



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN FISIOLÒGIA

TESIS DOCTORAL

**INFLUENCIA DE LA DIABETES EXPERIMENTAL SOBRE LOS
MECANISMOS IMPLICADOS EN LA RESPUESTA DE LAS
ARTERIAS CARÓTIDA Y RENAL DE CONEJO AL PÉPTIDO
NATRIURÉTICO B**

Presentada por:

D. Luis Miranda Gómez

Directores:

Dr. Francisco Javier Miranda Alonso

Dr. José María Centeno Guil

Dra. María Castelló Ruiz

Valencia, julio de 2016

D. **FRANCISCO JAVIER MIRANDA ALONSO**, Catedrático de Fisiología, D. **JOSÉ MARÍA CENTENO GUIL**, Profesor Contratado Doctor de Fisiología y Dña. **MARÍA CASTELLÓ RUIZ**, Profesora Asociada de Fisiología,

CERTIFICAN:

Que D. **LUIS MIRANDA GÓMEZ**, Licenciado en Medicina, ha realizado bajo nuestra dirección la Tesis Doctoral que lleva por título: "**INFLUENCIA DE LA DIABETES EXPERIMENTAL SOBRE LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN LA RESPUESTA DE LAS ARTERIAS CARÓTIDA Y RENAL DE CONEJO AL PÉPTIDO NATRIURÉTICO B**" en el Departament de Fisiologia de la Universitat de València.

Y para que así conste, se expide el presente en Valencia, a 14 de julio de 2016

Dr. Francisco J. Miranda

Dr. José M Centeno

Dra. María Castelló

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecer a mis directores, los profesores Francisco Javier Miranda, José María Centeno y María Castelló, su dedicación y esfuerzo en la realización de este trabajo.

Al Prof. Enrique Alborch Domínguez, Director del grupo de investigación, por su acogida y su cordialidad, y por haber liderado y conservado durante tantos años en un empeño común a los miembros del grupo.

A todos los componentes del grupo de investigación, Dr. Germán Torregrosa, Dr. Joan Salom, Dra. Teresa Jover, Dra. Consuelo Burguete y Dra. Vannina G. Marrachelli y Mikahela López-Morales, sin cuya ayuda este trabajo no hubiese llegado a buen puerto y sin la cual no hubiese podido compaginar la realización de esta Tesis con mi trabajo asistencial.

A Salvador Banacloche, por su trabajo y su disponibilidad en el laboratorio. A Mari Blanch, que con su amabilidad y su buen hacer me ha resuelto de forma eficaz los no siempre fáciles trámites burocráticos.

Al resto de los compañeros del Departamento de Fisiología de la Universidad de Valencia, que hacen que el laboratorio tenga vida y que, directa o indirectamente, contribuyen a que el trabajo salga adelante.

A todos mis compañeros del Servicio de Cirugía Plástica, Reparadora y Estética del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia, que me han sabido comprender y me han ayudado para poder realizar este trabajo sin dejar de lado mi labor asistencial.

Al Prof. José Antonio Alabadí, que tuve el placer de conocer personalmente, fundamental en los inicios del laboratorio del grupo en la Facultad de Farmacia y en los primeros trabajos que se hicieron allí. Tengo constancia de que, a través de la memoria, sigue siendo y será parte del alma del grupo y, en especial, del despacho del que salen muchas de las ideas, los resultados y las líneas que se plasman en este trabajo y en muchos de los que vendrán.

A mis padres, que han sido mi motor y mi guía. A Nacho, que me ha precedido en este itinerario, y ha sido un magnífico ejemplo a seguir. Y a Paula, por su apoyo y su cariño incondicionales.

A Rus, mi fuerza y mi ánimo.

A Rus

RESUMEN

La diabetes constituye un importante factor de riesgo de la enfermedad cardiovascular, con una mayor prevalencia de ictus y nefropatía. El péptido natriurético tipo B (BNP) juega un papel importante en la fisiopatología cardiovascular y podría tener acciones protectoras cardiovasculares y nefrovasculares en pacientes diabéticos. En este trabajo hemos estudiado las modificaciones producidas por la diabetes en los mecanismos que regulan la respuesta de las arterias carótida y renal de conejo al BNP. La concentración plasmática de NT-proBNP en conejos diabéticos fue mayor que en conejos control.

ARTERIA CARÓTIDA. El BNP indujo una relajación de la arteria carótida, que fue menor en conejo diabético que en conejo control. La eliminación del endotelio no modificó la relajación en conejos control, pero aumentó la acción relajante del BNP en conejos diabéticos. En ambos grupos de animales, en arterias sin endotelio el isatin inhibió la relajación inducida por el BNP. La arteria carótida de conejo diabético tiene una menor expresión del receptor NPR-A y una mayor expresión del NPR-C que la arteria de conejo control. En conejos control, la indometacina inhibió la relajación arterial al BNP, tanto en arterias con endotelio como en arterias sin endotelio. En conejos diabéticos, la indometacina no modificó la relajación arterial al BNP en arterias con endotelio, pero la inhibió en arterias sin endotelio. En presencia de BNP la arteria carótida liberó tromboxano A_2 y prostaciclina, y la liberación endotelial de prostaciclina fue inhibida en arterias de conejos diabéticos. En arterias despolarizadas, la relajación al BNP quedó fuertemente inhibida en ambos grupos de animales. La incubación con glibenclamida o 4-aminopiridina inhibió la relajación arterial al BNP, pero esta inhibición fue mayor en conejos control que en conejos diabéticos. La diabetes produce hiporreactividad de la arteria carótida de conejo al BNP, que puede estar relacionada, por un lado, con una disminución de la expresión de los receptores musculares NPR-A y un aumento de la expresión de los receptores endoteliales NPR-C y, por otro, con una

disminución de la liberación de prostaciclina endotelial y una menor participación de los canales de potasio sensibles a ATP K_{ATP} y de los canales de potasio dependientes de voltaje K_v .

ARTERIA RENAL. El BNP indujo una relajación de la arteria renal, que fue mayor en conejo diabético que en conejo control. La eliminación del endotelio aumentó la acción relajante del BNP en conejos control, pero la inhibió en conejos diabéticos. La arteria renal de conejo expresa el receptor NPR-A y el NPR-C, sin diferencias entre ambos grupos de animales. La indometacina aumentó la relajación arterial al BNP en conejos control, pero no la modificó en conejos diabéticos. En arterias incubadas con BNP la arteria renal liberó tromboxano A_2 y prostaciclina, sin diferencias significativas entre ambos grupos de animales. La incubación con iberiotoxina no modificó la relajación arterial al BNP en ambos grupos de conejos. La charibdotoxina desplazó a la derecha la curva concentración-respuesta al BNP en ambos grupos de animales, pero inhibió las relajaciones al BNP solo en conejos diabéticos. La glibenclamida no modificó la relajación arterial al BNP en conejos control pero la inhibió en conejos diabéticos. Estos resultados indican que la diabetes produce hiperreactividad de la arteria renal de conejo al BNP por mecanismos que, al menos, incluyen una menor influencia vasoconstrictora de los prostanoides, que no está relacionada con cambios en la liberación de tromboxano A_2 o prostaciclina, y una mayor actividad moduladora de los canales de potasio sensibles a ATP K_{ATP} y de los canales endoteliales de potasio de intermedia conductancia dependientes del calcio IK_{Ca} .

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SIGLAS

4-AP	4-aminopiridina
ADRF	Factor relajante derivado de los adipocitos
AGEs	Productos finales de la glucosilación avanzada
ANOVA	Análisis de la varianza
ANP	Péptido atrial natriurético
ATP	Trifosfato de adenosina
BK _{Ca}	Canales de K ⁺ activados por calcio de gran conductancia
BNP	Péptido natriurético tipo B
cAMP	Trifosfato de adenosina cíclico
cGMP	Trifosfato de guanosina cíclico
CNP	Péptido natriurético tipo C
COX	Ciclooxigenasa
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Receptor para la prostaglandina D ₂
EDH	Hiperpolarización dependiente del endotelio
EDHF	Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
EDRF	Factor relajante derivado del endotelio
EEM	Error estándar de la media
EIA	Enzimoimmunoanálisis
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
EP	Receptor para la prostaglandina E ₂
FAD	Flavina-adenina-dinucleótido
FMN	Flavina-mononucleótido
FP	Receptor para la prostaglandina F _{2α}
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1
IK _{Ca}	Canales de K ⁺ activados por calcio de conductancia intermedia
IL	Interleuquina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IP	Receptor para la prostaciclina
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
K _{ATP}	Canales de K ⁺ sensibles a ATP
K _{Ca}	Canales de K ⁺ activados por calcio

K _{ir}	Canales de K ⁺ rectificadores de entrada
K _v	Canales de K ⁺ dependientes de voltaje
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
L-NA	<i>N</i> ^ε -nitro-L-arginina
MLC	Cadena ligera de la miosina
MLCK	Kinasa de la cadena ligera de la miosina
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido, forma reducida
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido, forma oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma reducida
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma oxidada
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
NPR-A	Receptor A de péptido natriurético
NPR-B	Receptor B de péptido natriurético
NPR-C	Receptor C de péptido natriurético
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno 1
PGD ₂	Prostaglandina D ₂
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α}
PGI ₂	Prostaciclina
PKA	Proteína quinasa dependiente de cAMP
PKC	Proteína quinasa C
PKG	Proteína quinasa dependiente de cGMP
RAGE	Receptores de productos finales de la glucosilación avanzada
sGC	Guanilato ciclasa soluble
SK _{Ca}	Canales de K ⁺ activados por calcio de conductancia pequeña
TEA	Tetraetilamonio
TF	Factor tisular
TNF	Factor de necrosis tumoral
TP	Receptor para el tromboxano A ₂
VCAM-1	Molécula de adhesión a la célula vascular 1
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VWF	Factor Von Willebrand

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. ESTRUCTURA DE LA PARED VASCULAR	3
1.1. Adventicia	3
1.2. Músculo liso vascular	4
1.3. Endotelio	5
2. REGULACIÓN DEL TONO VASCULAR	7
2.1. Óxido nítrico (NO)	7
2.2. Prostanoides	13
2.3. Factor hiperpolarizante	19
3. PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS	24
4. DIABETES Y DAÑO VASCULAR	33
4.1. Disfunción endotelial en la diabetes	35
4.2. Diabetes y enfermedad cerebrovascular	45
4.3. Diabetes y nefropatía	48
5. ESTUDIOS PREVIOS EN NUESTRO LABORATORIO	54
OBJETIVOS	57
MATERIAL Y MÉTODOS	61
1. INDUCCIÓN DE LA DIABETES EXPERIMENTAL	63
2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE GLUCOSA, ANP y NT-proBNP	64
3. REGISTRO DE LA TENSIÓN ISOMÉTRICA DESARROLLADA POR SEGMENTOS DE ARTERIAS CARÓTIDA Y RENAL DE CONEJO	65
3.1. Obtención y montaje de los segmentos arteriales	65
3.2. Técnicas de registro y medición	66
3.3. Procedimiento experimental	67
4. WESTERN BLOT	69

5. ENZIMOINMUNOANÁLISIS (EIA)	70
6. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	71
7. FÁRMACOS Y SOLUCIONES	71
RESULTADOS	73
1. GLUCEMIA, PESO CORPORAL, ANP Y NT-proBNP PLASMÁTICO	75
2. CURVAS CONCENTRACIÓN-RESPUESTA	76
2.1. Arteria carótida	76
2.2. Arteria renal	91
3. WESTERN BLOT	108
4. ENZIMOIMUNOANÁLISIS (EIA)	111
DISCUSIÓN	115
1. EFECTO DEL BNP SOBRE LA ARTERIA CARÓTIDA	119
2. EFECTO DEL BNP SOBRE LA ARTERIA RENAL	125
3. CONSIDERACIONES FINALES	130
CONCLUSIONES	133
BIBLIOGRAFÍA	137

INTRODUCCIÓN

1. ESTRUCTURA DE LA PARED VASCULAR

La pared vascular está formada por tres capas: una túnica íntima formada por una monocapa de células endoteliales y una lámina elástica interna, una capa intermedia de células musculares lisas, y una túnica externa o adventicia (Figura 1).

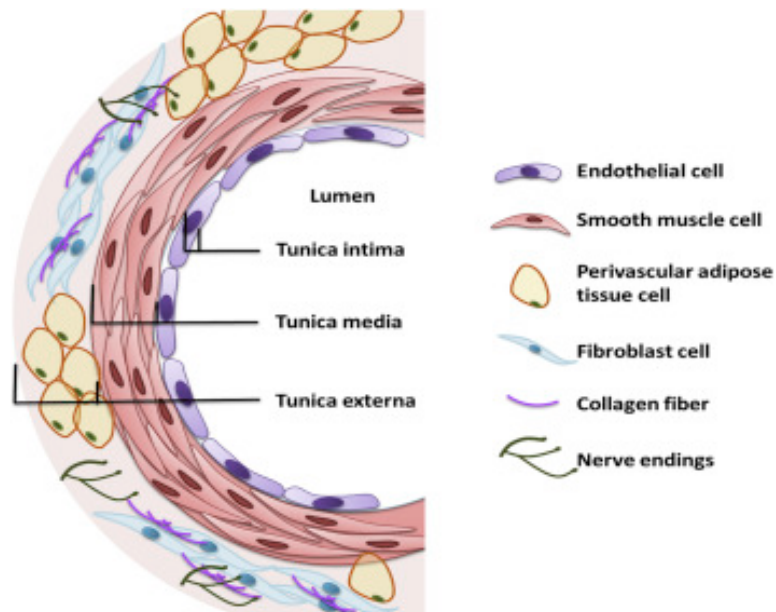


Figura 1. Estructura de la pared vascular. Tomado de Zhao et al., 2015.

1.1. Adventicia

Mientras que el endotelio y el músculo liso de la pared vascular han sido motivo de estudio durante muchos años, la capa adventicia ha suscitado tradicionalmente menos interés. Esta capa externa está formada (Figura 2) por una matriz extracelular donde se alojan terminaciones nerviosas perivasculares, tejido adiposo perivascular, vasos sanguíneos y linfáticos, células progenitoras, células del sistema inmune y elementos conectivos (fibroblastos y fibras de colágeno) que convierten a esta capa en un complejo y dinámico compartimento de la pared vascular (Stenmark et al., 2013; Majesky, 2015; Zhao et al., 2015).

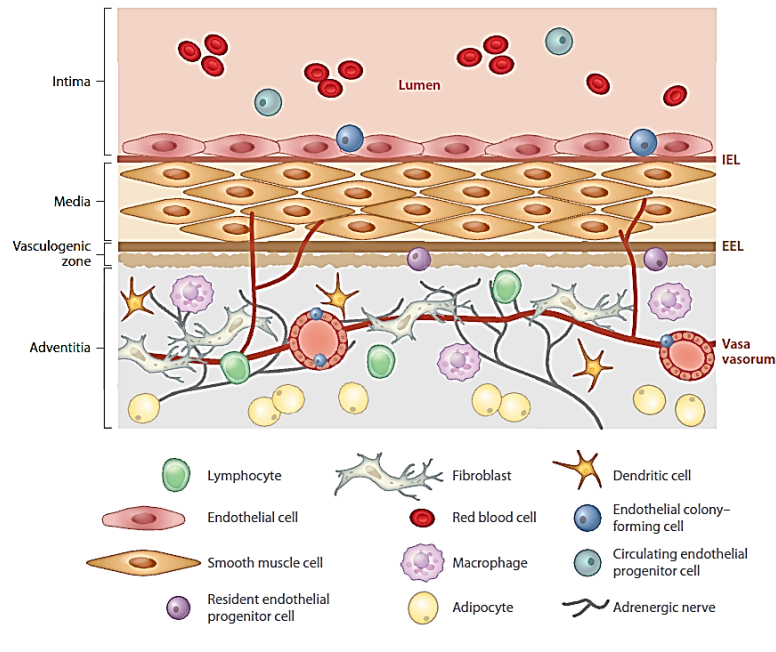


Figura 2. Complejo celular presente en la capa adventicia. Tomado de Stenmark et al., 2013.

Los componentes de la adventicia están implicados en el desarrollo y remodelado vascular, regulación del tono vascular, vigilancia inmunitaria, regulación de las células del sistema inmune cuando atraviesan el vaso, e intercambio de señales entre el vaso y los tejidos circundantes (Stenmark et al., 2013; Majesky, 2015; Zhao et al., 2015). En particular, los adipocitos del tejido adiposo perivascular segregan adipoquinas que contribuyen a la regulación del tono vascular. Así, por ejemplo, se ha descrito un factor relajante derivado de los adipocitos (ADRF) que produce relajación del músculo liso perivascular adyacente a través de la apertura de canales de potasio dependientes de voltaje (K_v), o si alcanza la célula endotelial puede estimular la liberación de NO (Gollasch, 2012; Zhao et al., 2015).

1.2. Músculo liso vascular

Es el responsable de la contracción o dilatación de los vasos sanguíneos. Las contracciones de las células musculares lisas pueden iniciarse por estímulos mecánicos

(presión intraluminal, estiramiento) o químico-farmacológico (por ejemplo, unión de ligandos a receptores de membrana) que aumentan la concentración de Ca^{2+} citosólico procedente bien de reservorios intracelulares (retículo sarcoplásmico) o que penetra desde el líquido extracelular a través de canales de Ca^{2+} localizados en la membrana celular (Figura 3). El Ca^{2+} libre intracelular se une a la calmodulina, y el complejo Ca^{2+} -calmodulina activa la kinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK). La MLCK fosforila la cadena ligera de la miosina (MLC) que desencadena el establecimiento de los puentes cruzados entre las cabezas de miosina y los filamentos de actina, que constituye la base molecular de la contracción de las células musculares lisas perivasculares (Zhao et al., 2015).

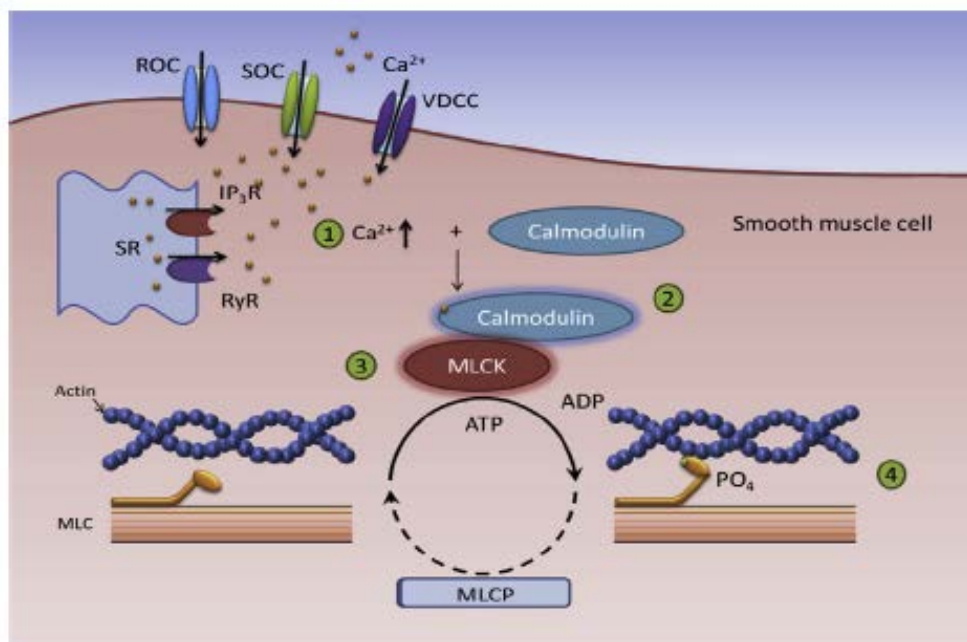


Figura 3. El aumento de Ca^{2+} intracelular estimula la contracción de las células musculares lisas de la pared vascular. Tomado de Zhao et al., 2015.

1.3. Endotelio

El endotelio vascular es una monocapa celular que recubre la superficie íntima de los vasos, con una superficie total estimada en humanos de unos 350 m² (Pries et al., 2000). El endotelio es un órgano dinámico que sirve como una barrera estructural y funcional entre la sangre y el lecho vascular, y que desempeña funciones importantísimas tanto en condiciones fisiológicas como fisiopatológicas. Las células endoteliales juegan un papel determinante en la regulación de la homeostasis vascular, debido a su interacción con las células sanguíneas y con las de la pared vascular, modulando el flujo sanguíneo, la permeabilidad vascular, y la adhesión y agregación de plaquetas y leucocitos. Las principales funciones endoteliales son (Poggesi et al., 2016):

- 1) Regulación del tono vascular, que es el resultado del equilibrio entre sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras, muchas de ellas producidas en o reguladas por el endotelio (Figura 4 A).
- 2) Regulación de la fibrinólisis y la coagulación. El endotelio tiene propiedades anticoagulantes y antitrombóticas. El daño vascular o la exposición a citoquinas o en situaciones proinflamatorias se altera el equilibrio hacia un fenotipo procoagulante/protrombótico de las células endoteliales (Figura 4 B).
- 3) Participación en la inflamación. Las células endoteliales, junto con leucocitos, mastocitos y plaquetas, desempeñan un papel crucial en la respuesta inflamatoria (Figura 4C).
- 4) Formación, reparación y remodelado de vasos sanguíneos. La angiogénesis es fundamental en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas (Figura 4 C).

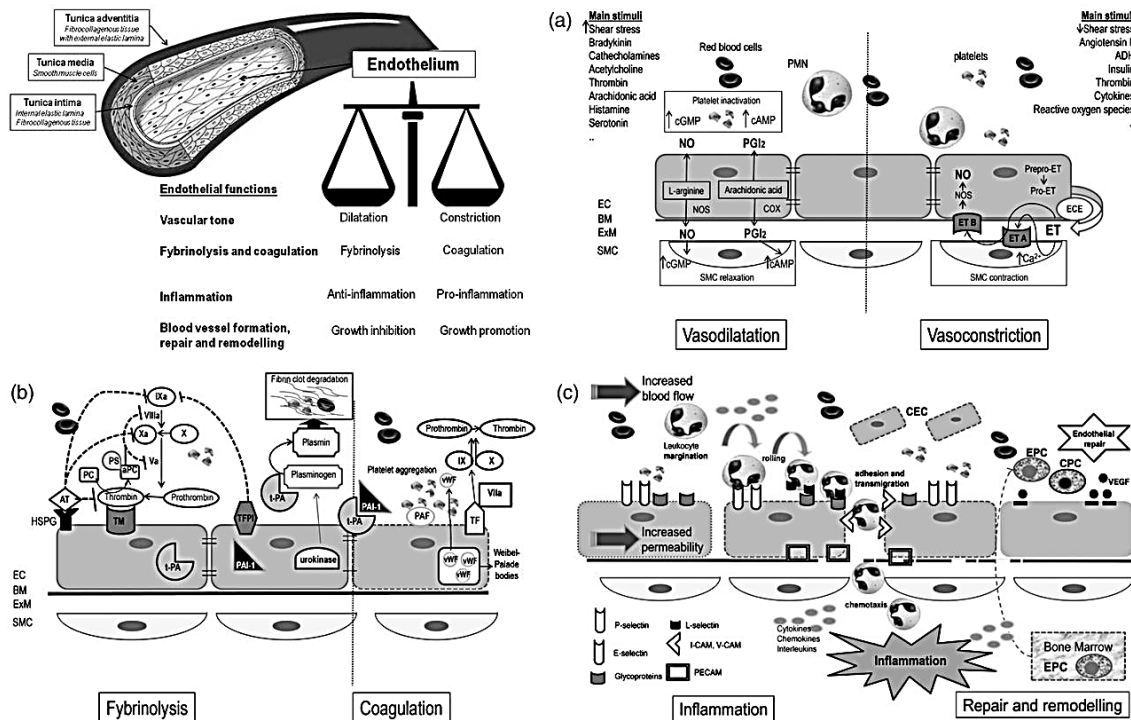


Figura 4. Representación esquemática de la estructura de un vaso sanguíneo y de las principales funciones del endotelio. Tomado de Pogessi et al., 2016.

2. REGULACIÓN DEL TONO VASCULAR

El tono vascular es el resultado de la interacción y balance entre una serie de sustancias que se liberan desde la propia pared vascular o desde las células sanguíneas, unas con acción vasodilatadora (óxido nítrico, prostaciclina, factor hiperpolarizante, etc.) y otras con acción vasoconstrictora (endotelina, tromboxano, prostaglandinas, etc.). Por ser motivo de estudio en esta Tesis, vamos a centrar nuestra atención en el óxido nítrico, los prostanoides y el factor hiperpolarizante.

2.1. Óxido nítrico (NO)

El NO es una molécula gaseosa inodora e incolora, identificada originalmente por Joseph Priestley en 1774. En aquellos tiempos se describió como un gas tóxico y altamente reactivo al que se le dio usos industriales, no descubriéndose su papel

biológico hasta más de dos siglos después. La evidencia primaria de que el endotelio es un componente indispensable en la regulación del tono vascular surgió cuando análisis experimentales demostraron que, en ausencia de esa monocapa de epitelio pavimentoso, la vasodilatación inducida por la acetilcolina no ocurría. En aquel momento, Furchgott y Zawadzki documentaron que, cuando era estimulado, el endotelio era capaz de liberar una sustancia vasoactiva que fue denominada factor relajante derivado del endotelio (EDRF, del inglés *endothelium-derived relaxing factor*). Pasados algunos años, el EDRF fue identificado por el grupo de Ignarro como el NO, un compuesto caracterizado en 1977 por Murad que, liberado por nitratos, causaba relajación en células musculares lisas. Ese contexto les valió a Robert F. Furchgott, Ferid Murad y Louis J. Ignarro el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1998 (Fig. 5). A partir de ahí, numerosos estudios han demostrado la ubicuidad de este gas y su participación en las más diversas funciones celulares (Dias et al., 2011; Cossenza et al., 2014; Bhatraju et al., 2015; Oliveira-Paula et al., 2016).

