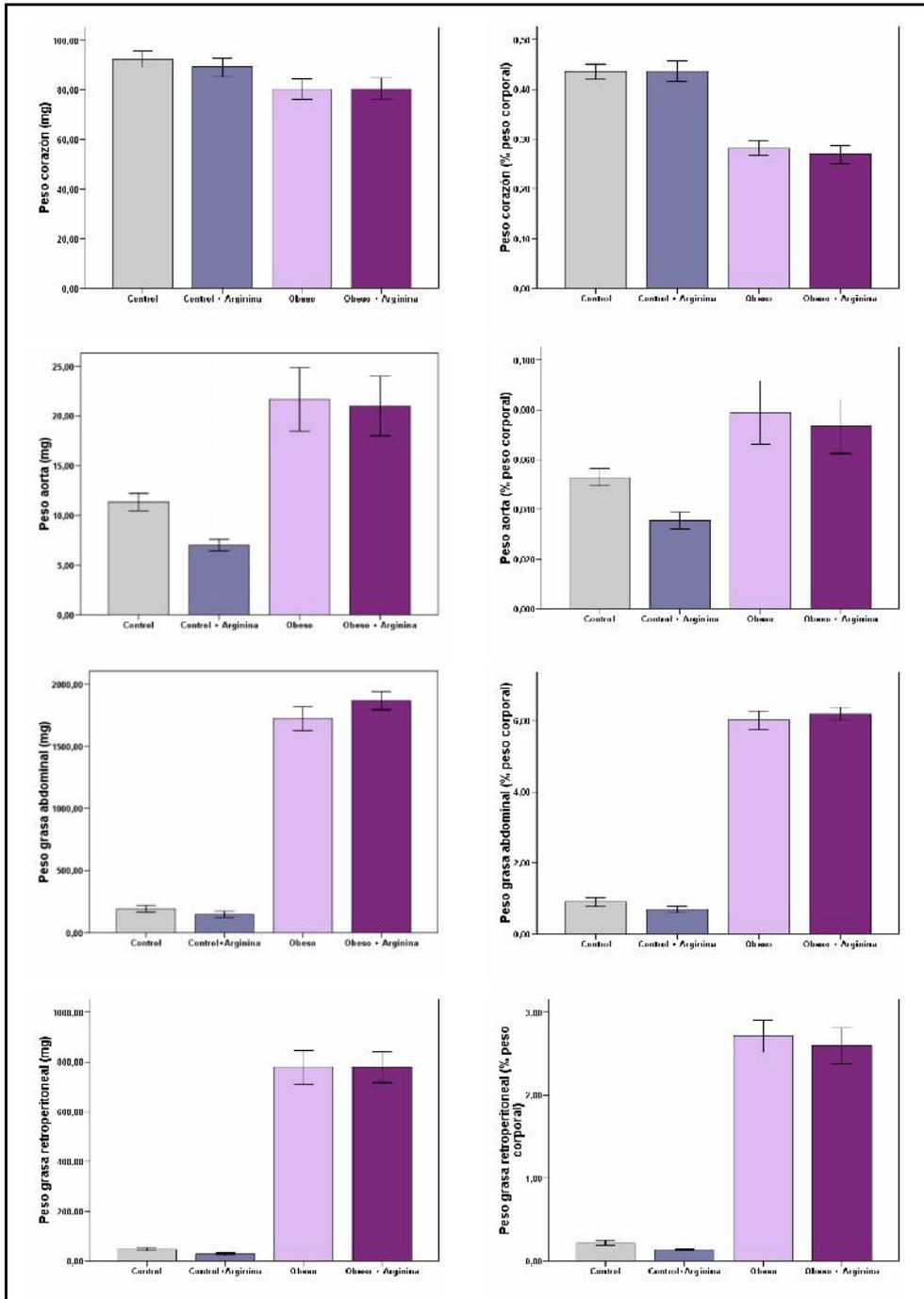


Figura 4.2 (Continuación). Peso absoluto y porcentaje respecto al peso corporal de diferentes órganos de los grupos control (lean), control + arginina, obeso (ob/ob), obeso + arginina. Los datos están indicados como media  $\pm$  error estándar de la media (ESM; n=15)

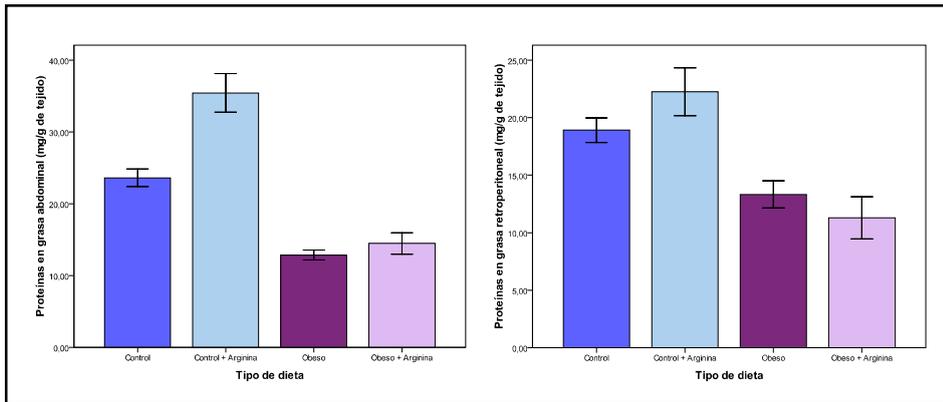
Como cabría esperar, la cantidad de tejido graso, tanto abdominal como retroperitoneal, de los ratones ob/ob es significativamente muy superior a la de sus controles lean, llegando a representar la suma de ambos tejidos cerca del 10% del peso corporal. Resaltar que el suministro de arginina redujo de forma apreciable (aunque en nuestro estudio no alcanzó significación estadística probablemente como consecuencia del tamaño muestral; N=15) el peso absoluto y porcentual de ambos tejidos grasos en los ratones lean, efecto que no se observa en los ratones obesos.

En relación al resto de tejidos analizados destacar que el peso del hígado, al igual que la aorta, presenta una elevación significativa tanto en valor absoluto como porcentual en los ratones ob/ob respecto a los lean. Sin embargo, a diferencia de la aorta, no se observan efectos atribuibles a la suplementación con arginina.

Por lo que se refiere al contenido proteico (Tabla 4.3), nuestros resultados no muestran diferencias significativas entre grupos experimentales para corazón, riñón, testículos y músculo. Sin embargo en hígado, páncreas, aorta y, principalmente, en los dos tejidos grasos analizados, los niveles de proteínas son sensible y significativamente más bajos en los grupos obesos que en los controles.

Proteínas (mg/g tejido)	Lean	Lean+Arg	Obeso	Obeso+Arg	ANOVA
Hígado	278±10 <sup>a</sup>	262±9 <sup>a,b</sup>	234±15 <sup>b,c</sup>	212±9 <sup>c</sup>	0,001
Riñón	158±7	161±3	145±5	151±3	ns
Testículos	84±5	90±5	84±2	85±5	ns
Páncreas	170±8 <sup>a</sup>	163±8 <sup>a</sup>	137±9 <sup>b</sup>	129±9 <sup>b</sup>	0,004
Músculo	110±6	120±8	99±8	103±10	ns
Corazón	175±10	178±13	168±10	173±11	ns
Aorta	102±9 <sup>a</sup>	99±7 <sup>a</sup>	62±5 <sup>b</sup>	74±4 <sup>b</sup>	0,008
Grasa abdominal	23,6±1,3 <sup>b</sup>	35,4±2,7 <sup>a</sup>	12,9±0,7 <sup>c</sup>	14,5±1,5 <sup>c</sup>	<0,001
Grasa retroperitoneal	18,9±1,1 <sup>a</sup>	22,3±2,1 <sup>a</sup>	13,3±1,2 <sup>b</sup>	11,3±1,8 <sup>b</sup>	<0,001

**Tabla 4.3. Contenido proteico de de los diferentes órganos de estudio en ratones lean y ob/ob. Efecto de la suplementación con arginina.** Los datos están indicados como media ± error estándar de la media (ESM; n=15). Letras minúsculas diferentes indican diferencias mínimas significativas entre los grupos, con p<0,05.



**Figura 4.3.** Niveles de proteínas totales en grasa abdominal y retroperitoneal de los grupos control (lean), control+arginina, obeso (ob/ob) y obeso+arginina. Los datos están indicados como media  $\pm$  error estándar de la media (ESM; n=15).

La suplementación con arginina no tuvo efectos significativos sobre el contenido proteico de los órganos y tejidos incluidos en este estudio, a excepción de los tejidos grasos de los ratones lean. En este grupo, tanto en grasa abdominal como retroperitoneal (Figura 4.3), la arginina incrementó sensiblemente el contenido proteico, alcanzando la elevación significación estadística en grasa abdominal.

## 4.2. METABOLISMO DE LA ARGININA: EFECTO DE SU SUPLEMENTACIÓN.

### 4.2.1. Producción de óxido nítrico: niveles de nitrato.

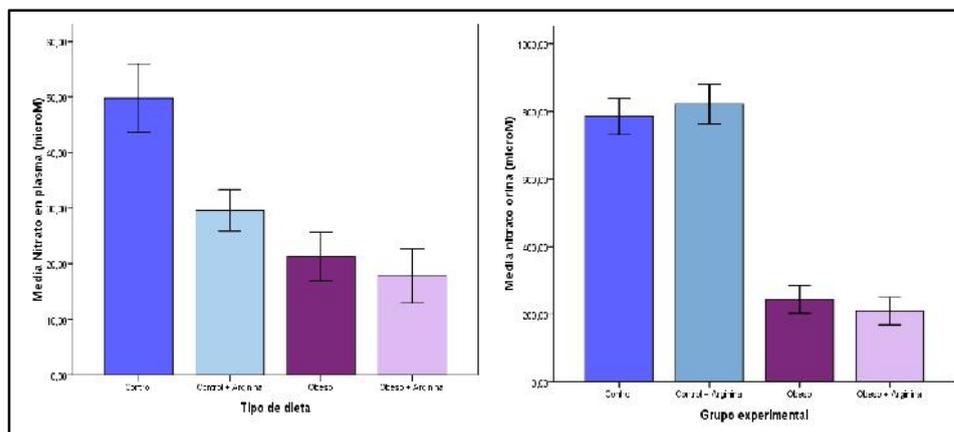
La Tabla 4.4 y la Figura 4.4 resumen las características de los ratones lean y ob/ob respecto a los parámetros analizados en relación al metabolismo de la arginina, concretamente, a la valoración de la síntesis de óxido nítrico (NO), evaluada en nuestro estudio por los niveles plasmáticos y urinarios de nitrato.

Respecto a los niveles plasmáticos de nitrato, nuestros resultados muestran valores significativamente más elevados en los ratones lean que en los ob/ob. Se observa, además, que la administración oral de arginina reduce sensiblemente éstos niveles, alcanzando la reducción significación estadística sólo en el caso del grupo control (ratones lean).

La menor síntesis de NO en los ratones ob/ob que en los lean se confirma cuando se determina la excreción total de nitrato por la orina en el periodo de experimentación. Sin embargo, a diferencia de lo observado en plasma, no se constatan diferencias atribuibles a la suplementación con arginina.

	Lean	Lean+Arg	Obeso	Obeso+Arg	ANOVA
Nitrato plasmático ( $\mu\text{M}$ )	49,81 $\pm$ 6,13 <sup>a</sup>	29,61 $\pm$ 3,76 <sup>b</sup>	21,33 $\pm$ 4,37 <sup>b</sup>	17,85 $\pm$ 4,90 <sup>b</sup>	<0,001
Nitrato urinario ( $\mu\text{M}$ )	785 $\pm$ 54 <sup>a</sup>	822 $\pm$ 59 <sup>a</sup>	244 $\pm$ 41 <sup>b</sup>	210 $\pm$ 40 <sup>b</sup>	<0,001
Nitrato urinario ( $\mu\text{moles /ratón y día}$ )	2,22 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>	2,30 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	0,76 $\pm$ 0,14 <sup>b</sup>	0,81 $\pm$ 0,22 <sup>b</sup>	<0,001

**Tabla 4.4: Niveles plasmáticos y urinarios de nitrato al final del periodo experimental.** Los datos están indicados como media  $\pm$  error estándar de la media (ESM; plasma n=15; orina n=25). Letras minúsculas diferentes indican diferencias mínimas significativas entre los grupos, con  $p < 0,05$ .



**Figura 4.4. Niveles plasmáticos y urinarios de nitrato de los grupos control (lean), control+arginina, obeso (ob/ob) y obeso+arginina.** Los datos están indicados como media  $\pm$  error estándar de la media (ESM; n=15).

## 4.2.2. Estudio de los niveles de poliaminas.

### 4.2.2.1. Niveles de putrescina.

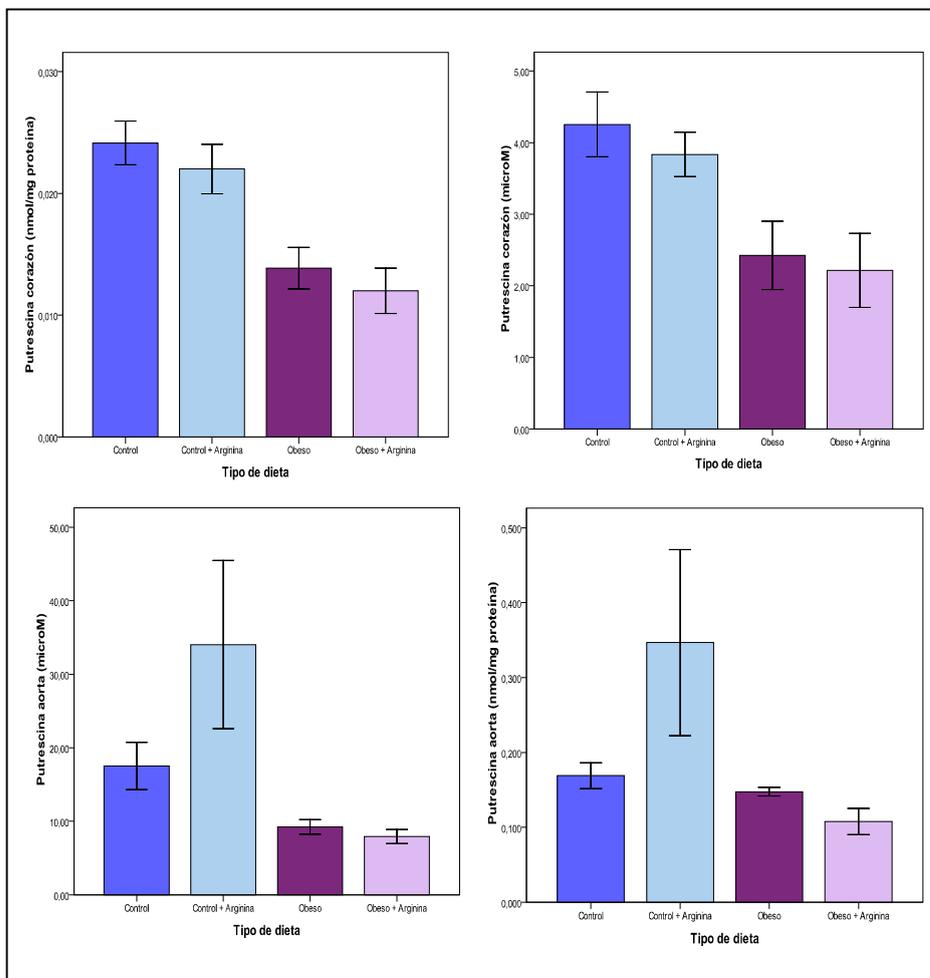
Los resultados de nuestras determinaciones de putrescina en los diferentes grupos experimentales se resumen en la Tabla 4.5. En ella sólo se incluyen los datos obtenidos en sangre, corazón y aorta ya que los niveles de putrescina tanto en grasa abdominal como retroperitoneal fueron indetectables con nuestro procedimiento experimental (límite de detección 1  $\mu\text{M}$ ).

PUTRESCINA	Lean	Lean+Arg	Obeso	Obeso+Arg	ANOVA
Sangre ( $\mu\text{M}$ )	1,33 $\pm$ 0,07	1,62 $\pm$ 0,11	1,47 $\pm$ 0,12	1,51 $\pm$ 0,16	ns
Corazón ( $\mu\text{M}$ )	4,25 $\pm$ 0,45 <sup>a</sup>	3,84 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup>	2,43 $\pm$ 0,48 <sup>b</sup>	2,22 $\pm$ 0,52 <sup>b</sup>	0,006
Corazón (nmol/mg proteína)	0,024 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	0,022 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	0,014 $\pm$ 0,002 <sup>b</sup>	0,012 $\pm$ 0,002 <sup>b</sup>	<0,001
Aorta ( $\mu\text{M}$ )	17,54 $\pm$ 3,20 <sup>a</sup>	34,02 $\pm$ 11,44 <sup>b</sup>	9,23 $\pm$ 1,00 <sup>c</sup>	7,94 $\pm$ 0,96 <sup>c</sup>	0,01
Aorta (nmol/mg proteína)	0,17 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,35 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>	0,15 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	0,11 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	0,01

**Tabla 4.5. Niveles de putrescina en sangre, corazón y aorta de ratones lean y ob/ob. Efecto de la suplementación con arginina.** Los datos están indicados como media  $\pm$  error estándar de la media (ESM; n=15). Letras minúsculas diferentes indican diferencias mínimas significativas entre los grupos, con  $p < 0,05$ .

Como puede observarse, los niveles de esta poliamina en sangre no difieren entre los cuatro grupos experimentales estudiados. Sin embargo, tanto en corazón como en aorta (Tabla 4.5 y Figura 4.5), los niveles de putrescina (independientemente de que se expresen como concentraciones absolutas o por mg de proteína) son significativamente más bajos en los grupos obesos que en los controles. La administración de arginina tiene efectos diferentes en función del tejido y grupo experimental considerado. Así, los niveles cardiacos de putrescina de ambos tipos de ratones (lean y ob/ob) no se modifican significativamente por la ingesta de arginina. El mismo efecto se observa para los ratones

ob/ob a nivel de aorta. Por el contrario, los niveles de putrescina en aorta se elevan significativamente cuando se suministra arginina al grupo control



**Figura 4.5. Niveles de putrescina en corazón y aorta de los grupos control (lean), control+arginina, obeso (ob/ob) y obeso+arginina.** Los datos están indicados como media  $\pm$  error estándar de la media (ESM; n=15).

#### 4.2.2.2. Niveles de espermidina.

La Tabla 4.6 y la Figura 4.6 resumen los resultados de las determinaciones de espermidina en los diferentes grupos experimentales. A diferencia de lo mencionado para la putrescina, los niveles de espermidina (y espermina; las dos poliaminas más abundantes)

han podido ser determinados en todos los órganos y tejidos de este estudio, incluidos los tejidos grasos.

ESPERMIDINA	Lean	Lean+Arg	Obeso	Obeso+Arg	ANOVA
Sangre ( $\mu\text{M}$ )	39,9 $\pm$ 1,9	38,9 $\pm$ 2,3	35,1 $\pm$ 2,0	34,9 $\pm$ 2,2	ns
Corazón ( $\mu\text{M}$ )	166 $\pm$ 14 <sup>a</sup>	185 $\pm$ 19 <sup>a</sup>	104 $\pm$ 15 <sup>b</sup>	112 $\pm$ 10 <sup>b</sup>	0.001
Corazón (nmol/mg proteína)	0.94 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	1.03 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.60 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	0.65 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	<0.001
Aorta ( $\mu\text{M}$ )	237 $\pm$ 44 <sup>a</sup>	253 $\pm$ 53 <sup>a</sup>	93 $\pm$ 1 <sup>b</sup>	138 $\pm$ 9 <sup>c</sup>	0.032
Aorta (nmol/mg proteína)	2.29 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>	2.52 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	1.51 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	1.86 $\pm$ 0.08 <sup>c</sup>	0.032
Grasa abdominal ( $\mu\text{M}$ )	56 $\pm$ 9 <sup>a</sup>	76 $\pm$ 11 <sup>a</sup>	19 $\pm$ 2 <sup>b</sup>	19 $\pm$ 2 <sup>b</sup>	<0.001
GA (nmol/mg proteína)	1.64 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	1.70 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	2.81 $\pm$ 0.31 <sup>b</sup>	2.98 $\pm$ 0.26 <sup>b</sup>	<0.001
Grasa retroperitoneal ( $\mu\text{M}$ )	72 $\pm$ 8 <sup>a</sup>	80 $\pm$ 9 <sup>a</sup>	24 $\pm$ 1 <sup>b</sup>	26 $\pm$ 2 <sup>b</sup>	<0.001
GR (nmol/mg proteína)	1.53 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	1.24 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	2.17 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	2.07 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	<0.001

**Tabla 4.6. Niveles de espermidina en sangre, corazón, aorta, grasa abdominal (GA) y grasa retroperitoneal (GR) de ratones lean y ob/ob. Efecto de la suplementación con arginina.** Los datos están indicados como media  $\pm$  error estándar de la media (ESM; n=15). Letras minúsculas diferentes indican diferencias mínimas significativas entre los grupos, con  $p < 0,05$ .

Los resultados para la espermidina en sangre, corazón y aorta son muy similares a los descritos para la putrescina. En sangre no se observan diferencias significativas entre los grupos de estudio y, en ambos tejidos, los niveles son significativamente más bajos en los ratones ob/ob, siendo la diferencia más acusada en aorta. La suplementación de arginina eleva ligeramente los niveles de espermidina en ratones control, ampliándose el efecto (diferencias significativas) al grupo obeso cuando el tejido es aorta

También en grasa abdominal y retroperitoneal los niveles de espermidina en ratones ob/ob son muy inferiores a los del control, y sólo en este último grupo se ven ligeramente afectados por la suplementación con arginina. Sin embargo, como ya hemos indicado (véase apartado 4.1.2.), la concentración de proteínas en el tejido graso (tanto abdominal como retroabdominal), además de ser muy inferior a la de corazón y aorta, se reduce drásticamente en los ratones ob/ob. Por ello, al expresar los niveles de espermidina en

función de la concentración proteica, se observan valores significativamente más altos en los ratones obesos que en los controles.