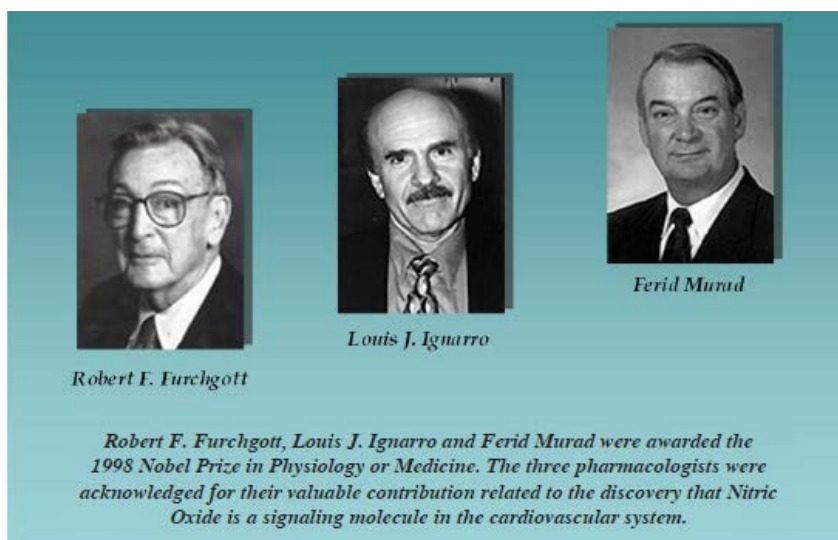


Figura 5. Ganadores del Premio Nobel en Fisiología o Medicina en 1998. Tomado de Dias et al., 2011.

El NO se sintetiza fundamentalmente a partir de la L-arginina por el enzima NO sintasa (NOS) en presencia de NADPH y oxígeno. La producción de NO por la NOS requiere de diversos cofactores como la flavina-adenina-dinucleótido (FAD), flavina mononucleótido (FMN), grupo hemo, tetrahidrobiopterina (BH4) y calmodulina (Figura 6) (Cossenza et al., 2014; Bhatraju et al., 2015; Zhao et al., 2015; Oliveira-Paula et al., 2016). Existen tres isoformas de este enzima: neuronal (nNOS, NOS-1), endotelial (eNOS, NOS-3) e inducible (iNOS, NOS-2). La iNOS produce grandes cantidades de NO y participa en reacciones de defensa, respuesta inflamatoria, y formación del epitelio de la vía aérea. Las isoformas nNOS y eNOS producen cantidades más bajas de NO que participa en procesos de señalización neuronal, inhibición de la hemostasia, vasodilatación y control de la presión sanguínea (Zhao et al., 2015; Oliveira-Paula et al., 2016). La enzima nNOS produce NO tanto en el sistema nervioso central como en el sistema nervioso periférico, y se le relaciona con procesos de excitabilidad y descarga neuronal, plasticidad sináptica y procesos de aprendizaje y memoria. Además, el NO producido por la nNOS regula la liberación de neurotransmisores como acetilcolina, histamina y serotonina, y se ha visto que se expresa también en músculo cardíaco, músculo esquelético, células endoteliales, células musculares lisas perivasculares, adventicia y mácula densa del riñón (Zhao et al., 2015). La expresión de iNOS es muy baja en condiciones fisiológicas, pero se induce su expresión en situaciones de infección, inflamación crónica y tumores. La expresión de iNOS en el músculo liso vascular en respuesta a citoquinas proinflamatorias contribuye decisivamente a la hipotensión, depresión cardíaca e hiporreactividad vascular del shock séptico (Zhao et al., 2015).

El NO producido en las células endoteliales va a difundir al interior del músculo liso de la pared vascular donde activa la enzima guanilato ciclasa soluble (sGC), aumentando la concentración intracelular de cGMP, el cual produce una activación de la proteína quinasa G-1 (PKG-1), que produce fosforilación de diversas proteínas en el

interior celular y una disminución de la concentración de Ca^{2+} libre intracelular, con la consiguiente relajación (Bhatraju et al., 2015; Zhao et al., 2015; Oliveira-Paula et al., 2016) (Figura 6): 1) la PKG-1 activa fosforila los canales de K^+ de gran conductancia (BK_{Ca}), lo que provoca salida de K^+ , hiperpolarización de la membrana, y disminución de la entrada de Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, con disminución del Ca^{2+} libre intracelular; 2) la PKG-1 también fosforila dicho canal de Ca^{2+} produciendo su inhibición; 3) la PKG-1 fosforila el receptor del 1,4,5 inositol trifosfato (IP_3); una proteína diana de la PKG-1 denominada sustrato de la PKG-1 asociada al receptor del IP_3 (con las siglas IRAG) ha sido caracterizada y considerada necesaria para la fosforilación del receptor IP_3 ; la fosforilación del IRAG lleva a disminuir la actividad del receptor IP_3 suprimiendo la salida de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplasmático; y 4) la fosforilación de otra proteína citosólica, el fosfolambán, inhibe la bomba de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático, promoviendo su secuestro en el interior del retículo. La disminución de la concentración de Ca^{2+} intracelular a resultas de estas múltiples fosforilaciones provoca la disminución del complejo Ca^{2+} -calmodulina-MLCK, favoreciendo la relajación del músculo liso vascular y vasodilatación. Por otra parte, la PKG-1 puede activar directamente la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina, contribuyendo también a vasodilatación.

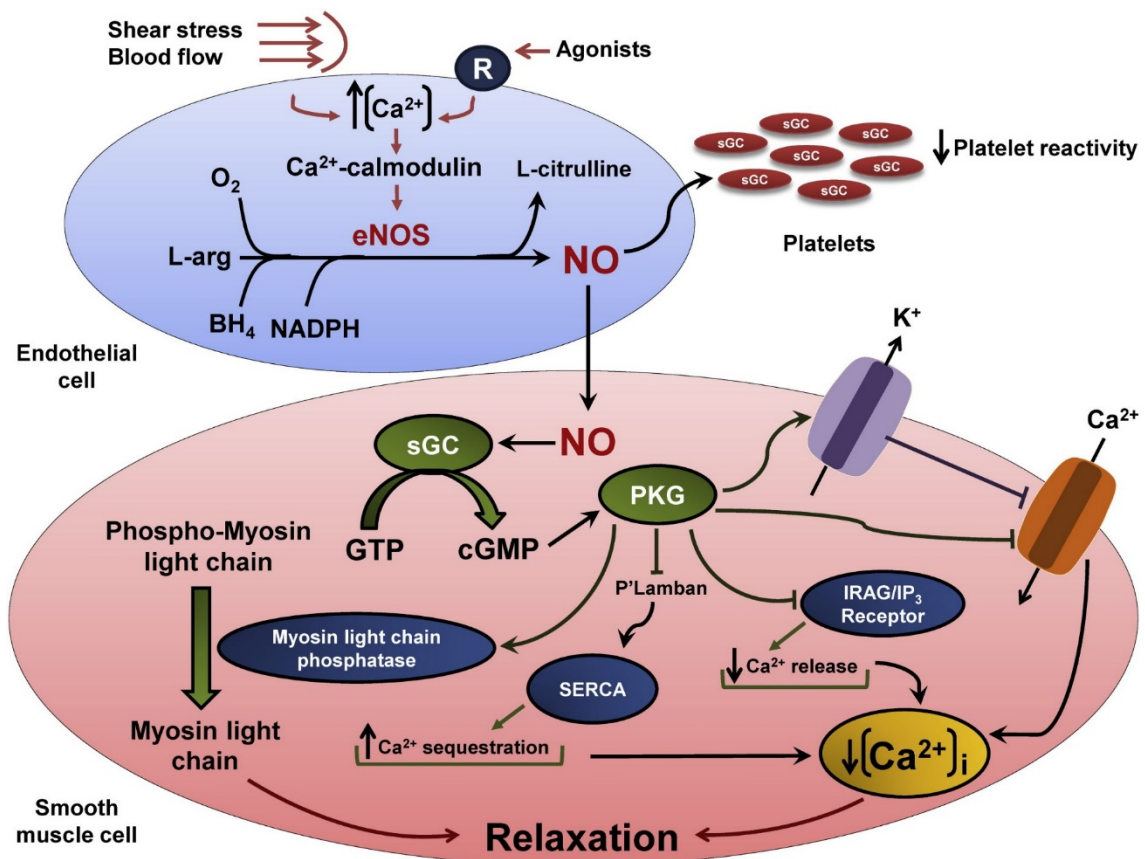


Figura 6. Mecanismos implicados en la formación y acción vasodilatadora del NO. Tomado de Oliveira-Paula et al., 2016.

La actividad de la eNOS puede ser estimulada/iniciada, de forma dependiente o independiente de Ca^{2+} , por diversos estímulos (Figuras 6 y 7) (Dias et al., 2011; Zhao et al., 2015; Oliveira-Paula et al., 2016). Diversos agonistas, como la acetilcolina, bradiquinina, e histamina, actúan sobre receptores de membrana de la célula endotelial y producen un aumento del Ca^{2+} libre intracelular, que se une a la calmodulina y de esa forma activan la eNOS. Por otra parte, la eNOS puede activarse por fosforilación a distintos niveles de su molécula. La proteína kinasa A (PKA) y la proteína kinasa B (Akt) activan el eNOS al fosforilar el residuo serina¹¹⁷⁷ en respuesta a varios estímulos, por ejemplo el estrés por fricción (*shear stress*) y el estradiol, de una manera independiente del Ca^{2+} . Por el contrario, la fosforilación del residuo treonina⁴⁹⁵ interfiere con el dominio de ligazón de la calmodulina, regulando negativamente la síntesis de NO.

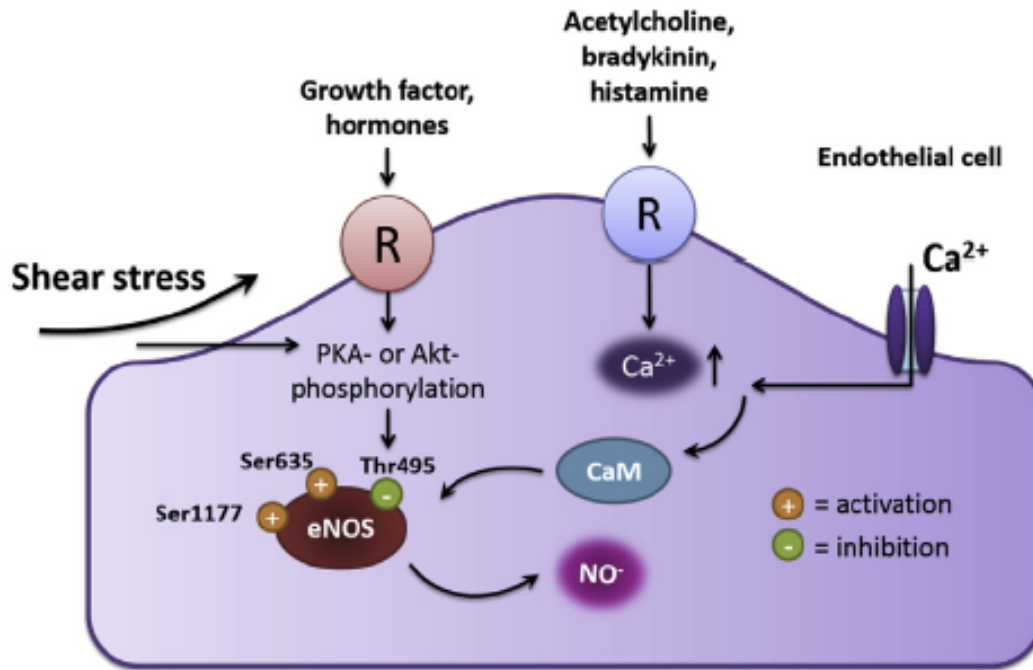


Figura 7. Activación de la eNOS por vía dependiente o independiente de Ca^{2+} . Tomado de Zhao et al., 2015.

Además de la acción relajante, el NO puede desempeñar otras funciones importantes en la homeostasis vascular (Oliveira-Paula et al., 2016) (Figura 8). Dado que el aumento de Ca^{2+} libre intracelular promueve la proliferación de la célula muscular lisa perivascular, el NO, a través de la activación de la sGC y el aumento del cGMP, puede tener acciones antiproliferativas. El NO también regula la adhesión de los leucocitos al endotelio vascular al inhibir el factor nuclear Kappa-B, que estimula la expresión endotelial de moléculas de adhesión y citoquinas. Además, el NO endógeno también puede influir indirectamente en la regulación del tono vascular y la proliferación por su influencia sobre el equilibrio redox del microambiente vascular. Por último, el NO tiene acciones antitrombóticas porque puede actuar sobre las plaquetas circulantes inhibiendo la agregación, la adhesión y la liberación de mediadores plaquetarios.

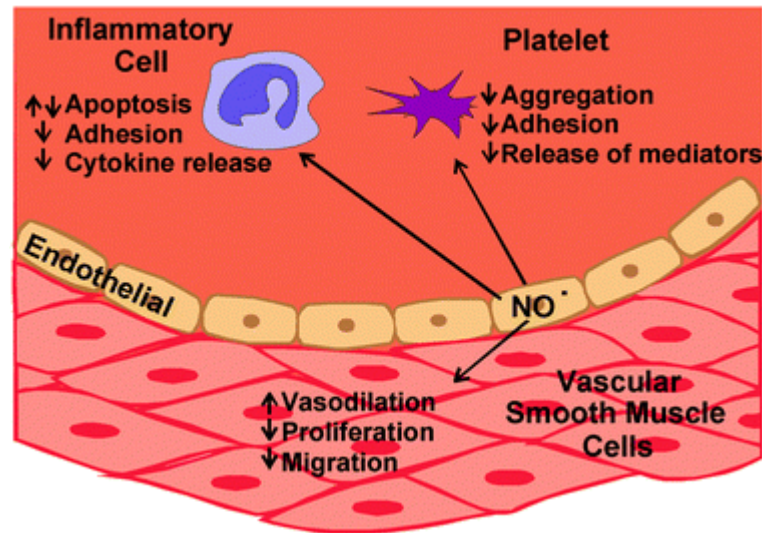


Figura 8. Acciones vasculares del óxido nítrico. Tomado de Carpenter y Schoenfisch, 2012.

2.2. Prostanoides

Las prostaglandinas son una familia de compuestos lipídicos derivados del ácido araquidónico por la vía de la ciclooxigenasa (COX) (Féléto et al., 2011; Kim, 2014; Korbecki et al., 2014; Mitchell et al., 2014; Luo et al., 2016; Stitham y Hwa, 2016). El ácido araquidónico no se encuentra libre en las células sino que se encuentra en los fosfolípidos de la membrana, de la que es liberado por la acción de la fosfolipasa A₂, en respuesta a diversos estímulos (estrés de fricción, activación de receptores de membrana, etc.). A partir del ácido araquidónico, la COX cataliza la formación de un sustrato intermedio, la prostaglandina H₂ (PGH₂), el cual es posteriormente transformado bajo la acción de las correspondientes sintasas en prostaglandina I₂ (PGI₂, prostaciclina), prostaglandina E₂ (PGE₂), prostaglandina D₂ (PGD₂), tromboxano A₂ (TxA₂) y prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) (Figura 9). Estas cinco prostaglandinas interactúan con su correspondiente receptor de prostanoides (P), que pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G, con siete dominios transmembrana, y que se clasifican en cinco

subtipos (IP, EP, DP, TP y FP) en función de su afinidad preferente sobre cada uno de los prostanooides.

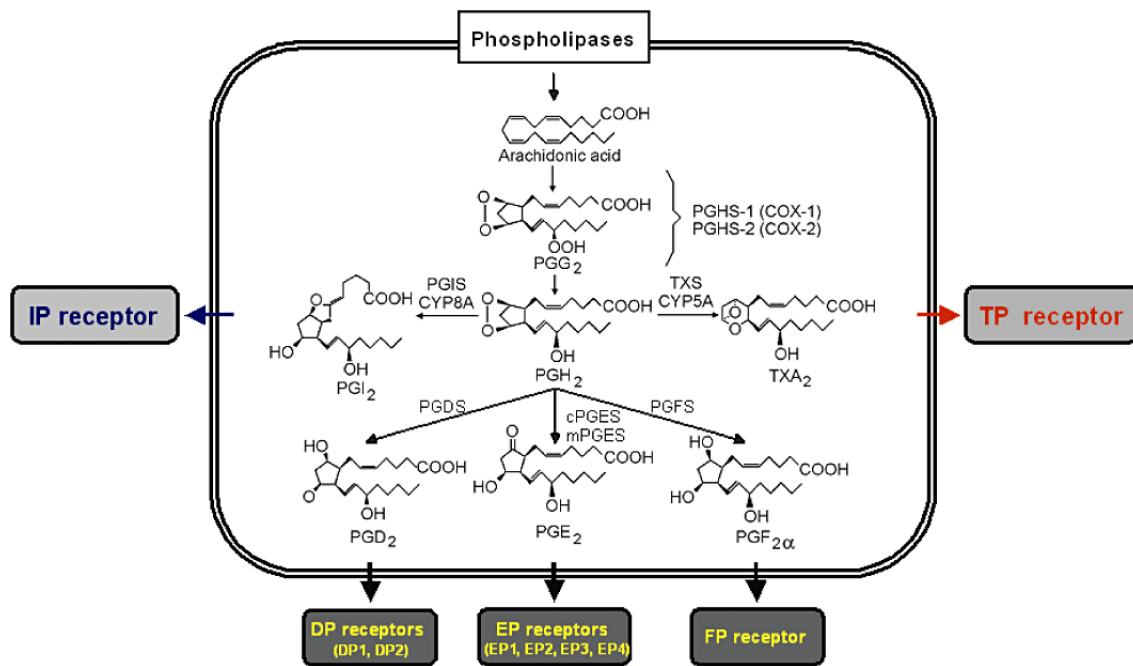


Figura 9. Síntesis de prostaglandinas. Tomado de Féléto et al., 2011.

En el sistema cardiovascular se han descrito dos isoformas de la COX, la COX-1 y la COX-2. Los dos metabolitos vasoactivos más importantes de la vía de la COX son el tromboxano A₂, que se produce fundamentalmente por la isoenzima COX-1, y la prostaciclina, que se sintetiza por ambas isoenzimas COX-1 y COX-2. Aunque tradicionalmente se ha considerado a COX-2 la isoenzima inducible, ambas se expresan constitutivamente. COX-1 se expresa constitutivamente en la mayoría de los tejidos, aunque también puede sobreexpresarse en respuesta a determinados estímulos, como por ejemplo el estrés de fricción. COX-2 es altamente inducible en respuesta a la inflamación, aunque también se expresa de forma constitutiva. El tromboxano A₂ es inactivado rápidamente por conversión a tromboxano B₂, y tiene una vida media de 30

s. La prostaciclina es inactivada también rápidamente a 6-keto-prostaglandina $F_{1\alpha}$. Posteriormente, tanto el tromboxano B_2 como la $PGF_{1\alpha}$ son metabolizados en otros órganos (hígado) y los productos finales se eliminan por orina y heces.

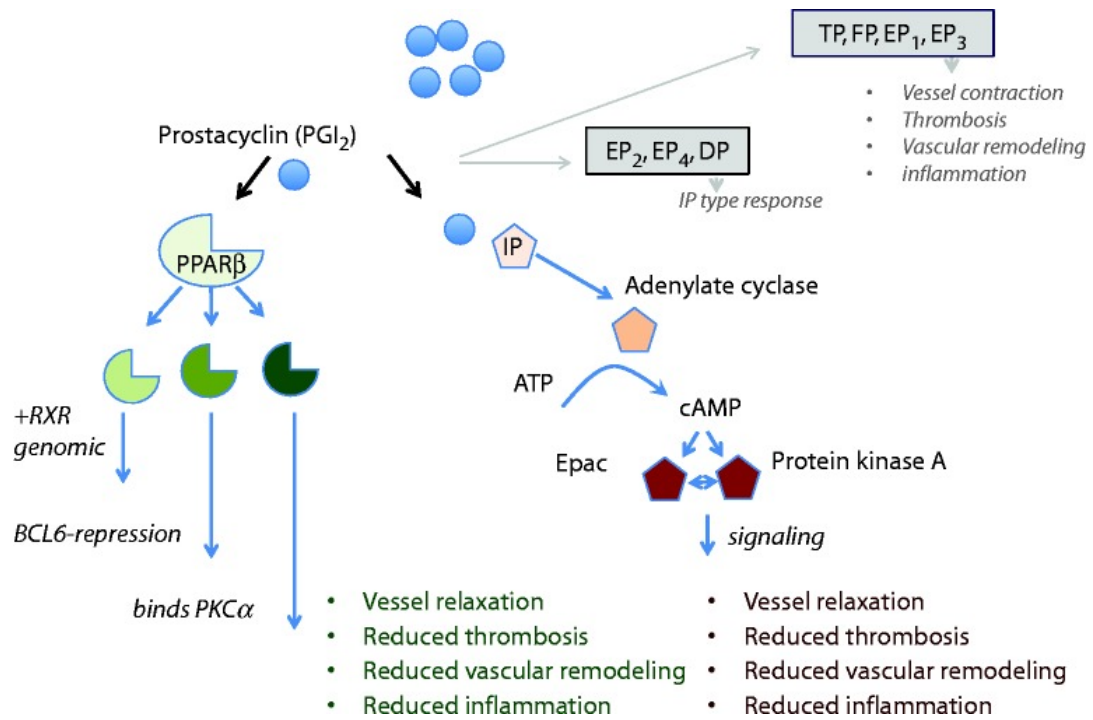


Figura 10. Vías de señalización utilizadas por la prostaciclina. Tomado de Mitchell et al., 2014.

La sintasa de la prostaciclina se expresa abundantemente en el endotelio vascular, pero también se expresa en el músculo liso vascular, neuronas, epitelio intestinal, riñón, etc., participando en la regulación cardiovascular, regulación de la función renal y de la liberación de renina, secreción gástrica, etc. La prostaciclina actúa preferentemente sobre el receptor de membrana IP, que activa la adenilato ciclasa, con la consiguiente formación de cAMP, el cual activa la proteína quinasa A (PKA) y la proteína de intercambio activada por cAMP (*Exchange protein activated by cAMP*, Epac), que produce una disminución del Ca^{2+} libre citosólico que media relajación, disminución de la agregación plaquetar, disminución del remodelado vascular y disminución de la

inflamación (Figura 10). Además, la prostaciclina también actúa sobre un receptor citosólico, el receptor activado por la proliferación de los peroxisomas beta (*peroxisome proliferator-activated receptors*, PPAR- β), que actúa por mecanismos genómicos y no genómicos, y cuya activación tiene importantes acciones antiinflamatorias (Mitchell et al., 2014).

La prostaciclina endotelial se sintetiza principalmente por la vía COX-1 en condiciones fisiológicas. Sin embargo, en situaciones de inflamación (por ejemplo, en la arterioesclerosis), la sobreestimulación de la COX-2 puede producir cantidades elevadas de prostaciclina. En esas condiciones, el receptor IP puede saturarse, y la prostaciclina puede actuar sobre el receptor TP, teniendo una acción vasoconstrictora; eso explica la utilidad de los antagonistas de la COX-2 en esas situaciones (Mitchell et al., 2014).

Además de en las plaquetas, el TxA₂ es sintetizado en el endotelio y músculo liso vascular, vía COX-1, y actúa sobre el receptor TP, cuya activación tiene fundamentalmente efectos vasoconstrictores, proliferativos, proagregantes y proinflamatorios (Muzaffar et al., 2011; Bauer et al., 2014; Capra et al., 2014; Ellinsworth et al., 2014). La unión del tromboxano A₂ al receptor de la célula muscular lisa conlleva la activación de la fosfolipasa C y la consiguiente formación de inositol 1,4,5-trisfosfato y diacilglicerol, que producen respectivamente la salida del Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico y activación de la proteína kinasa C (PKC) y contracción (Figura 11). El TxA₂ también puede activar la contracción a través de la vía de la Rho kinasa.

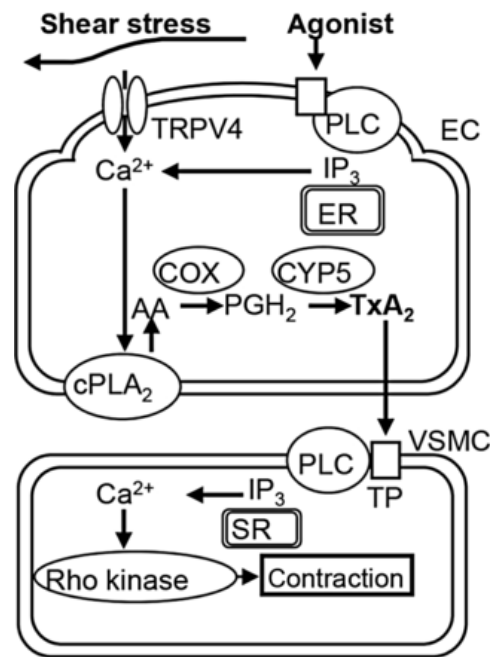


Figura 11. Síntesis y mecanismo de acción del tromboxano A₂ en el lecho vascular. EC, célula endotelial; VSMC, célula muscular lisa vascular; AA, ácido araquidónico; COX, ciclooxigenasa; cPLA₂, fosfolipasa A₂ constitutiva; CYP, citocromo P450; IP₃, inositol 1,4,5-trisfosfato; ER, retículo endoplásmico; PGH₂, prostaglandina H₂; PLC, fosfolipasa C; SR, retículo sarcoplásmico; TP, tromboxano/prostaglandina receptor; TRPV4, transient receptor potential vanilloid type 4 channel. Tomado de Ellinsworth et al., 2014.

El receptor TP también puede activarse por los isoprostanos, que son prostanoides que se producen en situaciones de estrés oxidativo, y que pueden desempeñar un papel importante en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular (Bauer et al., 2014) (Figura 12). En muchas situaciones patológicas del sistema cardiovascular, la inflamación y el estrés oxidativo asociados aumentan la producción de eicosanoides mediada por COX-1 y COX-2, y cambia su influencia neta desde la vasodilatación-antiagregante a la vasoconstricción-proagregante (Félétou et al., 2011; Figura 13). En estas situaciones se ha descrito la existencia de una disfunción tanto a nivel endotelial como del músculo liso vascular, con un aumento de la expresión de COX-1 y COX-2, un aumento en la producción de prostaciclina, tromboxano A₂ y prostaglandina H₂, un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno, una

respuesta exagerada del receptor TP a la prostaciclina (produce contracción) y prostaglandina H₂, una alteración del receptor de la prostaciclina IP y una alteración de la vía de la adenilato ciclasa (Féletou et al., 2011).

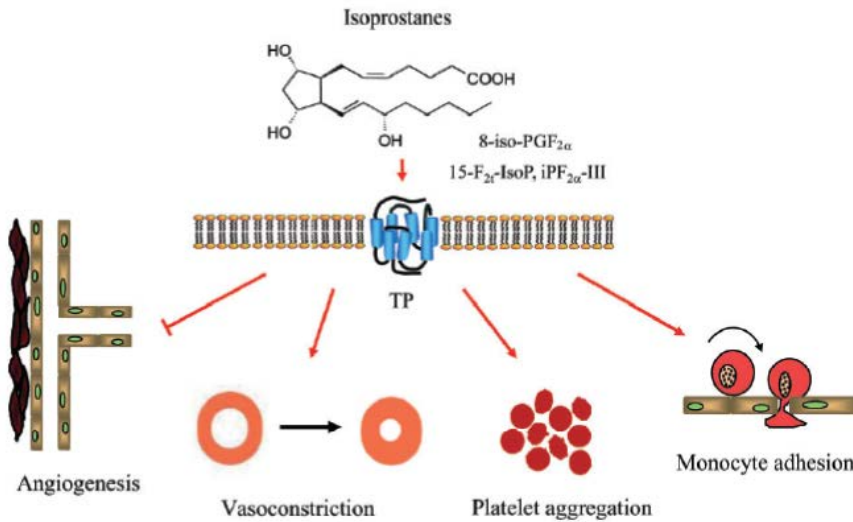


Figura 12. Mecanismo propuesto para la acción de los isoprostanos en el sistema cardiovascular, donde actúan como agonistas parciales del receptor TP y pueden desempeñar un importante papel en situaciones de estrés oxidativo. Tomado de Bauer et al., 2014.

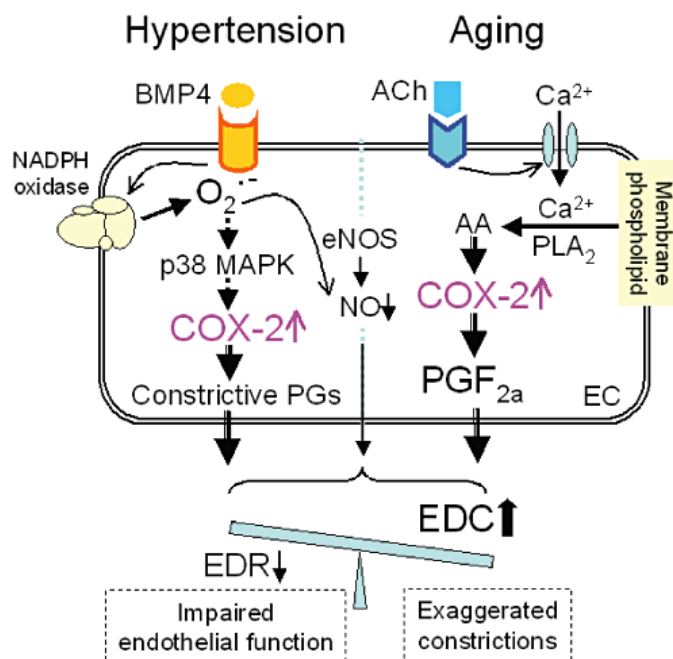


Figura 13. Exagerado papel de COX-2 en la hipertensión y el envejecimiento que media aumento de prostaglandinas vasoconstrictoras y disminución de óxido nítrico. Tomado de Féletou et al., 2011).

2.3. Factor hiperpolarizante

Desde principios de los años 80s se conocía que determinadas sustancias producían vasodilatación por un mecanismo que implicaba la hiperpolarización de la membrana de la célula muscular, y que este efecto solo se observaba en presencia de endotelio, por lo que empezó a usarse el término de *endothelium-derived hyperpolarizing factor*, EDHF (Garland y Dora, 2016). El mecanismo iónico de la hiperpolarización consiste en la salida de K^+ desde el interior celular a través de canales de K^+ . La hiperpolarización resultante provocaría el cierre de los canales de Ca^{2+} operados por voltaje, con la consiguiente disminución de Ca^{2+} libre citosólico y relajación del músculo liso de la pared vascular.

Los canales de K^+ constituyen la más extensa familia de proteínas integrales de membrana, codificadas por más de setenta genes, que forman poros a través de los cuales puede difundir el K^+ (Humphries y Dart, 2015). Estructuralmente, los canales de K^+ tienen subunidades alfa que forman el poro, y pueden tener asociadas otras subunidades auxiliares reguladoras. Las tres familias más importantes se denominan en función de las unidades transmembrana de la subunidad alfa (Petkov, 2009; Alexander et al., 2011; Humphries y Dart, 2015): 2TM, 4TM y 6TM con dos, cuatro y seis dominios transmembrana respectivamente (Figura 14). La familia 2TM se conoce también como la familia de canales de K^+ rectificadores de entrada (*inward-rectifier K channels*, K_{IR}), y comprende siete subfamilias, entre las que cabe resaltar la de los canales sensibles a ATP (K_{ATP} o $K_{IR6.X}$, con los subtipos $K_{IR6.1}$ y $K_{IR6.2}$), que tienen como subunidades asociadas los receptores de las sulfonilureas (SUR) y que se bloquean con glibenclamida. La familia 4TM es la que ha suscitado menor consenso en su nomenclatura, comprende seis subfamilias, con diversos subtipos en cada una de ellas, y se caracterizan porque

las subunidades alfa formadoras del poro forman dos poros, por lo que también se conoce esta familia como canales K₂P. La familia 6TM comprende, entre otras, varias subfamilias de canales de K⁺ activados por voltaje (K_v), que se bloquean con 4-aminopiridina, y dos subfamilias de canales de K⁺ activados por Ca⁺² (K_{Ca}), la subfamilia Slo o Maxi K_{Ca}, que se bloquean por tetraetilamonio (TEA) e iberiotoxina, y que en realidad es 7TM, y la subfamilia SK, que se bloquean con charibdotoxina y apamina.

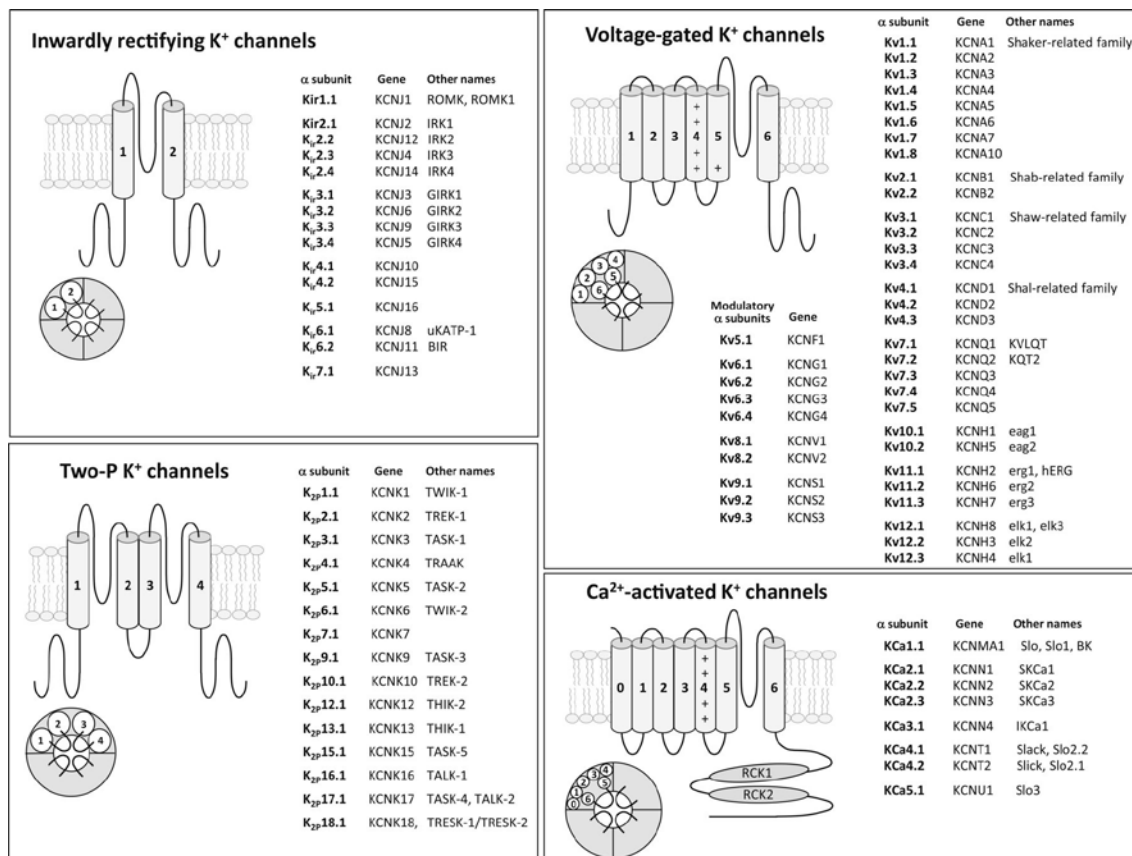


Figura 14. Estructura esquemática de las cuatro familias más importantes de canales de K⁺. Tomado de Humphries y Dart, 2015.

Las subunidades alfa formadoras del poro constituyen tetrámeros en las familias 2TM y 6TM, y esa estructura tetramérica del poro en la familia 4TM-K₂P se forma a partir de dos dímeros funcionales, habiéndose descrito formas heterodímeras en las distintas subfamilias (Figura 15).

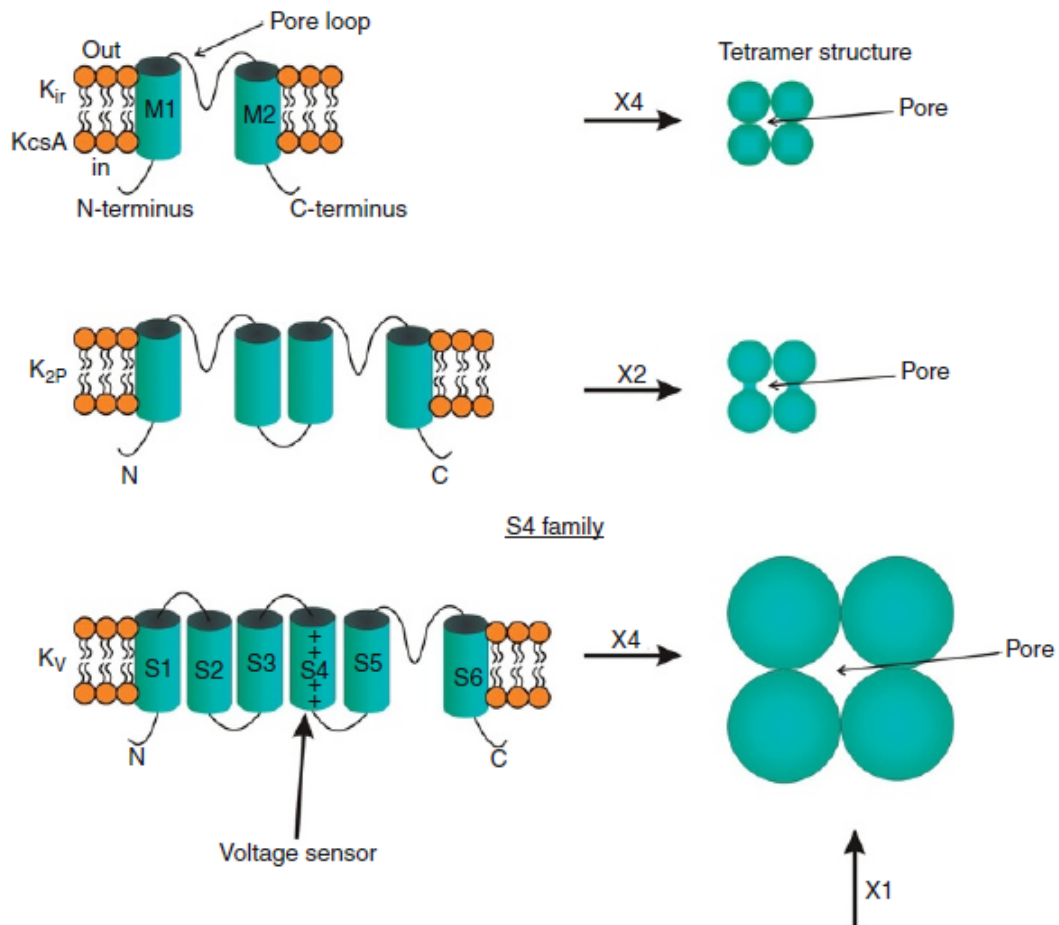


Figura 15. Estructura tetramérica del poro transmembrana en los canales de K^+ . Tomado de Petkov, 2009.

La idea inicial de la existencia de un factor difusible (EDHF) que se generaba en el endotelio y que producía hiperpolarización de la célula muscular lisa de la pared vascular, y por tanto vasodilatación, ha ido evolucionando progresivamente hacia el concepto de hiperpolarización dependiente de endotelio (EDH), como expresión de una corriente hiperpolarizante que se genera en el endotelio y que se propaga al músculo liso adyacente, y no siempre por medio de un factor difusible (Félétoú y Vanhoutte, 2009; Sorensen et al., 2012; Ellinsworth et al., 2014; Garland y Dora, 2016). EDH se activa por un aumento del Ca^{2+} libre en la célula endotelial, que potencialmente produce la activación de tres subtipos de canales de K^+ activados por calcio (K_{Ca}), los de pequeña (SK_{Ca} o $K_{Ca2.3}$), intermedia (IK_{Ca} o $K_{Ca3.1}$) y gran (BK_{Ca} o $K_{Ca1.1}$) conductancia. Los dos

primeros están presentes constitutivamente en la célula endotelial, y los BK_{Ca} actúan como dianas en músculo liso de un factor difusible EDHF. El propio K^+ que sale al líquido extracelular desde la célula endotelial a través de los canales SK_{Ca} e IK_{Ca} puede actuar como factor difusible EDHF (Dong et al., 2016; Garland y Dora, 2016). Por otra parte, la existencia de uniones mioendoteliales tipo GAP también contribuye a la transmisión directa de la corriente hiperpolarizante desde la célula endotelial a la célula muscular, sin necesidad de factor difusible (Figura 16).

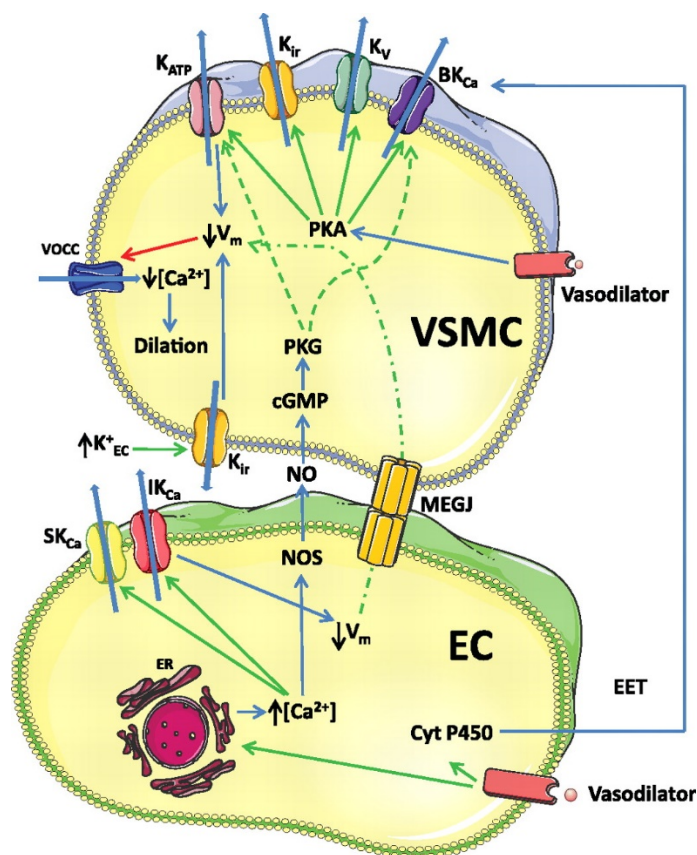


Figura 16. Vías de vasodilatación que implican canales de K^+ . MEGJ, unión mioendotelial. La flecha azul indica efecto; la flecha roja indica inhibición; la flecha verde, activación. Tomado de Sorensen et al., 2012.

El tono vascular en un territorio determinado no es simplemente el resultado de la suma lineal del efecto contráctil/relajante de cada uno de los factores reguladores del tono, sino que se han descrito diversas interrelaciones entre ellos. Además, la

importancia relativa de los diversos factores varía en función del lecho vascular. En muchos lechos vasculares, la contribución del factor hiperpolarizante endotelial aumenta y la del óxido nítrico disminuye conforme disminuye el radio del vaso. Las vías de la NOS y de la COX tienen numerosas interferencias cruzadas (Kim, 2011; Kim, 2014). El NO puede activar la vía de la COX, aumentando la síntesis de prostaciclina. Recíprocamente, la vía de la COX puede influir en la actividad de la NOS: la inhibición de la COX con aspirina o indometacina produce una disminución de la producción de NO que está mediada por la disminución de la producción y liberación de tromboxano A₂ en las plaquetas. El NO endógeno inhibe la síntesis de tromboxano A₂, el cual a su vez puede interferir por distintas vías el mecanismo del EDH; por ello, en presencia de un inhibidor de la síntesis de NO el tromboxano A₂ endógeno inhibe la hiperpolarización mediada por SK_{Ca} endotelial (McNeish et al., 2012; Ellinsworth et al., 2014). Los mecanismos por los que se produce la interacción entre la vía de la NOS y la de la COX no están claros, existiendo además resultados contradictorios (Kim, 2011; Kim, 2014). Entre los mecanismos propuestos a nivel postranslacional se sugiere que junto con el NO se produce simultáneamente superóxido, y ambos pueden reaccionar para formar peroxinitrito, el cual puede modificar la actividad enzimática al interactuar tanto con el grupo hemo o los residuos de tirosina de la COX (Figura 17). Además, el NO puede modificar directamente los residuos de cisteína de la COX, activándola.

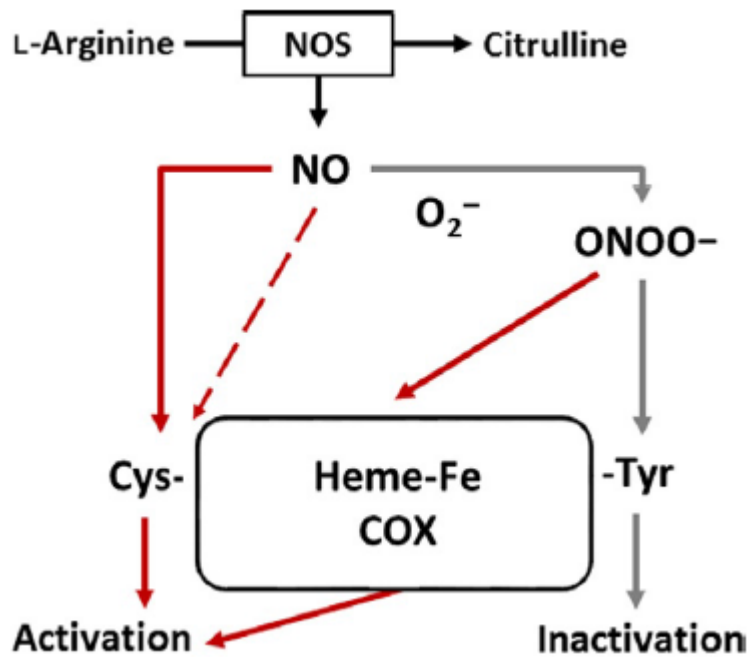


Figura 17. Mecanismos propuestos para la regulación de la COX por el óxido nítrico. Tomado de Kim, 2014.

3. PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS

Las propiedades endocrinas del corazón se describieron por primera vez por de Bold en 1981, cuando descubrió que la inyección intravenosa en ratas de un extracto crudo de miocardio auricular tenía un potente efecto diurético y natriurético (de Bold et al., 1981). A partir de ahí, en los años siguientes se fueron identificando los diferentes péptidos que forman la familia del sistema de los péptidos natriuréticos. Este sistema de regulación endocrina, paracrina y autocrina desempeña un papel importantísimo en la regulación de la homeostasis cardiovascular, y está compuesto por tres péptidos, genéticamente distintos pero estructuralmente relacionados (revisado recientemente en Schlueter et al., 2014; Volpe, 2014; De Vito, 2014; Guo et al., 2014; Hodes y Lichtstein, 2014; Pandey, 2014; Ramos et al., 2015): péptido natriurético auricular o atrial (ANP), péptido natriurético tipo B (BNP) y péptido natriurético tipo C (CNP). Los tres péptidos

se secretan como prohormonas que se van escindiendo por diversas proteasas hasta alcanzar su forma final, activa biológicamente. Los tres péptidos tienen una estructura común, constituida por un anillo de 17 aminoácidos, con un puente disulfuro entre los dos residuos cisteínicos (Figura 18). En humanos, la secuencia de aminoácidos de este anillo es muy similar, con pequeños cambios de un péptido a otro.

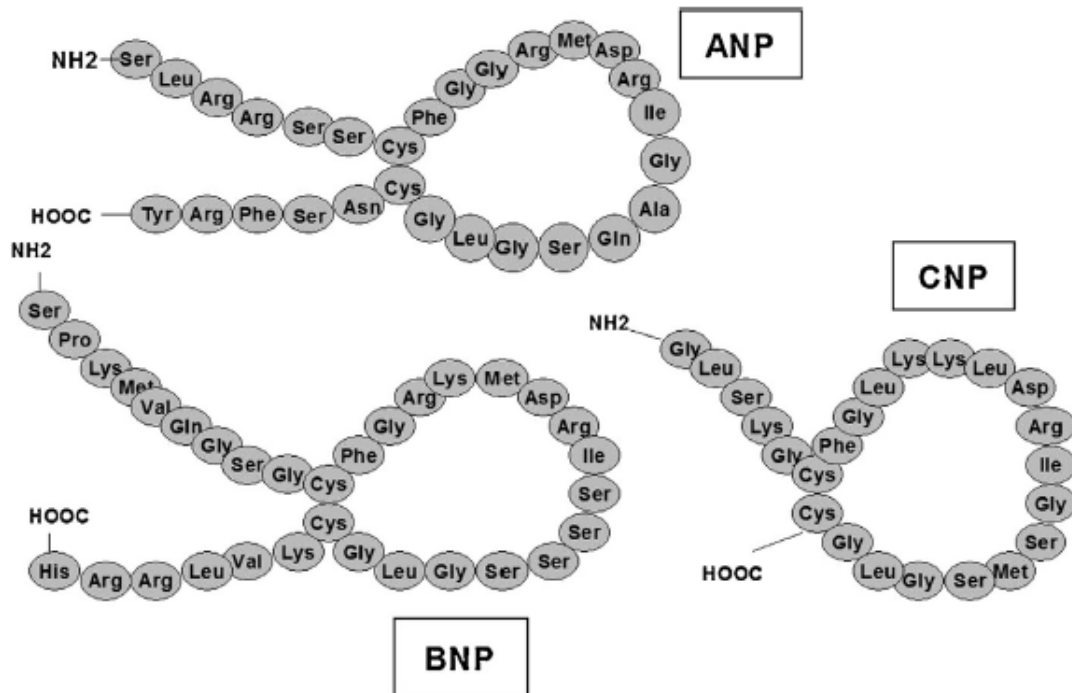


Figura 18. Estructura y secuencia de aminoácidos de los péptidos natriuréticos. Tomado de De Vito, 2014.