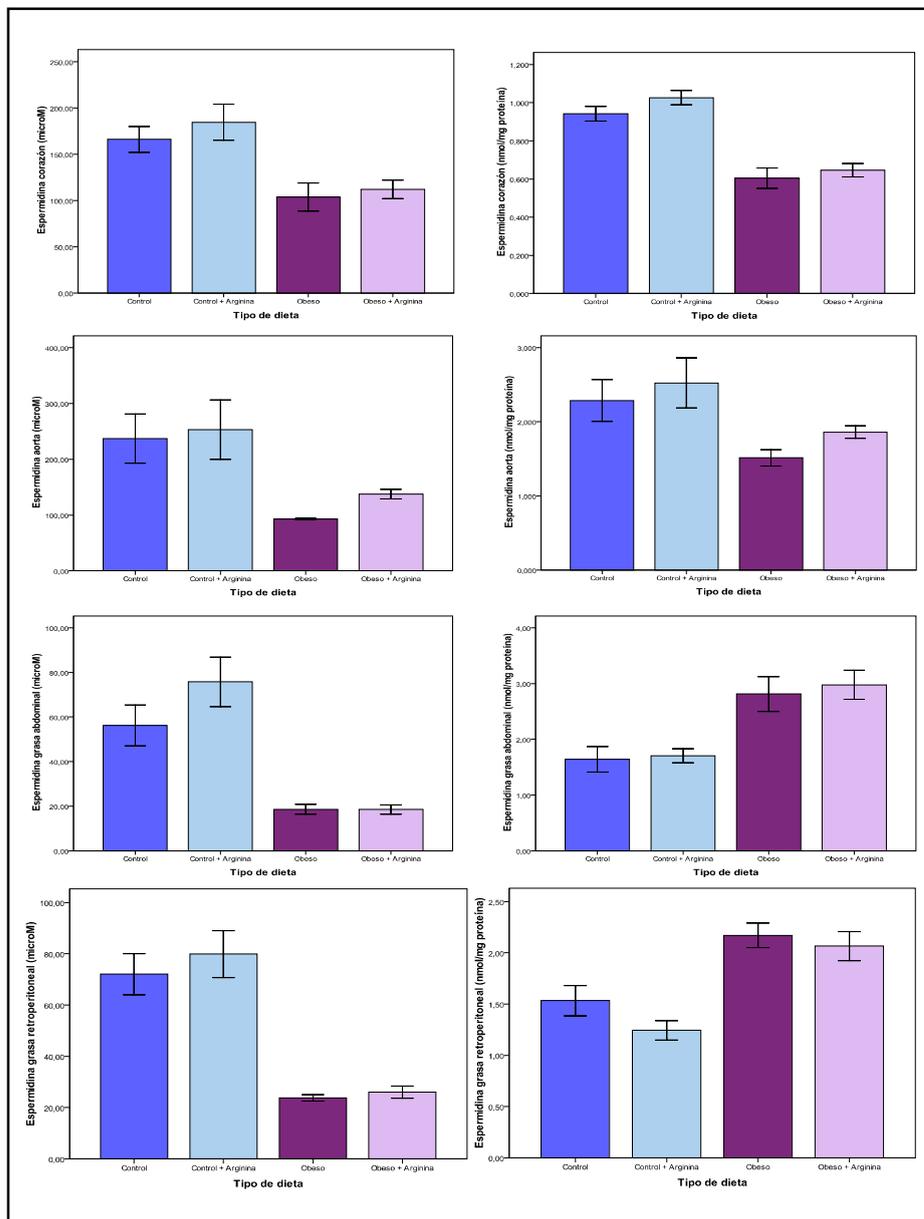


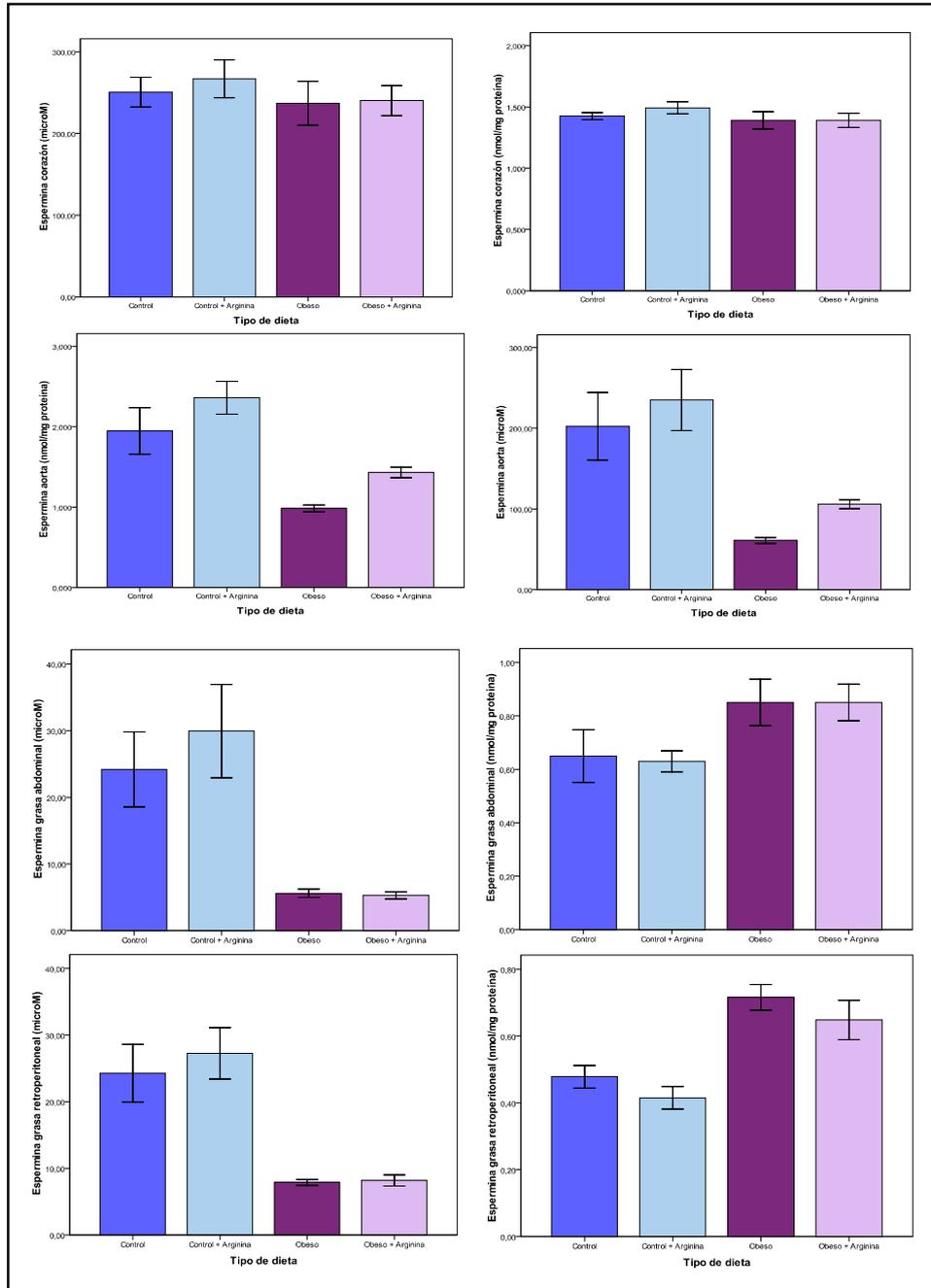
Figura 4.6. Niveles de espermidina en corazón, aorta, grasa abdominal y grasa retroperitoneal de los grupos control (lean), control arginina, obeso (ob/ob) y obeso+arginina. Los datos están indicados como media  $\pm$  error estándar de la media (ESM; n=15).

#### 4.2.2.3. Niveles de espermina.

Por lo que respecta a los niveles de espermina nuestros resultados muestran (Tabla 4.7 y Figura 4.7) para esta poliamina un comportamiento idéntico al de la espermidina en aorta, grasa abdominal y grasa retroperitoneal: disminución significativa en el grupo obeso cuando su concentración se expresa de forma absoluta ( $\mu\text{M}$ ) y ligera elevación de sus niveles por la suplementación de arginina en ratones lean que se amplía a los ratones obesos en el caso de la aorta (elevación significativa). Sin embargo, a diferencia de la espermidina, los niveles de espermina en corazón no difieren entre los cuatro grupos experimentales de nuestro estudio. Por el contrario, los niveles sanguíneos de espermina se encuentran significativamente elevados en los grupos obesos respecto a los lean, sin que se evidencien efectos por la administración de arginina en ninguno de los grupos.

ESPERMINA	Lean	Lean+Arg	Obeso	Obeso+Arg	ANOVA
Sangre ( $\mu\text{M}$ )	4,10 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>	4,10 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup>	5,54 $\pm$ 0,46 <sup>b</sup>	6,11 $\pm$ 0,70 <sup>b</sup>	0,004
Corazón ( $\mu\text{M}$ )	251 $\pm$ 18	267 $\pm$ 23	237 $\pm$ 27	240 $\pm$ 19	ns
Corazón (nmol/mg proteína)	1,43 $\pm$ 0,03	1,49 $\pm$ 0,05	1,39 $\pm$ 0,07	1,39 $\pm$ 0,06	ns
Aorta ( $\mu\text{M}$ )	202 $\pm$ 42 <sup>a</sup>	235 $\pm$ 38 <sup>a</sup>	61 $\pm$ 4 <sup>b</sup>	106 $\pm$ 6 <sup>c</sup>	0,008
Aorta (nmol/mg proteína)	1,95 $\pm$ 0,29 <sup>a</sup>	2,36 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	0,98 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	1,43 $\pm$ 0,06 <sup>c</sup>	0,003
Grasa abdominal ( $\mu\text{M}$ )	24,17 $\pm$ 5,61 <sup>a</sup>	29,92 $\pm$ 7,00 <sup>a</sup>	5,60 $\pm$ 0,62 <sup>b</sup>	5,30 $\pm$ 0,53 <sup>b</sup>	0,006
GA (nmol/mg proteína)	0,65 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	0,63 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,850 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	0,85 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	0,05
Grasa retroperitoneal ( $\mu\text{M}$ )	24,29 $\pm$ 4,32 <sup>a</sup>	27,27 $\pm$ 3,86 <sup>a</sup>	7,89 $\pm$ 0,45 <sup>b</sup>	8,16 $\pm$ 0,84 <sup>b</sup>	<0,001
GR (nmol/mg proteína)	0,48 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,42 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,72 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	0,65 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	<0,001

Tabla 4.7. Niveles de espermina en sangre, corazón, aorta, grasa abdominal (GA) y grasa retroperitoneal (GR) de ratones lean y ob/ob. Efecto de la suplementación con arginina. Los datos están indicados como media  $\pm$  error estándar de la media (ESM; n=15). Letras minúsculas diferentes indican diferencias mínimas significativas entre los grupos, con  $p < 0,05$ .



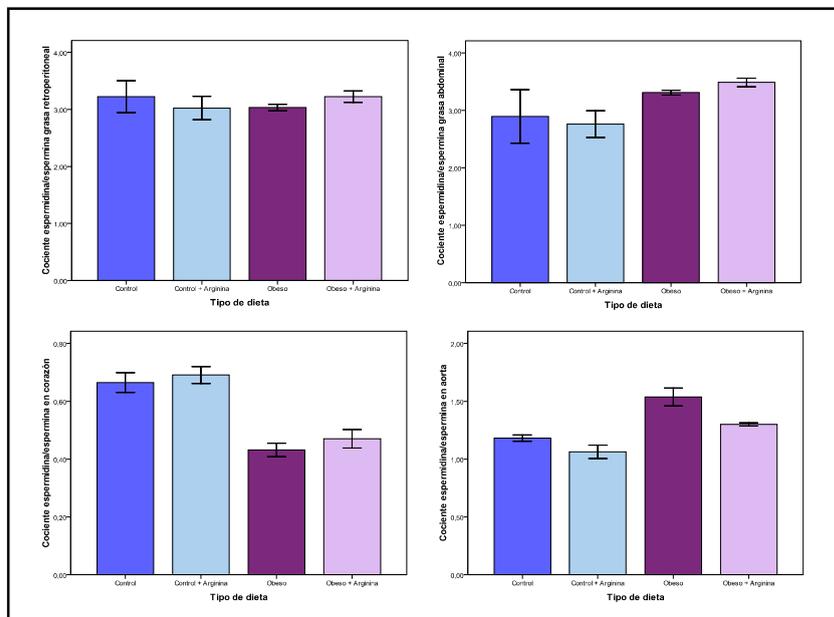
**Figura 4.7. Niveles de espermina en corazón, aorta, grasa abdominal y grasa retroperitoneal de los grupos control (lean), control+arginina, obeso (ob/ob) y obeso+arginina. Los datos están indicados como media  $\pm$  error estándar de la media (ESM; n=15).**

#### 4.2.2.4. Cociente espermidina/espermina

El cociente espermidina/espermina es considerado un índice de hiperplasia y proliferación celular. El análisis de este cociente en los órganos y tejidos de nuestro estudio muestra (Tabla 4.8 y Figura 4.8) importantes diferencias de comportamiento.

ESPERMIDINA/ESPERMINA	Lean	Lean +Arg	Obeso	Obeso+Arg	ANOVA
Sangre	9,86±0,42 <sup>a</sup>	9,93±0,61 <sup>a</sup>	6,70±0,40 <sup>b</sup>	6,21±0,50 <sup>b</sup>	<0,001
Corazón	0,67±0,03 <sup>a</sup>	0,69±0,03 <sup>a</sup>	0,43±0,02 <sup>b</sup>	0,47±0,03 <sup>b</sup>	<0,001
Aorta	1,18±0,03 <sup>a</sup>	1,06±0,06 <sup>a</sup>	1,54±0,08 <sup>b</sup>	1,30±0,01 <sup>c</sup>	0,001
Grasa abdominal	2,89±0,47	2,76±0,23	3,31±0,04	3,49±0,07	ns
Grasa retroperitoneal	3,22±0,28	3,03±0,21	3,04±0,06	3,22±0,10	ns

**Tabla 4.8. Cociente espermidina/espermina en sangre, corazón, aorta, grasa abdominal y grasa retroperitoneal de ratones lean y ob/ob. Efecto de la suplementación con arginina.** Los datos están indicados como media ± error estándar de la media (ESM; n=15). Letras minúsculas diferentes indican diferencias mínimas significativas entre los grupos, con p<0,05.



**Figura 4.8. Cociente espermidina/espermina en corazón, aorta, grasa abdominal y grasa retroperitoneal de los grupos control (lean), control+ arginina, obeso (ob/ob) y obeso+ arginina.** Los datos están indicados como media ± error estándar de la media (ESM; n=15).

El grupo obeso presenta, respecto al control lean, una disminución significativa del cociente espermidina/espermina en sangre y corazón junto con una elevación en aorta. En este último tejido, la suplementación de arginina disminuye significativamente el cociente, aunque sin restaurar completamente los valores del grupo control. Por lo que respecta a los tejidos grasos, no se observan diferencias significativas en la relación espermidina/espermina entre los cuatro grupos experimentales en grasa abdominal ni retroperitoneal. A fines comparativos, los niveles de este cociente (y de las tres poliaminas) en sangre se resumen en la Figura 4.9.

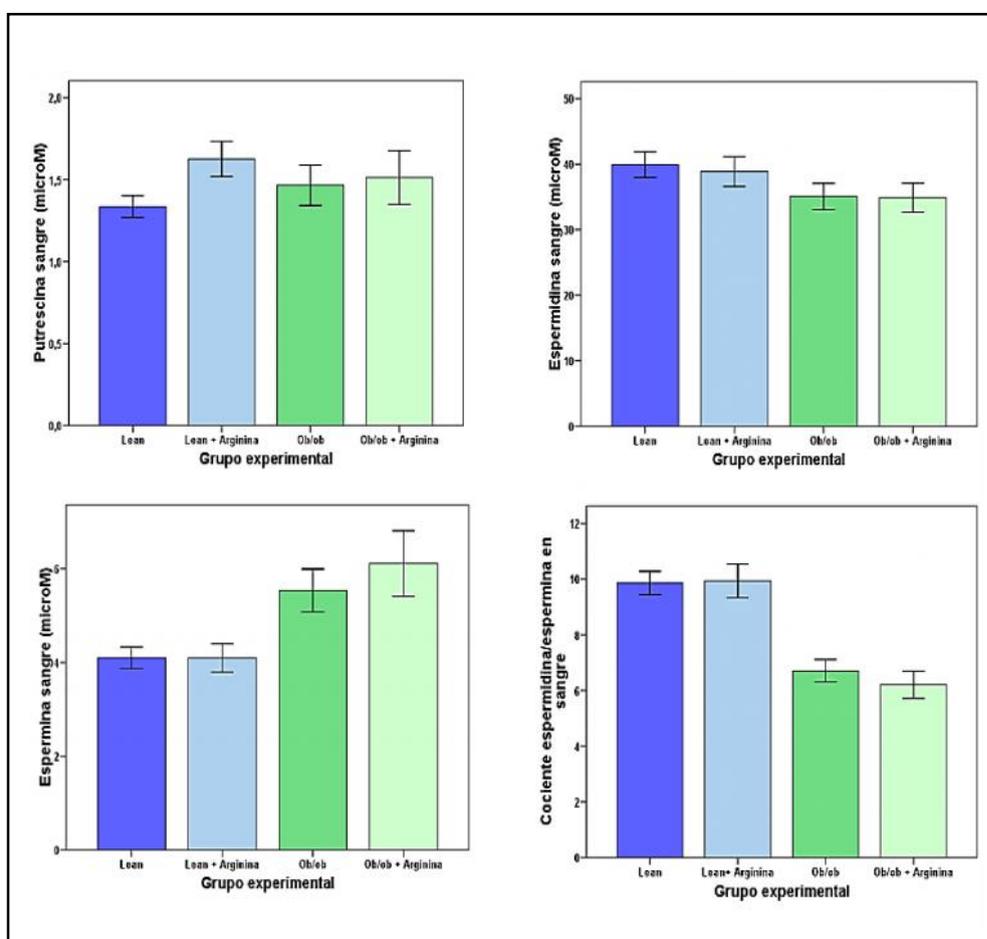


Figura 4.9. Niveles sanguíneos de poliaminas y cociente espermidina/espermina de los grupos control (lean), control+ arginina, obeso (ob/ob) y obeso+ arginina. Los datos están indicados como media  $\pm$  error estándar de la media (ESM;  $n=15$ ).

### 4.3. DAÑO OXIDATIVO: EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE ARGININA.

#### 4.3.1. Indicadores de peroxidación lipídica.

Como ya se comentó en el apartado de Material y Métodos, los indicadores de peroxidación lipídica evaluados en nuestro estudio han sido el MDA plasmático y TBARM e isoprostanos en plasma y orina. A nivel de órganos y tejidos, por cuestiones prácticas, el parámetro estimado ha sido el TBARM. Los resultados de las determinaciones plasmáticas y/o urinarias de los parámetros indicados se resumen en la Tabla 4.9 y en las Figuras 4.10. y 4.11.

	Lean	Lean+Arg	Obeso	Obeso+Arg	ANOVA
TBARM plasma ( $\mu\text{M}$ )	54,2 $\pm$ 2,0	57,7 $\pm$ 2,0	58,2 $\pm$ 2,5	58,9 $\pm$ 4,0	ns
TBARM orina ( $\mu\text{M}$ )	39,5 $\pm$ 3,6 <sup>b</sup>	30,3 $\pm$ 2,5 <sup>b</sup>	42,7 $\pm$ 4,8 <sup>b</sup>	56,1 $\pm$ 6,6 <sup>a</sup>	0,002
TBARM orina (nmol/ratón día)	113 $\pm$ 10 <sup>b,c</sup>	83 $\pm$ 6 <sup>c</sup>	126 $\pm$ 17 <sup>b</sup>	173 $\pm$ 22 <sup>a</sup>	0,001
MDA plasma ( $\mu\text{M}$ )	16,1 $\pm$ 1,6 <sup>b</sup>	12,4 $\pm$ 1,7 <sup>c</sup>	21,6 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	9,5 $\pm$ 0,3 <sup>c</sup>	<0,0001
Isoprostanos plasma (ng/mL)	1,23 $\pm$ 0,28 <sup>b</sup>	1,07 $\pm$ 0,20 <sup>b</sup>	3,89 $\pm$ 1,41 <sup>a,b</sup>	6,56 $\pm$ 2,94 <sup>a</sup>	0,014
Isoprostanos orina (ng/mL)	1,93 $\pm$ 0,22 <sup>b</sup>	1,76 $\pm$ 0,18 <sup>b</sup>	3,37 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>	3,05 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>	<0,0001
Isoprostanos orina (ng/ratón día)	5,61 $\pm$ 0,58 <sup>b</sup>	4,93 $\pm$ 0,44 <sup>b</sup>	9,46 $\pm$ 0,68 <sup>a</sup>	9,98 $\pm$ 0,87 <sup>a</sup>	<0,0001

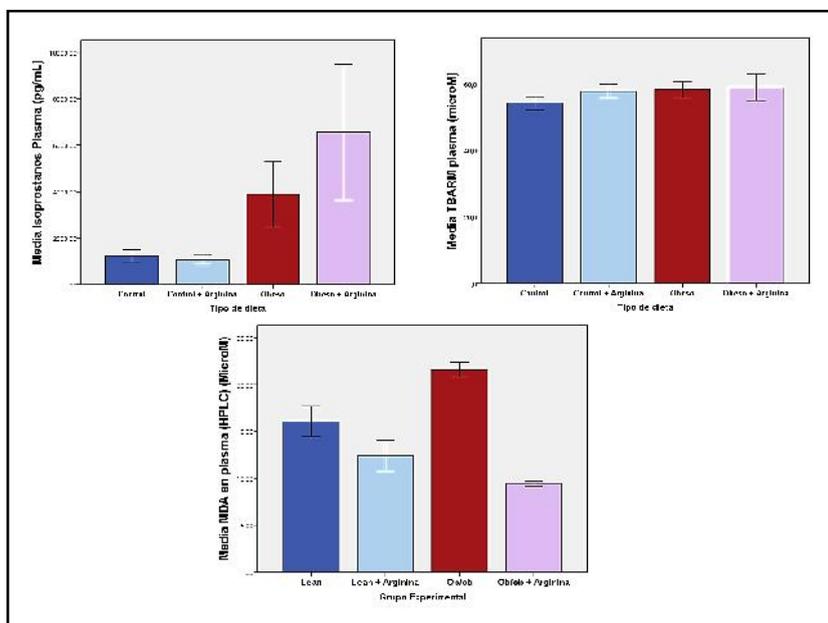
**Tabla 4.9. Niveles de indicadores de peroxidación lipídica en plasma y orina de ratones lean y ob/ob. Efecto de la suplementación con arginina.** Los datos están indicados como media  $\pm$  error estándar de la media (ESM;  $n \geq 15$ ). Letras minúsculas diferentes indican diferencias mínimas significativas entre los grupos, con  $p < 0,05$ .

Respecto a los valores de TBARM en plasma no se observan diferencias significativas entre los distintos grupos. Por lo que hace referencia al TBARM en orina, nuestros resultados sólo muestran una tendencia al alza en los grupos obesos que alcanza significación estadística con la administración de arginina. Por el contrario, la ingesta de arginina reduce sensiblemente la excreción urinaria de TBARM del grupo lean. Indicar que los valores reseñados han sido adecuadamente corregidos atendiendo a la glucosuria del grupo obeso y que interfiere en el procedimiento colorimétrico utilizado en la valoración del TBARM.

A diferencia de lo observado para el TBARM, los niveles de MDA determinado específicamente por HPLC se elevan clara y significativamente en el grupo obeso respecto al control lean y, en ambos grupos, se reducen significativamente con la suplementación de arginina.

Al igual que el MDA, los niveles de 8-isoprostanos en plasma y orina son significativamente más altos en los grupos obesos que en los controles lean. Sin embargo, la administración de arginina sólo redujo ligeramente los niveles de este marcador en el grupo lean. En el grupo obeso, la arginina no tuvo efecto sobre los niveles urinarios de 8-isoprostanos, mientras que los elevó sensiblemente a nivel plasmático.

Resaltar la excelente correlación entre los niveles plasmáticos y urinarios de cada uno de los parámetros, y de los diferentes indicadores entre sí. Igualmente, la correlación inversa entre niveles plasmáticos y urinarios de nitrato (severamente disminuida en el grupo obeso) con los indicadores evaluados de daño oxidativo resulta significativa y evidente en todos los casos (datos no mostrados).



**Figura 4.10. Niveles plasmáticos de TBARM, MDA e isoprostanos de los grupos control (lean), control+arginina, obeso (ob/ob) y obeso+arginina.** Los datos están indicados como media  $\pm$  error estándar de la media (ESM; n=15).

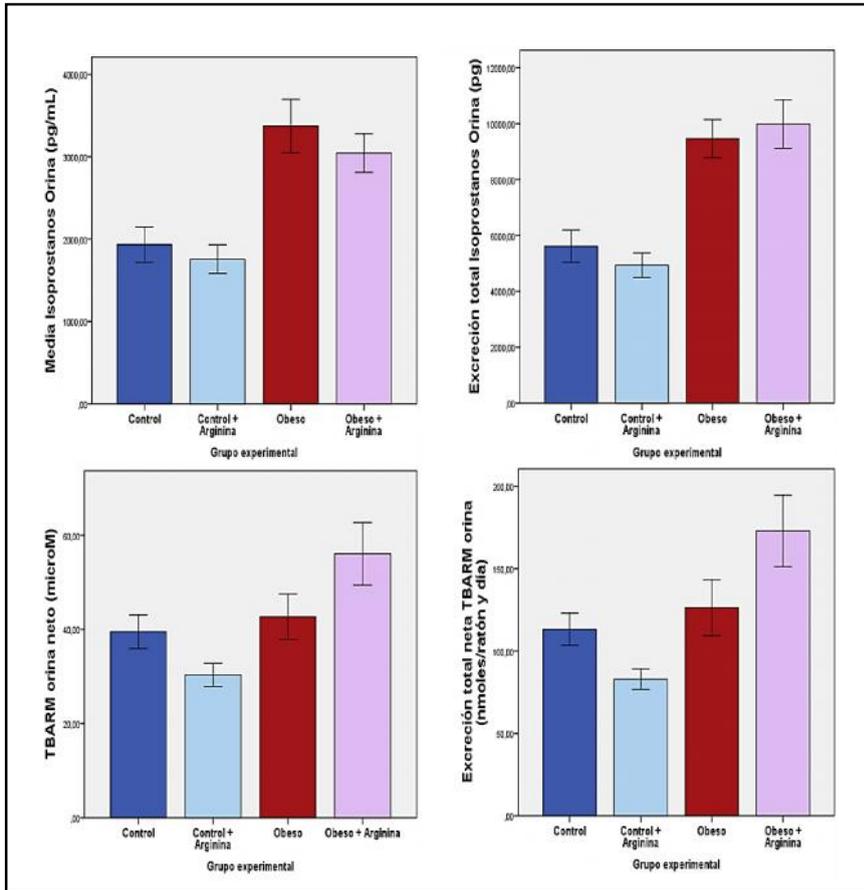


Figura 4.11. Niveles urinarios de TBARM e isoprostanos de los grupos control (lean), control+arginina, obeso (ob/ob) y obeso+arginina. Los datos están indicados como media  $\pm$  error estándar de la media (ESM;  $n \geq 15$ ).

Los resultados de las determinaciones de TBARM como indicador de peroxidación lipídica a nivel de órganos y tejidos se muestran en la en la Figura 4.12 y en la Tabla 4.10. Como puede observarse, únicamente se detectan diferencias significativas en hígado, páncreas y tejidos grasos. En todos ellos, los niveles de TBARM son significativamente inferiores en los grupos obesos que en los controles. Las diferencias reseñadas son independientes de que se exprese el nivel de TBARM en términos absolutos (por gramo de tejido) o relativos al contenido proteico (por mg de proteína) (Figura 4.12). El único efecto significativo de la arginina fue reducir los niveles de TBARM en páncreas de los ratones lean.