El ANP se produce en los cardiomiocitos auriculares como preprohormona, y se almacena en gránulos intracelulares en forma de preprohormona, la cual se transforma en la forma final activa, de 28 aminoácidos durante el proceso de liberación. El BNP se descubrió primeramente en cerebro porcino, y de ahí su nombre (B de *Brain*), aunque su producción fundamental es en los cardiomiocitos ventriculares (también se produce en los auriculares, aunque en menor cantidad); al igual que el ANP, se produce como preprohormona, y la forma final tiene 32 aminoácidos. El CNP se identificó inicialmente

en el cerebro porcino, aunque se produce fundamentalmente en el endotelio vascular y en el sistema nervioso central, y su forma activa es la de cadena más corta, con 22 aminoácidos. El ANP se libera en respuesta a la distensión auricular, y el BNP se libera en respuesta a la sobrecarga de volumen ventricular. En condiciones fisiológicas los niveles plasmáticos de BNP son mucho más bajos que los de ANP, y solo aumentan notablemente en situaciones patológicas. Se ha sugerido que el ANP representaría la hormona "fisiológica" de este sistema, interviniendo en la regulación cardio-renal normal, mientras que el BNP funcionaría más como una hormona de respuesta al estrés cardíaco, e intentaría contrarrestar los mecanismos que conducen a ese estrés. El CNP se libera en el endotelio en respuesta a citoquinas proinflamatorias (interleuquina-1 y factor de necrosis tumoral) o en respuesta a diferentes agentes vasoactivos (por ej., acetilcolina). Al igual que el BNP sus niveles plasmáticos son muy bajos en condiciones fisiológicas, y aumentan en situaciones patológicas. Los péptidos natriuréticos ejercen sus acciones a través de su interacción con receptores específicos (Figura 19). Se han identificado tres receptores, A (NPR-A), B (NPR-B) y C (NPR-C). Los receptores NPR-A y NPR-B son receptores transmembrana que están acoplados al enzima guanilato ciclasa. NPR-A se une al ANP y al BNP, con mayor afinidad por ANP; NPR-B se une preferiblemente al CNP; y NPR-C se une a los tres péptidos con menor afinidad por BNP. NPR-A se expresa primariamente en el lado exterior de las membranas de las células endoteliales y musculares lisas de la pared vascular, tanto en el sistema arterial como venoso; este receptor también se expresa en neuronas y otros tejidos (tejido adiposo, riñón, médula suprarrenal, hígado). El receptor NPR-B se expresa en el cerebro y en el sistema vascular, principalmente en el sistema venoso, y también se expresa en los condrocitos, donde juega un papel importante en la osificación endocondral durante el crecimiento de los huesos largos. El receptor NPR-C se expresa primariamente en venas, cerebro, riñones y pulmones, y representa cuantitativamente el 95% de los NPRs. El NPR-C carece de

actividad guanilato ciclasa, y se considera principalmente un receptor de aclaramiento, de forma que cuando un péptido natriurético se une al receptor NPR-C sufre un proceso de endocitosis y degradación lisosomal. Adicionalmente, los péptidos natriuréticos son eliminados por la acción de una endopeptidasa neutra o neural (*neural or neutral endopeptidase*, NEP), la neprilisina.

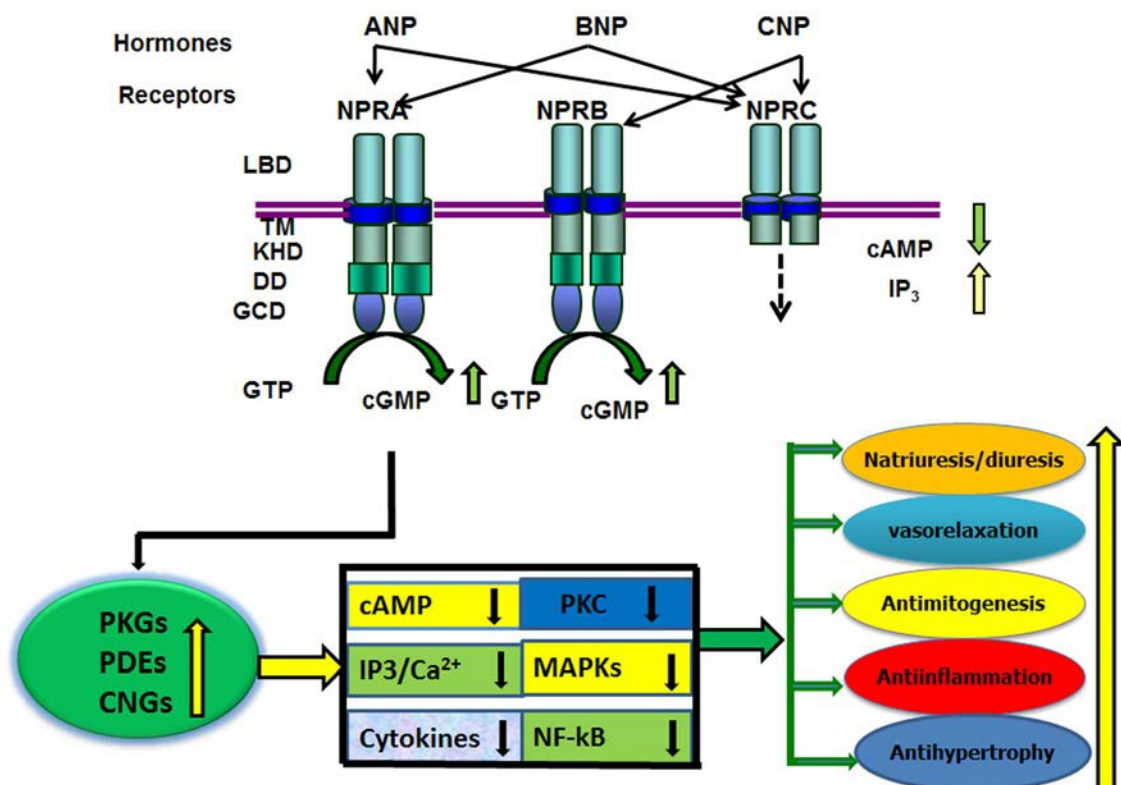


Figura 19. Diagrama representativo de los péptidos natriuréticos y su unión a receptores NPR. Tomado de Pandey, 2014.

La mayor parte de las acciones biológicas de los péptidos natriuréticos están relacionadas con la activación del enzima guanilato ciclasa, aumentando la concentración intracelular de cGMP, el cual produce una activación de la proteína kinasa G-1 (PKG-1), que produce fosforilación de diversas proteínas en el interior celular y una disminución de la concentración de Ca²⁺ libre intracelular, con la consiguiente relajación (Bhatraju et

al., 2015; Zhao et al., 2015; Oliveira-Paula et al., 2016) (Figura 6), tal como se ha comentado anteriormente en el apartado del NO. Existen dos tipos de guanilato ciclasa: 1) la guanilato ciclasa particulada, que está presente en el lado intracelular de la membrana, relacionada con los receptores NPR-A y NPR-C; y 2) la guanilato ciclasa soluble, presente en el citosol, y que se activa fundamentalmente por el NO. Una vez activado un tipo u otro de guanilato ciclasa, se aumenta la concentración de cGMP, y la cascada de acontecimientos que siguen es la misma, con independencia del tipo de guanilato ciclasa activado.

La importancia de los péptidos natriuréticos en la regulación de la homeostasis cardiovascular está relacionada con sus acciones sobre distintos órganos y sistemas (Figura 20). Los péptidos natriuréticos inhiben el sistema renina-angiotensina-aldosterona, aumentando la excreción renal de sodio y de agua, e inhiben la actividad del sistema nervioso autónomo, reduciendo el tono vascular. El aumento de la diuresis y natriuresis también está relacionado con su acción directa a nivel renal, donde aumentan el filtrado glomerular y disminuyen la reabsorción de agua en el túbulo proximal y en el tubo colector. Además, los péptidos natriuréticos aumentan la permeabilidad endotelial, facilitando el paso de agua al compartimento extracelular y reducen la precarga, posiblemente por disminución del retorno venoso y aumento de la capacitancia venosa. También se ha descrito que los péptidos natriuréticos pueden ejercer importantes acciones metabólicas. En el tejido adiposo aumentan la lipólisis y la liberación de adiponectinas, e inhiben la liberación de leptina; además, aumentan la biogénesis mitocondrial y la capacidad oxidativa en el tejido adiposo y en músculo esquelético. El aumento de la biogénesis mitocondrial en el tejido adiposo blanco estimula la transformación de grasa blanca en grasa parda, lo que aumenta el gasto energético y la producción de calor.

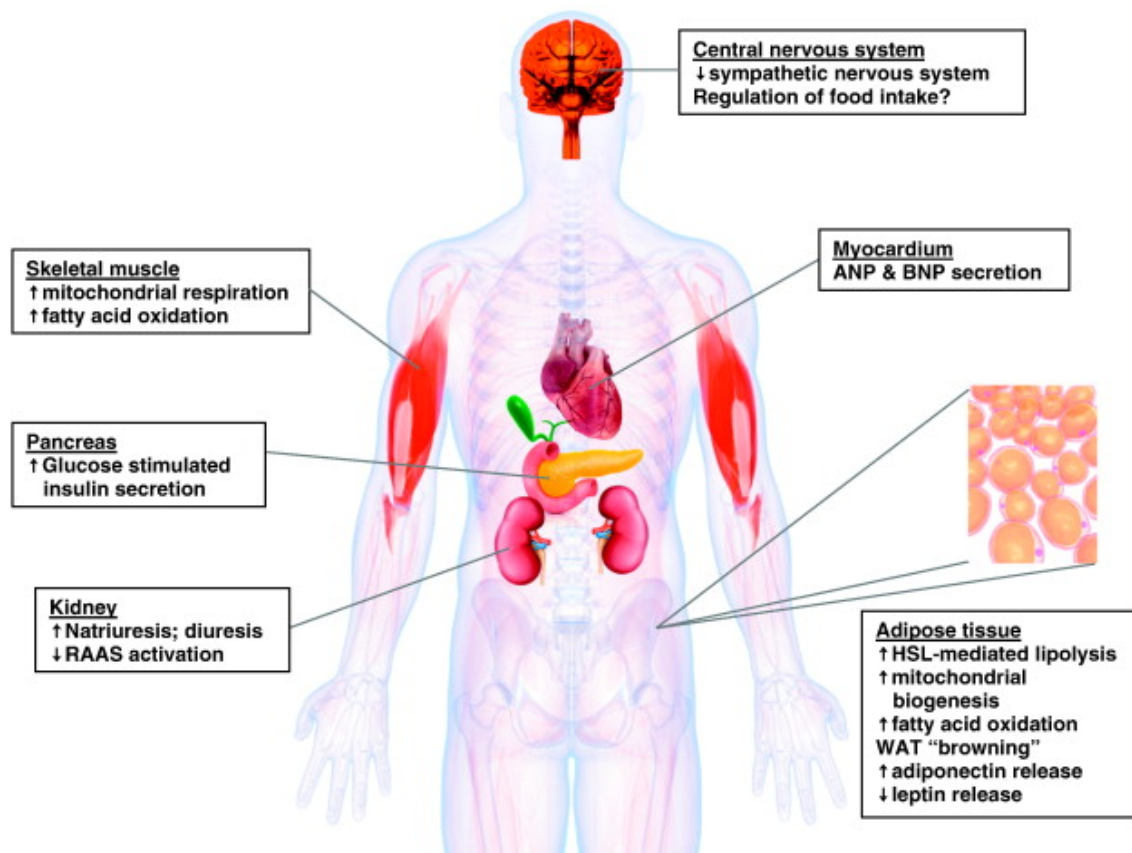


Figura 20. Principales acciones biológicas y órganos diana de los péptidos natriuréticos. Tomado de Schlueter et al., 2014.

Además de las acciones cardiovasculares y metabólicas de los péptidos natriuréticos se ha descrito que estos péptidos pueden actuar como inmunomoduladores, con efectos citoprotectores (Chiurchiù et al., 2008; de Bold et al., 2010; De Vito, 2014). Estos péptidos pueden contribuir a la inmunidad innata por diversos mecanismos, entre los que se citan: 1) estimular la defensa frente a agentes infecciosos aumentando la fagocitosis y la producción de especies reactivas de oxígeno; 2) inhibir la producción y liberación de mediadores proinflamatorios (TNF α , interleuquina-1, MCP-1, NO, COX-2); y 3) inhibir la expresión de moléculas de adhesión como molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) y E-selectina. Además, los péptidos

natriuréticos también pueden modificar la inmunidad adaptativa por diversos mecanismos: 1) reducir el número de linfocitos CD4⁺ CD8⁺ y disminuir el número de linfocitos CD4⁻ CD8⁻; y 2) estimular la diferenciación de células CD4⁺ novatas (*naïves*) hacia el fenotipo Th2 y/o Th17. Por otra parte, los efectos citoprotectores de los péptidos natriuréticos se manifiestan: 1) en situaciones de daño miocárdico e hipertrofia ventricular; 2) en aterosclerosis e hipertensión, por la inducción de factores antiproliferativos; 3) en situaciones de estrés oxidativo, por su capacidad de neutralizar los efectos de los radicales libres; y 4) en situaciones de tumores, frena el crecimiento tumoral al inducir apoptosis y necrosis.

Los péptidos natriuréticos están modificados en diversas situaciones fisiopatológicas. Clásicamente se conocía que los péptidos natriuréticos estaban aumentados en plasma en situaciones de insuficiencia cardiaca congestiva, como consecuencia del estrés en la pared ventricular derivada del aumento de la presión telediastólica. De hecho, la determinación de las concentraciones plasmáticas de BNP y NT-proBNP tienen un valor diagnóstico y pronóstico en estos enfermos (Madamanchi et al., 2014). Los péptidos natriuréticos pueden comportarse como neurotransmisores o neuromoduladores en el cerebro (Hodes and Lichtstein, 2014), y pueden participar en la regulación de la hemodinámica cerebral en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas, como por ejemplo, el ictus (Guo et al., 2014; Guo et al., 2015). La existencia de una concentración plasmática elevada de medioregional proANP (MR-proANP), un fragmento estable del proANP que se secreta en cantidades equimolares al ANP, está independientemente asociada a una peor evolución, con mayor número de secuelas funcionales y mayor mortalidad en pacientes con ictus isquémico (Katan et al., 2010) y hemorrágico (Fischer et al., 2014). Además, existen evidencias de que la existencia de mutaciones en la secuencia del gen del ANP se asocia con un mayor riesgo de ictus (Rubattu et al., 2004; De Paolis et al., 2007; Pereira et al., 2015). BNP y NT-proBNP son

biomarcadores útiles de riesgo cardiovascular en pacientes con ictus isquémico (Fonseca et al., 2011; Santamarina et al., 2012; Rost et al., 2012) y en diabetes (Görmüs et al., 2010; Wiersma et al., 2010; Senmaru et al., 2013). Además, el BNP plasmático es un factor pronóstico independiente de mala evolución y de mortalidad precoz en pacientes con ictus agudo (Montaner et al., 2012; García-Berrocoso et al., 2013; Maruyama et al., 2014). Finalmente, se ha sugerido que los péptidos natriuréticos podrían tener un efecto neuroprotector después del daño cerebral secundario, por ejemplo, a la isquemia (Guo et al., 2014; Hodes y Lichtstein, 2014).

A raíz del conocimiento de las acciones metabólicas de los péptidos natriuréticos ha suscitado gran interés la posible relación de este sistema con la obesidad, la diabetes mellitus tipo 1 y 2 y la resistencia a la insulina (Gruden et al., 2014; Schlueter et al., 2014). Existe un aumento de la concentración plasmática de ANP en pacientes con diabetes tipo 1 (McKenna et al., 2005) y tipo 2 (Nannipieri et al., 2002), y también se ha descrito en modelos experimentales de diabetes en ratas (Obineche et al., 2004) y conejos (Yeğen et al., 1995). Por otra parte, las concentraciones plasmáticas elevadas de ANP se han relacionado con un mal control de la glucemia (McKenna et al., 2005). Los péptidos natriuréticos estimulan la lipólisis, aumentan la producción de adiponectina y pueden contribuir a un mejor control de la glucemia (Welsh y McMurray, 2012; Heinisch et al., 2012). Se ha observado una relación inversa entre la concentración plasmática de péptidos natriuréticos y el peso corporal. La obesidad estaría relacionada con una disminución de la concentración plasmática de los péptidos natriuréticos y un aumento de la expresión del receptor NPR-C en el tejido adiposo, lo que ocasionaría un aumento de la resistencia a la insulina y una disminución de la función mitocondrial, con disminución del gasto energético, hiperinsulinemia e hiperglucemia (Figura 21). Estas interrelaciones ayudarían a explicar también la relación entre la obesidad y la hipertensión, ya que la disminución de la concentración plasmática de los péptidos

natriuréticos contribuiría a la hipertensión por su acción directa sobre el riñón (menor vasodilatación, diuresis y natriuresis) y la menor acción antagónica sobre el sistema renina-angiotensina-aldosterona y sobre el sistema nervioso autónomo. Considerando conjuntamente sus efectos sobre el metabolismo glucídico y lipídico y sobre la presión arterial, los péptidos natriuréticos pueden, potencialmente, ser la base para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas que actúen simultáneamente sobre los problemas cardiovasculares y metabólicos (Schlueter et al., 2015).

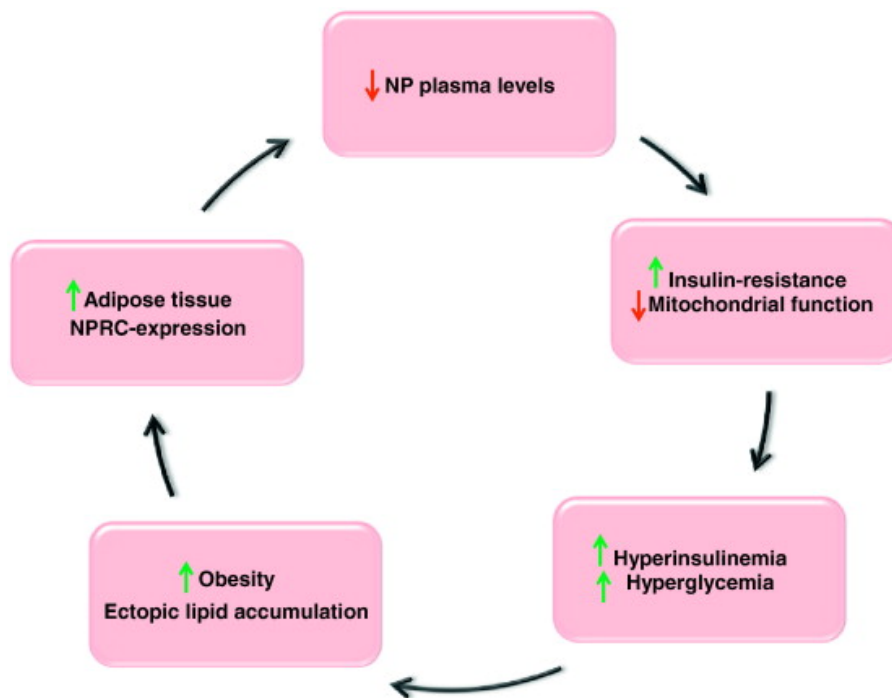


Figura 21. Obesidad, resistencia a la insulina y disminución de la concentración plasmática de péptidos natriuréticos. Tomado de Schlueter et al., 2014.

El potencial terapéutico de los péptidos natriuréticos se ha empezado a aplicar en los últimos años en el tratamiento de diversas situaciones patológicas (James et al., 2010; Saito, 2010; Gruden et al., 2014; Schlueter et al., 2014). El uso clínico de análogos recombinantes como el carperitide (ANP sintético) está autorizado en Japón y USA para

el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva aguda, aunque su corta vida media y sus efectos secundarios limitan mucho su uso clínico. El neseritide (análogo sintético del BNP) constituye una opción terapéutica en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva aguda y en el tratamiento de la hipertensión pulmonar. Otra opción para aumentar la actividad de estos péptidos es bloquear su aclaramiento, por ejemplo utilizando un inhibidor de la endopeptidasa neutra, solo o combinado con fármacos que antagonizan el sistema renina-angiotensina-aldosterona. Así, por ejemplo, el LCZ696 (Entresto[®], de Novartis) lleva valsartan, que es un bloqueante del receptor de la angiotensina, habitualmente usado en la hipertensión, y sacubitril, un inhibidor de la endopeptidasa neutra, y se ha visto que puede ser útil en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva (Hubers y Brown, 2016; McCormack, 2016; Tummala et al., 2016), estando actualmente autorizado su uso en España. Recientemente se ha utilizado un nuevo fármaco agonista del receptor NPR-A, el PL-3994, que es resistente a la acción de la endopeptidasa neutra, que reproduce los efectos del ANP o BNP, pero de forma más persistente, y que puede ser potencialmente útil en el tratamiento del broncoespasmo asociado al asma (Edelson et al., 2013). También se ha descrito que los péptidos natriuréticos podrían tener un efecto neuroprotector en ictus isquémico o hemorrágico, y este efecto podría deberse a su acción vasodilatadora de la circulación cerebral y también a sus acciones inmunomoduladoras (Hodes y Lichtstein, 2014).

4. DIABETES Y DAÑO VASCULAR

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica que se caracteriza por una deficiente secreción de insulina en el páncreas o por una deficiente acción de la insulina sobre las células, con el consiguiente trastorno en el metabolismo de la glucosa, ya que las células necesitan de la acción de la insulina para que la glucosa entre a su interior, y

la consiguiente alteración de la homeostasis de la glucemia, con hiperglucemia crónica. Hay tres tipos principales de diabetes (IDF Diabetes Atlas, 2015):

1. Diabetes tipo 1, generalmente de inicio juvenil, se produce habitualmente por una reacción autoinmune contra las células alfa pancreáticas productoras de insulina. Se caracteriza por niveles plasmáticos de insulina bajos. Habitualmente necesita tratamiento con insulina.

2. Diabetes tipo 2, también llamada diabetes no-insulina dependiente, generalmente aparece en el adulto, y representa aproximadamente el 90% de los casos de diabetes. Se caracteriza por resistencia a la insulina y/o deficiencia relativa de insulina. Con frecuencia está asociada a sobrepeso u obesidad, que por sí mismos pueden causar resistencia a la insulina e hiperglucemia. En ocasiones remite con ejercicio físico y pérdida de peso; suele beneficiarse del uso de fármacos antidiabéticos orales, y a veces requiere del tratamiento con insulina.

3. Diabetes gestacional, aparece durante la gestación y suele remitir después del parto. La mujer con diabetes gestacional tiene un mayor riesgo de padecer en el futuro diabetes tipo 2. Como en el caso de la diabetes tipo 2, se benefician de ejercicio suave, y a veces requieren antidiabéticos orales o insulina.

Existen además formas menos frecuentes, como la diabetes monogénica, que representa el 4-13% de las diabetes en la infancia, o la diabetes secundaria a otras enfermedades, como enfermedad de Cushing, acromegalia, enfermedades pancreáticas, etc.

Los datos epidemiológicos reflejan la magnitud del problema sanitario que representa la diabetes (IDF Diabetes Atlas, 2015). En el mundo, uno de cada 11 adultos tienen diabetes (415 millones). En 2040 se calcula que los afectados por diabetes serán

uno de cada 10 (642 millones). Cada 6 segundos muere una persona por problemas derivados de su diabetes (5 millones de muertes al año). Uno de cada 7 nacimientos está afectado por diabetes gestacional. Uno de cada dos adultos con diabetes está sin diagnosticar. La diabetes ocasiona el 12% de los gastos mundiales sanitarios. El enfermo diabético tiene una disminución de su expectativa de vida, de 7.5 años en varones y 8.2 años en mujeres (Mozaffarian et al., 2015).

Los enfermos diabéticos tienen alto riesgo de desarrollar una serie de complicaciones, que por sí mismas representan una elevada morbilidad y mortalidad. Un adecuado control de las cifras de glucemia constituye la mejor herramienta preventiva de estas complicaciones. Entre las complicaciones más graves están las que afectan al sistema cardiovascular, y suelen agruparse en macropatías (ictus, cardiopatía isquémica e infarto de miocardio) y micropatías (retinopatía, neuropatía, isquemia de los miembros inferiores), según afecten a vasos de calibre grande o pequeño (Orasanu y Plutzky, 2009; Domingueti et al., 2016). El riesgo absoluto de padecer un incidente cardiovascular en adultos es dos veces mayor en diabéticos que en sujetos no diabéticos, y cuando aparece, el riesgo de muerte a consecuencia del incidente también es mayor en diabéticos (Mozaffarian et al., 2015). Más de la mitad de los pacientes diabéticos mueren de enfermedad cardiovascular (principalmente cardiopatía e ictus), constituyendo la primera causa de muerte en estos pacientes (Mozaffarian et al., 2015).

4.1. Disfunción endotelial en la diabetes

En condiciones fisiológicas el endotelio y el músculo liso de la pared vascular interaccionan mutuamente para regular el tono vascular y asegurar una adecuada perfusión al tejido. La hiperglucemia se considera un factor clave en el desarrollo de la vasculopatía diabética. La disfunción endotelial, entendida como una disminución de la respuesta vasodilatadora mediada por el endotelio, constituye un indicador temprano del

desarrollo de micro y macroangiopatía en la diabetes (Ding y Triggle, 2010; Giannini et al., 2011; Domingueti et al., 2016). En la diabetes, la hiperglucemia juega un papel clave en el desarrollo del daño vascular a través de diversos mecanismos, que están intensamente interrelacionados (Xu, 2015; Domingueti et al., 2016): 1) glucosilación irreversible no enzimática de las proteínas; 2) alteración del potencial redox celular; 3) inflamación; 4) disfunción endotelial; y 5) hipercoagulabilidad (Figura 22).