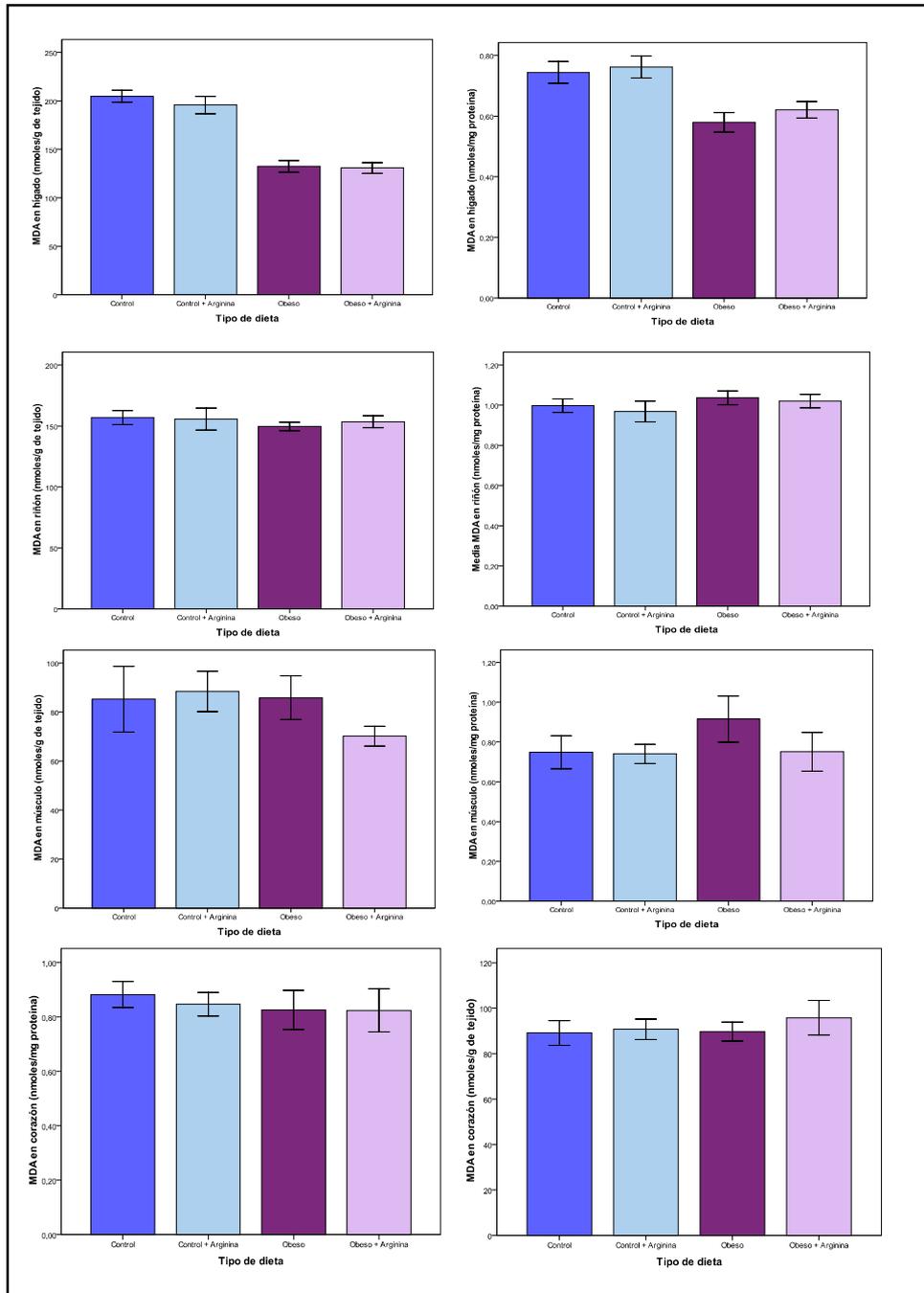


Figura 4.12. Niveles de TBARM en los distintos órganos y tejidos estudiados de los grupos control (lean), control+arginina, obeso (ob/ob) y obeso+arginina. Los datos están indicados como media  $\pm$  error estándar de la media (ESM; n=15).

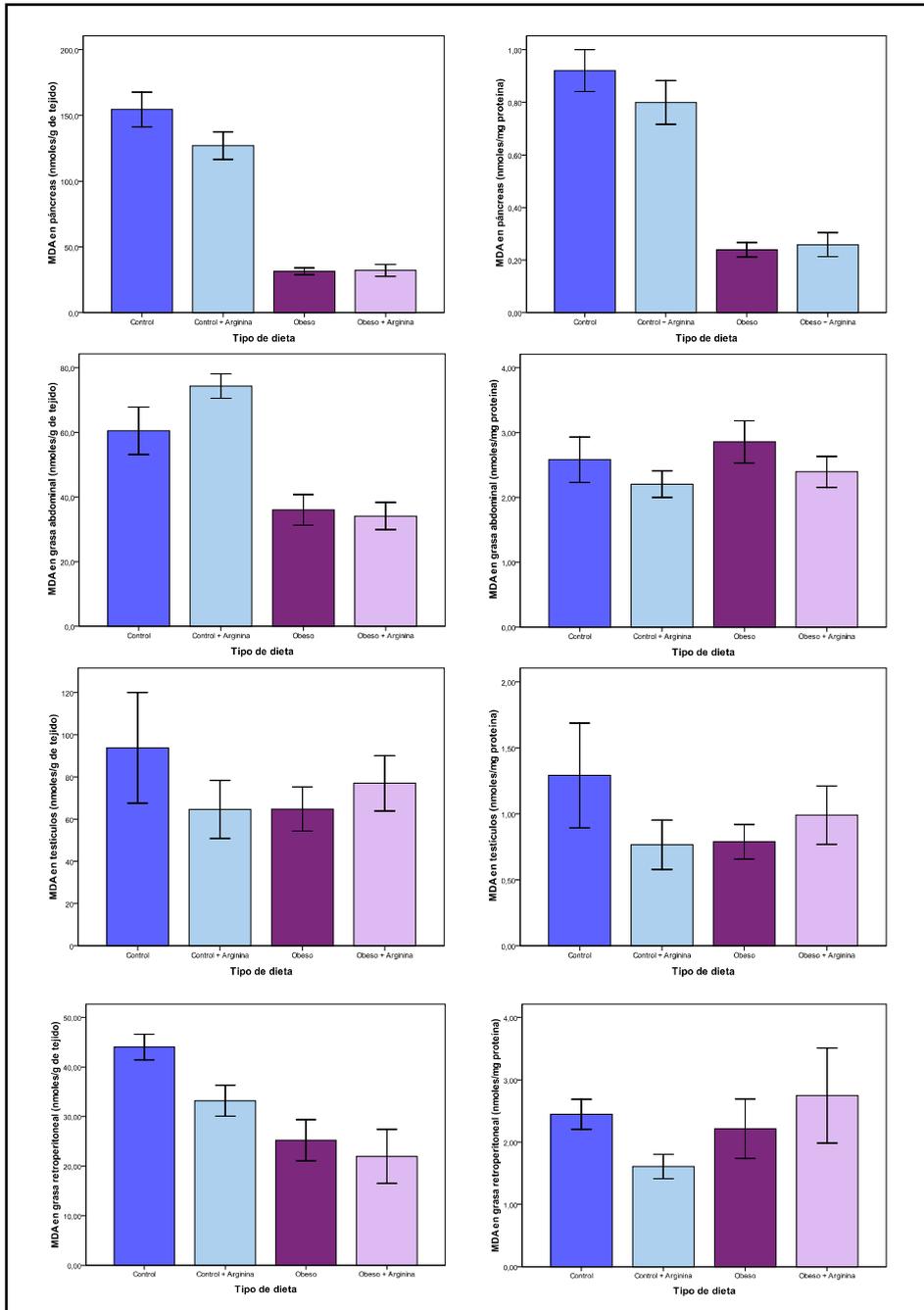


Figura 4.12. (Continuación) Niveles de TBARM en los distintos órganos y tejidos estudiados de los grupos control (lean), control+arginina, obeso (ob/ob) y obeso+arginina. Los datos están indicados como media  $\pm$  error estándar de la media (ESM; n=15).

TBARM (nmol/g tejido)	Lean	Lean+Arg	Obeso	Obeso+Arg	ANOVA
Hígado	204,8±6,1 <sup>a</sup>	195,7±9,0 <sup>a</sup>	132,5±6,0 <sup>b</sup>	130,78±5,4 <sup>b</sup>	<0,001
Riñón	156,9±5,76	155,7±9,03	149,7±3,49	153,6±4,82	ns
Músculo	85,20±13,4	88,4±8,2	85,8±8,9	70,11±4,0	ns
Corazón	89,10±5,48	90,70±4,52	89,70±4,19	95,78±7,58	ns
Páncreas	154,5±13,3 <sup>a</sup>	127,0±10,5 <sup>b</sup>	31,5±2,6 <sup>c</sup>	32,1±4,4 <sup>c</sup>	<0,001
Testículos	93,8±26,3	64,6±13,8	64,8±10,5	77,0±8,5	ns
Grasa abdominal	60,5±7,35 <sup>a</sup>	74,3±3,77 <sup>a</sup>	36,0±4,70 <sup>b</sup>	34,11±4,23 <sup>b</sup>	<0,001
Grasa retroperitoneal	44,01±2,57 <sup>a</sup>	33,18±9,90 <sup>a,b</sup>	25,22±4,17 <sup>b</sup>	21,96±5,45 <sup>b</sup>	0,002

**Tabla 4.10. Niveles de material reactivo con ácido tiobarbitúrico (TBARM) en los diferentes tejidos estudiados de ratones lean y ob/ob. Efecto de la suplementación con arginina.** Los datos están indicados como media ± error estándar de la media (ESM; n=15). Letras minúsculas diferentes indican diferencias mínimas significativas entre los grupos, con  $p < 0,05$ .

#### 4.3.2. Daño oxidativo a proteínas.

En nuestro estudio hemos determinado dos indicadores de oxidación global de las proteínas solubles en diferentes órganos y tejidos. Los niveles de productos avanzados de oxidación proteica (AOPPs; constituidos mayoritariamente por grupos carbonilo (CO)) y los grupos SH libres.

Los resultados obtenidos para los niveles de AOPPs en los ratones lean y ob/ob suplementados o no con arginina se resumen en la Tabla 4.11 y Figura 4.13. A pesar de la variabilidad individual observada, los datos obtenidos indican una tasa propia y característica de AOPPs por mg de proteína para cada órgano y tejido analizado. Esta tasa oscila entre los 0,5-5 nmoles en grasa abdominal, músculo y corazón, a los 10-15 nmoles de hígado y riñón, presentando el resto de órganos y tejidos valores intermedios.

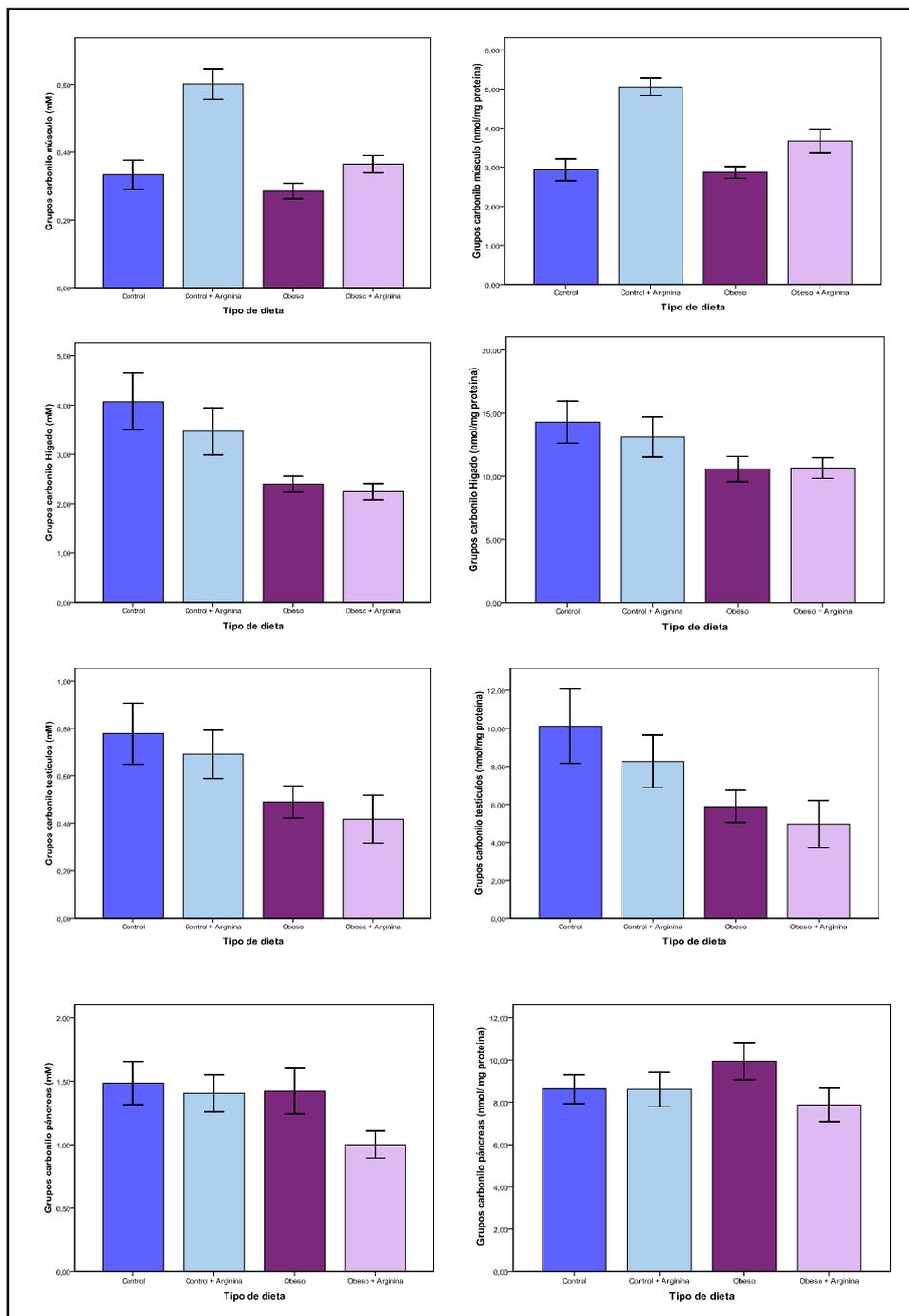
Los resultados obtenidos muestran escasas diferencias en los niveles de AOPPs entre los grupos lean y ob/ob, así como entre los suplementados o no con arginina. Sólo se

observan diferencias significativas para este parámetro de oxidación proteica en músculo, grasa abdominal e hígado, si bien en este último caso las diferencias se hacen no significativas al expresar los valores por mg de proteína. Destacar que, en hígado, los niveles de AOPPs son significativamente más bajos en los ratones ob/ob que en los controles lean. Un comportamiento similar, aunque sin significación estadística, se observa para testículos y grasa.

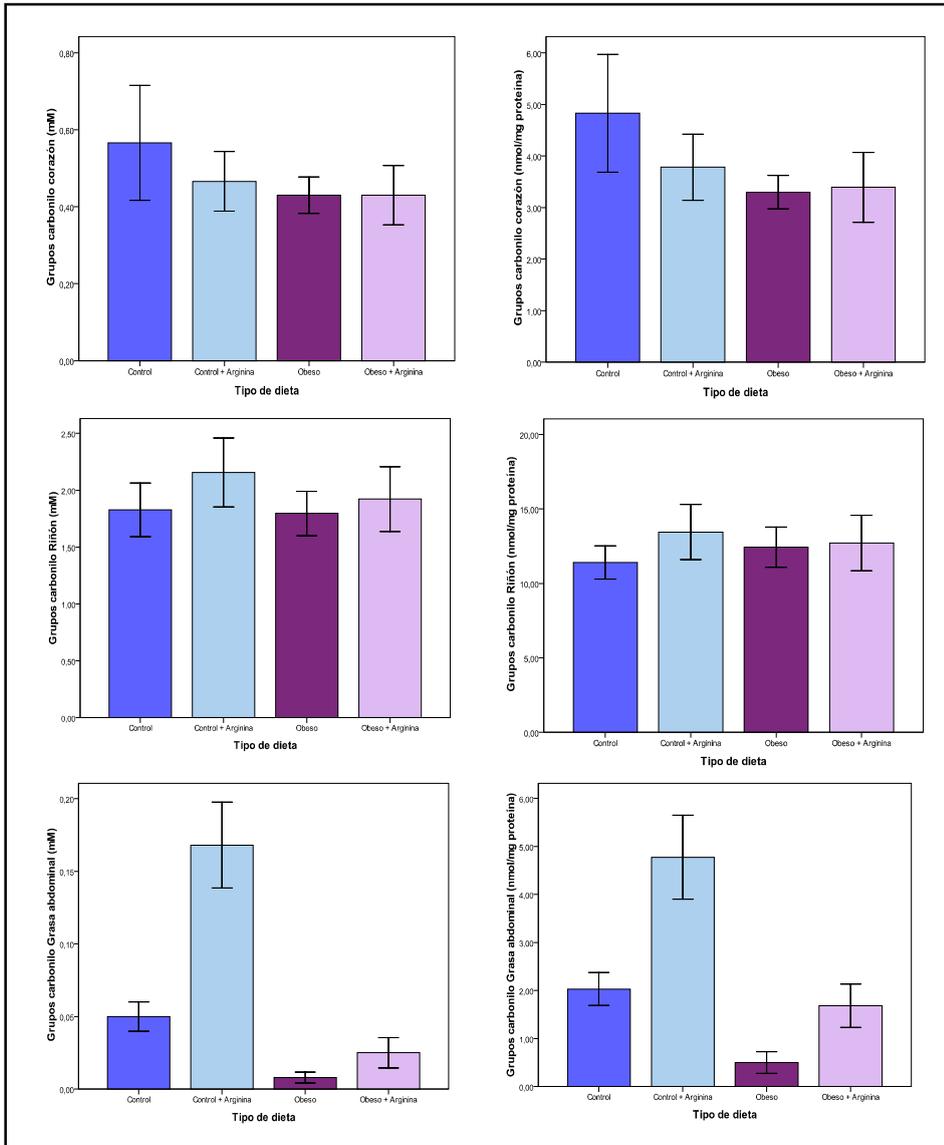
En general, la suplementación de arginina tuvo efectos escasos y variables según el órgano o tejido considerado. Sin embargo, cabe destacar que en músculo y grasa la administración de arginina elevó el grado de oxidación proteica (AOPPs) tanto en ratones lean como ob/ob, aunque sólo en el primero de estos grupos alcanzó significación estadística.

AOPPs	Lean	Lean+Arg	Obeso	Obeso+Arg	ANOVA
Hígado (mM)	4,07±0,57 <sup>a</sup>	3,47±0,48 <sup>a,b</sup>	2,40±0,16 <sup>b,c</sup>	2,24±0,17 <sup>c</sup>	0,006
Hígado (nmol/mg proteína)	14,30±1,66	13,11±1,59	10,58±1,00	10,67±0,81	ns
Riñón (mM)	1,83±0,24	2,16±0,30	1,80±0,19	1,92±0,12	ns
Riñón (nmol/mg proteína)	11,40±1,12	13,45±1,85	12,44±1,36	12,71±1,86	ns
Músculo (mM)	0,33±0,04 <sup>b</sup>	0,60±0,04 <sup>a</sup>	0,28±0,03 <sup>b</sup>	0,36±0,03 <sup>b</sup>	<0.001
Músculo (nmol/mg proteína)	2,93±0,28 <sup>c</sup>	5,06±0,23 <sup>a</sup>	2,87±0,15 <sup>c</sup>	3,67±0,31 <sup>b</sup>	<0.001
Corazón (mM)	0,57±0,15	0,47±0,08	0,43±0,05	0,43±0,08	ns
Corazón (nmol/mg proteína)	4,83±1,14	3,78±0,64	3,30±0,32	3,39±0,68	ns
Páncreas (mM)	1,49±0,17	1,40±0,15	1,42±0,18	1,00±0,11	ns
Páncreas (nmol/mg proteína)	8,62±0,68	8,61±0,81	9,94±0,88	7,88±0,79	ns
Testículos (mM)	0,78±0,13	0,69±0,10	0,49±0,07	0,42±0,10	ns
Testículos (nmol/mg proteína)	10,12±1,95	8,26±1,39	5,89±0,84	4,96±1,25	ns
Grasa abdominal (GA; mM)	0,05±0,01 <sup>b</sup>	0,17±0,03 <sup>a</sup>	0,01±0,003 <sup>b</sup>	0,02±0,01 <sup>b</sup>	<0.001
GA (nmol/mg proteína)	2,03±0,34 <sup>b</sup>	4,77±0,87 <sup>a</sup>	0,5±0,23 <sup>b</sup>	1,68±0,45 <sup>b</sup>	0,001

Tabla 4.11. Niveles de productos avanzados de oxidación proteica (AOPPs) en los diferentes órganos y tejidos estudiados de ratones lean y ob/ob. Efecto de la suplementación con arginina. Los datos están indicados como media ± error estándar de la media (ESM; n=15). Letras minúsculas diferentes indican diferencias mínimas significativas entre los grupos, con p<0,05.



**Figura 4.13.** Niveles de AOPPs en los distintos órganos y tejidos estudiados de los grupos control (lean), control+arginina, obeso (ob/ob) y obeso+arginina. Los datos están indicados como media  $\pm$  error estándar de la media (ESM; n=15).



**Figura 4.13. (Continuación) Niveles de AOPPs en los distintos órganos y tejidos estudiados de los grupos control (lean), control+arginina, obeso (*ob/ob*) y obeso+arginina.** Los datos están indicados como media  $\pm$  error estándar de la media (ESM;  $n=15$ ).

Respecto a los niveles de grupos -SH, el otro parámetro de oxidación proteica determinado en este estudio, sus niveles en los diferentes grupos experimentales se resumen en la Tabla 4.12 y Figura 4.14.

De acuerdo con nuestros resultados, y a semejanza de lo observado para los AOPPs, las diferencias tisulares en grupos –SH proteicos entre ratones lean y ob/ob son escasas, al igual que los efectos de la arginina. Sólo en riñón los niveles de grupos –SH son significativamente más bajos en los grupos obesos que en los lean. Por el contrario, los niveles de –SH son más altos en ratones ob/ob en páncreas (significativamente) y grasa abdominal. El único efecto significativo de la arginina es elevar el nivel de grupos –SH en grasa retroperitoneal de ratones lean y, en menor medida, de los ob/ob.

GRUPOS -SH	Lean	Lean+Arg	Obeso	Obeso+Arg	ANOVA
Hígado (mM)	8,82±0,67	9,66±0,71	8,43±0,71	8,63±0,76	ns
Hígado (nmol/mg prot)	32,0±2,6	37,1±2,8	37,5±4,1	41,4±4,2	ns
Riñón (mM)	4,93±0,33 <sup>a</sup>	4,86±0,47 <sup>a</sup>	3,69±0,23 <sup>b</sup>	3,89±0,34 <sup>a,b</sup>	0,033
Riñón (nmol/mg prot)	31,0±1,5	30,3±2,9	25,5±1,6	25,9±2,3	ns
Músculo (mM)	2,47±0,14	2,70±0,17	2,47±0,14	2,69±0,12	ns
Músculo (nmol/mg prot)	22,65±1,15	22,67±0,66	26,54±2,73	28,30±9,89	ns
Corazón (mM)	4,07±0,33	3,96±0,24	4,40±0,33	4,27±0,50	ns
Corazón (nmol/mg prot)	39,80±1,94	37,48±2,80	39,29±2,21	36,15±3,55	ns
Páncreas (mM)	3,51±0,32	3,43±0,37	3,35±0,32	3,61±0,29	ns
Páncreas (nmol/mg prot)	20,62±1,75 <sup>b</sup>	20,84±2,21 <sup>b</sup>	24,40±1,74 <sup>a,b</sup>	28,37±2,14 <sup>a</sup>	0,031
Testículos (mM)	3,81±0,30	3,56±0,36	2,95±0,44	4,17±0,55	ns
Testículos (nmol/mg prot)	47,90±5,36	41,33±5,23	35,39±5,32	50,64±7,50	ns
Grasa abdominal (mM)	0,32±0,10	0,40±0,12	0,35±0,06	0,29±0,07	ns
GA (nmol/mg prot)	14,19±3,90	11,43±4,10	26,78±4,38	21,59±5,28	ns
Grasa retroperitoneal (mM)	0,25±0,02 <sup>b</sup>	0,63±0,03 <sup>a</sup>	0,30±0,0 <sup>b</sup>	0,34±0,05 <sup>b</sup>	0,012
GR (nmol/mg prot)	11,94±1,43	22,62±1,16	25,84±9,41	41,57±10,45	ns

**Tabla 4.12. Niveles de grupos -SH en los diferentes órganos y tejidos estudiados de ratones lean y ob/ob. Efecto de la suplementación con arginina.** Los datos están indicados como media ± error estándar de la media (ESM; n=15). Letras minúsculas diferentes indican diferencias mínimas significativas entre los grupos, con p<0,05.