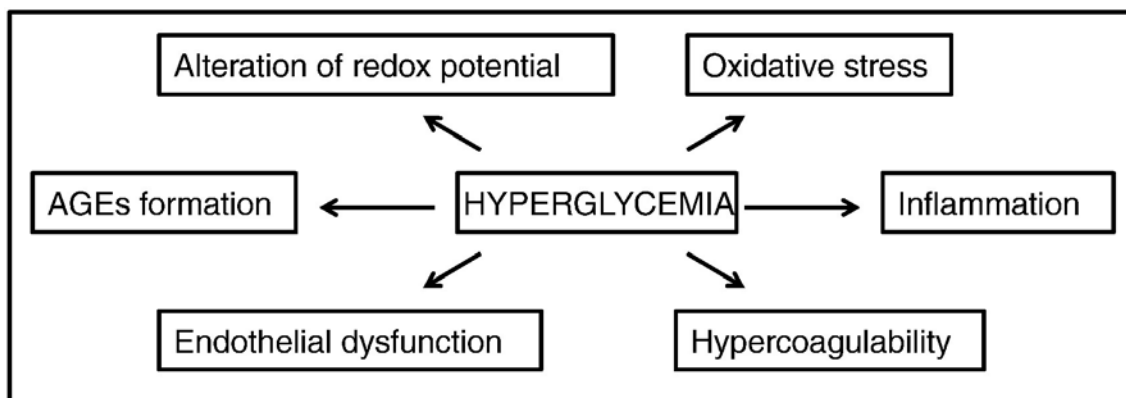


Figura 22. Mecanismos implicados en el desarrollo de las complicaciones vasculares en la diabetes. Tomado de Domingueti et al., 2016.

La célula endotelial es muy sensible a la hiperglucemia, ya que la glucosa difunde pasivamente al interior celular sin necesidad de insulina. La acumulación intracelular de glucosa en la célula endotelial activa una vía metabólica secundaria, la vía de la aldosa reductasa, en la que la aldosa reductasa y la sorbitol deshidrogenasa catalizan el metabolismo de glucosa a sorbitol y del sorbitol a fructosa, respectivamente. Estas reacciones implican la oxidación del NADPH a NADP⁺, y la reducción del NAD⁺ a NADH. Por ello, el excesivo influjo de glucosa al interior de la célula endotelial produce un cambio del potencial redox, como consecuencia de la depleción del NADPH celular y el aumento del cociente NADH/NAD⁺ citosólico (Figura 23). El aumento de este cociente por la hiperglucemia imita los efectos de la hipoxia, causando una aceleración de la glucólisis, con el consiguiente aumento de la síntesis *de novo* de diacilglicerol a partir de

metabolitos intermedios de la glucólisis, y la subsiguiente activación de la PKC (Kizub et al., 2014; Domingueti et al., 2016).

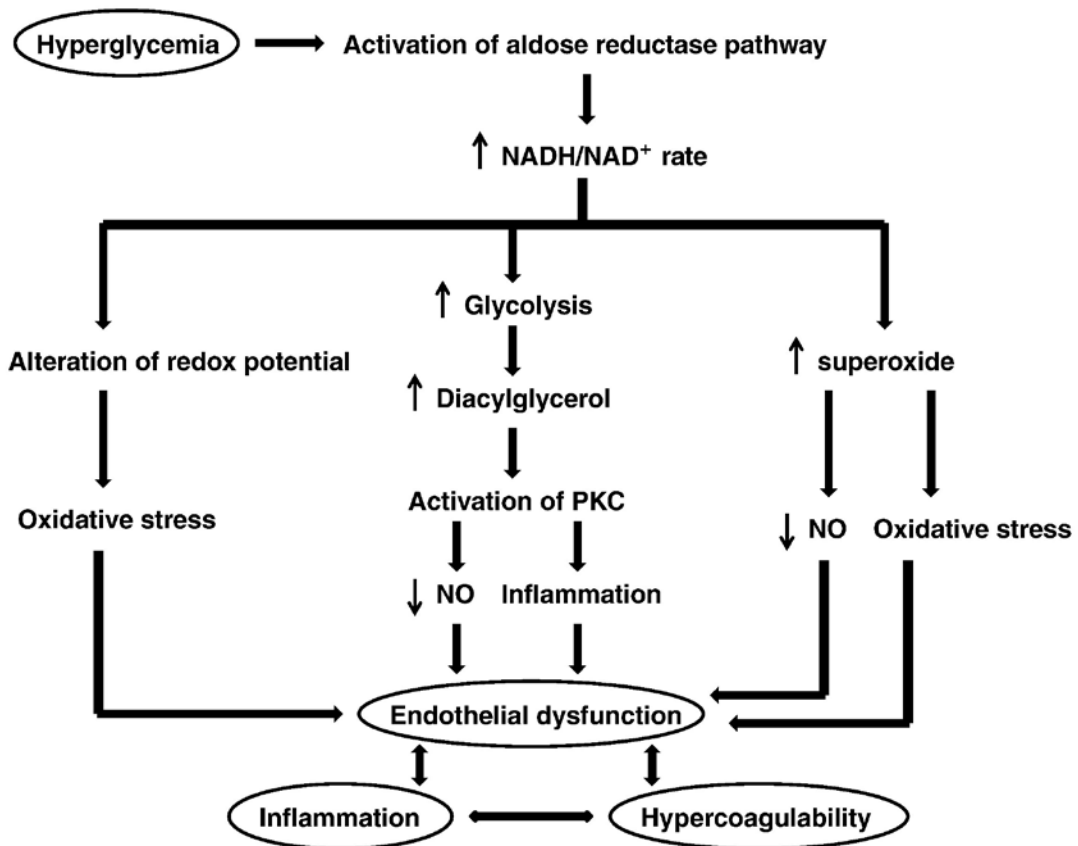


Figura 23. Mecanismos por los cuales la hiperglucemia puede producir daño vascular a través de la vía de la aldosa reductasa. Tomado de Domingueti et al., 2016.

La activación de la PKC interfiere con la síntesis de NO, promueve un aumento de la permeabilidad vascular y de la contractilidad, estimula la síntesis de la matriz extracelular y el engrosamiento de la membrana basal, y promueve una respuesta inflamatoria a través de la activación de citoquinas y moléculas de adhesión. Además, la alteración del cociente NADH/NAD⁺ también ocasiona un aumento de la producción de anión superóxido debido a la activación de oxidasas dependientes de la NADH, el cual oxida lipoproteínas de baja densidad (LDL), tiene efectos citotóxicos en las células endoteliales y provoca la disminución de la biodisponibilidad de NO, lo que conlleva a la

disfunción endotelial. El endotelio dañado libera a su vez moléculas procoagulantes, como el factor Von Willebrand (VWF), el inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) y el tromboxano A₂, y expresa en su superficie factor tisular (TF) y moléculas de adhesión, como la P-selectina, E-selectina, molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) y molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1), que median la interacción de los neutrófilos y plaquetas con el endotelio. Por lo tanto, la disfunción endotelial puede provocar un estado proinflamatorio y procoagulante.

Cuando se exponen a las aldosas, las proteínas son sometidas a un proceso de glucosilación y oxidación. Inicialmente la reacción consiste en la condensación de la glucosa a través de su grupo carbonilo con los grupos amino de las proteínas para formar compuestos inestables y reversibles, denominados bases de Schiff, las cuales pueden posteriormente sufrir un remodelado para formar compuestos más estables, denominados compuestos de Amadori, como por ejemplo, la hemoglobina glucosilada. Estos compuestos estables sufren complejas transformaciones que conducen a la formación de los denominados productos finales de la glucosilación avanzada (AGEs, de *advanced glycation end-products*), que son irreversibles. Las moléculas ligadas a AGEs adquieren nuevas propiedades, y son prooxidantes, lo que conlleva la producción de especies reactivas de oxígeno, que favorecen un aumento del estrés oxidativo e inhiben la liberación de NO, comprometiendo la función vascular (Figura 24). Los AGEs pueden unirse a sus receptores RAGE (*receptors for advanced glycation end-products*), presentes en la superficie de las células endoteliales, células musculares lisas perivasculares, fibroblastos, linfocitos, monocitos y macrófagos, con la consiguiente activación del factor nuclear de transcripción kappa B (NF-κB, *nuclear factor-kappa B*). Tras su activación, el factor NF-κB induce la transcripción de varios genes, entre ellos los de la endotelina-1, VCAM-1, ICAM-1, E-selectina, trombomodulina, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, *vascular endothelial growth factor*),

interleuquina-1 (IL-1), TNF- α y RAGE, provocando un estado proinflamatorio y procoagulante, que causa activación endotelial. El aumento de la expresión de citoquinas inflamatorias y moléculas de adhesión puede amplificar las respuestas inflamatorias, agravando el daño vascular. Además, las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 e IL-6 median el efecto procoagulante del endotelio lesionado, ya que estimulan la liberación y expresión endotelial de moléculas procoagulantes como VWF, PAI-1 y TF, e inhiben la expresión de moléculas anticoagulantes como la trombosmodulina. Además, la producción aumentada de factores de crecimiento como el VEGF y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, *fibroblast growth factor*) puede estimular el remodelado vascular, produciendo un engrosamiento de la membrana basal, que favorece el depósito de lípidos, promueve la esclerosis y daña la vasodilatación. El daño vascular, el estrés oxidativo, la inflamación y la alteración crónica del balance hemodinámico producidos por la hiperglucemia pueden iniciar un proceso de aterosclerosis y la formación de trombos intraarteriales. La expresión de moléculas de adhesión en el endotelio lesionado promueve su unión con los leucocitos y su trans migración al interior de la pared vascular. Además, se reclutan y activan los monocitos circulantes, se transforman en macrófagos, que fagocitan el exceso de LDL oxidado y se transforman en células espumosas que forman las líneas o rayas grasas características de las fases iniciales del proceso aterosclerótico. Los monocitos también liberan citoquinas que promueven el reclutamiento de otras células inflamatorias. En respuesta a este estado proinflamatorio las células musculares lisas proliferan y emigran desde la túnica media a la íntima, y sintetizan y secretan matriz extracelular (colágeno, elastina y proteinglicanos) que facilitan la formación de un fibroateroma. En las fases iniciales de la aterosclerosis no se suele producir trombosis. Sin embargo, cuando el proceso avanza, se producen fisuras o ulceraciones de la placa que, expuestas a sustancias altamente trombogénicas como el TF y VWF, provoca la adhesión y

agregación plaquetar y un rápido crecimiento del trombo. Además, las plaquetas activadas también liberan citoquinas y factores de crecimiento que facilitan el reclutamiento de monocitos a la placa aterosclerótica y estimulan la proliferación de fibroblastos y de células musculares lisas, que acentúan el proceso aterosclerótico. Las plaquetas activadas también pueden interactuar con el endotelio, estimulando la formación de moléculas de adhesión y citoquinas, exacerbando el proceso inflamatorio. Resulta por tanto incontestable el papel de la disfunción endotelial, la inflamación y la hipercoagulabilidad en el desarrollo de las complicaciones vasculares en la diabetes.

En un reciente metaanálisis (Loader et al., 2015) se ha observado que durante la hiperglucemia aguda se produce una disminución de la función endotelial en la macrocirculación, aunque no se ha observado en la microcirculación; sin embargo, la función de las células musculares lisas no se ve afectada durante la hiperglucemia aguda. Esta disfunción endotelial macrovascular puede ser atribuible a una disminución de la biodisponibilidad de NO secundaria al estrés oxidativo producido por la hiperglucemia. La ausencia de disfunción endotelial en la microcirculación podría explicarse por el hecho de que el NO tiene un menor peso en la regulación vascular en la microcirculación, pesando más otros mediadores químicos vasodilatadores como el EDHF o la prostaciclina (Loader et al., 2015). Por otra parte, el hecho de que la función del músculo liso vascular no esté alterada durante la hiperglucemia aguda indica que la disfunción endotelial precede a la disfunción de la célula muscular lisa, sugiriendo que la disfunción endotelial tiene un papel primordial en la patogénesis de la enfermedad cardiovascular (Loader et al., 2015). Aunque la menor biodisponibilidad de NO durante la hiperglucemia aguda pueda ser transitoria, la repetición o el mantenimiento de esta situación puede provocar un estado proinflamatorio con proliferación del músculo liso vascular, mayor tono vasoconstrictor y remodelado vascular, todos ellos factores que están implicados en la fisiopatología de la enfermedad cardiovascular.

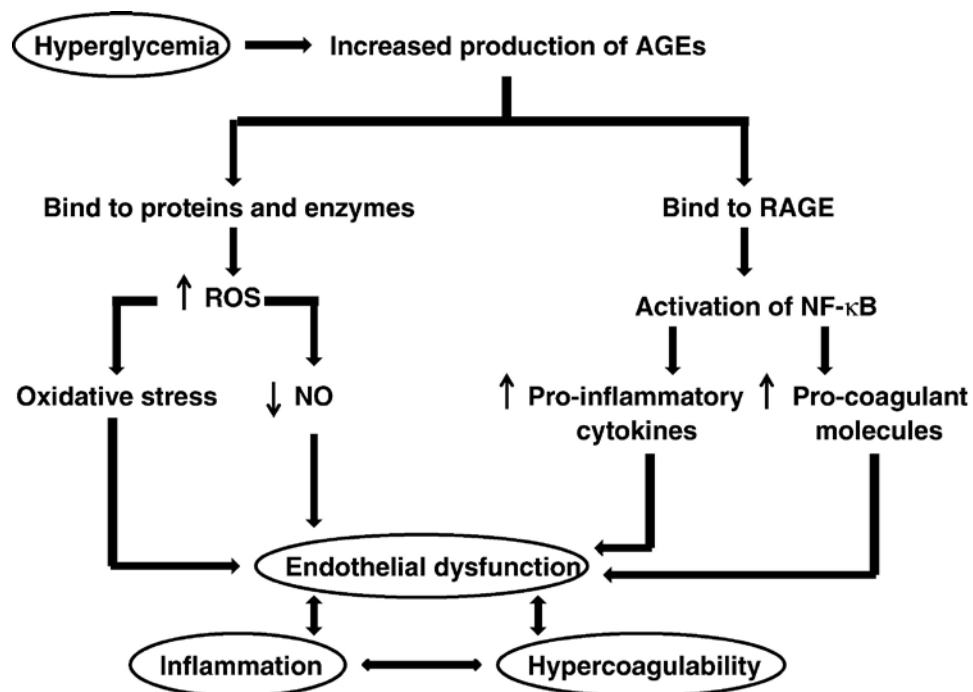


Figura 24. Mecanismos por los cuales la hiperglucemia puede producir daño vascular a través de la vía de los productos finales de la glucosilación avanzada (AGEs). Tomado de Domingueti et al., 2016.

Como se ha comentado anteriormente, en condiciones fisiológicas el NO se sintetiza a partir de la L-arginina con la participación del enzima NO sintasa (NOS); esta enzima está inhibida por la dimetil arginina asimétrica (ADMA). El NO ejerce sus acciones vasodilatadoras, antiagregantes, antiproliferativas y antioxidantes a través de la activación de la guanilato ciclasa soluble (sGC) y la formación de cGMP. Sin embargo, durante la hiperglucemia aguda se genera un exceso de superóxido que secuestra el NO, contribuyendo a la atenuación de sus acciones tisulares y a la formación de peroxinitrito (ONOO^\cdot). Además, se aumenta la expresión de una proteína proinflamatoria, la thioredoxin-interacting protein (TXNIP), que aumenta el estrés oxidativo, contribuyendo potencialmente a la disfunción de la sGC (Figura 25) (Horowitz et al., 2015).

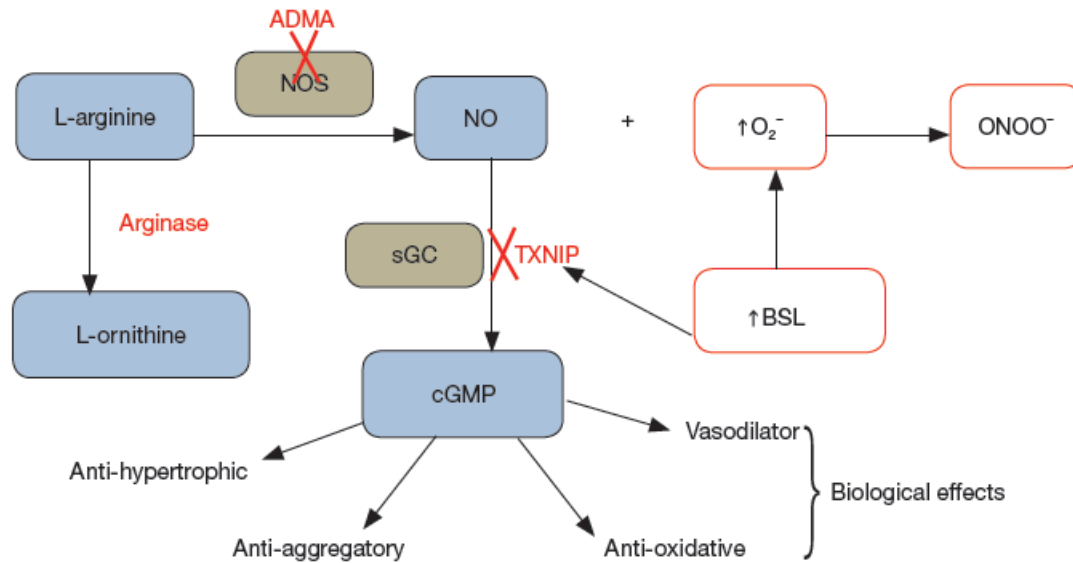


Figura 25. Influencia de la hiperglucemia sobre el sistema óxido nítrico (NO)/guanilato ciclasa soluble (sGC). BSL, azúcar plasmático (*blood sugar level*); GMP, guanosina monofosfato. Tomado de Horowitz et al., 2015.

Diversos estudios han puesto de manifiesto que en la diabetes se produce una disminución de la síntesis de prostaciclina y un aumento de la síntesis de tromboxano, condicionando un aumento del cociente vasoconstrictor/vasodilatador prostanoidérgico en diabetes que puede contribuir a la disfunción endotelial, hipercoagulabilidad, aterosclerosis y trombosis (Stitham y Hwa, 2016). Los mecanismos propuestos por los cuales la hiperglucemia produciría ese cambio en el balance regulador de los prostanoides serían básicamente un aumento de la inducción de COX-2, mediada por el aumento de la PKC descrito en párrafos anteriores (Kizub et al., 2014; Domingueti et al., 2016; Stitham y Hwa, 2016), y que produciría un aumento del tromboxano A_2 , y por otra parte, el peroxinitrito ($ONOO^-$) inhibiría la prostaciclina sintasa, lo que conllevaría una disminución de la síntesis de prostaciclina (Figura 26).

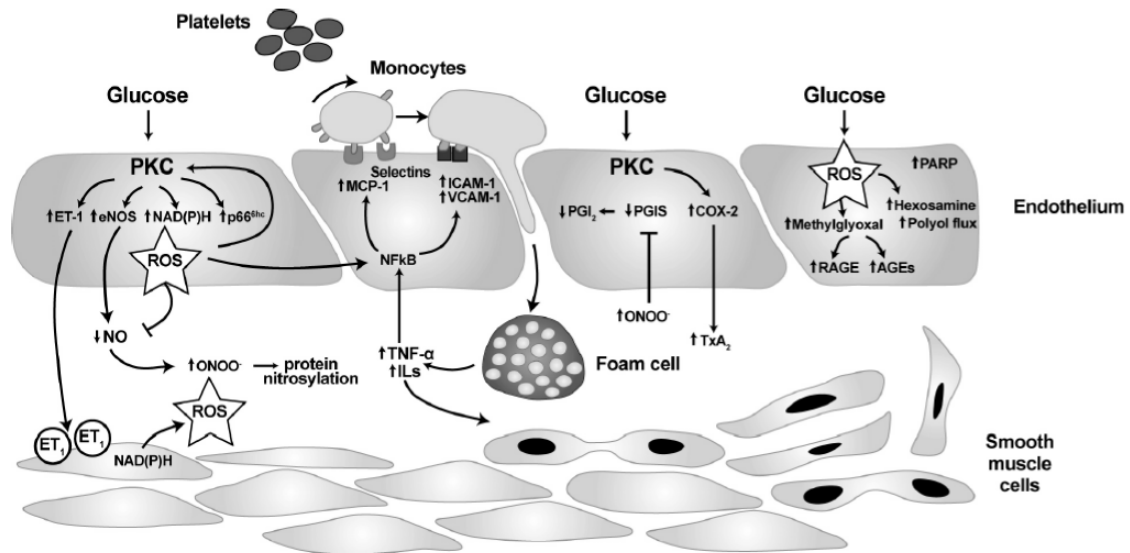


Figura 26. Mecanismos por los que la hiperglucemia produce cambios en el balance de los prostanoideos en el lecho vascular en la diabetes mellitus. Tomado de Stitham y Hwa, 2016.

La disregulación de la vía de los prostanoideos en la diabetes puede tener importantes repercusiones clínicas y terapéuticas (Stitham y Hwa, 2016). Por ejemplo, los tratamientos que evitan alterar la síntesis de prostaciclina, o los que son más selectivos sobre COX-1 (aspirina a dosis bajas) podrían tener una especial utilidad en determinados pacientes, tanto en la prevención primaria como secundaria de la enfermedad cardiovascular. De acuerdo con la Asociación Americana de Diabetes, la aspirina a dosis bajas (75-162 mg/d) debería considerarse como estrategia de prevención primaria en todos los pacientes con diabetes tipo 1 o 2 que tengan un riesgo aumentado de enfermedad cardiovascular, es decir, en varones mayores de 50 años o mujeres mayores de 60 que tengan al menos un factor de riesgo adicional: antecedente familiar de enfermedad cardiovascular, hipertensión, hábito tabáquico, dislipemia o albuminuria (American Diabetes Association, 2015). La aspirina, a las dosis citadas, es aconsejable como prevención secundaria en todos los pacientes con diabetes que hayan tenido un evento cardiovascular (infarto de miocardio, ictus). Aunque la terapia antiplaquetar es fundamental en estos pacientes, la baja adherencia al tratamiento

puede exacerbar el estado hipercoagulante y protrombótico. Por otra parte, la mayor parte de la prostaciclina circulante en condiciones fisiológicas está mediada por COX-1 (no por COX-2). Por otra parte, diversos estudios han mostrado la utilidad de los inhibidores COX-2 en el tratamiento de la disfunción endotelial asociada a hipertensión, enfermedad arterial periférica y coronariopatía; en ellos se ha observado una reducción de la proteína C reactiva y de la LDL oxidada, sugiriendo una disminución de la inflamación y un aumento de la respuesta vasodilatadora como potencial explicación de la mejora clínica. No obstante, no está claro el riesgo de una disminución de la producción de prostaciclina, y no descarta los peligros cardiovasculares potenciales asociados al uso de estos inhibidores COX-2 (Stitham y Hwa, 2016).

La disfunción endotelial en la diabetes también podría estar relacionada con cambios en el mecanismo de relajación vascular dependiente de EDH. Se ha observado que los AGEs inducen sobreexpresión de los canales IK_{Ca} en el músculo liso vascular y en fibroblastos (Zhao et al., 2012; Zhao et al., 2013). En un modelo de diabetes tipo 2 en ratas (ratas ZDF) se ha descrito una elevada contribución de los canales IK_{Ca} en la respuesta vasodilatadora de la arteria mesentérica, que se acompaña de un aumento de expresión de dichos canales en la pared arterial (Schach et al., 2014). El bloqueo farmacológico de los canales IK_{Ca} reduce significativamente el desarrollo de la nefropatía diabética (Huang et al., 2015). En arteriolas coronarias humanas se ha descrito que la respuesta al NS309, un activador de los canales endoteliales SK_{Ca} e IK_{Ca} , está disminuida en la diabetes, aunque este menor papel funcional de estos canales no se acompaña de cambios significativos en la expresión de los mismos en el lecho arteriolar (Liu et al., 2015). De forma similar, una alteración en la relajación mediada por activación de canales IK_{Ca} contribuye a la disfunción endotelial en la circulación uteroplacentaria en ratas (Gokina et al., 2015). Por otra parte, la actividad de los canales BK_{Ca} (Qian et al.,

2014; Nystoriak et al., 2014) y K_v (Nieves-Cintrón et al., 2015; Hong et al., 2016) también está alterada en la diabetes, y contribuye al mayor tono arterial.