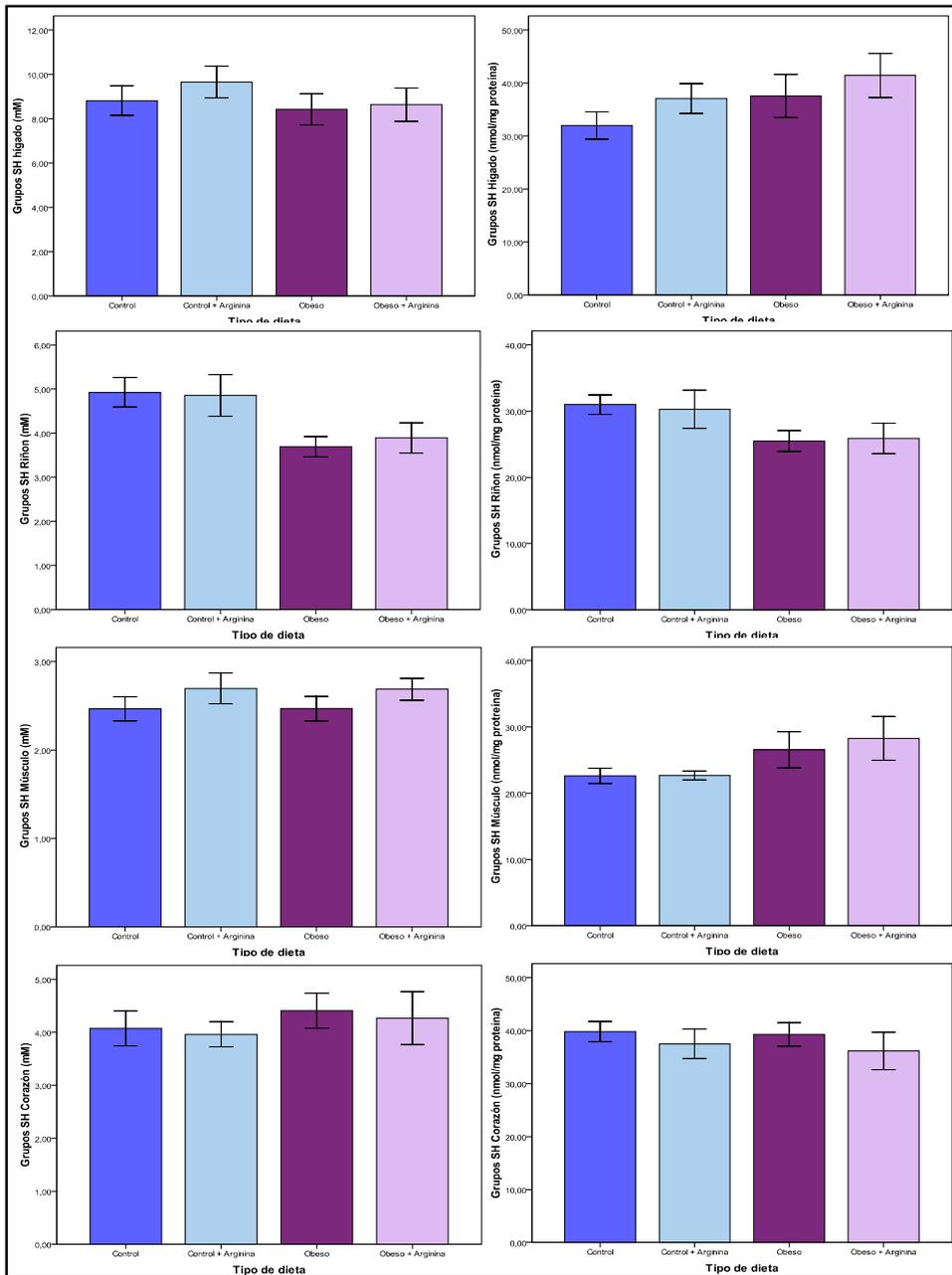


Figura 4.14. Niveles de grupos -SH en los distintos órganos y tejidos estudiados de los grupos control (lean), control+arginina, obeso (*ob/ob*) y obeso+arginina. Los datos están indicados como media  $\pm$  error estándar de la media (ESM; n=15).

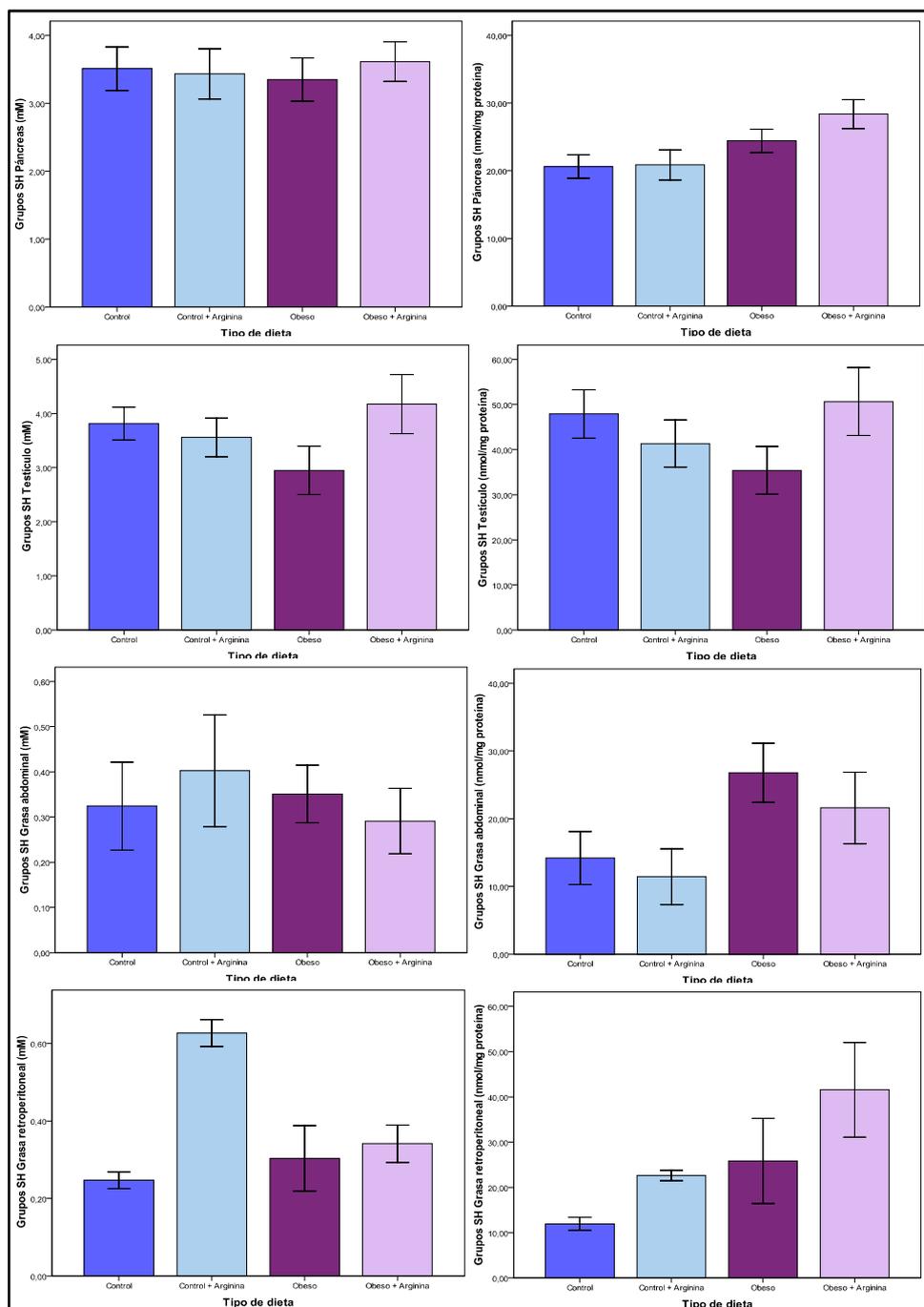


Figura 4.14. (Continuación). Niveles de grupos -SH en los distintos órganos y tejidos estudiados de los grupos control (lean), control+arginina, obeso (ob/ob) y obeso+arginina. Los datos están indicados como media  $\pm$  error estándar de la media (ESM; n=15).

La evaluación conjunta de los niveles de los dos marcadores de oxidación proteica incluidos en este estudio a través del cociente AOPPs/SH muestra los resultados que se resumen en la Figura 4.15. El análisis ANOVA indica diferencias significativas entre grupos experimentales en músculo ( $p < 0,0001$ ), grasa abdominal ( $p = 0,006$ ) e hígado ( $p = 0,05$ ), y que son atribuibles, principalmente, a la respuesta a la suplementación con arginina. Ésta disminuye el cociente AOPPs/SH en hígado mientras que lo eleva en músculo y grasa.

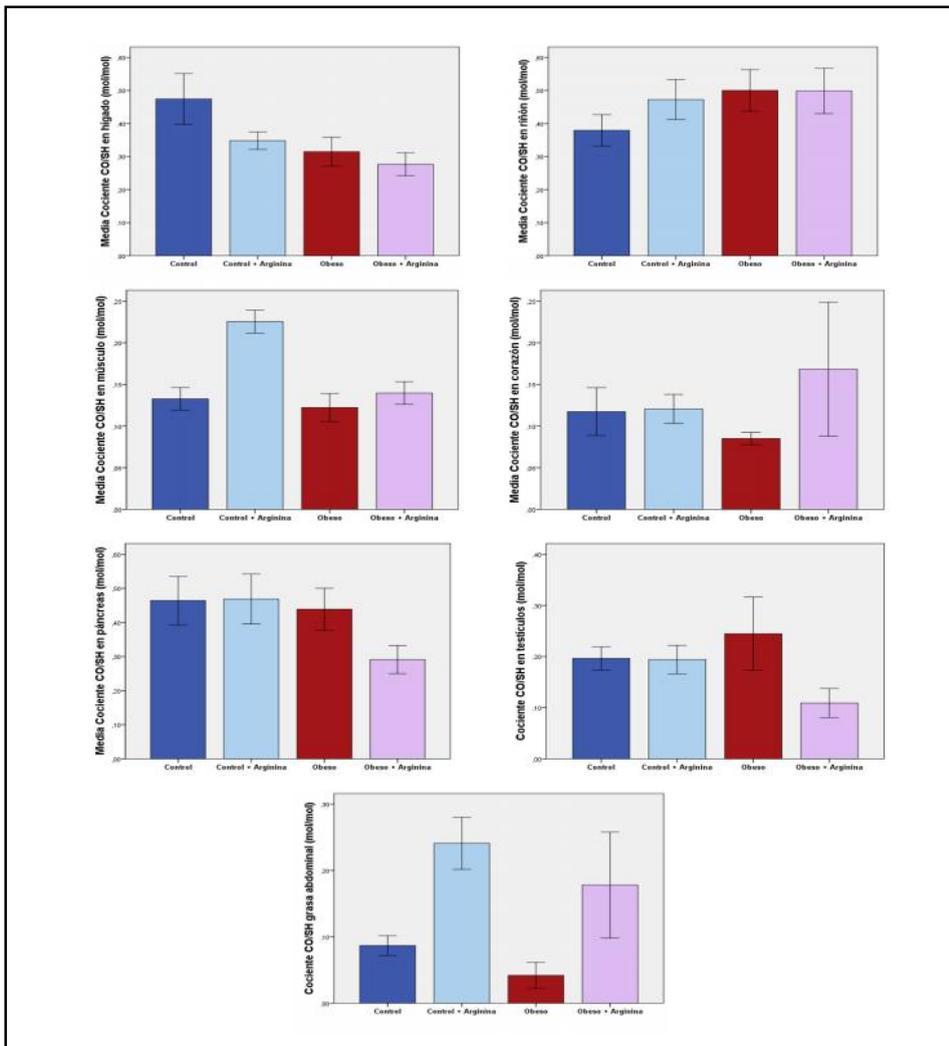


Figura 4.15. Cociente (AOPPs/SH) en los distintos órganos y tejidos estudiados de los grupos control (lean), control+arginina, obeso (*ob/ob*) y obeso+arginina. Los datos están indicados como media ± error estándar de la media (ESM; n=15).

#### 4.4. NIVELES DE INSULINA, ADIPOQUINAS Y CITOQUINAS INFLAMATORIAS. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ARGININA.

La accesibilidad a la tecnología Multiplex nos ha permitido valorar en nuestro estudio los niveles de resistina, leptina, IL-6, TNF- $\alpha$  e insulina en plasma de ratones control y ob/ob. Los resultados de estas determinaciones se resumen en la Tabla 4.13 y en la Figura 4.16. En ellas se incluye el índice HOMA de resistencia insulínica calculado a partir de los valores de glucemia basal e insulina ( $\text{HOMA} = (\text{insulina } (\mu\text{U/mL}) \times \text{glucosa (mmol/L)}) / 22,5$ ). No se incluyen valores para TNF- $\alpha$  ya que en todos los casos se encontraron por debajo del límite de detección (12 pg/mL).

	Lean	Lean+Arg	Obeso	Obeso+Arg	ANOVA
Resistina (pg/mL)	1352 $\pm$ 74 <sup>a</sup>	1644 $\pm$ 202 <sup>a</sup>	3269 $\pm$ 297 <sup>b</sup>	2965 $\pm$ 324 <sup>b</sup>	<0,0001
Leptina (pg/mL)	1041 $\pm$ 323 <sup>a</sup>	443 $\pm$ 84 <sup>b</sup>	NP	NP	0,004
IL-6 (pg/mL)	5,52 $\pm$ 1,17 <sup>a</sup>	12,12 $\pm$ 3,35 <sup>a</sup>	65,20 $\pm$ 28,57 <sup>b</sup>	43,01 $\pm$ 14,18 <sup>b</sup>	0,014
Insulina (pg/mL)	594 $\pm$ 162 <sup>a</sup>	594 $\pm$ 186 <sup>a</sup>	3981 $\pm$ 653 <sup>b</sup>	2675 $\pm$ 506 <sup>c</sup>	<0,0001
HOMA	4,76 $\pm$ 1,81 <sup>a</sup>	4,06 $\pm$ 1,86 <sup>a</sup>	53,40 $\pm$ 11,41 <sup>b</sup>	28,64 $\pm$ 7,14 <sup>c</sup>	<0,0001

**Tabla 4.13. Niveles de resistina, leptina, IL-6 e insulina en plasma de ratones lean y ob/ob. Valores del índice HOMA calculado.** Los datos están indicados como media  $\pm$  ESM (n=15). Letras minúsculas diferentes indican diferencias mínimas significativas entre los grupos, con  $p < 0,05$ . NP: No procede. Niveles de Leptina analizados por t-Test.

De acuerdo con nuestros resultados, los niveles de resistina, IL-6 e insulina se encuentran clara y significativamente elevados en ratones obesos respecto a los controles. Las elevaciones de insulina y glucemia basal (véase **Tabla 4.1**) se traducen en un índice HOMA unas 10 veces superior en el grupo ob/ob que en el control. La detección de leptina en ratones ob/ob (Figura 4.16) no se incluye en la tabla ya que responde a reactividad cruzada de la leptina inactiva que presentan estos animales con los anticuerpos del ensayo Multiplex.

En ratones lean, el suplemento de arginina disminuyó significativamente los niveles circulantes de leptina. También de forma sensible, aunque no significativa, redujo la resistencia insulínica (índice HOMA) a expensas de disminuir la glucemia.

Los efectos de la suplementación de arginina fueron mucho más evidentes en ratones obesos. En este grupo, la arginina redujo significativamente los niveles de insulina y la resistencia insulínica (índice HOMA). También redujo de forma sensible (aunque no estadísticamente significativa) los niveles de resistina e IL-6, efecto contrario al observado en los ratones lean.

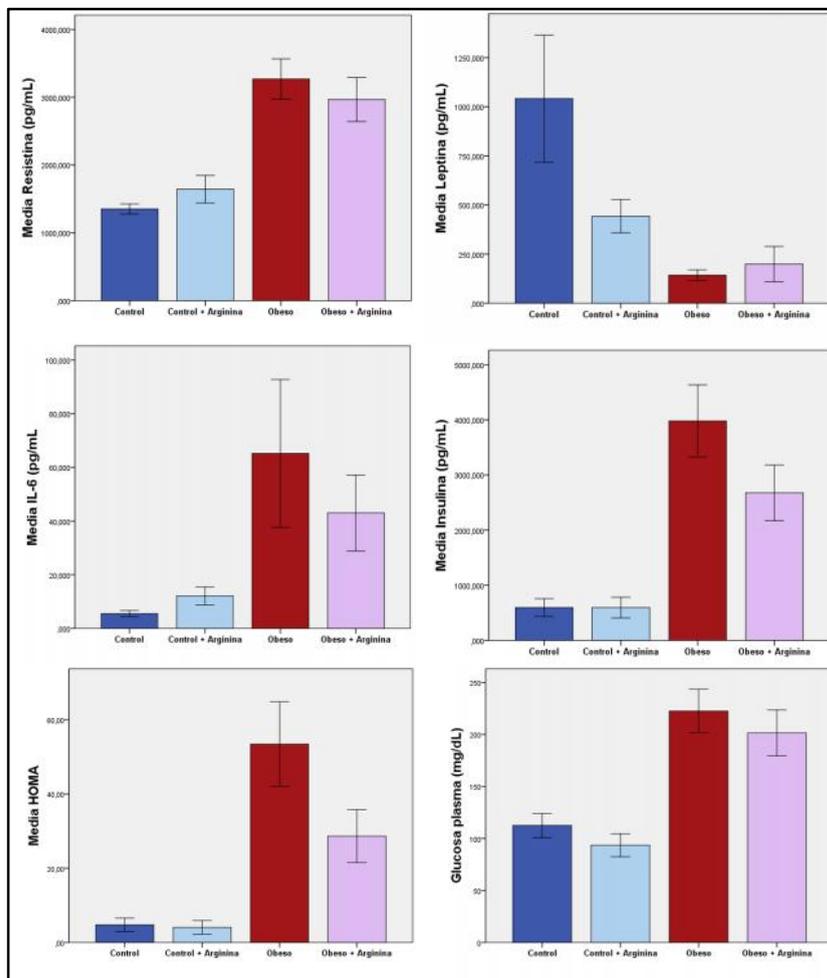


Figura 4.16. Niveles de resistina, leptina, IL-6, insulina, glucosa e índice HOMA (calculado) en plasma de ratones lean y ob/ob. Los datos están indicados como media ± ESM (n=15).

#### 4.5. NIVELES DE EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS DE NOS: EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE ARGININA.

El análisis mediante RT-PCR de las isoformas neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e inducible (iNOS) de NOS en corazón y aorta (representativos del sistema cardiovascular) muestra (Figura 4.17) que los niveles de mRNA de nNOS y eNOS no difieren entre los ratones ob/ob y lean, mientras que la iNOS se encuentra sobreexpresada (2.5 veces) en aorta de ratones ob/ob, de acuerdo con un estado proinflamatorio.

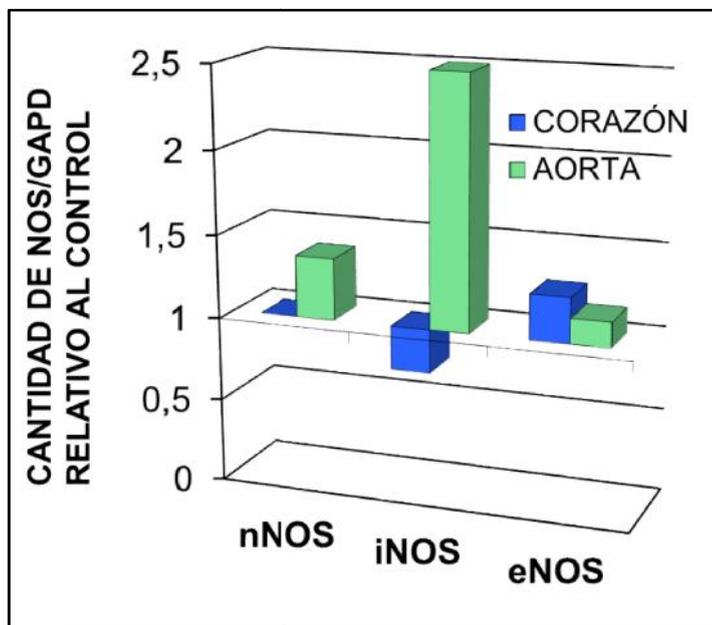


Figura 4.17. Niveles relativos de expresión de nNOS, iNOS y eNOS en corazón y aorta de los ratones ob/ob respecto a los lean. Los datos representan la media de un mínimo de 5 determinaciones.

Respecto al efecto de la arginina, bajo nuestras condiciones experimentales, sólo la expresión de la isoforma neuronal de NOS resultó afectada por la suplementación. El aminoácido elevó en torno al 70% la expresión de nNOS tanto en corazón como en aorta de los controles lean, mientras que disminuyó en un 38% y en un 84% la expresión del mismo isoenzima en corazón y aorta, respectivamente, de los ratones ob/ob. Estos resultados se resumen en la Figura 4.18.

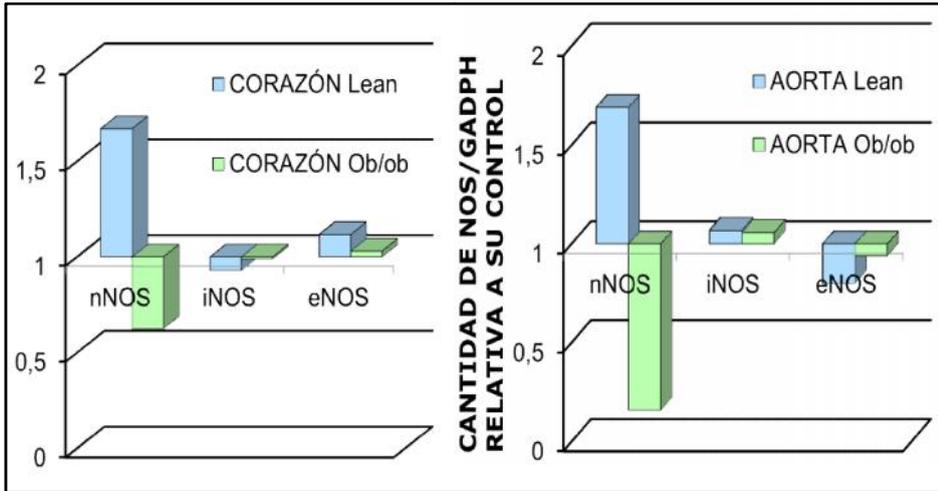


Figura 4.18. Efecto de la arginina sobre los niveles relativos de expresión de nNOS, iNOS y eNOS en corazón y aorta de los ratones ob/ob y lean. Los datos representan la media de un mínimo de 5 determinaciones.

**DISCUSIÓN**





En línea con trabajos previos de nuestro grupo de investigación, el presente estudio incide en el análisis de la estrecha y compleja interconexión entre el estrés oxidativo, el metabolismo de la arginina y la disfunción endotelial que acompañan a las patologías de riesgo cardiovascular. En trabajos anteriores hemos evaluado estos procesos en modelos animales y/o pacientes con diabetes, hipertensión arterial e hipercolesterolemia (Meneu, 2000; García-Taberner, 2001; Santaolaria, 2001; Serra, 2008) como factores de riesgo cardiovascular. En esta ocasión hemos centrado nuestro estudio en la obesidad. Su elevada prevalencia, su tendencia al aumento en las sociedades desarrolladas, y su fuerte asociación con la morbi-mortalidad cardiovascular justifican sobradamente su elección como base de nuestro estudio (Popkin, 2012; Lissner et al, 2013).

La aproximación experimental utilizada en el presente trabajo ha consistido en analizar, en ratones genéticamente obesos (ob/ob), las alteraciones bioquímicas que acompañan a la obesidad evaluando diferentes parámetros indicativos del metabolismo de la arginina, el estrés oxidativo, la inflamación y la funcionalidad endotelial. También se ha analizado la repercusión que sobre estos procesos tiene la suplementación con arginina, aminoácido para el que se han descrito amplios beneficios sobre la adiposidad, y las alteraciones metabólicas que la acompañan, y que predisponen fuertemente al RCV (Gornik y Creager, 2004; Jobgen et al, 2009; McKnight et al, 2010; Clemmensen et al, 2012; Tan et al, 2012; Hassan, 2013).

Un interés adicional del presente trabajo es que se ha desarrollado paralelamente a nuestros estudios en una población infantil obesa, en la que hemos podido constatar importantes alteraciones en el metabolismo de la arginina y del daño oxidativo relacionadas con el grado de obesidad, la inflamación y la disfunción endotelial (Codoñer-Franch et al, 2011a; Codoñer-Franch et al, 2011b; Codoñer-Franch et al, 2012; Codoñer-Franch et al, 2014). Está ampliamente demostrado que la obesidad infantil, al igual que la del adulto, predispone fuertemente al RCV. Y su tratamiento no resulta sencillo. Ante este grave problema socio-sanitario, nuestro trabajo incide en la búsqueda de aproximaciones terapéuticas que permitan retrasar, si no eliminar, dichas complicaciones en la cada vez más numerosa población obesa.

En este contexto cobra relevancia el análisis de los efectos de la administración oral moderada de arginina en nuestro modelo experimental de ratone obesos (ob/ob). Existe un amplio consenso sobre los beneficios de la arginina en la práctica totalidad de las patologías de RCV, y particularmente en la obesidad (Gornik y Creager, 2004; Jobgen et al, 2009; McKnight et al, 2010; Clemmensen et al, 2012; Tan et al, 2012; Hassan, 2013). Sin embargo, resulta sorprendente su escaso traslado a la práctica clínica y a la terapia. Dada la baja o nula toxicidad de la arginina, desconocemos las causas que dificultan la evaluación de sus beneficios en humanos. Sin embargo, creemos que los resultados del presente estudio pueden servir de base para tal planteamiento en la población obesa. Como pasaremos a comentar, los resultados de nuestro estudio en ratones ob/ob, en particular los referentes a los niveles circulantes de espermina, parámetros de estrés oxidativo, inflamación y resistina, coinciden con los observados por nuestro grupo en pacientes pediátricos obesos (Codoñer-Franch et al, 2011a; Codoñer-Franch et al, 2011b; Codoñer-Franch et al, 2012; Codoñer-Franch et al, 2014).

De forma didáctica discutiremos en primer lugar los resultados generales del modelo experimental con particular atención a la adiposidad. A continuación se analizarán los resultados del metabolismo de la arginina hacia NO y poliaminas y, posteriormente, el daño provocado en las moléculas biológicas por el estrés oxidativo. Finalmente, comentaremos los datos referentes a inflamación, adipoquinas y resistencia insulínica. De forma simultánea comentaremos la influencia de la suplementación de arginina sobre cada uno de estos aspectos.

## **5.1. PARÁMETROS GENERALES: ADIPOSIDAD Y EFECTO DE LA ARGININA.**

La deficiencia de leptina funcional es la causa primaria de la hiperfagia y la obesidad que caracterizan a los ratones ob/ob. La leptina, el producto del gen ob, es una hormona producida mayoritariamente por el tejido adiposo que regula la ingesta de alimento y el peso corporal. Además, la leptina, a través de su interacción con sus receptores, ejerce un amplio rango de acciones biológicas, muchas de ellas centradas en el sistema cardiovascular (Katagiri et al, 2007), cuya desregulación ha sido constatada en la hipertensión y en el fallo cardiaco (Botella et al, 2001). En el mismo sentido, los niveles

plasmáticos de leptina constituyen en el hombre un factor predictor de eventos cardiovasculares (Katagiri et al, 2007). De acuerdo con estos datos, los ratones ob/ob, deficientes en leptina, presentan diferentes alteraciones cardiovasculares tales como hipertrofia cardíaca, alteración de la señalización  $\beta$ -adrenérgica, aumento de la apoptosis de células cardíacas y supervivencia disminuida (Saraiva et al, 2007; Lindström, 2007; Lindström, 2012).

En el análisis de nuestros resultados debemos recordar que nuestro modelo se ha basado en el uso de ratones jóvenes (4-5 semanas de edad) sometidos a alimentación paralela con controles lean con una dieta de bajo contenido graso. Por lo tanto, es importante resaltar que los cambios observados no son debidos a una excesiva ingesta de alimento sino, exclusivamente, a las consecuencias resultantes de la deficiencia de leptina en individuos jóvenes. En estas condiciones, nuestros resultados indican que se mantienen las características propias de este modelo de riesgo cardiovascular asociado a obesidad tales como hiperglucemia, hipercolesterolemia y elevación del cociente aterogénico (colesterol total/HDL), además de la hiperinsulinemia, RI e inflamación que se comentarán posteriormente (Lindstrom, 2007; Lindström, 2012). Sin embargo, es necesario también resaltar que el estricto control dietario mantenido seguramente ha contribuido a minimizar las diferencias entre ratones ob/ob y lean, así como los efectos de la administración de arginina, en algunos de los parámetros estudiados (Sáinz et al, 2010). A pesar de ello, la suplementación con arginina mejora sensiblemente el perfil glucídico y la resistencia insulínica tanto en los ratones lean como en los ob/ob; los beneficios sobre el perfil lipídico sólo son evidentes en los ratones control. Estos resultados son acordes con los beneficios descritos para la arginina sobre la secreción de insulina y la sensibilidad a su efecto en tejidos periférico (Clemmensen et al, 2012; Stancick, 2012).

Nuestros datos sobre el incremento ponderal, el peso absoluto y relativo de los órganos y su contenido proteico constatan el mantenimiento de las características previamente descritas de los ratones ob/ob (Lindström, 2007; Lindström, 2012), incluso bajo nuestras condiciones experimentales de “relativa” restricción alimentaria. Así, los ratones ob/ob muestran, respecto a los controles lean, una mayor y significativa ganancia de peso corporal vinculada (principal pero no exclusivamente) a un mayor aumento de la masa del hígado y de los acúmulos grasos, representados en nuestro estudio por los paquetes

grasos abdominal y retroperitoneal. Tanto en éstos como en la mayoría de órganos y tejidos analizados, el contenido proteico fue menor en los ratones ob/ob que en los lean. La acumulación intra y extracelular de grasa e infiltración lipídica (observada pero no valorada en nuestro estudio) en la mayoría de órganos y tejidos podría explicar, al menos parcialmente, el descenso relativo del contenido proteico. Estos datos son acordes con el importante papel de la leptina en la resistencia insulínica y, por extensión, en el uso corporal de los nutrientes y el gasto energético (Lindström, 2007; Lindström, 2012).

La deficiencia de leptina en ratones ob/ob conlleva una menor actividad física, descenso del gasto energético y una derivación eficiente del metabolismo de los nutrientes hacia acúmulos grasos. Numerosas células y tejidos periféricos, aparte del SNC, poseen receptores para la leptina. Ello incluye músculo, hígado y grasa que, a nivel metabólico, resultan claves en el uso, distribución y almacenamiento de los combustibles energéticos. Numerosos estudios sugieren para la leptina efectos similares a los de la insulina en el metabolismo de la glucosa a nivel muscular, probablemente porque comparten vías de señalización (Katsarelli y Dedoussis, 2014). Sin embargo, leptina e insulina parecen diferir en sus efectos sobre el metabolismo lipídico en los adipocitos (Lindström, 2012). Otra de las funciones descritas para la leptina es regular el equilibrio entre almacenamiento y oxidación de los lípidos a nivel mitocondrial, proceso central en el metabolismo energético. La función mitocondrial se halla comprometida de forma generalizada, pero particularmente, en hígado, tejido adiposo y músculo de los ratones ob/ob deficientes en leptina, lo que podría explicar su reducida capacidad oxidativa, la acumulación intracelular de grasa y la lipotoxicidad. El descenso de la expresión de la proteína desacopladora UCP-1 en el tejido adiposo blanco contribuye adicionalmente a un uso más eficiente de los nutrientes y a reducir la tasa metabólica basal. El conjunto de estas alteraciones en los ratones ob/ob se traducen, a nivel metabólico, en un descenso de la incorporación y oxidación de la glucosa y de ácidos grasos, y un aumento de la captación y deposición de lípidos en los tejidos. Es decir, en una redistribución del almacenamiento de grasas del tejido adiposo hacia hígado, músculo y otros tejidos, capaz de inducir daño celular y lipotoxicidad (revisado en Lindström, 2007; Lindström, 2012).

Por su relación con la disfunción endotelial y el RCV, en nuestro estudio hemos prestado particular atención a las características metabólicas de corazón y aorta. La hipertrofia

ventricular izquierda es una característica tardía ampliamente descrita en los ratones ob/ob, que va precedida, en sus etapas iniciales, por disfunción cardíaca y aumento de la apoptosis (Saraiva et al, 2007; Lindström et al, 2007; Lindström et al, 2012). Esta hipertrofia ventricular es un potente factor de riesgo cardiovascular. En nuestros ratones hemos observado un ligero descenso del peso del corazón que resulta significativo cuando se expresa como % del peso corporal, sin cambios en el contenido proteico. No existen signos evidentes de la hipertrofia cardíaca característica de los ratones ob/ob (Barouch et al, 2006; Saraiva et al, 2007), a pesar de que se ha alcanzado ya un grado de adiposidad similar al de edades más avanzadas (Lemonnier, 1971), a expensas del incremento del tamaño de los adipocitos y de sus acúmulos grasos (Abraham, 1973) y una reducción drástica de sus contenidos proteicos. Es posible que ello refleje una elevación de la apoptosis y disminución de supervivencia de las células cardíacas en nuestros jóvenes ratones experimentales, de manera que supere a la hipertrofia del cardiomiocito.

En cuanto al peso de la aorta, el aumento claro y significativo observado en nuestros ratones ob/ob puede ser indicativo del inicio precoz del deterioro endotelial que inicia un proceso aterosclerótico. A diferencia de lo observado en corazón, las alteraciones anatómicas en el árbol vascular son ya evidentes en este estadio con importante engrosamiento de las paredes y clara infiltración lipídica. De hecho, el peso del tejido obtenido de aorta torácica en los ratones obesos es muy superior al de los controles (tanto en términos absolutos como relativos al peso corporal) y se caracteriza, además, por poseer un menor contenido proteico. Si presumimos que este descenso es consecuencia de la infiltración lipídica, atendiendo a los contenidos proteicos de aorta (~100 mg/g) de los ratones lean y grasa (~10 mg/g) de los ob/ob, ésta puede estimarse en torno al 30-40% en nuestras condiciones experimentales. El grado de infiltración lipídica deberá tomarse en consideración, por lo tanto, en el análisis de los resultados de poliaminas en aorta y tejido adiposo, pero no cabe esperar que afecte de forma sensible el análisis de los resultados cardíacos (Barouch et al, 2006; Lindström, 2012).

Un dato a destacar a este nivel es el beneficio evidente de la suplementación de arginina sobre la adiposidad en los ratones lean y pero no en los ob/ob. Así, en el grupo control, la arginina redujo sensiblemente la ganancia ponderal (~10%), el peso de la aorta y de los paquetes grasos e incrementó, en el caso de la grasa, el contenido proteico. Sin embargo,

en ratones ob/ob, la arginina sólo incrementó los niveles de proteínas en aorta torácica. Estos resultados contrastan con la constatada eficacia de la arginina en la disminución de la obesidad en otros modelos animales (Fu et al, 2005). Por lo tanto, aunque los resultados con ratones lean apoyan el reconocido papel de la arginina en el control del peso corporal y de la adiposidad (revisado en Wu et al, 2008; Jobgen et al, 2009; McKnight et al, 2010; Clemmensen et al, 2012; Tan et al, 2012; Hassan, 2013), faltan por establecer las razones bioquímicas por las que este efecto no es observable en nuestro modelo de obesidad. Señalar en este sentido que, en ratas Zucker (Fu et al, 2005), a diferencia de lo observado en nuestros ratones ob/ob, la suplementación de arginina es capaz de elevar la producción de NO. Es posible que los efectos de la arginina sobre la adiposidad impliquen vías leptina/NO-dependientes que favorezcan la oxidación corporal de combustibles energéticos.

La estrecha conexión entre leptina, NO y arginina se comentará más adelante al abordar los resultados sobre la producción de NO en nuestro modelo. Sin embargo, en relación a los beneficios de la arginina sobre la adiposidad, cabe resaltar que son debidos a su capacidad para reducir el tejido adiposo blanco, mejorar la resistencia insulínica y elevar el gasto energético. La arginina incrementa la biogénesis mitocondrial y la expresión de genes implicados en la oxidación de sustratos energéticos; también eleva los niveles de UCP-1 (“browning”) lo que contribuye decisivamente a elevar el gasto energético basal (Lindström, 2012; Sansbury y Hill, 2014; Joffin et al, 2015; Jankovic et al, 2015). La participación decisiva del NO derivado de la arginina en estos procesos viene apoyada por la evidencia experimental de que son reproducibles con la administración de nitrato (Roberts et al, 2015).

Otro proceso recientemente implicado en el control del gasto energético del tejido adiposo y de la adiposidad es el catabolismo de las poliaminas, concretamente, la actuación de la espermidina/espermina acetiltransferasa (SSAT), el enzima que media la interconversión de poliaminas e inicia, vía acetilación, su catabolismo y exportación (Pirinen et al, 2007; Jell et al, 2007; Bonhoure et al, 2015). La sobreexpresión de este enzima reduce considerablemente los depósitos grasos y modifica los niveles de poliaminas incrementando drásticamente los de putrescina (del orden de 100 veces) y disminuyendo los de espermidina y espermina sin afectar a su cociente (Pirinen et al,

2007; Jell et al, 2007). De acuerdo con nuestros resultados en grasa abdominal y retroperitoneal, los niveles absolutos de espermidina y espermina son significativamente más bajos en los ratones ob/ob, sin cambios en el cociente espermidina/espermina, y siendo indetectables, en todos los casos, los niveles de putrescina. A falta de un análisis experimental, tales resultados apoyarían una mayor expresión/actividad de la SSAT en los ratones ob/ob, relacionada con el grado de obesidad y el estrés oxidativo que se comentará posteriormente. Sería interesante, dados los limitados efectos de la arginina en los ratones ob/ob, analizar la relación entre arginina, leptina, NO, estrés oxidativo y SSAT (Pegg, 2009; Clemmensen et al, 2012; Tan et al, 2012; Li et al, 2014; Jankovic et al, 2015).

## **5.2. METABOLISMO DE LA ARGININA: EFECTO DE SU SUPLEMENTACIÓN.**

La relevancia actual de las patologías de RCV ha despertado un interés creciente por el estudio del papel que en ellas desempeñan la arginina y sus metabolitos biológicamente activos (Böger et al, 1998; Eid et al, 2002; Li et al, 2014). La mayoría de estos estudios abordan el papel del óxido nítrico (NO), generado a partir de la arginina por las óxido nítrico sintasas (NOS), y directamente implicado, entre otros muchos efectos, en la vasodilatación e hiperproliferación del músculo liso vascular. Aunque con resultados dispares y por mecanismos diversos, descensos en la síntesis y/o actuación del NO se han descrito en la práctica totalidad de las patologías de RCV, incluida la obesidad. De hecho, las alteraciones en la funcionalidad del NO son actualmente consideradas como una de las principales causas de la vasoconstricción y excesiva proliferación celular implicadas en la disfunción endotelial que antecede a la instauración de las mencionadas patologías (Duan et al, 2000; Gonçalves-Díaz et al, 2011; Li et al, 2014; Sansbury y Hill, 2014).

Más reciente, aunque todavía escaso y limitado, es el interés por las poliaminas, derivados indirectos de la arginina a través de la acción de la arginasa y de la ornitina descarboxilasa. Al igual que para el NO, para las principales poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) se han propuesto diferentes funciones entre las que se incluyen acciones antioxidantes y pro-proliferativas opuestas, en cierta medida, a las del NO (Pegg, 2009). Las poliaminas están implicadas en el control de los flujos celulares y mitocondriales de  $\text{Ca}^{2+}$ , y la elevación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular activa la síntesis de NO (Morgan, 1994a). De

hecho, las evidencias experimentales apoyan un control simultáneo de ambas vías y del transporte celular de arginina (Durante et al, 1997). La acción de la arginasa jugaría un papel decisivo derivando la arginina precursora hacia una u otra vía de forma que alteraciones en la síntesis de NO podrían repercutir sobre la síntesis de poliaminas y viceversa (Yang y Ming, 2013; Rath et al, 2014). Por la misma razón, la disponibilidad de arginina en condiciones fisiológicas, patológicas o intencionalmente manipuladas podría ser un condicionante para la funcionalidad de ambas vías (Morgan, 1994a; Morgan, 1994b; Olefsky y Glass, 2010; Yang y Ming, 2013; Rath et al, 2014).

Numerosas evidencias experimentales sugieren que la vía de señalización de la leptina se encuentra conectada con la del óxido nítrico (Beltowski et al, 2003; Yetik-Anacak y Catravas, 2006; Katsareli y Deudossis, 2014). Sin embargo, contradictoriamente, la clara deficiencia de leptina en los ratones ob/ob se ha relacionado tanto con descensos (corazón) como con aumentos (cerebro) de la expresión de diferentes isoformas de la NOS y de síntesis de NO (Saraiva et al, 2007). No tenemos constancia de que se haya evaluado hasta el momento la situación global de estos ratones respecto a la producción de NO bajo nuestras condiciones dietarias.

En este sentido, sin lugar a dudas, uno de los resultados más destacables de nuestro estudio es la severa reducción de la producción global de óxido nítrico observada en los ratones ob/ob bajo condiciones de alimentación paralela respecto a los controles lean. Tal resultado abogaría a favor de la actuación del NO en la vía de señalización de la leptina como señal de saciedad, así como en la mediación de los eventos conducentes al deterioro vascular, entre los que podría encontrarse el propuesto desequilibrio nitroso/redox (Saraiva et al, 2007; Li et al, 2014; Jankovic et al, 2015). Recordemos que nuestros resultados experimentales, como se comentará posteriormente, muestran una elevación significativa de los niveles circulantes y urinarios de marcadores de estrés oxidativo en ratones ob/ob por lo que, ante el descenso de la producción de NO, el equilibrio nitroso/redox podría verse secundariamente modificado.

El hecho de que la arginina, el sustrato biológico para la producción de NO, no permita restaurar su producción en este modelo experimental, tal y como muestran nuestros resultados actuales, también aboga a favor de una deficiencia basal en la producción de

NO en los ratones ob/ob. Sin embargo, dado que el efecto no logrado por la suplementación de arginina, sí se consigue con el aumento de la ingesta dietaria (y calórica; ésta permite restaurar los niveles plasmáticos y urinarios de nitrato de los ratones ob/ob hasta valores normales; E Alonso, comunicación personal) nuestros resultados abren diferentes posibilidades interpretativas, no excluyentes, que deben someterse a ulterior análisis experimental.

La posibilidad de que la expresión de las diferentes isoformas de NOS responda en los ratones ob/ob a la ingesta dietaria y calórica no parece ser una explicación plausible para nuestros resultados experimentales si ésta responde exclusivamente a la ausencia de leptina. Sin embargo, tal posibilidad ha sido explorada en este trabajo valorando el nivel de expresión del mRNA de las diferentes isoformas de NOS en aorta y corazón. Según nuestros resultados, sólo la expresión de la iNOS se encuentra discretamente elevada (~2,5 veces) en aorta de los ratones ob/ob, en concordancia con su estado proinflamatorio. En el mismo sentido, la suplementación con arginina sólo afecta de forma muy discreta el nivel de expresión de la isoforma neuronal (nNOS), elevándolo en corazón y aorta de los ratones lean y disminuyéndolo en el caso de los ratones ob/ob.

A pesar de que nuestra observación experimental sobre la afectación de la expresión de nNOS por arginina pueda apoyar el papel de este isoenzima en la instauración de la hipertrofia cardíaca en este modelo y los beneficios cardiovasculares del aminoácido (Saraiva et al, 2007; Sansbury et al, 2012; Li et al, 2014), el alcance de nuestras observaciones está limitado por varios factores. El primero es la restricción de nuestros estudios a corazón y aorta, mientras que los niveles circulantes y urinarios de nitrato reflejan la producción global de NO por el organismo (Tsikas, 2005). Dada la distribución ubicua de las NOS y su más que probable función y regulación diferencial en sus distintas localizaciones tisulares, nuestros resultados no excluyen comportamientos diferentes a los observados en el análisis de otros órganos o tejidos (Sansbury et al, 2012). En el mismo sentido, nuestros análisis sólo han valorado los niveles de mRNA, no la cantidad ni actividad de las NOS, y está claramente establecido el estricto y complejo control postranscripcional y postraduccion al que están sometidas las diferentes isoenzimas (Sansbury y Hill, 2014; Li et al, 2014).

Una segunda posibilidad para explicar la reducida síntesis de NO en los ratones ob/ob podría ser la acumulación de inhibidores endógenos de la NOS como el ADMA, y que se ha descrito en pacientes y modelos experimentales de patologías de RCV (Sibal et al, 2010). Aunque los niveles de ADMA no han sido determinados en nuestro estudio, esta posibilidad es difícilmente compatible con nuestra observación de que la suplementación de arginina no restaure la producción de NO en los ratones ob/ob.

Finalmente, está la posibilidad de que la síntesis de NO en los ratones ob/ob sometidos a restricción dietaria se encuentre limitada por una reducida disponibilidad de sustratos cofactores de la NOS diferentes de la arginina. Recordemos que las NOS catalizan una compleja reacción oxidativa en la que se requieren, entre otros, NADPH, BH<sub>4</sub> y FAD como cofactores (Moncada y Higgs, 1993; Li et al, 2014). No es posible descartar, a la luz de los datos disponibles, que alguno de dichos cofactores no sea limitante en nuestras condiciones experimentales dadas las particulares características metabólicas de los ratones ob/ob respecto al uso de nutrientes y metabolismo energético (Lindström, 2007; Lindström, 2012). Numerosos trabajos aluden a la reducida disponibilidad de BH<sub>4</sub> como factor limitante en la biosíntesis de NO (Bendall et al, 2014; Li et al, 2014). La sensibilidad de este cofactor a la oxidación y el estrés oxidativo observado en los ratones ob/ob serían compatibles con esta posibilidad. En este sentido, un mayor aporte a través de la dieta de los precursores de tales cofactores permitiría restaurar la biosíntesis de NO, tal y como indican nuestros resultados experimentales. Nos planteamos si la falta de atención a las pautas alimentarias utilizadas con este modelo animal (la mayor parte de las veces no descritas en los trabajos; véase como ejemplo Saraiva et al, 2007) puede ser, como parecen indicar nuestros resultados, lo que haya impedido hasta este momento el disponer de una idea más detallada de las características de la producción de NO en los ratones ob/ob.

La drástica reducción de la síntesis de NO coexiste, en los ratones ob/ob de nuestro estudio, con una discreta pero significativa elevación de los niveles circulantes de la poliamina espermina, que incluso se incrementa tras la administración de arginina. Tal resultado nos hace presumir una alteración metabólica basal en la homeostasis de los niveles de poliaminas asociada, directa o indirectamente, a la deficiencia de leptina y de NO. De hecho, cuando se consideran globalmente nuestros resultados, se observa una

correlación directa entre niveles plasmáticos de nitrato y leptina ( $P=0,496$ ;  $r<0,0001$ ) así como una inversa entre nitrato y espermina ( $P=-0,289$ ;  $r<0,038$ ).

Desconocemos, ante la falta de estudios disponibles en este campo, el origen bioquímico y el significado fisiopatológico de los cambios en los niveles de poliaminas circulantes, particularmente en relación a la disfunción del sistema cardiovascular. Tanto el colesterol como la glucosa provocan a largo plazo cambios anatómo-patológicos en la pared vascular, con proliferación de células del músculo liso, y atracción de fibroblastos. En esta situación de aumento de la división y crecimiento celular, podría considerarse “esperable” una elevación de los niveles de poliaminas. Sin embargo, también podrían reflejar una respuesta compensatoria frente a condiciones prooxidantes tales como las existentes en los ratones ob/ob. Con todo ello, nuestras observaciones en los ratones ob/ob pueden servir de base para el análisis tanto de los mecanismos que controlan ambas vías, como de su implicación en la iniciación y progresión de las alteraciones cardiovasculares de este modelo experimental (Saraiva et al, 2007). En el sentido de esclarecer tanto el origen del aumento de poliaminas circulantes como su significado fisiopatológico se deben enmarcar los resultados del presente trabajo.

En él hemos evaluado los posibles cambios en los niveles de poliaminas a nivel del sistema cardiocirculatorio, concretamente, en sangre, corazón y aorta torácica de ratones lean y ob/ob. Además, condicionados por las características propias de obesidad de nuestro modelo experimental (que supone infiltración lipídica de los tejidos), hemos incluido también en nuestro estudio la determinación de los niveles de poliaminas en el tejido adiposo tanto abdominal como retroperitoneal. Analizar el efecto de la suplementación de arginina sobre los parámetros indicados ha constituido también uno de los objetivos fundamentales de nuestro estudio.

En el análisis de nuestros resultados cabe señalar que, en todos los casos, los niveles experimentales se encuentran en el rango de lo descrito, y que la discreción de los cambios observados es acorde con nuestros estudios previos (Teixeira, 1999; Teixeira et al, 2002; Garcia-Taberner, 2001). Una característica interesante de las poliaminas es la escasa fluctuación de sus niveles en respuesta a cambios fisiopatológicos importantes como, por ejemplo, la privación completa de arginina, condición en la que

prácticamente todas las vías que derivan de la arginina, incluida la síntesis de NO, están severamente limitadas (Teixeira, 1999; Teixeira et al, 2002). La constancia de sus niveles se explica por lo intrincado de su metabolismo y los sofisticados mecanismos de regulación que determinan su patrón órgano/tejido específico. Esta misma constancia refuerza la importancia fisiológica de las poliaminas (Algranati et al, 2006; Pegg, 2009; Guasco-Herrera et al, 2014).

Según nuestros resultados sobre los niveles circulantes de putrescina, espermidina y espermina, sólo ésta última se eleva significativamente en los ratones ob/ob respecto a los lean. Este resultado es acorde con la moderada elevación de poliaminas eritrocitarias en otros modelos de patologías de RCV. Elevaciones de espermidina y espermina se han descrito en diabéticos tipo 2 (Seghieri et al, 1997; Meneu, 2000; Santaolalia, 2001), y de espermidina en pacientes o modelos animales de DM1 (Seghieri et al, 1992; García-Taberner, 2001). En todos los casos mencionados (Meneu, 2000; Santaolalia, 2001; Seghieri et al, 1992; Seghieri et al, 1997) las poblaciones diabéticas estaban afectas también de HTA, otro factor de riesgo vascular que parece ser decisivo en el aumento de poliaminas (Santaolalia ML, 2001). En nuestros estudios en pacientes pediátricos obesos hemos observado elevaciones de las tres poliaminas (Codoñer-Franch et al, 2011a). La coincidencia de resultados respecto a la elevación en los niveles circulantes de poliaminas en diferentes condiciones de RCV hace pensar que forman parte de una respuesta convergente que, aunque por diferentes procesos etiopatogénicos, está relacionada con el deterioro endotelial común de estas patologías. En este sentido, y dada la constancia y escasa variabilidad de sus niveles, podría constituir un buen marcador en el seguimiento del RCV. La dificultad estriba en establecer su significado.