4.2. Diabetes y enfermedad cerebrovascular

El ictus es una causa importante de morbilidad y mortalidad en el adulto (Mozaffarian et al., 2015). El ictus es la primera causa de incapacidad crónica, y después de la enfermedad cardiovascular y el cáncer, es la tercera causa de muerte en los países industrializados. En función de la causa o mecanismo de producción, el 87% son isquémicos, el 10 % son por hemorragia intraparenquimatosa y el 3% son hemorragia subaracnoidea. El ictus es el responsable del 16% de las muertes en pacientes diabéticos (Mozaffarian et al., 2015). La relación entre diabetes e ictus es bidireccional: por un lado, la diabetes es un importantísimo factor de riesgo independiente de ictus isquémico y hemorrágico (Luitse et al., 2012; Ergul et al., 2012; Högström et al., 2015; Mozaffarian et al., 2015) y por otro lado, casi la mitad de los pacientes que padecen un ictus agudo presentan hiperglucemia en las primeras horas de evolución, y muchos de ellos no tienen historia conocida de diabetes mellitus (Hafez et al., 2014; Castilla-Guerra et al., 2016). Además, la presencia de hiperglucemia en las fases iniciales del ictus aumenta el riesgo de transformación hemorrágica con el tratamiento con activador del plasminógeno tisular (tPA), empeora la evolución clínica del paciente, alarga el tiempo de estancia hospitalaria, y aumenta la mortalidad (Hafez et al., 2014; Nakagawa et al., 2014; Lei et al., 2015). Según estudios de monitorización continua de la glucemia, existirían 2 fases de hiperglucemia postictus (Castilla-Guerra et al., 2016): una precoz, durante las primeras 8 horas, que se produce en el 100% de los diabéticos y en el 50% de los no diabéticos; y una segunda fase más tardía, pasadas 48 horas tras el ictus, que ocurriría en el 78% de los diabéticos y el 27% de los no diabéticos. Por lo tanto, una concentración elevada de glucosa durante la fase aguda de un ictus no permite distinguir entre una

«hiperglucemia de estrés» y la elevación de la glucemia en pacientes con prediabetes o diabetes establecida, sean o no previamente conocidas. La reacción de estrés que induce la hiperglucemia se produce tanto por la activación del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal, que conduce a la secreción de cantidades elevadas de glucocorticoides (cortisol), como por la activación del sistema nervioso autónomo simpático. El incremento en las concentraciones de hormonas de estrés estimula la producción de glucosa por la glucogenolisis, gluconeogénesis, proteólisis y lipólisis. El aumento de la adrenalina contribuye además a la resistencia a la insulina y a la hiperinsulinemia. Por otra parte, el daño de determinadas áreas cerebrales, como las zonas insulares y operculares del hemisferio derecho, promueven la hiperglucemia, posiblemente por desinhibición del flujo simpático. El incremento reactivo de las concentraciones de glucosa no es intrascendente, sino que, como se demuestra en múltiples estudios, existe una asociación entre la hiperglucemia al ingreso de un ictus isquémico y un peor pronóstico, condicionado por una peor respuesta al tratamiento fibrinolítico y un mayor volumen del área de infarto medido por resonancia magnética, entre otras razones. En el estudio *GLyemia in Acute Stroke* (GLIAS) realizado en España (Fuentes et al., 2009), que incluyó a 476 pacientes con infarto cerebral de menos de 24 horas de evolución, se identificó que el umbral de glucemia capilar que condicionaba una evolución peor era 155 mg/dl. Los pacientes que alcanzaban esta concentración en algún momento dentro de las primeras 48 horas del infarto cerebral, tenían 2.7 veces más riesgo de muerte o dependencia a los 3 meses, independientemente de la edad, la existencia de diabetes previa, el volumen del infarto y la gravedad del ictus. El valor pronóstico de la hiperglucemia pasadas las primeras 48 horas y su relación de causalidad con el desenlace es menos clara.

La relación observada entre la hiperglucemia y el peor pronóstico en pacientes con ictus conlleva a preguntarse si su corrección mediante el tratamiento

hipoglucemiante puede mejorar el pronóstico (Castilla-Guerra et al., 2016). Los principales ensayos clínicos que han explorado la eficacia del tratamiento de la hiperglucemia en el ictus agudo se han centrado en el tratamiento intensivo con insulina (TII), más que en el convencional con insulina. La preferencia por el TII de la hiperglucemia en los pacientes con ictus agudo se basa en los primeros estudios realizados en pacientes atendidos en unidades de cuidados intensivos (UCI), que inicialmente parecían favorecer su uso al conseguir una disminución de la mortalidad y las complicaciones. Sin embargo, algunos estudios posteriores no han podido corroborar estas conclusiones; incluso se ha demostrado que el TII, frente a la terapia insulínica convencional, aumentaba la mortalidad en pacientes críticos. Una revisión sistemática de 21 ensayos de TII en pacientes hospitalizados, que incluyó situaciones como ingreso en UCI, atención perioperatoria, infarto agudo de miocardio, accidente cerebrovascular y otras lesiones cerebrales, concluyó que no había evidencia consistente que demostrara que un control muy estricto de la glucemia, en comparación con un control menos estricto, mejorase el pronóstico. Por el contrario, el TII se asociaba a un aumento, 6 veces mayor, del riesgo de hipoglucemia grave.

Los mecanismos por los cuales se produce la enfermedad cerebrovascular en la diabetes son similares a los descritos anteriormente, y están relacionados principalmente con la hiperglucemia, que causa un exceso de ácidos grasos libres, disfunción endotelial con pérdida de mecanismos de relajación dependientes de endotelio, resistencia a la insulina, estrés oxidativo y un estado protrombótico y proinflamatorio que conduce a la formación de la placa ateromatosa (Figura 27; Xu, 2015).

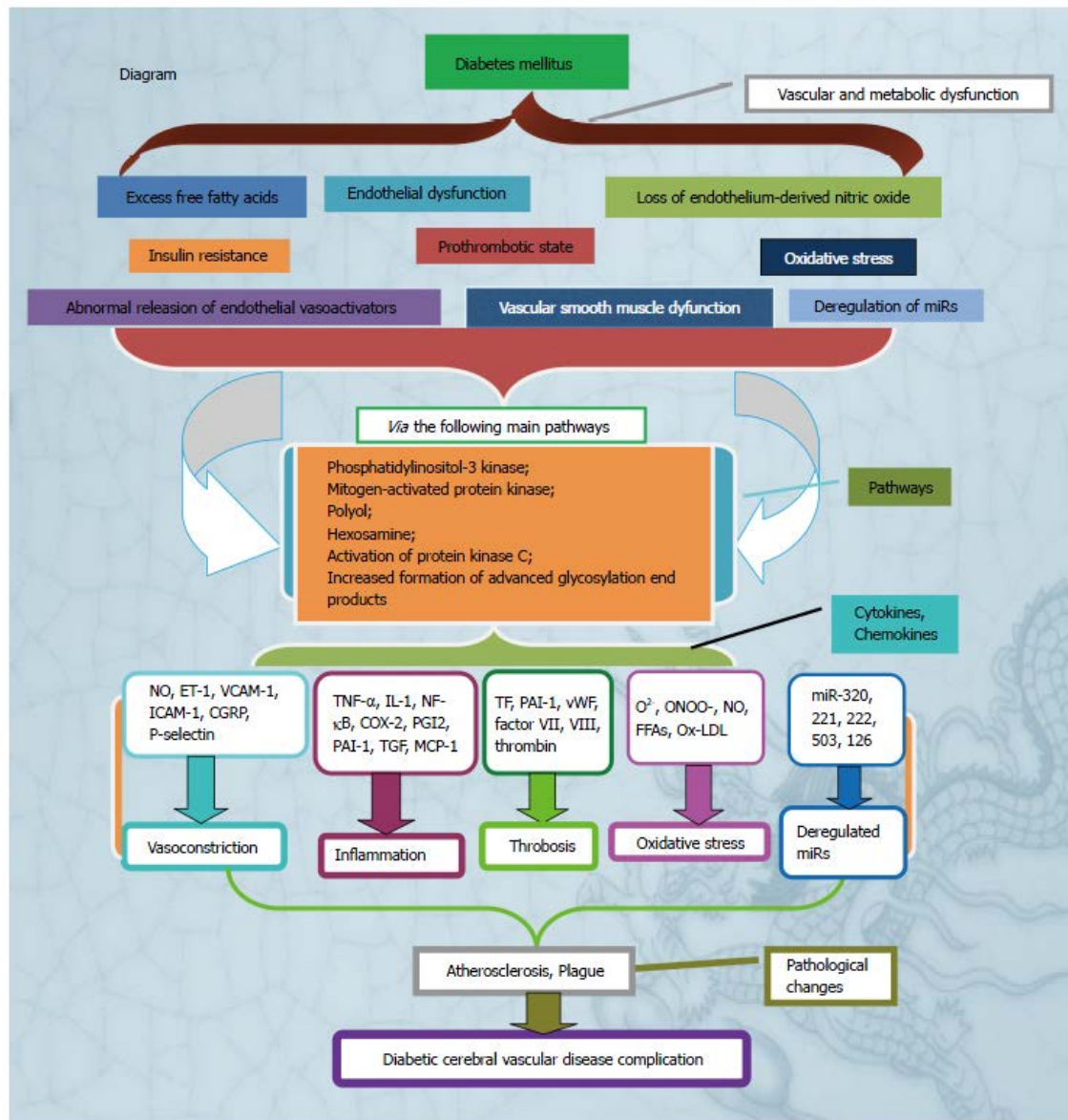


Figura 27. Diagrama que representa la patogénesis del daño vascular cerebral en la diabetes mellitus. Tomado de Xu, 2015.

4.3. Diabetes y nefropatía

La enfermedad renal crónica constituye un serio problema de salud a nivel mundial, y se caracteriza por una disminución del filtrado glomerular y/o proteinuria. Los factores de riesgo más importantes son la hipertensión y la diabetes mellitus (Mozaffarian et al., 2015; Said et al., 2015). De hecho, la prevalencia de la enfermedad

renal crónica es del 44% en diabéticos y 23% en hipertensos. Tiene una evolución crónica, y lenta y progresivamente evoluciona con el transcurso de los años hacia la enfermedad renal terminal, que necesita tratamiento de reemplazo con hemodiálisis, diálisis peritoneal o trasplante renal. Al inicio de la diabetes se producen cambios en la función renal, como hiperfiltración glomerular, aumento del flujo sanguíneo renal e hipertrofia renal (Ahmad, 2015). Muchos de estos cambios son reversibles en las fases iniciales si se consigue un adecuado control de la glucemia, pero si no se controla acaba desencadenando la nefropatía clínica (Fioretto et al., 2014).

				Persistent albuminuria categories Description and range		
				A1	A2	A3
				Normal to mildly increased	Moderately increased	Severely increased
				<30 mg/g <3 mg/mmol	30-300 mg/g 3-30 mg/mmol	>300 mg/g >30 mg/mmol
GFR categories (ml/min/ 1.73 m ²) Description and range	G1	Normal or high	≥90			
	G2	Mildly decreased	60-89			
	G3a	Mildly to moderately decreased	45-59			
	G3b	Moderately to severely decreased	30-44			
	G4	Severely decreased	15-29			
	G5	Kidney failure	<15			

Figura 28. Estadios de la insuficiencia renal crónica en función del filtrado glomerular (G1-G5) y de la albuminuria (A1-A3) y clasificación de los pacientes en función del riesgo de progresión a insuficiencia renal terminal: verde, riesgo bajo; amarillo, riesgo moderado; y rojo, riesgo alto. Tomado de Said et al., 2015.

Se considera enfermedad renal crónica cuando el filtrado glomerular es inferior a 60 ml/min/1.73 m² y/o albuminuria con cociente albúmina/creatina mayor de 30 mg/g

durante 3 meses. Se clasifica por estadios en función del filtrado glomerular (G1-G5) y en función de la albuminuria (A1-A3), y de las combinaciones posibles entre esos estadios se distinguen 18 grupos de pacientes en función del riesgo de progresión a enfermedad renal terminal (Said et al., 2015; Figura 28).

De forma similar a lo comentado en párrafos anteriores, la hiperglucemia es la responsable de los cambios metabólicos y hemodinámicos que condicionan el daño renal (Figura 29) (Satirapoj y Adler, 2014; Ahmad, 2015; Toth-Manikowski y Atta., 2015). Estos cambios inducen un estado proinflamatorio, prooxidativo, isquémico y fibrótico que provoca una acumulación de la matriz mesangial, borramiento y pérdida de podocitos, engrosamiento de la membrana basal glomerular, disfunción endotelial, atrofia tubular, inflamación del intersticio tubular y hialinosis arteriolar. En relación a los factores metabólicos, la hiperglucemia provoca un aumento de la entrada de glucosa al interior de la célula mesangial que activa una serie de mecanismos de señalización en cascada que conducen a la glomerulosclerosis, y que implican TGF- β , AGEs, PKC y varias citoquinas y factores de crecimiento (VEGF, IL-1, IL-6, IL-18 y TNF- α). Los factores hemodinámicos que contribuyen a la enfermedad renal en el diabético engloban un aumento de la presión sistémica y glomerular, con hiperfiltración, y la activación de diversas sustancias vasoactivas, como el NO, sistema renina-angiotensina-aldosterona, VEGF, endotelina. Estos cambios hemodinámicos juegan un papel importante desde las fases tempranas de la enfermedad, exacerbando el paso de albúmina a través de los capilares glomerulares, y contribuyendo al engrosamiento de la matriz mesangial, al daño de los podocitos y a la pérdida de nefronas (Satirapoj y Adler, 2014; Ahmad, 2015; Toth-Manikowski y Atta, 2015).

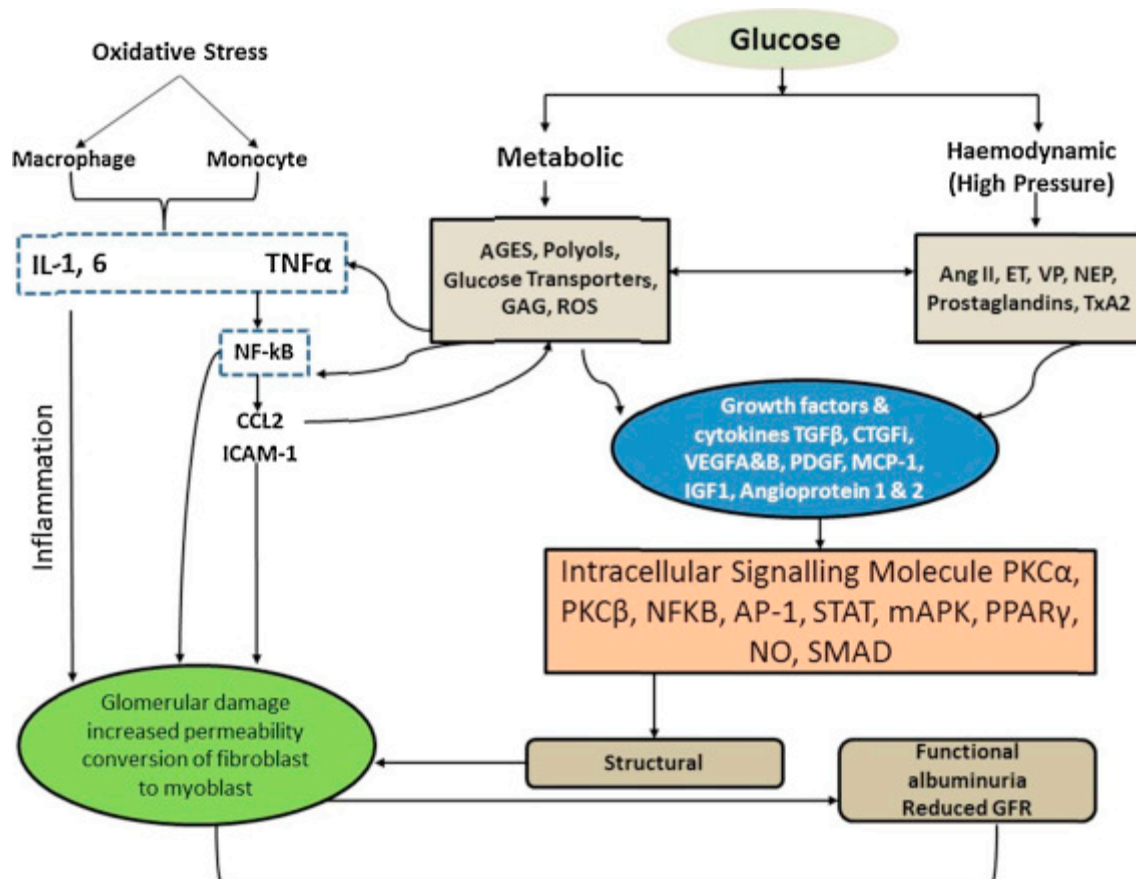


Figura 29. Representación esquemática de la fisiopatología de la nefropatía diabética. Abreviaturas: IL-1, 6, interleuquina 1, 6; TNF- α , factor necrosis tumoral α , NF-kB, factor nuclear kB; CCL2, chemokine (cc-motif) ligand 2, también denominada proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1); ICAM-1, molécula adhesión intercelular 1; PKC, protein kinasa C; AGES, productos finales de la glucosilación avanzada; AP-1, proteína activadora 1; CTGF, factor de crecimiento del tejido conectivo; MAPK, protein kinasas activadas por mitógenos; MCP-1, proteína quimiotáctica de monocitos 1; NEP, endopeptidasas neutras; NO, óxido nítrico; PAI-1, inhibidor del activador del plasminógeno 1; PDGF, factor de crecimiento derivado de las plaquetas; PPARG, factor proliferante de peroxisomas activados por receptor gamma; ROS, especies reactivas de oxígeno; STAT, transductor de señal y activador de la transcripción; TGF- β , factor de crecimiento transformante beta; TXA, tromboxano; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular; VP, vasopéptido. Tomado de Ahmad, 2015.

La enfermedad renal crónica constituye por sí misma un factor de riesgo de enfermedad cardiovascular, con la que además comparte factores de riesgo, y que constituye la causa de muerte más importante en estos pacientes (Gargiulo et al., 2015). Y por supuesto, hay que sumar el riesgo que constituye la diabetes por sí misma o la hipertensión, frecuentemente asociada, a lo que también habría que añadir el riesgo de otros factores de riesgo que pueden estar también presentes en el paciente (tabaco,

obesidad, dislipemia, etc.). Esta enfermedad cardiovascular se manifiesta de diversas maneras: enfermedad vascular, con aterosclerosis y arteriosclerosis (coronarias, arterias cerebrales, arterias periféricas), cardiomiopatía, valvulopatías, arritmias e insuficiencia cardíaca congestiva. A raíz de las estrechas interrelaciones que existen entre la insuficiencia renal y la enfermedad cardiovascular se ha propuesto una entidad clínica llamada síndrome cardiorrenal. Se ha comprobado que el adecuado manejo de la nefropatía diabética es importante para la prevención de la mortalidad asociada a incidentes cardiovasculares, insuficiencia renal crónica e insuficiencia renal terminal (Ronco, 2010; Seki et al., 2013; Volpe, 2014). El enfoque terapéutico de la enfermedad renal del diabético, desde una base fisiopatológica, además del control de la glucemia (insulina/antidiabéticos orales) y del tratamiento de otros factores de riesgo concurrentes, como hipertensión, dislipemia, obesidad, etc. (bloqueo del sistema renina-angiotensina-aldosterona a sus diferentes niveles) (Khan y Quaggin, 2015), consiste en la inhibición de los diversos mediadores del daño renal, fundamentalmente mediadores inflamatorios (Figura 30) y metabólicos (Figura 31) (Toth-Manikowski y Atta, 2015).

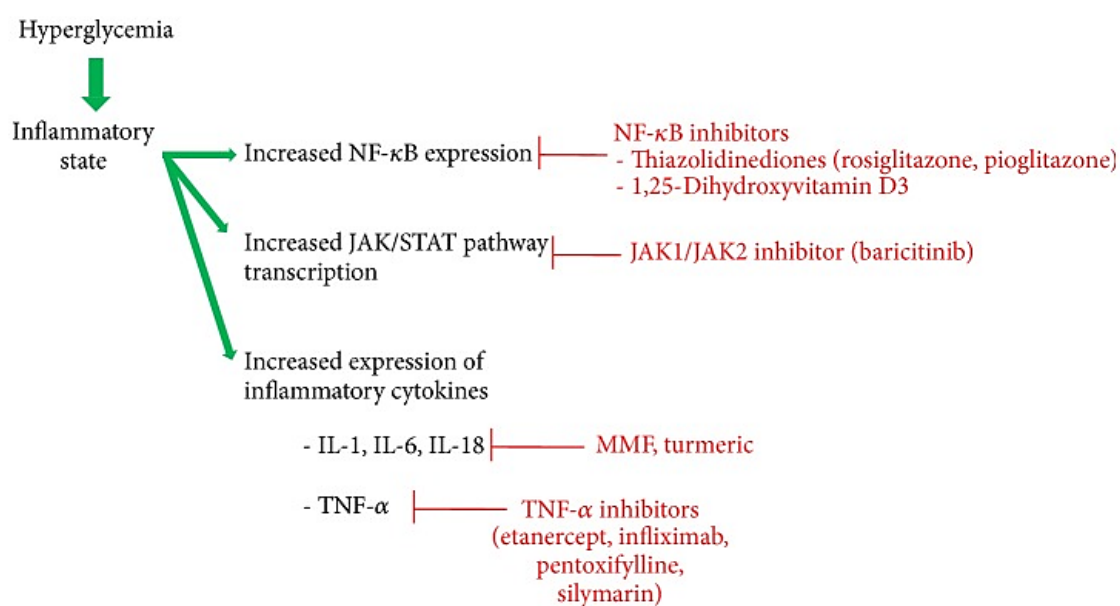


Figura 30. Representación esquemática de las dianas terapéuticas disponibles en la vía inflamatoria en la fisiopatología de la nefropatía diabética. Tomado de Toth-Manikowski y Atta, 2015.

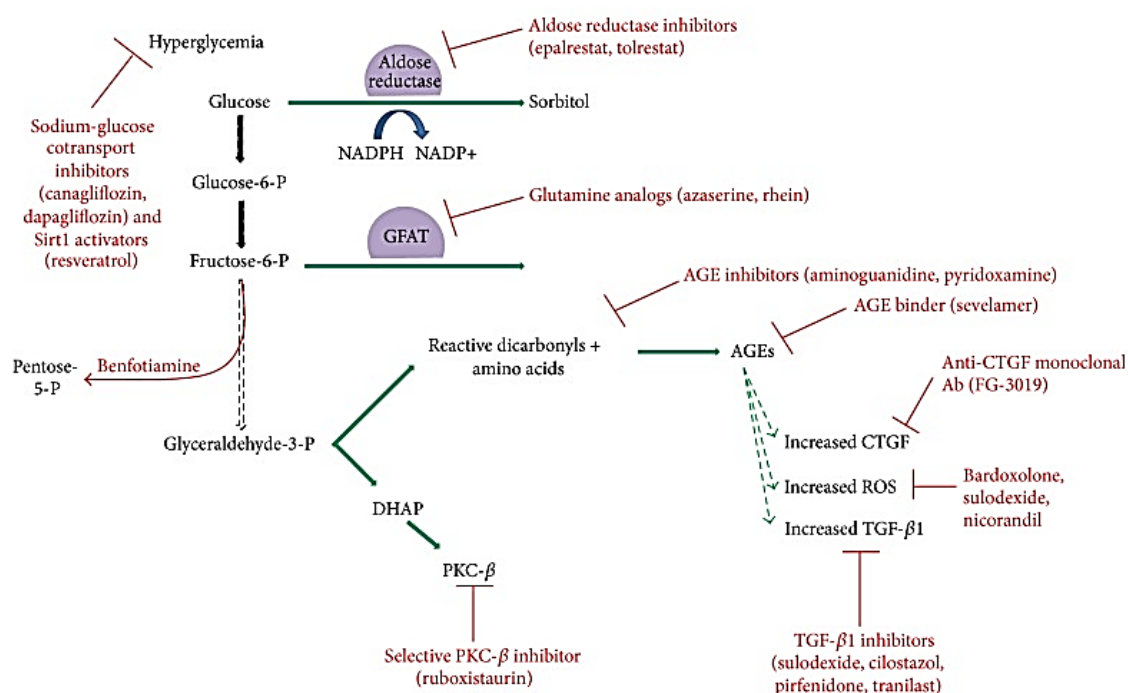
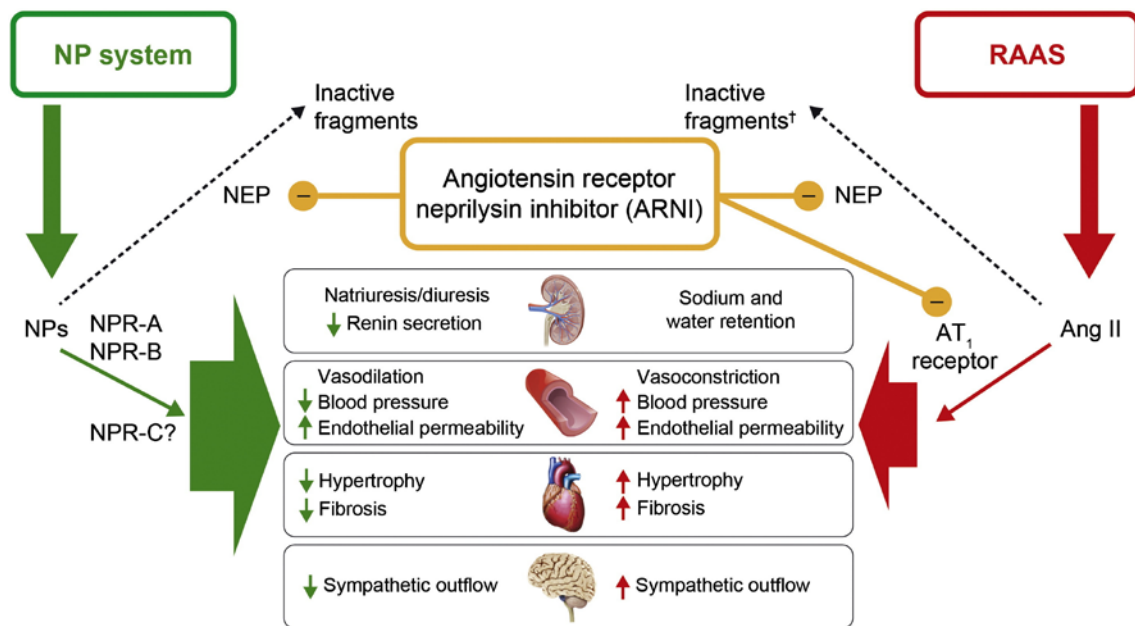


Figura 31. Representación esquemática de las dianas terapéuticas disponibles en la vía metabólica en la fisiopatología de la nefropatía diabética. Tomado de Toth-Manikowski y Atta, 2015.

En los últimos años se ha sugerido que los péptidos natriuréticos podrían tener utilidad para contrarrestar los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad cardiorenal en el diabético (Volpe, 2014). La concentración plasmática de BNP está aumentada en pacientes con nefropatía diabética y podría contribuir a la hiperfiltración glomerular que se da en las fases iniciales de la enfermedad (Vesely et al., 1999; Vallon and Thomson, 2012), y se ha sugerido que la monitorización del BNP plasmático podría ayudar en el control de estos pacientes (Seki et al., 2013; Taskapan et al., 2013; Seki et al., 2015; Theilade et al., 2015). Por otro lado, considerando que los péptidos natriuréticos contrarrestan las acciones del sistema renina-angiotensina-aldosterona y las del sistema nervioso autónomo, se han propuesto estrategias terapéuticas que buscan restaurar o aumentar las funciones fisiológicas, lo que junto con terapias inhibitoras del sistema renina-angiotensina-aldosterona, podría ser útil en el tratamiento

de los mecanismos fisiopatológicos del síndrome cardiorenal (Volpe, 2014; Balion et al., 2014; Song et al., 2015). Así, por ejemplo, el LCZ696, que como se ha comentado anteriormente tiene un efecto bloqueante del receptor de la angiotensina y un efecto inhibidor de la endopeptidasa neutra, podría ser de utilidad en la terapéutica de la nefropatía diabética (Figura 32; Volpe, 2014).



[†]In vitro evidence

Figura 32. Representación esquemática del modo de acción del LCZ696, un bloqueante del receptor de la angiotensina e inhibidor de la endopeptidasa neutra o nepriliasina, en el tratamiento de la nefropatía diabética. Tomado de Volpe, 2014.

5. ESTUDIOS PREVIOS EN NUESTRO LABORATORIO

Desde hace años nuestro grupo de investigación está investigando los cambios que produce la diabetes experimental en la reactividad vascular, como intento de profundización en los mecanismos fisiopatológicos que intervienen en el desarrollo de la vasculopatía diabética, y que permitan eventualmente identificar posibles dianas terapéuticas. Así, en distintas publicaciones hemos demostrado a lo largo de estos años

que la diabetes modifica los mecanismos que regulan la reactividad de las arterias carótida y renal de conejo a vasoconstrictores como 5-hidroxitriptamina (Miranda et al., 2000b; Miranda et al., 2002) y endotelina-1 (Lloréns et al., 2004; Marrachelli et al., 2006) y a vasodilatadores como la acetilcolina (Miranda et al., 2000a; Alabadí et al., 2001) y testosterona (Marrachelli et al., 2010a; Marrachelli et al., 2010b). Como antecedente directo del estudio que se presenta en esta Tesis Doctoral hemos identificado los mecanismos que contribuyen a la hiporreactividad de la arteria carótida (Marrachelli et al., 2011) y renal (Marrachelli et al., 2012) de conejo al péptido atrial natriurético. De nuestros estudios se desprende que los mecanismos que regulan la respuesta vascular y la influencia de la diabetes varían en función del lecho vascular y de la sustancia vasoactiva. Las arterias carótidas y renales tienen un especial interés ya que las primeras suministran la sangre y el oxígeno al cerebro y las segundas tienen un papel de primer orden en la regulación cardiovascular y en la función renal tanto en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas. Los cambios que produce la diabetes en los mecanismos que regulan la reactividad de las arterias carótida y renal a diferentes sustancias vasoactivas pueden ayudar a entender la fisiopatología de la enfermedad cerebrovascular y la nefropatía diabética, y por la gran relación existente entre ellas, de la enfermedad cardiovascular asociada a la diabetes.

OBJETIVOS

El objetivo genérico del proyecto de investigación que se presenta en esta Tesis Doctoral consiste en analizar los cambios que produce la diabetes experimental en los mecanismos que regulan la respuesta de las arterias carótida y renal de conejo al BNP.

Para ello se plantean los siguientes objetivos concretos:

1. Estudiar la respuesta relajante de la arteria carótida de conejo al BNP, analizando el papel de los receptores NPR-A y NPR-C, la función moduladora del endotelio, del óxido nítrico, de derivados del ácido araquidónico y de los canales de potasio en la respuesta arterial al BNP, y los posibles cambios inducidos por la diabetes experimental.
2. Estudiar la respuesta relajante de la arteria renal de conejo al BNP, analizando el papel de los receptores NPR-A y NPR-C, la función moduladora del endotelio, del óxido nítrico, de derivados del ácido araquidónico y de los canales de potasio en la respuesta arterial al BNP, y los posibles cambios inducidos por la diabetes experimental.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización del presente trabajo se han utilizado 60 conejos blancos machos de Nueva Zelanda, los cuales se dividieron en dos grupos al azar. A 30 animales no se les realizó ninguna manipulación experimental y constituyeron el grupo de conejos control, mientras que a los otros 30 animales se les indujo la diabetes de forma experimental y constituyeron el grupo de conejos diabéticos. Los estudios se han llevado a cabo con segmentos de arteria carótida y de arteria renal. Las condiciones de estabulación y los procedimientos experimentales utilizados se han realizado respetando la normativa vigente (Real Decreto 53/2013) que regula el uso de animales en la investigación científica, y cuentan con la aprobación del Comité Ético de Experimentación y Bienestar Animal de la Comisión de Ética de la Universitat de València (expte. A1295344586921).

1. INDUCCIÓN DE LA DIABETES EXPERIMENTAL

Tras un ayuno de 24 horas del animal, se le induce la diabetes previa sedación con 40 mg de clorhidrato de Ketamina (Ketolar®). La inducción de la diabetes se realiza mediante la inyección, en la vena marginal de la oreja, de aloxano (85 mg/kg disueltos en 10 mL de solución salina), un tóxico selectivo de las células β -pancreáticas. Debido a la destrucción de las células β -pancreáticas provocada por el aloxano, en las primeras horas posteriores a la inyección se produce una liberación masiva de insulina y un estado de hipoglucemia. Con el fin de evitar los graves problemas que la hipoglucemia puede acarrear para la vida del animal, tras el aloxano se le administran 10 mL de solución glucosada al 5% por vía intravenosa, y luego 10 mL de la misma solución por vía subcutánea. Durante las primeras horas se mantiene al conejo con agua de bebida glucosada al 10% hasta que alcanza el estado hiperglucémico (normalmente entre 24 y 48 horas post aloxano). Luego, la solución glucosada se sustituye por agua de bebida

normal y los conejos, tanto del grupo control como los del grupo diabético, permanecen estabulados durante seis semanas.

2. DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE GLUCOSA, ANP Y NT-proBNP

En el periodo de estabulación a todos los animales (controles y diabéticos) se les realizan controles de peso y glucemia semanalmente. La concentración plasmática de glucosa se midió semanalmente por el método de la glucosa oxidasa con un analizador de glucosa (Glucometer Elite, Bayer), basado en una tecnología de sensor por electrodo. Para ello se utiliza una tira reactiva que aspira por capilaridad una pequeña cantidad de sangre y la lleva a una cámara de reacción. Los resultados se visualizan en 60 segundos. La determinación de ANP y NT-proBNP plasmático se realizó en muestras de sangre (3 ml) de la arteria central de la oreja recogidas, en tubos con heparina, justo antes de la muerte de los animales. Todas las muestras se tomaron a la misma hora de la mañana para evitar la influencia de las variaciones circadianas en los niveles plasmáticos de ANP y NT-proBNP. El plasma se obtuvo tras centrifugar la muestra de sangre a 1000x g durante 15 min a 4° C, se almacenó inmediatamente a -80° C. La medición cuantitativa de la concentración de ANP y NT-proBNP se llevó a cabo posteriormente por enzimoimmunoensayo utilizando los correspondientes kits (USCN Life Science Inc.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

3. REGISTRO DE LA TENSIÓN ISOMÉTRICA DESARROLLADA POR SEGMENTOS DE ARTERIAS CARÓTIDA Y RENAL DE CONEJO

3.1. Obtención y montaje de los segmentos arteriales

Seis semanas después de la inducción de la diabetes, los conejos diabéticos (y los del grupo control) se sacrifican mediante una inyección, en la vena marginal de la oreja, de una solución de 10 mEq de KCl (0,5 mL/kg) previa anestesia con inyección i.v. al 2% de 100 mg de tiopental sódico (Tiobarbital Braun). La muerte se produce por parada cardíaca como consecuencia de la despolarización miocárdica. Para aislar las arterias carótidas se sitúa al animal en posición de decúbito supino y se le practica una incisión longitudinal amplia en la región anterior del cuello a cada lado de la tráquea, extrayendo ambas carótidas mediante disección roma, obteniéndose así segmentos arteriales de unos 3-4 cm de longitud. Para aislar las arterias renales, manteniendo al animal en la misma posición, se le practica una incisión longitudinal amplia en la línea media del abdomen, se apartan las vísceras abdominales y se diseccionan y extraen las dos arterias renales desde su origen en la aorta hasta el hilio renal. Inmediatamente las arterias se sumergen en una solución salina fisiológica fría (4°C) y a continuación, con la ayuda de una lupa binocular (Wild M3B Heerbrugg) y utilizando una fuente de luz fría (Euromex EK-1) para no deteriorar el tejido, se eliminan los restos de sangre de su interior y se cortan en segmentos de aproximadamente 3-4 mm de longitud.

Para el registro de la tensión isométrica desarrollada por los segmentos arteriales, se introducen los extremos finos y rígidos de dos alambres de acero inoxidable (207 μ m de diámetro) a través de la luz vascular. Uno de los alambres queda unido a un soporte fijo, de tal forma que la arteria queda en posición horizontal. El otro se conecta a un transductor de tensión isométrica (Panlab UF-1 y Letica TRI 201), de forma que puede

traccionar verticalmente, en sentido perpendicular al eje mayor del segmento arterial, en respuesta a los cambios de tensión que se producen en la pared del vaso. La tensión isométrica es convenientemente amplificadora, digitalizada, registrada y almacenada para su posterior análisis. Cada segmento vascular, con los alambres en el interior de su luz, se aloja en un baño de órganos que contiene 5 mL de una solución que simula las condiciones fisiológicas (solución nutritiva de Ringer-Locke). Esta solución se encuentra burbujeada continuamente con gas carbógeno (95% de O₂ y 5% de CO₂), lo que le confiere un pH de 7.3-7.4. Un circuito de agua caliente, que rodea las copas de los baños, permite mantener las soluciones con los tejidos vasculares a una temperatura constante de $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Se dispone de una reserva de la solución, en condiciones idénticas a las descritas, que se utiliza para renovar el medio en que se hallan inmersos los segmentos arteriales.

3.2. Técnicas de registro y medición

El sistema de medida y registro consta, para cada uno de los segmentos arteriales, de un transductor de tensión isométrica (Panlab Mod. UF-1/ Letica TRI 201), un tornillo micrométrico adaptado al transductor y capaz de desplazar el conjunto transductor-alambre, un amplificador de tensión (Amplifier Panlab 40154/Letica ISO 506), y un sistema informatizado de digitalización y registro (PowerLab 8sp y software Chart 5, ADInstruments).

Los cambios de tensión isométrica producidos por los diferentes estímulos aplicados sobre los segmentos arteriales se cuantifican midiendo, a partir del trazado basal o del trazado de tono activo, el desplazamiento producido hasta el efecto máximo desarrollado por cada una de las dosis. Las cantidades obtenidas pueden expresarse en términos absolutos (mg) o relativos, es decir, porcentualmente, respecto del tono activo o de la tensión producida por un estímulo previo.

3.3. Procedimiento experimental

Una vez situados los segmentos arteriales en el baño de órganos, previa calibración del aparato, se les aplica mediante rotación del tornillo micrométrico, una tensión basal de 2.0 g. Dado que la tendencia inmediata de los segmentos arteriales es relajarse, la tensión debe reajustarse periódicamente hasta que se estabilizan a dicha tensión. Durante este período el líquido nutritivo se renueva cada 20 minutos. Una vez alcanzada una tensión basal estable, y con el fin de analizar la reactividad de los segmentos arteriales, éstos se someten a un estímulo despolarizante con una solución de KCl 50 mM. No se observaron diferencias significativas en la respuesta al KCl entre las arterias de conejos control y de conejos diabéticos. Posteriormente, tras varios lavados en solución nutritiva se verifica la funcionalidad endotelial administrando un tono activo con fenilefrina (10^{-7} - 10^{-6} M) y comprobando la relajación a la acetilcolina (10^{-5} M). Se consideró que el endotelio estaba "intacto" cuando la relajación producida por la acetilcolina fue superior al 80% del tono activo. Por último, tras realizar varios lavados de las arterias con la solución nutritiva durante un período de 45-60 minutos, se administra un tono activo con fenilefrina (10^{-7} - 10^{-6} M) y se inician las curvas concentración-respuesta al BNP (10^{-12} - 10^{-7} M) en las diversas situaciones experimentales. Dichas curvas se obtienen mediante la adición al baño de órganos de dosis acumulativas del fármaco. Cada dosis se añade cuando la inmediatamente anterior ha desarrollado su efecto máximo, siendo la concentración del fármaco en el baño cuando se aplica una dosis, la suma de esta última con las dosis administradas con anterioridad a ella. En cada segmento arterial sólo se realiza una curva concentración-respuesta.

Para el estudio de los receptores NPR implicados se realizan curvas concentración-respuesta al BNP en arterias previamente incubadas (20 min) con el antagonista no selectivo de dichos receptores, isatin (10^{-3} M)

Para el estudio del papel modulador del endotelio se realizan curvas concentración-respuesta al BNP en arterias a las que se les ha eliminado el endotelio mediante legrado de su cara interna (arterias legradadas).

Para el estudio del papel modulador de los derivados del ácido araquidónico por la vía de la ciclooxigenasa, se realizan curvas concentración-respuesta al BNP en arterias previamente incubadas (20 min) con el inhibidor no selectivo de dicha enzima, indometacina (10^{-5} M), y con el inhibidor selectivo de COX-2, nimesulide (10^{-5} M).

Para el estudio del papel de los canales de potasio en la respuesta arterial al BNP se realizan curvas concentración-respuesta al péptido en arterias despolarizadas con KCl 50 mM.

Para el estudio del papel de los canales de potasio dependientes de calcio (K_{Ca}) se realizan curvas concentración-respuesta al BNP en arterias previamente incubadas (20 minutos) con los inhibidores de los canales de potasio dependientes del calcio (K_{Ca}), tetraetilamonio (10^{-3} M) (BK_{Ca}), iberiotoxina (5×10^{-8} M) (BK_{Ca}) y charibdotoxina (10^{-8} M) (BK_{Ca} e IK_{Ca}).

Para el estudio del papel de los canales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP}) se realizan curvas concentración-respuesta al BNP en arterias previamente incubadas (20 minutos) con el inhibidor de dichos canales, glibenclamida (10^{-5} M). En otro set de experimentos se realizan curvas con el activador de los canales K_{ATP} , pinacidil (10^{-7} - 3×10^{-5} M)

Para el estudio del papel de los canales de potasio dependientes de voltaje (K_v) se realizan curvas concentración-respuesta al BNP en arterias previamente incubadas (20 minutos) con el inhibidor de dichos canales, 4-aminopiridina (10^{-6} , 10^{-4} M).

Todos los experimentos se realizan en segmentos arteriales procedentes de conejos control y en segmentos arteriales procedentes de conejos diabéticos con el fin de estudiar el efecto de la diabetes experimental sobre cada uno de los aspectos objeto de estudio.

3.4. Western blot

Complementando los estudios funcionales, se examinó la expresión de los receptores NPR-A y NPR-C en la arterias carótida y renal de conejo. Para ello se utilizaron arterias ultracongeladas, procedentes de 10 conejos (5 control y 5 diabéticos), que se pulverizaron en nitrógeno líquido y posteriormente se homogenaron con tampón de lisis (ProteoJet™ Mammalian Cell Lysis Reagent, Fermentas) que contiene un cocktail de inhibidores de proteasas (1 %, Sigma). El polvo fue resuspendido con un vórtex e incubado durante 10 min a temperatura ambiente en un agitador (1200 rpm), y el lisado fue purificado por centrifugación a 8255 rpm durante 15 min. El lisado celular resultante fue almacenado a -80°C hasta su uso. La concentración de proteínas se determinó con el kit BCA (Pierce, Rockford, IL). Los extractos de proteínas (20 μg) se disolvieron en tampón de carga (NuPAGE LDS, Invitrogen), se cargaron en un gel de gradiente (NuPAGE 4-12 % Bis-TRIS GEL, Invitrogen) para electroforesis y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para inmunomarcado. A continuación, las membranas se bloquearon durante una hora a temperatura ambiente en una solución con leche desnatada al 5 % en TBS con 100 μl de Tween 20. Después, se incubaron durante toda la noche con el correspondiente anticuerpo primario policlonal (Santa Cruz): anti NPR-A (1:500) y anti NPR-C (1:500). A la mañana siguiente, las membranas se incubaron

(1:5000) con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado a la peroxidasa de rábano picante durante 2 horas a temperatura ambiente; posteriormente se trataron con reactivos para potenciar la quimioluminiscencia (ECL, Amersham Life Science) y se revelaron y cuantificaron mediante el sistema BioRad Molecular Imager Chemi Doc™ XRS+ Imaging System. Las membranas fueron reprocesadas con anticuerpo anti β -actina (1:5000) para control de carga de proteína. Para comparar los diferentes grupos, las cuantificaciones densitométricas sólo se llevaron a cabo en muestras procesadas de idéntica manera. Las bandas se analizaron usando el software Quantity One 1-D Analysis, versión 4.6 (Bio-Rad). Las densidades relativas de las bandas inmunorreactivas fueron normalizadas con la densidad de las correspondientes bandas de β -actina. Todos los análisis se realizaron por triplicado, calculándose la media \pm error estándar de la media (EEM) para cada muestra.

3.5. Enzimoimmunoanálisis (EIA)

La liberación de tromboxano A_2 y prostaciclina inducida por BNP se estudió mediante EIA. Para determinar la producción de tromboxano B_2 (metabolito estable de tromboxano A_2) y 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ (metabolito estable de la prostaciclina), los segmentos de arteria carótida y renal con endotelio y sin endotelio (legrados) de conejos control y de conejos diabéticos se incubaron en 150 μ l de solución de Ringer-Locke con fenilefrina (10^{-7} - 10^{-6} M) y BNP (10^{-8} M) durante 3 horas a 37° C y, posteriormente, el medio de incubación se procesó en los correspondientes kits (EIAs; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). Las muestras se procesaron por triplicado y las concentraciones de eicosanoides se estandarizaron en relación al peso seco de cada segmento arterial, calculándose la media \pm EEM para cada muestra.

3.6. Análisis de los resultados

La respuesta relajante al BNP se expresa como porcentaje respecto al tono activo previamente inducido por fenilefrina. Cada curva concentración-respuesta se repite en segmentos arteriales procedentes de animales diferentes. Para cada curva se calculan el efecto máximo (E_{max}) y la concentración eficaz 50 (EC_{50}), es decir, la concentración de fármaco que produce la mitad del E_{max} , mediante análisis de regresión no lineal. Los resultados se agrupan posteriormente según el tipo de experimento y, a partir de los valores obtenidos para cada una de las concentraciones, se construyen las curvas concentración-respuesta medias para cada una de las situaciones experimentales. Los valores de EC_{50} se expresan como media y sus límites de confianza, y el resto de valores se expresan como media aritmética, la desviación típica y el error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico para determinar las posibles diferencias entre las distintas situaciones experimentales planteadas, se realiza mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías, seguido del test *post hoc* de comparaciones múltiples Bonferroni. La comparación de cada situación experimental entre el grupo de animales control y el grupo de animales diabéticos se realiza con el test de la *t* de Student. La comparación de los resultados obtenidos en los ensayos de Western blot y EIA entre el grupo de animales control y el grupo de animales diabéticos se realiza con el test de la *t* de Student. Las diferencias se consideran significativas si $P < 0.05$.

3.7. Fármacos y soluciones

Aloxano, acetilcolina, fenilefrina, ANP, BNP, isatin, nitro-L-arginina, indometacina, nimesulide, tetraetilamonio, iberiotoxina, glibenclamida y 4-aminopiridina proceden de RBI-Sigma–Aldrich Química. Aloxano, acetilcolina, fenilefrina, isatin, nitro-L-arginina, nimesulide, tetraetilamonio, iberiotoxina y 4-aminopiridina se disuelven y diluyen en

solución salina fisiológica. El ANP y BNP se disuelven en ácido acético acuoso 0.5 % y se diluye en una mezcla de tampón fosfato en solución salina (NaCl, 120 mM y NaH₂PO₄ 10 mM) y seroalbúmina bovina 0.05%. La indometacina y el nimesulide se disuelven y diluyen en etanol. La glibenclamida se disuelve en DMSO. En ensayos previos se comprobó que las concentraciones más altas alcanzadas en el baño de etanol (0.69%) y DMSO (0.1%) no modificaban el tono vascular. La composición de la solución Ringer-Locke es (mM): NaCl, 120; KCl, 5.4; CaCl₂, 2.2; MgCl₂, 1.0; NaHCO₃, 25; y glucosa, 5.6. Para preparar la solución nutritiva de Ringer Locke en primer lugar se prepara una solución concentrada (20x) de cloruros (NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂) que se diluye en el momento de su uso, añadiendo entonces el NaHCO₃ y la glucosa. La solución despolarizante de KCl 50 mM, se prepara del mismo modo que la solución de Ringer Locke, pero sustituyendo el NaCl por una cantidad equimolar de KCl.

RESULTADOS

1. GLUCEMIA, PESO CORPORAL, ANP Y NT-PROBNP PLASMÁTICO

Los conejos del grupo diabético mostraron un aumento significativo en la concentración plasmática de glucosa (5.7 ± 0.02 y 18.5 ± 1.1 mM en conejos control y diabéticos, respectivamente), y un menor peso final, 6 semanas después de la administración del aloxano, en comparación con los conejos del grupo control (3.70 ± 0.15 y 3.29 ± 0.11 kg en conejos control y conejos diabéticos, respectivamente). Por otro lado, las concentraciones plasmáticas de ANP y NT-proBNP fueron significativamente mayores en los conejos diabéticos que en los conejos control (Figura 33).

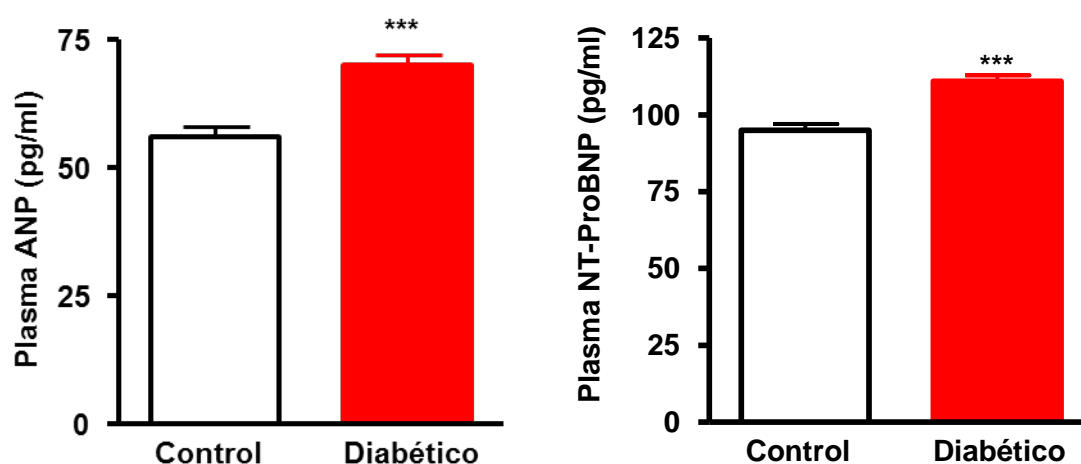


Figura 33. Concentración plasmática de ANP y NT-proBNP en conejos control (n=6) y conejos diabéticos (n=6). Los valores representan la media \pm EEM de "n" animales. *** Significativamente diferente, $P < 0.001$.

2. CURVAS CONCENTRACIÓN-RESPUESTA

2.1. Arteria carótida

El BNP (10^{-12} – 10^{-7} M) no modificó el tono basal de arterias carótidas de conejos control o de conejos diabéticos. El tono activo inducido por fenilefrina (10^{-6} M) en arterias carótidas de conejos control (1815 ± 144 mg) no fue significativamente diferente al obtenido en arterias de conejos diabéticos (1816 ± 157 mg). La adición al baño de órganos de concentraciones acumulativas de BNP (10^{-12} - 10^{-7} M) produjo una relajación dependiente de concentración de las arterias carótidas precontraídas con fenilefrina (10^{-6} M), procedentes de los dos grupos de animales, aunque la relajación fue significativamente menor en arterias de conejos diabéticos que en las de conejos control (Figura 34). El valor de EC_{50} de la curva concentración respuesta de BNP de arterias de conejo diabético [2.99 (2.74 - 3.27) $\times 10^{-9}$ M] fue significativamente mayor que el obtenido en arterias de conejo control [1.47 (1.35 - 1.59) $\times 10^{-9}$ M].