Los niveles circulantes de poliaminas se elevan en situaciones de proliferación celular y, en el cáncer, se han relacionado con la extensión y agresividad del tumor (Minois et al, 2011; Soda, 2011; Battaglia et al, 2014). Por los datos de que disponemos en las patologías de RCV, podrían estar relacionadas con la presencia de sus complicaciones vasculares; podrían ser marcadores de daño vascular, proliferación celular o reparación endotelial activa por la existencia de vasos lesionados (Seghieri et al, 1992; Seghieri et al, 1997).

Otra posibilidad es que las poliaminas circulantes estén relacionadas con la respuesta frente al estrés oxidativo que acompaña a las patologías de RCV. La espermidina y la espermina, al igual que la arginina, poseen capacidad antioxidante y son capaces de proteger a las moléculas biológicas (DNA y lípidos) del daño oxidativo mediado por radicales libres (Tadolini, 1988; Lovaas y Carlin, 1991; Lovaas, 1997). El estrés oxidativo podría activar las señales intracelulares para el crecimiento y la proliferación celular modificando el metabolismo y recambio de las poliaminas. De hecho, tanto la ODC como la SSAT y otros enzimas clave en el metabolismo de las poliaminas son sensibles al estrés oxidativo o sus consecuencias (Otieno y Kensler, 2000; Jell et al, 2007; Pirinen et al, 2007; Smirnova et al, 2012).

Ciertos resultados previos de nuestro grupo sugieren una conexión entre niveles circulantes de poliaminas y estrés oxidativo. En pacientes diabéticos, los niveles circulantes de poliaminas evolucionan paralelamente a los de MDA, uno de los marcadores más ampliamente utilizados de estrés oxidativo (Santaolaria, 2001). En el mismo sentido, la elevación de espermidina y espermina en la diabetes clínica o experimental se normaliza con el suministro de arginina, con probados efectos antioxidantes, al tiempo que se reduce la excreción urinaria MDA (Meneu, 2000; García-Taberner, 2001). Estos resultados apoyarían el propuesto papel antioxidante de las poliaminas (Lovaas, 1997), aunque no descartan efectos indirectos ni significados bioquímico-fisiológicos diferentes para las distintas poliaminas.

Un resultado similar hemos obtenido en este estudio en el que la elevación sanguínea de espermina en los ratones ob/ob se correlaciona con la de los marcadores circulantes de estrés oxidativo como 8-isoprostanos ( $R=0,702$ ;  $p<0,0001$ ) y MDA ( $R=0,522$ ;  $p<0,0001$ ). Estos resultados reproducen totalmente los obtenidos en nuestros estudios con pacientes pediátricos obesos (Codoñer-Franch et al, 2011a) por lo que abren la puerta al análisis detallado de su utilidad potencial, en concreto, al abordaje de su respuesta a la suplementación con arginina.

Sin embargo, otro resultado interesante de nuestro estudio es la insensibilidad de los niveles de circulantes de espermina de los ratones ob/ob a la suplementación de arginina. En trabajos previos con pacientes diabéticos observamos que la suplementación de

arginina disminuía los niveles sanguíneos de espermidina y espermina (Meneu V, 2000). Es posible que la disponibilidad de arginina en el hombre tenga un mayor reflejo en los niveles sanguíneos de poliaminas, al menos bajo condiciones patológicas. Otra posibilidad no descartable a la luz de nuestros resultados es que la efectividad de la arginina esté relacionada con la funcionalidad de la vía leptina-NO, el defecto primario en los ratones ob/ob.

Por lo que respecta a los niveles de poliaminas tisulares (corazón, aorta y paquetes grasos abdominal y retroperitoneal) los resultados obtenidos confirman nuestras observaciones previas en lo referente al patrón diferencial de cada órgano/tejido, y que los cambios de sus niveles tisulares son mucho más pronunciados que a nivel sanguíneo (Teixeira, 1999; Teixeira et al, 2002). En el actual estudio hemos observado, para los órganos tejidos analizados, un comportamiento caracterizado por 1) un descenso generalizado y significativo de la mayoría de poliaminas en los ratones ob/ob respecto a los lean; 2) cambios específicos de tejido en el cociente espermidina/espermina; y 3) un débil efecto de la arginina, en todo caso más evidente en los ratones lean que en los ob/ob. Consideraremos independientemente los resultados de cada tejido y su posible significado en el contexto del modelo experimental utilizado.

Según nuestros resultados los ratones ob/ob presentan, respecto a los lean, niveles cardiacos significativamente más bajos de putrescina y espermidina sin cambios en los de espermina, lo que reduce el cociente espermidina/espermina significativamente en este órgano. Desconocemos si el descenso de este cociente (índice de hiperplasia y proliferación celular) o de los niveles individuales de putrescina y/o espermidina reflejan eventos primarios previos a la hipertrofia cardiaca que caracteriza los estadios más avanzados de este modelo de obesidad. Entre estos eventos podría encontrarse una elevación de los procesos apoptóticos (Barouch et al, 2006), fenómeno en el que también se ha implicado a las poliaminas (Jänne et al, 2004). Recordemos, aunque ya se ha comentado, que nos movemos en estadios iniciales de la obesidad y sus complicaciones, y la elevación de poliaminas no parece ser un evento decisivo, aunque sí frecuente, en la hipertrofia cardiaca experimental (revisado en Jänne et al, 2004).

A diferencia de lo referido para corazón, el engrosamiento e infiltración lipídica del tejido aórtico resultó ya evidente en nuestro modelo experimental. A pesar de ello el comportamiento del tejido aórtico respecto a los cambios en los niveles de poliaminas fue muy similar al cardiaco, observándose en este caso descensos significativos para las tres poliaminas en ratones ob/ob. Sin embargo, dado el mayor descenso de la espermina, el cociente espermidina/espermina en este tejido, a diferencia del corazón, se eleva significativamente, y resulta tentador relacionarlo con una disfunción y excesiva proliferación del tejido vascular (Jänne et al, 2004). Pero más allá de esta observación experimental, que debe ser tomada con cautela dada la más que probable contribución a estos efectos de depósitos grasos adheridos a la pared arterial, se encuentra la respuesta a la arginina de este tejido. A diferencia de la falta de efectos apreciables a nivel cardiaco, la ingesta de arginina restauró de forma parcial pero significativa los niveles de espermidina y espermina y el cociente espermidina/ espermina en el grupo obeso. Tal comportamiento sugiere que los cambios en los niveles de poliaminas mediados por la arginina en el árbol vascular podrían estar implicados en los ampliamente descritos beneficios cardiovasculares del aminoácido (Clemmensen et al, 2012; Stancic et al, 2012).

Como ya se ha comentado, el catabolismo de las poliaminas, al igual que los efectos de la arginina, se han relacionado con la adiposidad y el control del gasto energético en el tejido adiposo (Pirinen et al, 2007; Jell et al, 2007; Pérez-Leal, 2012; Bonhoure et al, 2015). Según nuestros resultados, los niveles tanto de espermidina como de espermina son significativamente más bajos en tejido adiposo (abdominal y retroperitoneal) de los ratones ob/ob que en los lean, permaneciendo constante su cociente, y careciendo de efecto la suplementación de arginina. Recordemos que la arginina ha resultado ineficaz en la reducción de los depósitos grasos de los ratones ob/ob en nuestro estudio. Sin embargo, en los ratones lean, la administración de arginina disminuyó estos depósitos alrededor de un 10%, efecto que se acompaña de una sensible (aunque no significativa) elevación de los niveles de espermidina y espermina. Según estos resultados no hay que descartar un cierto grado de implicación del metabolismo de la arginina hacia poliaminas en el control de la obesidad. En cualquier caso, o bien la vía leptina-NO sería fundamental, o la contribución de la vía arginina-poli-aminas se encuentra infravalorada en nuestras particulares condiciones experimentales de alimentación restringida de los ratones ob/ob. Un dato que apoyaría esta segunda posibilidad es que el nivel de estrés oxidativo, al que

es sensible el metabolismo de las poliaminas, depende críticamente de la ingesta dietaria en los ratones ob/ob (Sáinz et al, 2010).

### **5.3. ESTRÉS OXIDATIVO: EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ARGININA.**

Nuestros resultados están de acuerdo, en términos generales, con la ampliamente descrita situación de estrés oxidativo asociada a la obesidad (Ruskovska y Bernlohr, 2013; Murdolo et al, 2013). Sin embargo, también muestran la importancia de los marcadores y lechos seleccionados para evaluar tal condición y, por nuestras condiciones experimentales, la importancia clave de la ingesta (Sáinz et al, 2010; Sohal y Forster, 2014).

El estrés oxidativo refiere al desequilibrio del estado redox que resulta de la superación de la capacidad antioxidante por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Su consecuencia, en última instancia, es el daño oxidativo a las macromoléculas celulares alterando su estructura y función. Otra consecuencia de la sobreproducción de ROS es la desregulación de las múltiples vías de señalización en las que se encuentran fisiológicamente implicadas (Dalton et al, 1999; Siti et al, 2015). Junto a las alteraciones de la biodisponibilidad de NO, el aumento del estrés oxidativo constituye otra observación común a las patologías de RCV en las que parece contribuir de forma decisiva a la instauración y desarrollo de sus complicaciones (Ruskovska y Bernlohr, 2013; Murdolo et al, 2013; Li et al, 2014; Jankovic et al, 2015).

Diferentes mecanismos se han relacionado con el estrés oxidativo en la obesidad. Entre ellos destacan la resistencia insulínica y la inflamación provocada por la expansión del tejido adiposo y, más concretamente, por la funcionalidad de este tejido. Resultan cada vez más numerosas las evidencias de que los efectos deletéreos de la obesidad no se relacionan críticamente con la masa de tejido adiposo sino con sus características metabólicas y secretoras como órgano endocrino (Olefsky y Glass, 2010; Katsareli y Dedoussis, 2014; Jankovic et al, 2015). Resistencia insulínica e inflamación acompañan en

nuestro modelo ob/ob a la falta de secreción de leptina funcional por el tejido adiposo. Estos resultados se comentarán en el siguiente apartado.

En nuestro estudio hemos evaluado el daño oxidativo provocado por las ROS a nivel lipídico mediante la determinación de TBARM y 8-isoprostanos plasmáticos y urinarios, y MDA en plasma. Los resultados son claramente indicativos de la existencia de estrés oxidativo a nivel sistémico en los ratones ob/ob. En éstos, tanto los niveles de 8-isoprostanos en plasma y orina como los de MDA en plasma medido mediante HPLC son significativamente más altos que en los controles lean. Sin embargo, los niveles de TBARM sólo se ven ligeramente aumentados tanto en plasma como en orina de los ratones obesos. Estos resultados concuerdan totalmente con los del estudio de Sáinz et al (2010) en ratones ob/ob sometidos a alimentación paralela respecto a los controles lean. Dos resultados interesantes de este mismo estudio son que los niveles circulantes de TBARM en estos ratones se elevan considerablemente (del orden de 4 veces) con la alimentación "ad libitum", y que este aumento se previene por el tratamiento con leptina (Sáinz et al, 2010). Estas observaciones refuerzan la idea de la importancia del control de la ingesta en el análisis de los resultados obtenidos en diferentes modelos experimentales, en particular, los referidos a los equilibrios redox por su especial sensibilidad a la disponibilidad y uso de los combustibles energéticos (Jankovic et al, 2015).

Los datos sobre el papel de la leptina en relación al estrés oxidativo son contradictorios, habiéndose descrito efectos tanto pro como antioxidantes (revisado en Lindström, 2012). Así, la producción de ROS in vitro por células inflamatorias y endoteliales, y el nivel de estrés oxidativo sistémico en animales no obesos son estimulados por la leptina, y la hiperleptinemia farmacológica induce estrés oxidativo sistémico y localizado, lo que sugiere un papel "pro-oxidante" de la leptina (Beltowski et al, 2003). Por el contrario, en ratones ob/ob, el estrés oxidativo inducido por la dieta se reduce por la administración de leptina recombinante que altera la expresión de 1127 genes de los cuales 86 están implicados en el estrés oxidativo, la defensa inmune y la respuesta inflamatoria (Sáinz et al, 2010). Nuestros resultados a nivel sistémico de marcadores de estrés oxidativo y de inflamación (IL-6; véase más adelante) son más acordes con su papel antioxidante in vivo, al menos bajo condiciones de restricción dietaria.

Sin embargo, según nuestros resultados, los efectos de la leptina podrían ser diferentes a nivel tisular. En nuestro estudio hemos valorado el daño oxidativo en diferentes órganos y tejidos utilizando como indicadores de peroxidación lipídica el TBARM, y los niveles de grupos SH y AOPPs (grupos CO) como marcadores de oxidación proteica. A fines prácticos, ésta última la hemos valorado conjuntamente por el cociente CO/SH. A pesar de la complejidad de los cambios órgano/tejido específicos para los diferentes parámetros, nuestros resultados apuntan a un menor grado de estrés oxidativo a nivel tisular en los ratones ob/ob que en los controles lean. En líneas generales, tanto los niveles de TBARM como el cociente CO/SH o no se modifican o descienden, particularmente en hígado y paquetes grasos, llegando a alcanzar las diferencias significación estadística. A diferencia de lo señalado, los niveles musculares de TBARM fueron ligera pero sensiblemente más altos en el grupo ob/ob que en el control. Estos resultados concuerdan totalmente con los del estudio de Sáinz et al (2010) que muestra niveles musculares de TBARM superiores en los ratones ob/ob que no difirieren significativamente de los del grupo lean sometido a alimentación paralela. Considerando el papel estimulador de la leptina en el reparto, flujo y utilización de los combustibles energéticos y la actividad metabólica mitocondrial, su deficiencia en los ratones ob/ob podría conllevar una menor liberación de ROS a este nivel y, en consecuencia, a un menor estrés oxidativo (Lindström, 2012). Esta condición podría prevalecer bajo condiciones de alimentación restringida, y ser superada cuando se eleva la ingesta dietaria como se observa en el trabajo de Sáinz et al (2010).

Es más que probable que la resistencia insulínica que acompaña a la deficiencia de leptina tenga un papel importante en los efectos observados a nivel tisular. De hecho, el descenso en los niveles de TBARM y del cociente CO/SH es particularmente evidente en hígado y grasa, dos tejidos insulino-sensibles, y los niveles de ambos marcadores se correlacionan directa o inversamente con el índice HOMA de resistencia insulínica en músculo, hígado y grasa ( $p < 0,025$  en todos los casos).

Sin embargo, la RI no parece ser decisiva en el estrés oxidativo a nivel sistémico, al menos de forma directa. Según nuestros resultados, los niveles de indicadores de daño oxidativo evaluados en plasma y/u orina (Isoprostanos, MDA, TBARM) parecen responder, de forma diferencial, al conjunto de las particulares condiciones metabólicas y adipoquinas que diferencian los ratones lean de los ob/ob. Así, el nivel plasmático de TBARM sólo se

correlaciona positivamente con el de triglicéridos ( $R=0,571$ ;  $p<0,0001$ ). Para el MDA se observan correlaciones con el colesterol total ( $R=0,325$ ;  $p=0,021$ ), colesterol HDL ( $R= -0,514$ ;  $p<0,0001$ ), cociente CT/HDL ( $R=0,464$ ;  $p=0,001$ ) y nitrato ( $R=0,388$ ;  $p=0,008$ ). Finalmente, los niveles plasmáticos de isoprostanos se correlacionan con los de glucosa ( $R=0,424$ ;  $p=0,005$ ), colesterol ( $R=0,543$ ;  $p<0,0001$ ), cociente CT/HDL ( $R=0,497$ ;  $p=0,001$ ), nitrato ( $R= -0,374$ ;  $p=0,005$ ). Además, sólo para los isoprostanos se observan correlaciones con los niveles de resistina ( $R=0,450$ ;  $p=0,003$ ), y el peso de los paquetes grasos abdominal ( $R=0,647$ ;  $p=0,007$ ) y retroperitoneal ( $R=0,553$ ;  $p=0,026$ ). Señalar que las correlaciones indicadas resultan del análisis conjunto de nuestros cuatro grupos experimentales. Sin embargo, los grupos lean y ob/ob difieren en la presencia o ausencia de leptina, y los niveles de ésta se correlacionan con los de MDA ( $R=0,437$ ;  $p=0,042$ ) en el grupo control. La importancia de la leptina en el estrés oxidativo se evidencia cuando se analizan separadamente los datos de los ratones lean y ob/ob. Así, en los ratones lean, las correlaciones anteriormente señaladas para el MDA se amplían a la resistina ( $R= -0,642$ ;  $p=0,001$ ) y al peso de los paquetes grasos ( $R=0,707$ ;  $p=0,05$ ). Por el contrario, sólo se conserva para los isoprostanos la correlación con la glucemia. A la luz de estos resultados no hay que descartar que la RI que conlleva la deficiencia de leptina, a través de sus secuelas metabólicas, condicione diferencialmente el grado y tipo (marcadores) de estrés oxidativo. Estos resultados también apoyan la importancia de la extensión y funcionalidad (niveles de resistina) de los depósitos grasos en el estrés oxidativo (Olefsky y Glass, 2010; Rath et al, 2014; Netzer et al, 2015).

Frente al amplio consenso sobre los beneficios de la arginina en el metabolismo energético, la obesidad y sensibilidad a la insulina, sus efectos sobre el estrés oxidativo siguen siendo objeto de controversia. Acciones antioxidantes y pro-oxidantes se han atribuido al aminoácido, tanto in vivo como in vitro, dependiendo del modelo experimental y marcadores evaluados (Sáinz et al, 2010; Sohal y Forster, 2014). Según nuestros resultados, sus efectos antioxidantes predominarían a nivel sistémico en los ratones lean en los que la suplementación con arginina disminuye los niveles de la práctica totalidad de marcadores de estrés oxidativo evaluados. Sin embargo, efectos prooxidantes y antioxidantes parecen coexistir en los ratones ob/ob ya que, en éstos, la arginina incrementa sensiblemente los niveles plasmáticos de isoprostanos y los urinarios de TBARM, al tiempo que disminuye significativamente los de MDA en plasma.

La mayoría de estudios que apoyan el papel antioxidante de la arginina lo atribuyen a su canalización hacia NO (Stancic et al, 2012; Sansbury y Hill, 2014; Li et al, 2014). Nuestros resultados apoyarían esta posibilidad dada la severa reducción de la síntesis de NO observada en los ratones ob/ob y su no normalización por la arginina. Sin embargo, nuestros resultados no descartan efectos antioxidantes directos o independientes de NO de la arginina sobre la generación de MDA. Tampoco descartan efectos indirectos relacionados con los cambios metabólicos inducidos por la suplementación. Como ya hemos comentado, los indicadores analizados de daño oxidativo se correlacionan de forma diferencial con el perfil glucídico y lipídico, la masa de los paquetes grasos y niveles de adipocinas, y los efectos de la arginina sobre estos parámetros difiere entre ratones lean y ob/ob.

Como ya se ha señalado, la sensibilidad a la insulina parece ser el principal factor relacionado con el estrés oxidativo a nivel tisular en nuestro estudio. Numerosas evidencias experimentales apoyan la mejora de la sensibilidad a la insulina así como el aumento de la captación de glucosa y su metabolismo con la administración de arginina. Otros efectos metabólicos de este aminoácido incluyen aumento de la lipólisis, inhibición de la lipogénesis, reducción de la síntesis de glucosa y triglicéridos, y elevación de la oxidación de glucosa y ácidos grasos en tejidos insulino sensibles (McKnight et al, 2010; Tan et al, 2012; Stancic et al, 2012; Clemmensen et al, 2012). De acuerdo con ello, nuestros resultados muestran que la resistencia insulínica (índice HOMA) se reduce significativamente en los ratones ob/ob con la ingesta de arginina. Este descenso es consecuencia de un menor requerimiento de insulina para mantener niveles iguales, o ligeramente inferiores, de glucosa circulantes y, aunque mucho menos acusado, también se observa en los ratones lean. Es posible que este cambio en la actividad metabólica con la administración de arginina repercuta en la generación de ROS y en el daño oxidativo en tejidos sensibles a la insulina como hígado músculo y tejido adiposo. Nuestros resultados no evidencian cambios significativos en la peroxidación lipídica (TBARM), pero sí en la oxidación proteica (CO/SH), en estos tres tejidos con la suplementación, con efectos más pronunciados en los controles lean. Así, la arginina reduce el cociente CO/SH en hígado, mientras que lo eleva clara y significativamente en músculo y, sobre todo, en tejido adiposo. Si ello refleja un aumento del estrés oxidativo por la arginina directa o indirectamente, si este estrés está implicado en la reducción de la masa adiposa y/o su

actividad secretora, y los mecanismos subyacentes creemos que son cuestiones que merecen más detallado análisis experimental.

La importancia del tejido adiposo como fuentes de radicales libres y el posible significado fisiopatológico del estrés oxidativo en este tejido en relación con la resistencia insulínica, inflamación y otras alteraciones que acompañan a la instauración y evolución de las complicaciones asociadas a la obesidad han sido objeto de recientes y magníficas revisiones (Murdolo et al, 2013; Ruskovska y Bernlohr, 2013; Netzer et al, 2015). En ellos se recogen las evidencias experimentales que apoyan la implicación del estrés oxidativo en el potencial de proliferación, diferenciación y remodelado celular implicados en la expansión y mantenimiento de la funcionalidad del tejido adiposo. Sin embargo, en ellos también se reconoce la falta de conocimientos sobre los mecanismos que relacionan el estrés oxidativo con su disfunción, así como de las especies oxidantes implicadas, sus dianas y los productos oxidados generados (marcadores). Además, la asociación del estrés oxidativo con la disfunción del tejido adiposo proviene, básicamente, de estudios en obesidad inducida por dieta; como muestran nuestros resultados y los de otros estudios (Sáinz et al, 2010) la ingesta calórica es un factor decisivo (la mayoría de las veces no contemplado) en el estrés oxidativo. No tenemos conocimiento de que se haya explorado el estrés oxidativo en tejido adiposo en los ratones ob/ob y los efectos sobre él de la administración de arginina. Sin embargo, como pasamos a comentar en el siguiente apartado, la arginina juega un papel crucial en el metabolismo de los macrófagos que infiltran el tejido adiposo condicionando su polarización hacia fenotipo M1 o M2 y, con ello, los procesos inflamatorios (Olefsky y Glass, 2010; Rath et al, 2014).

#### **5.4. ADIPOQUINAS, INFLAMACIÓN Y RESISTENCIA INSULÍNICA: EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE ARGININA.**

Existen abrumadoras evidencias clínicas y experimentales que apoyan el papel de la adiposidad como causa primaria de la resistencia insulínica y la inflamación que acompañan a las complicaciones de la obesidad (Stancic et al, 2012; Sansbury y Hill, 2014; Katsareli y Dedoussis, 2014; Cavalera et al, 2014). Sin embargo, cada vez cobra más fuerza la hipótesis de que es la “desregulación” de la actividad del tejido adiposo y no su masa lo

que conecta la obesidad con el RCV. Es decir, que el aumento de la masa del tejido adiposo no es suficiente ni necesaria para que se produzcan las alteraciones metabólicas (Olefsky y Glass, 2010; Rath et al, 2014).

La obesidad conlleva importantes cambios estructurales y funcionales del tejido adiposo. Entre ellos, aumento de los acúmulos grasos en los adipocitos ya existentes (hipertrofia) y generación de nuevos adipocitos a partir de pre-adipocitos (adipogénesis). De acuerdo con la hipótesis de la “expandibilidad”, el límite de adiposidad “sana” vendría determinado por la capacidad individual del tejido adiposo para expandirse por adipogénesis. La alteración de la capacidad adipogénica caracteriza a la obesidad metabólicamente “dañina” o hipertrófica (revisado en Murdolo et al, 2013; Ruskovska y Bernlohr, 2013).

El compromiso de las funciones endocrinas es otra característica inherente a la obesidad dañina, y cuyas manifestaciones finales son la resistencia a la insulina y la inflamación. Además de servir de almacén para el exceso calórico en forma de grasa, el tejido adiposo es considerado actualmente como un activo e importante órgano endocrino. Como tal, secreta numerosas moléculas bioactivas decisivas en el control del metabolismo energético y sensibilidad a la insulina como la leptina, resistina y adiponectina. Otras, como TNF- $\alpha$  e IL-6, no son de secreción exclusiva por los adipocitos pero tienen efectos proinflamatorios estrechamente relacionados con la resistencia insulínica (Olefsky y Glass, 2010; Katsareli y Dedoussis, 2014)

La infiltración de macrófagos y otras células del sistema inmune es otra característica del remodelado del tejido adiposo en la obesidad y que contribuye a su disfunción. La interacción entre adipocitos y macrófagos, a través de la liberación de ácidos grasos y citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-6, establece un circuito paracrino de retroalimentación por el que se establece una inflamación de bajo grado que, posteriormente, se cronifica y propaga. Finalmente, la secreción de grandes cantidades de TNF- $\alpha$  e IL-6 por los macrófagos y los adipocitos hipertróficos, y la reducida adipogénesis, contribuyen a desregular la liberación de adipoquinas y a promover la resistencia a la insulina. El estado inflamatorio es, junto a la resistencia a la insulina, otra de las causas del deterioro vascular que acompaña a la obesidad. De hecho, la obesidad es considerada actualmente una enfermedad inflamatoria (Lumeng y Saltiel, 2011; Rocha y Folco, 2011).

La estrecha conexión entre obesidad, resistencia a la insulina e inflamación ha sido valorada en nuestro estudio a través de los niveles de insulina y glucosa (integrados en el índice HOMA), IL-6 y TNF- $\alpha$  (citoquinas proinflamatorias), resistina y leptina (adipoquinas indicadoras de la funcionalidad del tejido adiposo), y el peso de los paquetes grasos abdominal y retroperitoneal (indicadores del grado de adiposidad). Los cambios en estos parámetros con la suplementación de arginina nos han permitido evaluar los beneficios descritos para este aminoácido en la obesidad.

En este contexto, nuestros resultados apoyan totalmente las observaciones previas y las amplían en el sentido de su constatación incluso en nuestras más que moderadas condiciones de restricción dietaria y en modelo, ratones ob/ob, en el que la ausencia de leptina conlleva una reducción drástica de la síntesis de NO. Según nuestros resultados, los ratones ob/ob bajo condiciones de alimentación paralela presentan, respecto a los controles lean, una masa grasa abdominal y retroperitoneal 10-20 veces superior; niveles circulantes de glucosa e insulina del orden de 2 y 7 veces superiores, respectivamente, lo que se traduce en una elevación del índice HOMA de más de 10 veces; niveles tres veces superiores de resistina; y unos niveles de IL-6 unas 10 veces superiores. Los niveles de TNF- $\alpha$  en nuestro estudio fueron indetectables en todos los grupos. Por lo tanto, la coexistencia de obesidad disfuncional, resistencia insulínica e inflamación han sido reproducibles en nuestro modelo.

También hemos podido constatar en nuestro modelo ob/ob algunos de los beneficios descritos para la arginina en la obesidad (McKnight et al, 2010; Stancic et al, 2012; Clemmensen et al, 2012; Tan et al, 2012). Entre ellos, aumento de la sensibilidad a la insulina (descenso del índice HOMA); reducción de la inflamación (IL-6); y mejora del perfil de adipoquinas (resistina). Sin embargo, en nuestros ratones ob/ob, estos efectos no se asocian a una reducción en la masa de tejido adiposo sino a cambios en su perfil secretor evidenciado por una menor liberación de resistina e IL-6. De acuerdo con los resultados previos en modelos de obesidad inducida por dieta (Stancic et al, 2012; Clemmensen et al, 2012; Tan et al, 2012), los beneficios de la arginina en los ratones lean se amplían a una sensible disminución del peso de los depósitos grasos (8-20%) y a un significativo descenso de la leptina. Por lo tanto, a pesar de que la derivación de la arginina hacia NO ha sido implicada en la mayoría de sus beneficios sobre el perfil cardiovascular, nuestros

resultados sugieren la implicación también de procesos NO-independientes mediados directamente por la propia arginina (antioxidante) o su derivación hacia otras vías (poliaminas).

Evidencias recientes apoyan la importancia de la disponibilidad de arginina y de su uso metabólico en la polarización de los macrófagos del tejido adiposo hacia el fenotipo M1/Th1 (proinflamatorio) o M2/Th2 (antiinflamatorio). Así, en los macrófagos M1 la arginina es metabolizada principalmente por la vía de la NOS mientras que en los M2 su principal derivación es hacia poliaminas vía arginasa (Olefsky y Glass, 2010; Rath et al, 2014). Una posibilidad que queda abierta al análisis experimental es que, dado el descenso observado en la síntesis de NO en los ratones ob/ob, exista un desequilibrio NO/poliaminas (M1/M2) en los macrófagos del tejido adiposo y que éste resulte sensible al aporte exógeno de arginina.

Estudios in vitro han constatado la importancia de la arginina en la diferenciación de los adipocitos (Vuohelainen et al, 2010; Tan et al, 2012). Este proceso se encuentra alterado en la obesidad, y pre-adipocitos y adipocitos difieren en sus características secretoras, por lo que no sería descartable una mejora del perfil secretor con la suplementación de arginina. De hecho, la expresión de adiponectina caracteriza a los adipocitos diferenciados, y una reducción de la relación leptina/adiponectina ha sido descrita tras la administración de arginina (revisado Rath et al, 2014). Los niveles de adiponectina no han sido evaluados en nuestro estudio pero sí hemos constatado una disminución significativa de leptina tras el tratamiento con arginina de los ratones lean.

Otras opciones directas para los beneficios de la arginina estarían relacionadas con su capacidad antioxidante, ya que las alteraciones del estado redox, la hipoxia y el estrés oxidativo se postulan como opciones para explicar el inicio y/o la progresión de la disfunción del tejido adiposo en la obesidad (Ruskovska y Bernlohr, 2013; Murdolo et al, 2013; Sansbury y Hill, 2014; Netzer et al, 2015; Jankovic et al, 2015).

Al margen de estas consideraciones, creemos que uno de los resultados más interesantes de nuestro estudio es la constatada elevación de los niveles de resistina en los ratones ob/ob, su parcial restauración por la administración de arginina, y la correlación de sus niveles con la mayoría de parámetros evaluados en nuestro estudio.

Se ha demostrado que la administración de resistina recombinante a ratones normales daña la acción de la insulina y la tolerancia a la glucosa, mientras que los dos procesos se mejoran en ratones con obesidad inducida por la dieta tras la inyección de anticuerpos frente a la resistina circulante (Steppan et al, 2001). Esta adipoquina actúa principalmente en hígado aumentando la liberación hepática de glucosa y, en menor medida (dependiendo de la especie de roedor), reduciendo la captación de glucosa en tejido adiposo y músculo (Benomar et al, 2013). La manipulación génica en roedores con el fin de provocar la sobreexpresión, reducción o supresión de la resistina, ha confirmado que ésta ejerce una función antagónica a la de la insulina dando lugar a intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia, como corroboran los datos de nuestro estudio, lo que indica que se produce un deterioro del efecto reductor de glucosa de la insulina. Por el contrario, la disminución de la expresión de resistina revierte la RI inducida por una dieta alta en grasas (Qi et al, 2006; revisado en Codoñer-Franch y Alonso-Iglesias, 2015).

El aumento de los niveles de resistina asociado a la obesidad en ratones ob/ob se confirmó en nuestro ensayo Multiplex, en el que obtuvimos una concentración de esta adipoquina casi tres veces mayor en el plasma del grupo obeso que en el control, que en nuestro caso depende de forma directa o indirecta de la presencia de leptina y no de la dieta. Al analizar la correlación entre niveles de resistina y los del resto de parámetros medidos, hemos podido observar que ésta se relaciona globalmente de forma significativa con los diferentes indicadores de alteraciones glucídicas o lipídicas, resistencia a insulina, inflamación, daño oxidativo y metabolismo de la arginina (poliaminas y óxido nítrico). En cuanto a la RI se ve correlación global positiva de la resistina con la insulina, la glucosa y el índice HOMA, el cual relaciona gluquemia e insulinemia. Además, la RI deriva en dislipidemia porque altera la actividad lipogénica, que en nuestro estudio se constata por la correlación positiva entre el nivel de resistina y el de colesterol y triglicéridos. De esta forma, nuestros resultados confirman en los ratones ob/ob la implicación de la resistina en la RI asociada a la obesidad. La resistina reduce la fosforilación dependiente de insulina de Akt y de las quinasas ERK1/2; aumenta la expresión de IL-6, SOCS-3 y PTP-1B (los principales reguladores negativos de la señalización de la insulina), a través de la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y AP-1; y activa JNK y p38MAPK (serin-quininas activadas por estrés), que aumentan la fosforilación del IRS-1 en el residuo S307

(que perjudican la señalización de insulina) y aumentan la expresión de los factores de transcripción mencionados, dando lugar, en conjunto, a RI y al aumento de expresión de citoquinas inflamatorias (TNF $\alpha$ , IL-6) (revisado en Codoñer-Franch y Alonso-Iglesias, 2015). Estas citoquinas inflamatorias también fueron cuantificadas en este estudio. El TNF- $\alpha$  no pudo valorarse con nuestro método, ya que sus niveles estuvieron en todos los casos por debajo del límite de detección. Sin embargo, los niveles de IL-6 son significativamente mayores, como se espera en un estado de RI y de hiperglucemia (Katsareli y Dedoussis, 2014). Haciendo un análisis de correlación entre el nivel de resistina y de IL-6, se observa una concordancia positiva entre ambos valores, tanto a nivel global como a nivel de grupo control y grupo obeso por separado, siendo especialmente alta en este segundo caso, donde llegado a un valor de resistina el nivel de IL-6 se dispara de forma exponencial.

Por lo tanto, a pesar del diferente origen de la molécula de resistina en ratones y humanos, nuestros resultados apoyan la idea de que no existe diferencia en su funcionalidad (Figura 5.1). De hecho, tal posibilidad ya ha sido evaluada por Qatani et al (2009) en ratones transgénicos “humanizados” que carecen de resistina murina derivada de adipocitos, pero sí expresan resistina humana en macrófagos. Estos ratones con una dieta alta en grasa muestran inflamación del tejido adiposo blanco y RI debido principalmente a una reducción de la captación muscular de glucosa. Por lo tanto, la resistina derivada de macrófagos también puede ligarse a respuestas inflamatorias, a la homeostasis de la glucosa y a RI en humanos. Trasladar los efectos de la resistina en la RI desde el ratón a humanos tiene un gran valor potencial, ya que la RI tiene un papel causal prominente en el estado inflamatorio que subyace a una amplia gama de patologías, incluyendo la obesidad, la diabetes, la aterosclerosis y la enfermedad vascular y los tumores malignos.

Reseñar finalmente la concordancia de los resultados de este trabajo en ratones ob/ob sobre los niveles circulantes de resistina, espermina, parámetros de estrés oxidativo e inflamación, con los observados por nuestro grupo en pacientes pediátricos obesos (Codoñer-Franch et al, 2011a; Codoñer-Franch et al, 2011b; Codoñer-Franch et al, 2012; Codoñer-Franch et al, 2014). Si la elevación sanguínea de espermina responde a deterioro vascular o es una respuesta al estrés oxidativo deberá ser objeto de análisis detallado. Sin embargo, el hecho de que tanto en humanos obesos como en ratones deficientes en

leptina se observe un mismo comportamiento sugiere una importancia relativa de la leptina y una mayor implicación de la propia condición de obesidad en estos procesos. Cabe señalar, que las variaciones en los niveles de poliaminas a nivel sanguíneo son mucho menos marcados que a nivel tisular, el modelo murino que hemos utilizado aporta información adicional que, aunque no sea suficiente para extraer conclusiones definitivas, sí permite orientar sobre futuros experimentos.

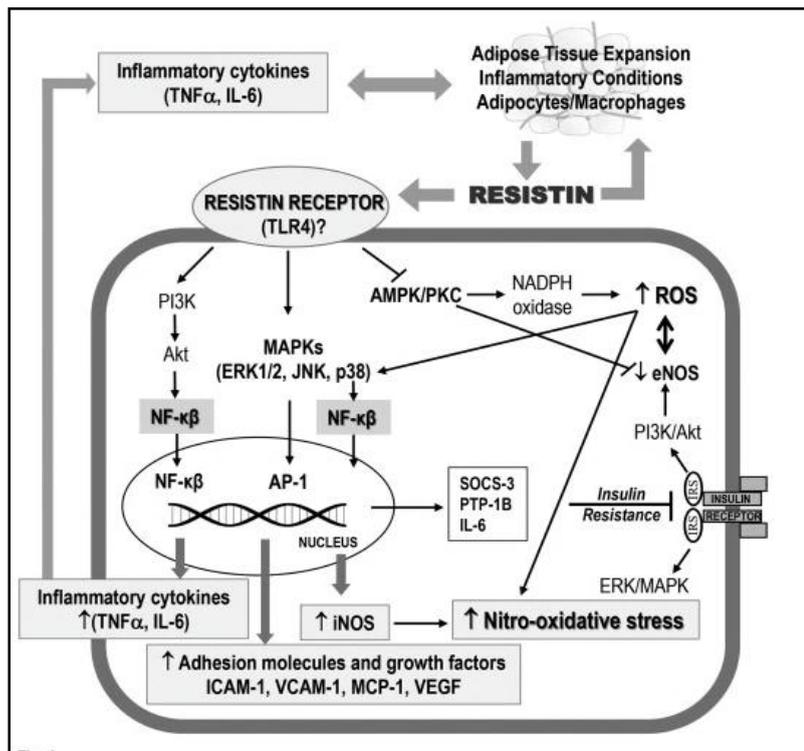


Figura 5.1. Integración del papel de la resistina en el contexto de inflamación, RI, estrés oxidativo y deterioro vascular. Tomada de Codoñer-Franch y Alonso-Iglesias (2015).



**CONCLUSIONES**





1. Los ratones ob/ob, un modelo largamente utilizado de RCV asociado a obesidad por deficiencia de leptina, mantienen, bajo condiciones de “alimentación paralela” con sus controles lean, las características que le configuran como tal: obesidad, aumento del peso de los paquetes grasos, hiperglucemia, hiperinsulinemia, resistencia insulínica, hipercolesterolemia, y elevación moderada de triglicéridos.
2. La suplementación con arginina mejora sensiblemente el perfil glucídico y la resistencia a la insulina tanto en ratones lean como ob/ob. Los beneficios sobre el perfil lipídico sólo son evidentes en ratones lean, al igual que los efectos sobre la ganancia ponderal, la adiposidad (reducción del peso de los paquetes grasos), la infiltración lipídica y contenido proteico de órganos y tejidos.
3. En los ratones ob/ob existe una severa disminución de la síntesis de NO, que no se acompaña de menor expresión de las isoformas de NOS, ni es restaurada por la suplementación con arginina.
4. Los ratones ob/ob presentan alteraciones del metabolismo de las poliaminas que incluyen un aumento de los niveles sanguíneos de espermina y un descenso generalizado de espermidina y espermina en corazón, aorta y paquetes grasos, y que no responden a la administración de arginina. El origen y significado de los cambios en los niveles de poliaminas, así como su relación con el deterioro vascular y cardiaco merecen ser objeto de análisis más detallado.
5. El estrés oxidativo sistémico es evidente en los ratones ob/ob a juzgar por los niveles de MDA y 8-isoprostanos. Sin embargo, no se detectan signos de estrés oxidativo a nivel tisular, probablemente como consecuencia de la restricción dietaria. Según nuestros resultados, algunos de los efectos antioxidantes de la arginina no son constatables en los ratones ob/ob.
6. La elevación de los niveles de IL-6 en los ratones ob/ob constata la condición de inflamación asociada a obesidad, sensible en este caso a la suplementación de arginina.

7. Los niveles de resistina se encuentran claramente elevados en los ratones ob/ob, y se correlacionan con los indicadores evaluados de RI, inflamación, daño oxidativo y metabolismo de la arginina. Estos resultados apoyan el modelo general de actuación propuesto para esta adipoquina en la obesidad, incluso en ausencia de leptina.

# BIBLIOGRAFIA





Abraham RR. (1973) "Some cellular characteristics of the epididimal adipose tissue in lean and obese-hyperglycaemic mice". *Diabetologia*. 9: 303-306.

Acosta AG, Añez J, Andarra CV, Valmore P, Bermudez P. (2006) "Mecanismos moleculares de la disfunción endotelial: de la síntesis a la acción del óxido nítrico". *AVFT*. 25(2): 54-58.

Algranati ID, Serra MP, Carrillo C, González NS. (2006). "Biología molecular del metabolismo de poliaminas en parásitos tripanosomátidos. Expresión de genes heterólogos de ornitina y arginina decarboxilasa en *Trypanosoma cruzi*." *Química Viva*. 5(2): 78-94.

Aranceta-Bartrina J, Serra-Majem L, Foz-Sala M, Moreno-Esteban B y Grupo Colaborativo SEEDO. (2005). "Prevalencia de obesidad en España". *Med Clin (Barc)*. 125(12): 460-466.

Banegas JR, Graciani A, Guallar-Castillón P, León-Muñoz LM, Gutiérrez-Fisac JL, López-García E. (2011). "Estudio de Nutrición y Riesgo Cardiovascular en España (ENRICA)". Universidad Autónoma de Madrid.

Banerjee RR, Rangwala SM, Shapiro JS, Rich AS, Rhoades B, Qi Y, Wang J, Rajala MW, Poci A, Scherer PE. (2004) "Regulation of fasted blood glucose by resistin". *Science*. 303: 1195–1198.

Barouch LA, Gao D, Chen L, Miller KL, Xu W, Phan AC, Kittleson MM, Minhas KM, Berkowitz DE, Wei C, Hare JM. (2006) "Cardiac Myocyte Apoptosis Is Associated With Increased DNA Damage and Decreased Survival in Murine Models of Obesity". *Circ Res*. 98: 119-124.

Bassand JP, Hamm CW, Ardissino D. (2007) "Guía de Práctica Clínica para el diagnóstico y tratamiento del síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST". *Rev Esp Cardiol*. 60(10): 1070-1080.

Basulto J, Manera M, Baladia E. (2008). "Postura del GREP-AEDN: la obesidad como enfermedad". *Act Diet*. 12(2): 98-99.

Battaglia V, Shields CD, Murray-Stewart T, Casero Jr RA. (2014) "Polyamine catabolism in carcinogenesis: potential targets for chemotherapy and chemoprevention". *Amino Acids*. 46(3): 511–519.

Bates S H, Kulkarni RN, Seifert M, Myers Jr, MG. (2005). "Roles for leptin receptor/STAT3-dependent and-independent signals in the regulation of glucose homeostasis". *Cell Metab*. 1(3): 169-178.

Beltowski J, Wójcicka G, Jamroz A. (2003). "Stimulatory Effect of Leptin on Nitric Oxide Production Is Impaired in Dietary-Induced Obesity". *Obes Res*. 11(12): 1571-1580.

Bendall JK, Douglas G, McNeill E, Channon KM, Crabtree MJ. (2014). "Tetrahydrobiopterin in Cardiovascular Health and Disease". *Antioxid Redox Signal*. 20: 3040-3077.

Benomar Y, Gertler A, De Lacy P, Crépin D, Hamouda HO, Riffault L, Taouis M. (2013). "Central resistin overexposure induces insuline resistance through Toll-like receptor 4". *Diabetes*. 62: 102-114.

Böger RH, Bode-Böger SM (2001). "The clinical pharmacology of l-arginine". *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 41: 79-99.

Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, Blaschke TF, Cooke JP. (1998) "Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction. Its role in hypercholesterolemia". *Circulation*. 98: 1842-1847.

Bolkenius FW, Seiler N. (1981). "Acetyl derivatives as intermediates in polyamine catabolism". *Int J Biochem*. 13: 287-292.

Bonhoure N, Byrnes A, Moir RD, Hodroj W, Preitner F, Praz V, Marcelin G, Chua Jr SC, Martinez-Lopez N, Singh R, Moullan N, Auwerx J, Willemin G, Shah H, Hartil K, Vaitheesvaran B, Kurland I, Hernandez N, Willis IM. (2015). "Loss of the RNA polymerase III repressor MAF1 confers obesity resistance". *Genes Dev*. 29: 934-947.

Botella JI, Lledín MD, Valero MA, Varela C. (2001). "Leptina: implicaciones fisiológicas y clínicas". *An Med Interna*. 18(3): 152-160.

Brachet P, PrévotEAU H, Mathé V, Tomé D. (1996). "Modulation of putrescine transport in rat intestinal brush-border membrane vesicles by fasting and refeeding". *Digestion*. 57(5): 374-381.

Bruder-Nascimento T, Ferreira-Baptista R, Pereira PC, Salomé-Campos DH, André- Soares L, Lima-Leopoldo AP, Oliveira SA(Jr), Padovani CR, Cicogna AC, Cordellin S. (2011). "Alteraciones vasculares en ratones obesos por dieta rica en grasa: papel de la vía L-arginina/NO endotelial". *Arq Bras Cardiol*. 97(1): 40-45

Cavalera M, Wang J, Frangogiannis NG. (2014). "Obesity, metabolic dysfunction, and cardiac fibrosis: pathophysiological pathways, molecular mechanisms, and therapeutic opportunities". *Transl Res*. 164: 323-335.

Centelles JJ, Esteban C, Imperial S. (2004). "Óxido nítrico. Un gas tóxico que actúa como regulador de la presión sanguínea". *OFFARM*. 23(11): 96-102.

Chehab FF, Qiu J, Ogus S. (2004). "The use of animal models to dissect the biology of leptin". *Recent Prog Horm Res*. 59: 245-266.

Clemmensen C, Madsen AN, Smajilovic S, Holst B, Bräuner-Osborne H. (2012). "L-Arginine improves multiple physiological parameters in mice exposed to diet-induced metabolic disturbances". *Amino Acids*. 43: 1265–1275.

Codoñer-Franch P, Alonso-Iglesias E. (2015). "Resistin: Insulin resistance to malignancy". *Clin Chim Acta*. 13(438C): 46-54.

Codoñer-Franch P, Tavárez-Alonso S, Murria-Estal R, Tortajada-Girbés M, Simó-Jordá R, Alonso-Iglesias E. (2012). "Elevated advanced oxidation protein products (AOPPs) indicate metabolic risk in severely obese children". *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 22: 237-243.

Codoñer-Franch P, Tavárez-Alonso S, Porcar-Almela M, Navarro-Solera M, Arilla-Codoñer A, Alonso-Iglesias E. (2014). "Plasma resistin levels are associated with homocysteine, endothelial activation, and nitrosative stress in obese youths". *Clin Biochem*. 47: 44-48.

Codoñer-Franch P, Tavárez-Alonso S, Murria-Estal R, Herrera-Martín G, Alonso-Iglesias E. (2011a). "Polyamines are increased in obese children and are related to markers of oxidative/nitrosative stress and angiogenesis". *J Clin Endocrinol Metab*. 96(9): 2821-2825.

Codoñer-Franch P, Tavárez-Alonso S, Murria-Estal R, Megías-Vericat J, Tortajada-Girbés M, Alonso-Iglesias E. (2011b). "Nitric oxide production is increased in severely obese children and related to markers of oxidative stress and inflammation". *Atherosclerosis*. 215: 2821-2825.

Coman D, Yapliito-Lee J, Boneh A. (2008). "New indications and controversies in arginine therapy". *Clin Nutr*. 27: 489-496.

Costopoulos C, Liew TV, Bennett M. (2007). "Ageing and atherosclerosis: Mechanisms and therapeutic options". *Biochem Pharmacol*. 13: 268-276.

Dalton TP, Shertzer HG, Puga A. (1999). "Regulation of gene expression by reactive oxygen". *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 39: 67-101.

Deanfield J, Donald A, Ferri C, Giannattasio C, Halcox J, Halligan S, Lerman A, Mancia G, Oliver JJ, Pessina AC, Rizzoni D, Rossi GP, Salvetti A, Schiffrin EL, Taddei S, Webb DJ. (2005). "Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular beds: a statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension". *J Hypertens*. 23(1): 7-17.

Dégano IR, Elosua R y Jaume Marrugat. (2013). "Epidemiología del Síndrome Coronario Agudo en España: Estimación del número de casos y la tendencia del 2005 al 2049". *Rev Esp Cardiol*. 66: 472-481.

Delgado L, Martínez G, Diaz A. (2009). "Determination of oxidative stress markers in cardiovascular disease patients" *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 43(3): 307-313.

Duan J, Murohara T, Ikeda H, Katoh A, Shintani S, Sasaki K, Kawata H, Yamamoto N, Imaizumi T. (2000). "Hypercholesterolemia inhibits angiogenesis in response to hind limb ischemia. Nitric oxide-dependent mechanism". *Circulation*, 102: III-370-III-376.

Durante W, Liao L, Peyton KJ, Schafer AI. (1997). "Lysophosphatidylcholine regulates cationic amino acid transport and metabolism in vascular smooth muscle cells. Role in polyamine biosynthesis". *J Biol Chem.* 272: 30154-30159.

Eid HM, Eritsland J, Larsen J, Arnesen H, Seljeflot I. (2002). "Increased levels of asymmetric dimethylarginine in population at risk for atherosclerotic disease". *Effects of pravastatin. Atherosclerosis.* 166: 279-284.

Ellman GL. (1959). "Tissue sulfhydryl groups". *Arch Biochem Biophys.* 82(1): 70-77.

Fontana-Gallego L, Sáez-Lara MJ, Santisteban-Bailón R, Gil-Hernández A. (2006). "Compuestos nitrogenados de interés en nutrición clínica". *Nutr Hosp.* 21(2): 15-29.

Fu WJ, Haynes TE, Kohli R, Hu J, Shi W, Spencer TE, Carroll RJ, Meininger CJ, Wu G. (2005). "Dietary L-Arginine Supplementation Reduces Fat Mass in Zucker Diabetic Fatty Rats". *J. Nutr.* 135: 714-721.

García-García E, De la Llata-Romero M, Kaufer-Horwitz M, Tusié-Luna MT, Calzada-León R, Vázquez-Velázquez V, Barquera-Cervera S, Caballero-Romo A, Orozco L, Velásquez-Fernández D, Rosas-Peralta M, Barriguete-Meléndez A, Zacarías-Castillo R, Sotelo-Morales J. (2008). "La obesidad y el síndrome metabólico como problema de salud pública. Una reflexión". *Salud Pública de México.* 50(6): 530-547.

García-Taberner MD. (2001). "Aporte dietario de arginina y patología diabética". Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.

Garrow J. (1981) "Treat obesity seriously" A clinical manual. Churchill Livingstone, London.

Gastón-Fourcade M. (2008). "El endotelio Vascular" *Flebología y Linfología, Lecturas Vasculares.* 3(9): 477-540.

Gergel D, Cederbaum AI. (1997). "Interaction of nitric oxide with 2-thio-5-nitrobenzoic acid: implications for the determination of free sulfhydryl groups by Ellman's reagent". *Arch Biochem Biophys.* 347(2): 282-288.

- Gonçalves-Díaz R, Negrao CE, Krieger MH. (2011). "Óxido Nítrico y Sistema Cardiovascular: Activación Celular, Reactividad Vascular y Variante Genética". *Arq Bras Cardiol.* 96(1): 68-75.
- Gornik HL, Creager MA. (2004). "Arginine and endothelial and vascular health". *J Nutr.* 134: 2880S-2887S.
- Granado M, Fuente-Martin E, García-Cáceres C, Argente J, Chowen JA. (2012). "Leptin in early life: A key factor for the development of the adult metabolic profile". *Obes Facts.* 5(1): 138-150.
- Guasco-Herrera C, Chávez JR, Ferriz-Martínez RA, De la Torre-Carbot K, Elton T, García T. (2014). "Poliaminas: pequeños gigantes de la regulación metabólica". *Rev Educ Bioquím REB.* 33(2): 51-57.
- Gutiérrez-Fisac JL, Guallar-Castillón P, León-Muñoz LM, Graciani A, Banegas JR, Rodríguez-Artalejo F. (2012). "Prevalence of general and abdominal obesity in the adult population of Spain. The ENRICA study". *Obes Rev.* 13: 388-392.
- Hassan SM. (2013). "Role of L-arginine supplementation in preventing obesity. Ultra hystochemical studies". *ESJ.* 9(36): 387-403.
- Hill JO, Wyatt HR, Reed GW, Peters JC. (2003). "Obesity and the environment: where do we go from here?". *Science.* 299(5608): 853-855.
- Horowitz JF, Coppack SW, Paramore D, Cryer PE, Zhao G, Klein S. (1999). "Effect of short-term fasting on lipid kinetics in lean and obese women". *Am J Physiol.* 276: E278-E284.
- Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP. (1983). "Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26 year follow-up of participants in the Framingham Heart Study". *Circulation.* 67: 968-977.
- Igarashi K, Kashiwagi K. (2000). "Polyamines: Mysterious modulators of cellular functions". *Biochem Biophys Res Commun.* 271: 559-564.
- Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). The Economist Intelligence Unit Limited, 2013. "El corazón del asusto: Nuevos enfoques para la prevención de las enfermedades cardiovasculares"
- Janicka M, Kot-Wasik A, Kot J, Namieśnik J. (2010). "Isoprostanes-biomarkers of lipid peroxidation: their utility in evaluating oxidative stress and analysis". *Int J Mol Sci.* 11(11): 4631-4659.

Jankovic A, Korac A, Buzadzic B, Otasevic V, Stancic A, Daiber A, Korac B. (2015). "Redox implications in adipose tissue (dys)function - A new look at old acquaintances". *Redox Biol.* 6: 19-32.

Jänne J, Alhonen L, Pietilä M, Keinänen TA. (2004). "Genetic approaches to the cellular functions of polyamines in mammals". *Eur J Biochem.* 271(5): 877-894.

Jell J, Merali S, Hensen ML, Mazurchuk R, Spornyak JA, Diegelman P, Kisiel ND, Barrero C, Deeb KK, Alhonen L, Patel MS, Porter CW. (2007). "Genetically Altered Expression of Spermidine/Spermine N<sup>1</sup>-Acetyltransferase Affects Fat Metabolism in Mice via Acetyl-CoA". *J Biol Chem.* 282(11): 8404-8413.

Jobgen W, Meininger CJ, Jobgen SC, Li P, Lee MJ, Smith SB, Spencer TE, Fried SK, Wu G. (2009). "Dietary L-Arginine Supplementation Reduces White Fat Gain and Enhances Skeletal Muscle and Brown Fat Masses in Diet-Induced Obese Rats". *J. Nutr.* 139: 230-237.

Joffin N, Jaubert AM, Bamba J, Barouki R, Noirez P, Forest C. (2015). "Acute induction of uncoupling protein 1 by citrulline in cultured explants of white adipose tissue from lean and high-fat-diet-fed rats". *Adipocyte.* 4(2): 129-134.

Jung, UJ, Choi MS. (2014). "Obesity and Its Metabolic Complications: The Role of Adipokines and the Relationship between Obesity, Inflammation, Insulin Resistance, Dyslipidemia and Nonalcoholic Fatty Liver Disease". *Int J Mol Sci.* 15: 6184-6223.

Karatas F, Karatepe M, Baysar A. (2002). "Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography". *Anal Biochem.* 311(1): 76-79.

Katagiri H, Yamada T, Oka Y. (2007). "Adiposity and cardiovascular disorders. Disturbance of the regulatory system consisting of humoral and neuronal signals". *Circ Res.* 101: 27-39.

Katsareli EA, Dedoussis GV. (2014). "Biomarkers in the field of obesity and its related comorbidities". *Expert Opin Ther Targets.* 18(4): 385-401.

Kavey RW, Daniels SR, Lauer RM, Atkins DL, Hayman LL, Taubert K. (2003). "American Heart Association guidelines for primary prevention of atherosclerotic cardiovascular disease beginning in childhood". *Circulation.* 107: 1562-1566.

Kieffer TJ, Habener JF. (2000). "The adipoinsular axis: effects of leptin on pancreatic  $\beta$ -cells". *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 278(1): E1-E14.

Knowles R. (1994). "Nitric oxide synthases". *The Biochemist*, Oct/Nov: 3-7.

- Kopelman PG. (2000). "Obesity as a medical problem". *Nature*. 404(6778): 635-643
- L'Abbé MR, Trick KD, Beare-Rogers JL. (1991). "Dietary (n-3) fatty acids affect rat heart, liver and aorta protective enzyme activities and lipid peroxidation". *J Nutr*. 121: 1331-1340.
- Lahoz C, Mostaza JM. (2007). "Atherosclerosis as a systemic disease". *Rev Esp Cardiol*. 60(2): 184-195.
- Lantorno M, Campia U, Di Daniele N, Nistico S, Forleo GB, Cardillo C, Tesauro M. (2014). "Gut hormones and endothelial dysfunction in patients with obesity and diabetes". *Int J Immunopathol Pharmacol*. 27(3): 433-436.
- Larsen TM, Dalskov SM, Van Baak M, Jebb SA, Papadaki A, Pfeiffer A, Martinez JA, Handjieva-Darlenska T, Kunešová M, Pihlsgård M, Stender S, Holst C, Saris WHM, Astrup A. (2010). "Diets with High or Low Protein Content and Glycemic Index for Weight-Loss Maintenance". *N Engl J Med*. 363(22): 2102-2113.
- Lemmonier D. (1971). "Sex Difference in the Number of Adipose Cells from Genetically Obese Rats". *Nature*. 231: 50-52.
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. (1990). "Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins". *Methods Enzymol*. 186: 465-478.
- Li H, Horke S, Förstermann U. (2014). "Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis". *Atherosclerosis*. 237: 208-219.
- Lindström P. (2012). "Mitochondrial function in leptin-deficient obese-hyperglycaemic mice [ob/ob mice]". *Cellular Bioenergetics in Health and Diseases: New Perspectives in Mitochondrial Biology*. 2012: 85-97. Lou PH and Peterson N, Eds.
- Lindström P. (2007). "The physiology of obese-hyperglycemic mice [ob/ob mice]". *SCI WORLD J*. 7: 666-685.
- Lissner L, Visscher TLS, Rissanen A, Heitmann BL. for the Prevention and Public Health Task Force of the European Association for the Study of Obesity. (2013). "Monitoring the Obesity Epidemic into the 21st Century - Weighing the Evidence". *Obes Facts*. 6: 561-565.
- Llisterri-Caro JL, Rodríguez-Roca GC, Alonso-Moreno FJ, Prieto-Díaz MA, Banegas JR, González-Segura Alsina D. (2012). En representación del Grupo de Trabajo de Hipertensión Arterial de la Sociedad Española de Atención Primaria (Grupo HTA/SEMERGEN) y de los investigadores del

Estudio PRESCAP 2010. "Control de la presión arterial en población hipertensa española atendida en Atención Primaria. Estudio PRESCAP 2010". *Med Clin (Barc)*. 139: 653-661.

Loscalzo J. (2004). "L-Arginine and Atherothrombosis". *J Nutr*. 134: 2798S-2800S.

Lovaas E. (1997). "Antioxidative and metal-chelating effects of polyamines". *Adv Pharmacol*. 38: 119-149.

Lovaas E, Carlin G. (1991). "Spermine: an anti-oxidant and anti-inflammatory agent". *Free Radic Biol Med*. 11: 455-461.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randal RJ. (1951). "Protein measurement with the folin phenol reagent". *J Biol Chem*. 193: 265-275.

Lucotti P, Setola E, Monti LD, Gallucio E, Costa S, Sandolli EP, Fermo I, Rabaiotti G, Gatti R, Piatti PM. (2006). "Beneficial effects of a long-term oral L-arginine treatment added to a hypocaloric diet and exercise training program in obese, insulin-resistant type 2 diabetic patients". *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 291: E906-E912.

Lumeng CN, Saltiel AR. (2011). "Inflammatory links between obesity and metabolic disease". *J Clin Invest*. 121(6): 2111-2117.

Martínez-Augustín O, Sánchez de Medina F. (2004). "Arginina, Óxido Nítrico y función endotelial" *Ars Pharm*. 45(4): 303-317.

Martín-Garrido A. (2007). "El peróxido de hidrógeno como mediador en el proceso de contracción-relajación. Estudios in vitro e in vivo". Tesis doctoral. Universidad de Alcalá.

Masnatta L, Fischer P, Dominguez G, Cabrera E, Ramirez A, Sanchez R. (2003). "Marcadores de estrés oxidativo. Su valor en la prevención y detección precoz de la enfermedad cardiovascular en el Hospital de Día". *Rev Fed Arg Cardiol*. 32: 177-183.

Mateos RI, Lecumberri E, Ramos S, Goya L, Bravo L. (2005). "Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress. Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits". *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 827(1): 76-82.

McKnight J, Satterfield M, Jobgen W, Smith S, Spencer T, Meininger J, McNeal C, Wu G. (2010). "Beneficial effects of L-arginine on reducing obesity: potential mechanisms and important implications for human health". *Amino Acids*. 39: 349-357.

- Meneu, V. (2000). "Metabolismo de la arginina en la patología diabética: Estudio en humanos". Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.
- Minois N, Carmona-Gutierrez D, Madeo F. (2011). "Polyamines in aging and disease". *Aging*. 3(8): 1-17.
- Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Dietz WH, Vinicor F, Bales VS, Marks JS. (2001). "Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors". *JAMA*. 289(1): 76-79.
- Moncada S, Higgs A. (1993). "Mechanisms of disease. The L-arginine-nitric oxide pathway". *N Engl J Med*. 329: 2002-2012.
- Morgan DML. (1994a). Polyamines, arginine and nitric oxide". *Biochem Soc Trans*. 22: 879-883.
- Morgan DML. (1994b). "Difluoromethylornithine (DFMO), an inhibitor of nitrite production by macrophages". *Biochem Soc Trans*. 22: 389S.
- Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PL. (1995). "Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation". *Clin Chem*. 41: 892-896.
- Murdolo G, Piroddi M, Luchetti F, Tortoioli C, Canonico B, Zerbinati C, Galli F, Iuliano L. (2013). "Oxidative stress and lipid peroxidation by-products at the crossroad between adipose organ dysregulation and obesity-linked insulin resistance". *Biochimie*. 95: 585-594.
- Netzer N, Gatterer H, Faulhaber M, Burtscher M, Pramsohler S, Pesta D. (2015). "Hypoxia, Oxidative Stress and Fat". *Biomolecules*. 5: 1143-1150;
- Nilsson C, Raun K, Yan FF, Larsen MO, Tang-Christensen M. (2012) "Laboratory animals as surrogate models of human obesity". *Acta Pharmacol Sin*. 33(2): 173-181.
- OECD "Obesity Update", 2014: [www.oecd.org/health/obesity-update.htm](http://www.oecd.org/health/obesity-update.htm)
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. (1979). "Essay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction". *Anal Biochem*. 95: 351-358.
- Olefsky JM, Glass CK. (2010). "Macrophages, Inflammation, and Insulin Resistance". *Annu Rev Physiol*. 72: 219-246.
- Oliveira CPMS, Alves VAF, Lima VMR, Stefano JT, Debbas V, Sá SV, Wakamatsu A, Correá-Gianella ML, Sobroza de Mello E, Havaki S, Tiniakos DG, Marinos E, de Oliveira MG, Gianella-Neto D, Laurindo FR, Caldwell S, Carrillo FJ. (2007). "Modulation of hepatic microsomal

trygliceride transfer protein (MTP) induced by nitroso-N-acetylcysteine in ob/ob mice". *Biochem Pharmacol.* 74: 290-297.

Otieno MA, Kensler TW. (2000). "A role for protein kinase C-delta in the regulation of ornithine decarboxylase expression by oxidative stress". *Cancer Res.* 60: 4391-4396.

Palm F, Nordquist L, Buerk DG, 2007. "Nitric oxide in the kidney; direct measurements of bioavailable renal nitric oxide". *Adv Exp Med Biol.* 599: 117123.

Parada-Díaz. (2010). "Adición de maltodextrina o goma arábica a pulpa de fresa para la obtención de polvos liofilizados estables durante el almacenamiento". Tesis doctoral. Universidad de las Américas Puebla.

Pegg AE. (2009). "Mammalian Polyamine Metabolism and Function". *IUBMB Life.* 61(9): 880–894.

Pegg AE. (1986). "Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes". *Biochem J.* 234: 249-263.

Perez-Leal O, Barrero CA, Clarkson AB, Casero Jr RA, Merali S. (2012) "Polyamine-Regulated Translation of Spermidine/Spermine-N1- Acetyltransferase". *Molec Cell Biol.* 32(8): 1453–1467.

Pirinen E, Kuulasmaa T, Pietilä M, Heikkinen S, Tusa M, Itkonen P, Boman S, Skommer J, Virkamäki A, Hohtola E, Kettunen M, Fatrai S, Kansanen E, Koota S, Niiranen K, Parkkinen J, Levonen AL, Ylä-Herttuala S, Hiltunen JK, Alhonen L, Smith U, Jänne J, Laakso M. (2007). "Enhanced Polyamine Catabolism Alters Homeostatic Control of White Adipose Tissue Mass, Energy Expenditure, and Glucose Metabolism". *Molec Cell Biol.* 2007: 4953-4967.

Plaza I, Villar A, Mata P, Pérez F, Márquez A, Casanova J.A. (2001). "Control de la colesterolemia en España. Un instrumento para la prevención cardiovascular". *Rev Esp Cardiol.* 53: 815-837.

Pearson-Stuttard J, Bajekal M, Scholes S, O'Flaherty M, Hawkins NM, Raine R, Capewell S. (2012). "Recent UK trends in the unequal burden of coronary heart disease" *Heart.* 98(21): 1573-82.

Popkin BM, Adair LS, Ng SW. (2012). "NOW AND THEN: The Global Nutrition Transition: The Pandemic of Obesity in Developing Countries". *Nutr Rev.* 70(1): 3–21.

Qatani M, Szwergold NR, Greaves DR, Ahima RS, Lazar MA. (2009). "Macrophage-derived human resistin exacerbates adipose tissue inflammation and insuline resistance in mice". *J Clin Invest.* 119: 531-539.

- Qi Y, Nie Z, Lee YS, Singhal NS, Scherer PE, Lazar MA, Ahima RS. (2006). "Loss of Resistin Improves Glucose Homeostasis in Leptin Deficiency". *Diabetes*. 55: 3083–3090.
- Rabe K, Lehrke M, Parhofer KG, Broedl UC. (2008). "Adipokines and insulin resistance". *Mol Med*. 14(11-12): 741-751.
- Rath M, Müller I, Kropf P, Closs EI, Munder M. (2014). "Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages". *Front Immunol*. 5: 00532.
- Roberts LD, Ashmore T, Kotwica AO, Murfitt SA, Fernandez BO, Feelisch M, Murray AJ, Griffin JL. (2015). "Inorganic Nitrate Promotes the Browning of White Adipose Tissue through the Nitrate-Nitrite-Nitric Oxide Pathway". *Diabetes*. 64(2): 471–484.
- Rocha VZ, Folco EJ. (2011). "Inflammatory Concepts of Obesity". *Int J Inflamm*. 2011/529061
- Ruskovska T, Bernlohr DA. (2013). "Oxidative stress and protein carbonylation in adipose tissue - Implications for insulin resistance and diabetes mellitus". *J Proteomics*. (92): 323-334.
- Sáinz N, Rodríguez A, Catalán V, Becerril S, Ramírez B, Gomez-Ambrosi J, Frühbeck G. (2010). "Leptin administration downregulates the increased expression levels of genes related to oxidative stress and inflammation in the skeletal muscle of ob/ob mice". *Mediators Inflamm*. 2010: 784343 (15 pages).
- Salas-Salvado J, Rubio MA, Barbany M, Moreno B. (2007). "Consensus for the evaluation of overweight and obesity and the establishment of therapeutic intervention criteria". *Med Clin*. 128: 184-96.
- Sansbury BE, Cummins TD, Tang Y, Hellmann, J, Holden CR, Harbeson MA, Chen Y, Patel RP, Spite M, Bhatnagar A, Hill BG. (2012). "Overexpression of Endothelial Nitric Oxide Synthase Prevents Diet-Induced Obesity and Regulates Adipocyte Phenotype". *Circ Res*. 111(9): 1176–1189.
- Sansbury BE, Hill BG. (2014). "Regulation of obesity and insulin resistance by nitric oxide". *Free Radic Biol Med*. 73: 383-399.
- Santaolalia ML. (2001). "Alteraciones en el metabolismo de la arginina en la hipertensión arterial y en la diabetes: estudio en humanos". Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.
- Santos MT, Valles J, Aznar J, Vilches J. (1980). "Determination of plasma malondialdehyde-like material and its clinical application in stroke patients". *J Clin Pathol*. 33: 973-976.

Saraiva RM, Minhas KM, Zheng M, Pitz E, Treur A, Gonzalez D, Schuleri KH, Vandegaer KM, Barouch AL, Hare JM. (2007). "Reduced neuronal nitric oxide synthase expression contributes to cardiac oxidative stress and nitroso-redox imbalance in ob/ob mice". *Nitric Oxide*. 16: 331-338.

Seghieri G, Anichini R, Ciuti M, Gironi A, Bennardini F, Franconi F. (1997). "Raised erythrocyte polyamine levels in non-insulin-dependent diabetes mellitus with great vessel disease and albuminuria". *Diabetes Res Clin Pract*. 37: 15-20.

Seghieri G, Gironi A, Mammini P, Alviggi L., DeGiorgio LA, Bartolomei G, Ignesti G, Franconi F. (1992). "Erythrocyte spermidine levels in IDDM patients". *Diabetes Care*, 15: 543-545.

Serra M. (2008) "Influencia de los niveles de colesterol sobre el metabolismo de la arginina y el estrés oxidativo. Efectos del tratamiento con estatinas". Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.

Sibal L, Agarwal SC, Home PD, Boger RH. (2010). "The Role of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Disease". *Curr Cardiol Rev*. 6: 82-90.

Siti HN, Kamisah Y, Kamsiah J. (2015). "The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review)". *Vasc Pharmacol*. 71: 40-56.

Smirnova OA, Isagulians MG, Hyvonen MT, Keinanen TA, Tunitskaya VL, Vepsalainen J, Alhonen L, Kochetkov SN, Ivanov AV. (2012). "Chemically induced oxidative stress increases polyamine levels by activating the transcription of ornithine decarboxylase and spermidine/spermine-N1-acetyltransferase in human hepatoma HUH7 cells". *Biochimie*. 94: 1876-1883.

Soda K. (2011). "The mechanisms by which polyamines accelerate tumor spread". *J Exp Clin Canc Res*. 30: 95-104.

Sohal RS, Forster MJ. (2014). "Caloric restriction and the aging process: a critique". *Free Radic Biol Med*. 73: 366-382.

Stancic A, Korac A, Buzadzic B, Otasevic V, Jankovic A, Vucetic M, Korac B. (2012). "L-Arginine in Nutrition: Multiple Beneficial Effects in the Etiopathology of Diabetes" *J Nutr Ther*. 1: 114-131.

Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. (2001). "The hormone resistin links obesity to diabetes". *Nature*. 409:307-312.

Suganami T, Nishida J, Ogawa Y. (2005). "A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: Role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha". *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 25: 2062-2068.

Sultan A, Strodthoff D, Robertson AK, Paulsson-Berne G, Fauconnier J, Parini P, Rydén M, Thierry-Mieg N, Johansson ME, Chibalin AV. (2009). "T cell-mediated inflammation in adipose tissue does not cause insulin resistance in hyperlipidemic mice". *Circ Res.* 104: 961–968.

Sydow K, Münzel T. (2003). "ADMA and oxidative stress". *Atheroscler Suppl.* 4(4): 41-51.

Tadolini B. (1988). "Polyamine inhibition of lipoperoxidation. The influence of polyamines on iron oxidation in the presence of compounds mimicking phospholipids polar heads". *Biochem J.* 249: 33-36.

Tan B, Li X, Yin Y, Wu Z, Liu C, Tekwe CD, Wu G. (2012). "Regulatory roles for L-arginine in reducing white adipose tissue". *Front Biosci.* 17: 2237–2246.

Tchoukalova YD, Votruba SB, Tchkonina T, Giorgadze N, Kirkland JL, Jensen MD. (2010). "Regional differences in cellular mechanisms of adipose tissue gain with overfeeding". *Proc Natl Acad Sci USA.* 107(42): 18226-18231.

Teixeira D, Santaolaria ML, Alonso E. (2003). "La arginina en su contexto metabólico y fisiológico". *Acta Bioquím Clín Lat.* 37(2): 165-179.

Teixeira D, Santaolaria ML, Meneu V, Alonso E. (2002). "Dietary arginine slightly and variably affects tissue polyamine levels in male swiss albino mice". *J Nutr.* 132(12):3715–3720.

Trayhurn P, Thurlby PL, James WPT. (1977). "Thermogenic defect in pre-obese ob/ob mice". *Nature.* 266(5597): 60-62.

Troliet MR, Rudd MA, Loscalzo J. (2001). "Oxidative stress and renal dysfunction in salt-sensitive hypertension". *Kidney Blood Press Res.* 24: 116-123.

Tsikas D. (2005). "Review Methods of quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological fluids". *Free Rad Res.* 39(8): 797-815.

Vanhoutte PM. (2012). "Obesity and vascular dysfunction: the fat-e of rich and poor". *Brit J Pharmacol.* 165: 541-543.

Vaziri ND, Wang XQ, Oveisi F, Rad B. (2000). "Induction of oxidative stress by glutathione depletion causes severe hypertension in normal rats". *Hypertension.* 36: 142-146

Vuohelainen S, Pirinen E, Cerrada-Gimenez M, Keinänen TA, Uimari A, Pietilä M, Khomutov AR, Jänne J, Alhonen L. (2010). "Spermidine is indispensable in differentiation of 3T3-L1 fibroblasts to adipocytes". *J Cell Mol Med.* 14(68): 1683-1692.

Wallace HM, Fraser AV, Hughes A. (2003). "A perspective of polyamine metabolism". *Biochem J.* 376: 1-14.

Wallace HM. (1998). "Polyamines: specific metabolic regulators or multifunctional polycations?". *Biochem Soc Trans.* 26: 595-601.

Wander RC, Du SH, Ketchum SO, Rowe KE. (1996). "Tocopherol influences in vivo indices of lipid peroxidation in postmenopausal women give fish oil". *J Nutr.* 45: 268-276.

Wang Z, Ciabattoni G, Creminon C, Lawson J, Fitzgerald GA, Patrono C, Maclouf J. (1995). "Immunological characterization of urinary 8-epi-prostaglandin F2 alpha excretion in man". *J Pharmacol Exp Ther.* 275: 94-100.

WHO. "Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases". Report of a Joint FAO/WHO. Expert consultation. WHO Technical report series 916. Geneva: WHO; 2003

WHO. "Obesity: preventing and managing the global epidemic". Report of a WHO consultation. Technical report series 894, Geneva: WHO; 2000

Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen-Khoa T, Capeillère-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, Dayer JM, Jungers P, Drüeke T, Descamps-Latscha B. (1998). "Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure". *J Immunol.* 161(5): 2524-2532.

Yang Z, Ming XF. (2013). "Arginase: the emerging therapeutic target for vascular oxidative stress and inflammation". *Front Immunol.* 4: 00149.

Yetik-Anacak G, Catravas JD. (2006). "Nitric oxide and the endothelium: History and impact on cardiovascular disease". *Vasc Pharmacol.* 45: 268-276.

Young-Sil L, Byung-Yoon C, Kiyoto S, Hiroshi Y, Sun-Sil , Kohji Y, Takayuki Y, Toshiaki T, Kazuo N, Je-Tae W. (2010). "Nobiletin improves hyperglycemia and insulin resistance in obese diabetic ob/ob mice". *Biochem Pharmacol.* 79: 1674-1683.

Zugasti-Murillo A, Moreno-Esteban B. (2005). "Obesidad como factor de riesgo cardiovascular". *Hipertensión.* 22(1): 32-36.