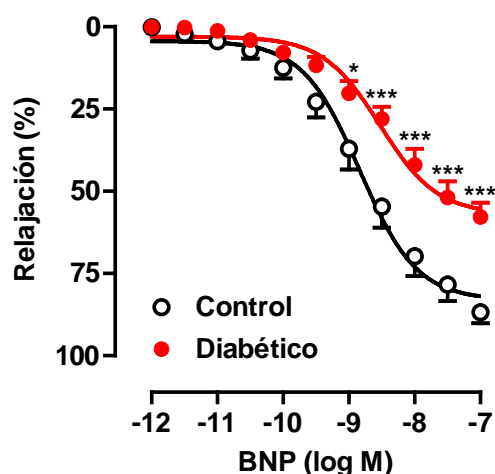


Figura 34. Curvas concentración-respuesta de BNP en segmentos de arteria carótida precontraídos con fenilefrina, procedentes de conejos control (n=13) y conejos diabéticos (n=18). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales. Significativamente diferente, * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.

En comparación con el ANP, la relajación al BNP fue significativamente mayor en conejos control, sin diferencias significativas en conejos diabéticos, siendo la EC_{50} significativamente mayor (menor potencia) para el BNP en ambos grupos de animales (Figura 35).

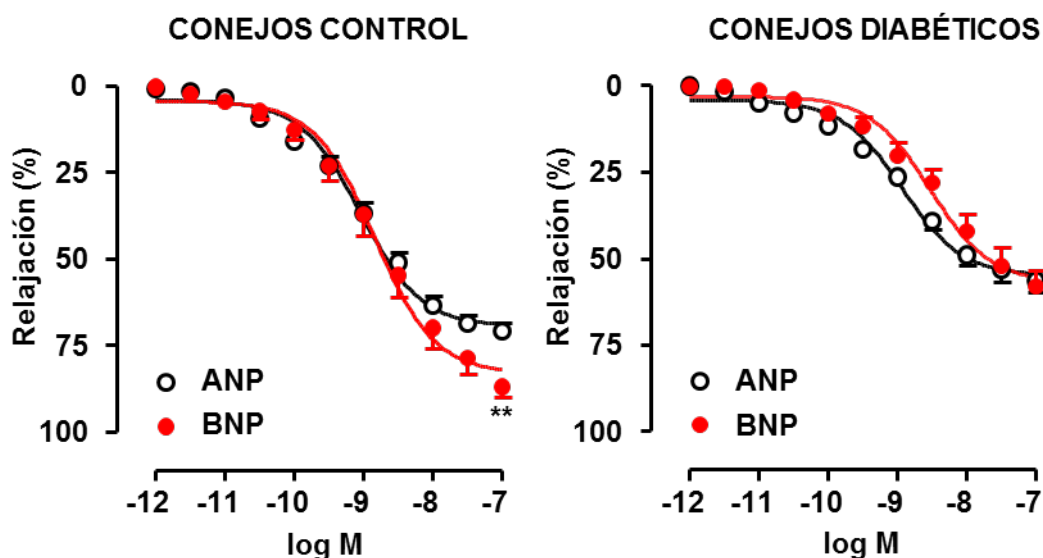


Figura 35. Curvas concentración-respuesta de ANP y BNP en segmentos de arteria carótida precontraídos con fenilefrina, procedentes de conejos control (ANP, n=25; BNP, n=13) y conejos diabéticos (ANP, n=17; BNP, n=18). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales. Significativamente diferente, ** $P < 0.01$.

La eliminación del endotelio aumentó la relajación arterial al BNP en arterias de conejos diabéticos, sin cambios significativos en conejo control, y produjo un desplazamiento significativo a la izquierda de la curva concentración-respuesta al BNP en ambos grupos de animales (Figura 36). En arterias sin endotelio el valor de EC_{50} de la curva concentración respuesta de BNP de arterias de conejo diabético [$4.74 (4.47-5.03) \times 10^{-10}$ M] fue significativamente menor que el obtenido en arterias de conejo

control [$7.16 (6.45-7.94) \times 10^{-10}$ M], y no se observaron diferencias significativas en la respuesta relajante al BNP entre los dos grupos de animales (Figura 37).

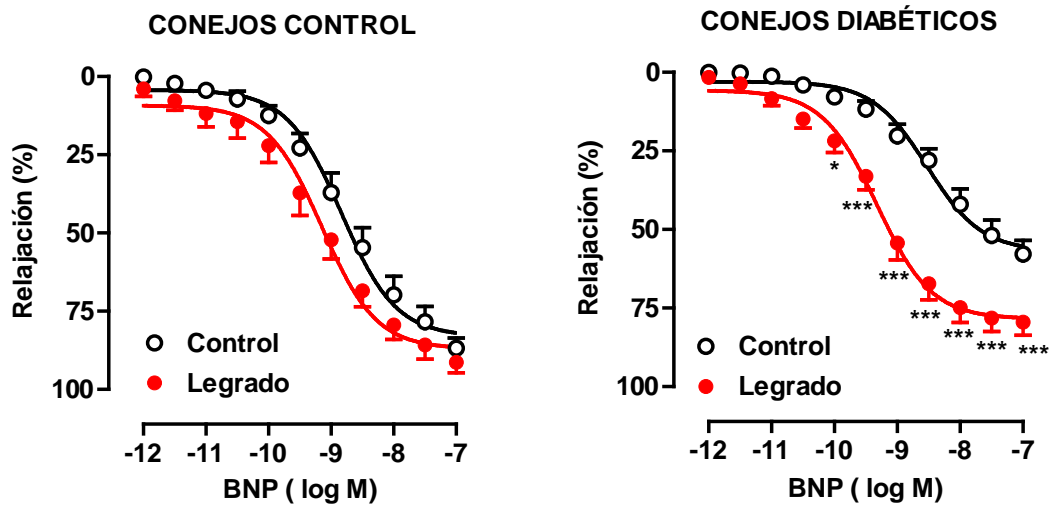


Figura 36. Curvas concentración-respuesta de BNP en segmentos de arteria carótida precontraídos con fenilefrina, procedentes de conejos control y conejos diabéticos, en arterias control y sin endotelio (n=10 en conejos control y n=17 en conejos diabéticos). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales. Significativamente diferente, * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.

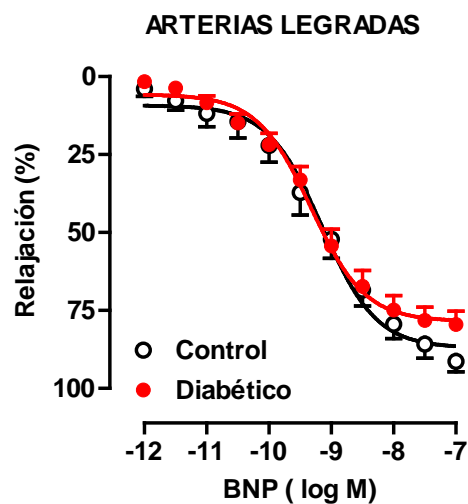


Figura 37. Curvas concentración-respuesta de BNP en segmentos de arteria carótida legrados y precontraídos con fenilefrina, procedentes de conejos control (n=10) y conejos diabéticos (n=17). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales.

En arterias de conejos control, la incubación con el antagonista de los receptores de los péptidos natriuréticos, isatin (10^{-3} M), inhibió la relajación al BNP, y desplazó significativamente a la derecha [EC_{50} 6.12 (5.80-6.46) $\times 10^{-9}$ M] la curva concentración-respuesta al BNP (Figura 38). En arterias de conejos diabéticos el isatin también aumentó significativamente el valor de EC_{50} [7.30 (6.60-8.07) $\times 10^{-9}$ M], pero no inhibió significativamente la respuesta relajante al BNP (Figura 38). En arterias legradas, el isatin (10^{-3} M) produjo una gran inhibición de la relajación inducida por el BNP, tanto en conejos control como en conejos diabéticos (Figura 39). En presencia de isatin (10^{-3} M) la EC_{50} de la curva concentración respuesta al BNP fue significativamente mayor (desplazada a la derecha) en conejos diabéticos que en conejos control en arterias con endotelio, y significativamente menor (desplazada a la izquierda) en arterias legradas (Figura 40).

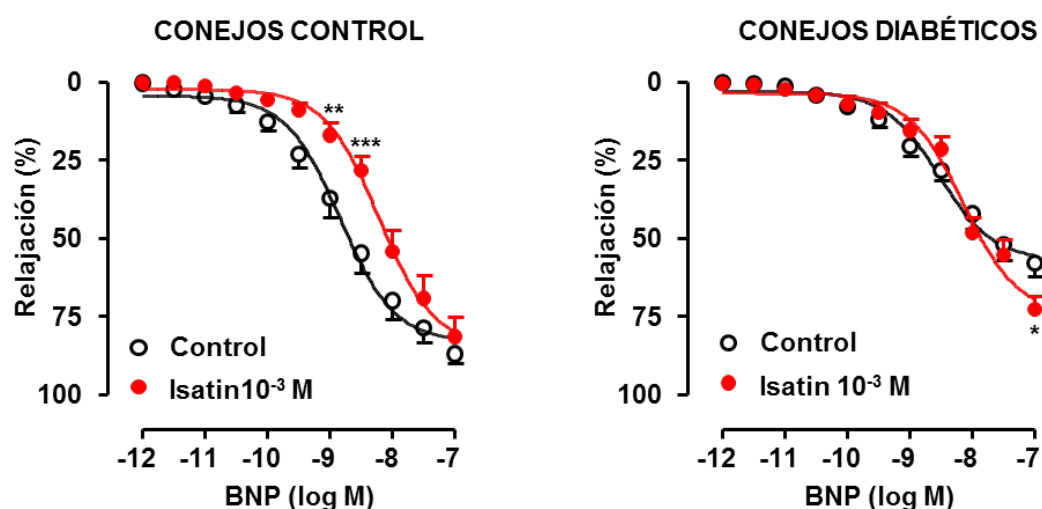


Figura 38. Curvas concentración-respuesta de BNP en segmentos de arteria carótida precontraídos con fenilefrina, procedentes de conejos control y conejos diabéticos, en arterias control e incubadas con isatin (10^{-3} M) ($n=15$ en conejos control y $n=16$ en conejos diabéticos). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales. Significativamente diferente, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

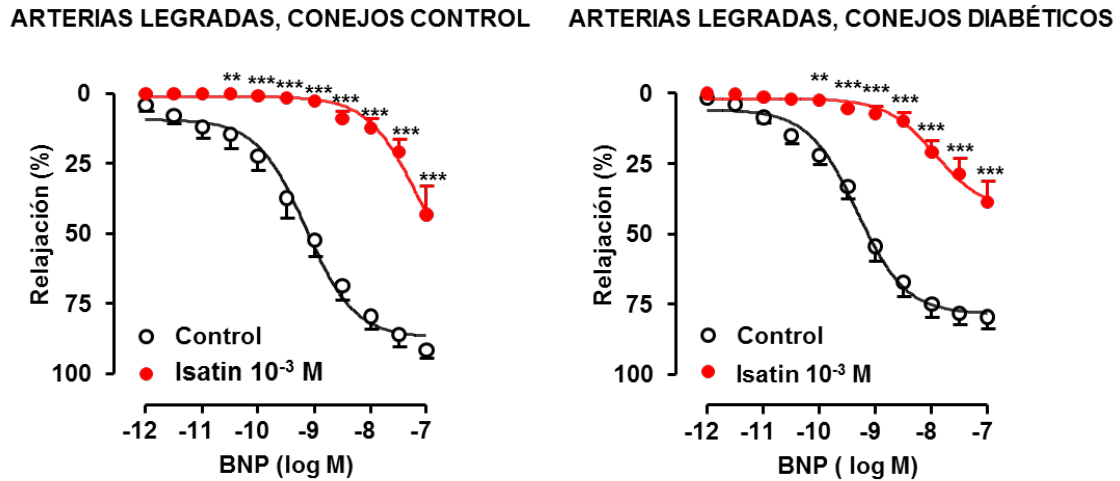


Figura 39. Curvas concentración-respuesta de BNP en segmentos de arteria carótida legrados y precontraídos con fenilefrina, procedentes de conejos control y conejos diabéticos, en arterias control e incubadas con isatin (10^{-3} M) ($n=9$ en conejos control y $n=11$ en conejos diabéticos). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales. Significativamente diferente, ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

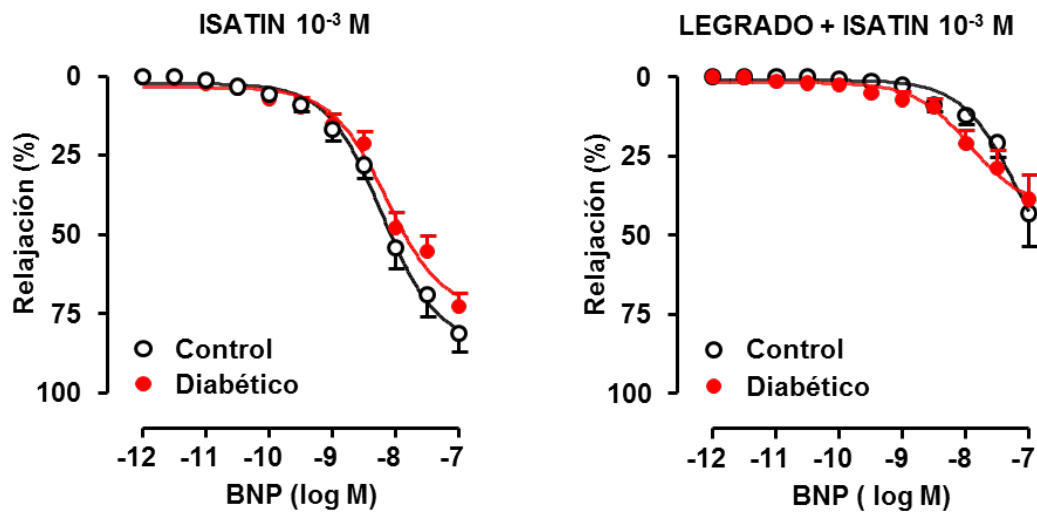


Figura 40. Curvas concentración-respuesta de BNP en segmentos de arteria carótida incubados con isatin (10^{-3} M) y precontraídos con fenilefrina, procedentes de conejos control y conejos diabéticos, en arterias con endotelio y sin endotelio (legrado).

La incubación de segmentos de arteria carótida con el inhibidor de la NOS, L-NA (10^{-5} M) no modificó la relajación arterial al BNP, tanto en arterias de conejos control

como en arterias de conejos diabéticos (Figura 41). En presencia de L-NA (10^{-5} M) la relajación arterial al BNP de arterias de conejos diabéticos fue significativamente menor que en arterias de conejos control (Figura 42).

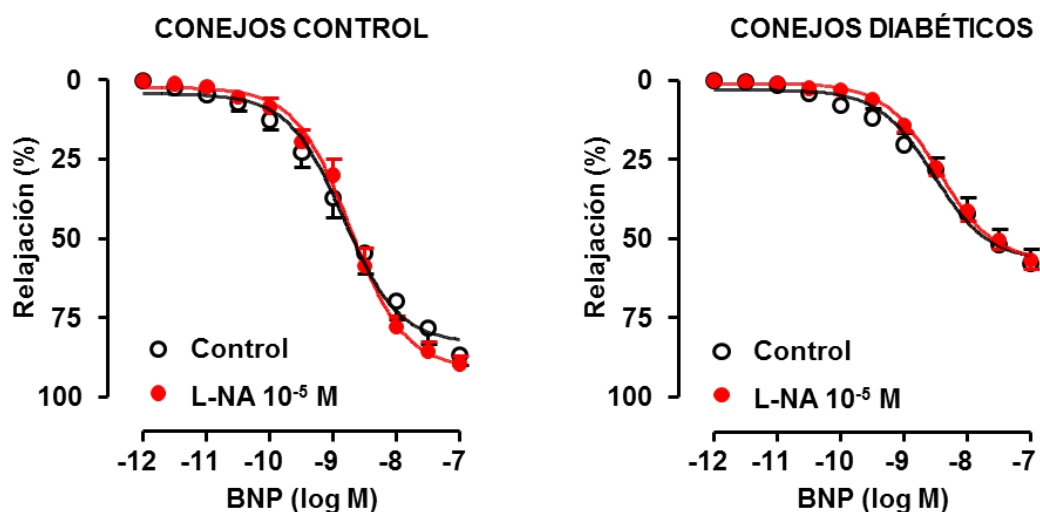


Figura 41. Curvas concentración-respuesta de BNP en segmentos de arteria carótida precontraídos con fenilefrina, procedentes de conejos control y conejos diabéticos, en arterias control e incubadas con L-NA (10^{-5} M) ($n=13$ en conejos control y $n=9$ en conejos diabéticos). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales.

En arterias con endotelio, la incubación de los segmentos arteriales con el inhibidor de la ciclooxigenasa, indometacina (10^{-5} M), inhibió significativamente la relajación al BNP en arterias de conejos control, pero no la modificó en arterias de conejos diabéticos (Figura 43). En presencia de indometacina, la relajación inducida por el BNP no fue significativamente diferente en arterias de ambos grupos de animales (Figura 44).

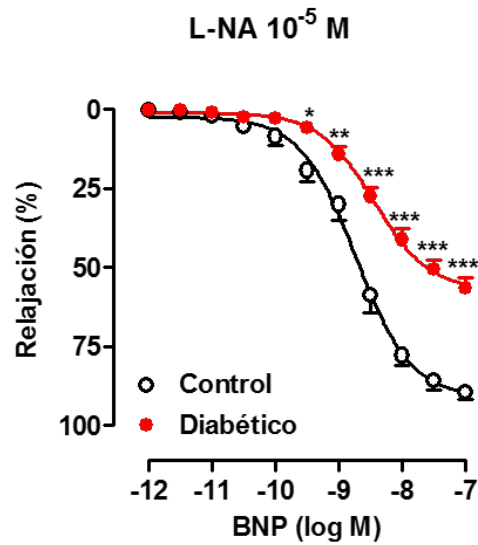


Figura 42. Curvas concentración-respuesta de BNP en segmentos de arteria carótida incubados con L-NA (10^{-5} M) y precontraídos con fenilefrina, procedentes de conejos control ($n=13$) y conejos diabéticos ($n=9$). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales. Significativamente diferente, * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$.

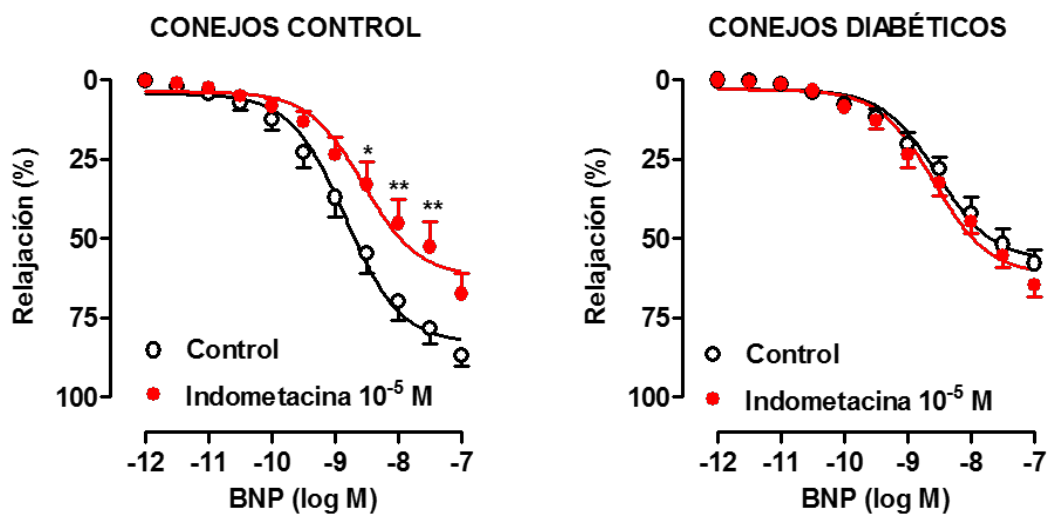


Figura 43. Curvas concentración-respuesta de BNP en segmentos de arteria carótida precontraídos con fenilefrina, procedentes de conejos control y conejos diabéticos, en arterias control e incubadas con indometacina (10^{-5} M) ($n=21$ en conejos control y $n=17$ en conejos diabéticos). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales. Significativamente diferente, * $P<0.05$; ** $P<0.01$.

En arterias sin endotelio, la indometacina inhibió significativamente la relajación inducida por el BNP en conejos control y desplazó a la derecha la curva concentración-

respuesta al BNP sin modificar la relajación máxima en arterias de conejos diabéticos (Figura 45). En arterias sin endotelio incubadas con indometacina, la relajación inducida por el BNP fue significativamente mayor en conejos diabéticos que en conejos control (Figura 46).

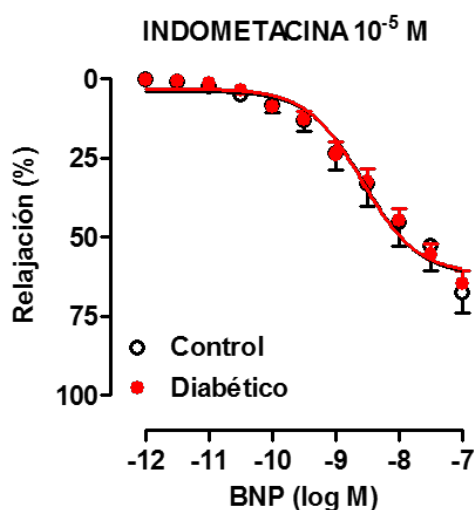


Figura 44. Curvas concentración-respuesta de BNP en segmentos de arteria carótida incubados con indometacina (10^{-5} M) y precontraídos con fenilefrina, procedentes de conejos control ($n=21$) y conejos diabéticos ($n=17$). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales.

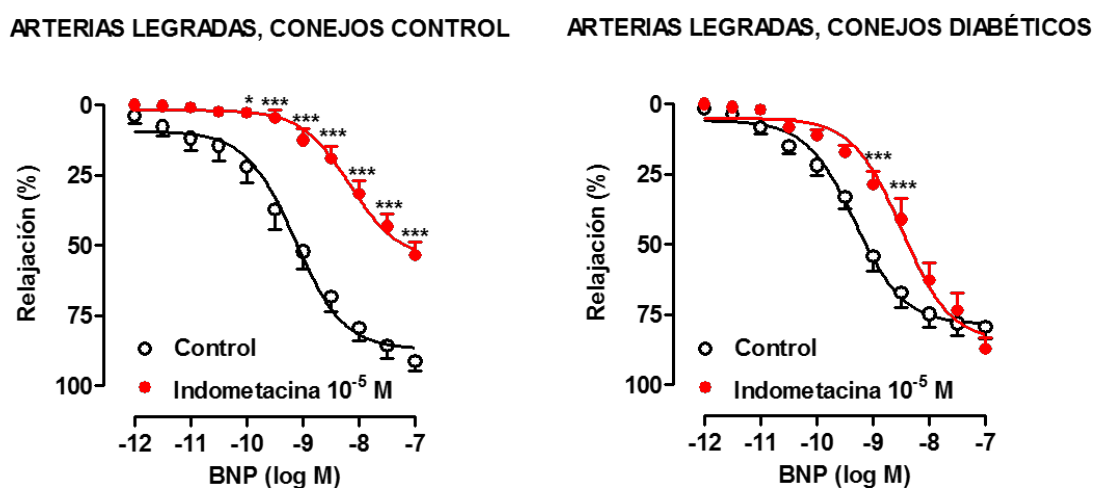


Figura 45. Curvas concentración-respuesta de BNP en segmentos de arteria carótida legrados y precontraídos con fenilefrina, procedentes de conejos control y conejos diabéticos, en arterias control e incubadas con indometacina (10^{-5} M) ($n=9$ en conejos control y en conejos diabéticos). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales. Significativamente diferente, * $P<0.05$; *** $P<0.001$.

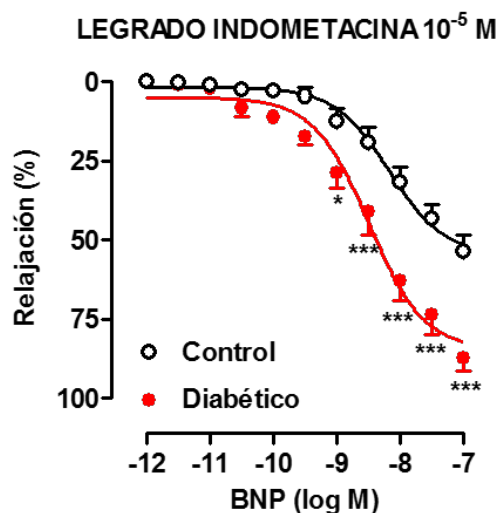


Figura 46. Curvas concentración-respuesta de BNP en segmentos de arteria carótida legrados e incubados con indometacina (10^{-5} M) y precontraídos con fenilefrina, procedentes de conejos control (n=9) y conejos diabéticos (n=9). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales. Significativamente diferente, * $P<0.05$; *** $P<0.001$.

En arterias despolarizadas con KCl 50 mM la relajación al BNP fue significativamente menor que la observada en arterias precontraídas con fenilefrina, tanto en conejos control como diabéticos (Figura 47), sin diferencias significativas entre ambos grupos de animales (Figura 48). El tono activo inducido por el KCl 50 mM en arterias carótidas de conejos control (2208 ± 261 mg) no fue significativamente diferente del obtenido en arterias de conejos diabéticos (2078 ± 226 mg).

La incubación de los segmentos arteriales con el inhibidor de los canales K_{Ca} y K_v TEA (10^{-3} M), no modificó significativamente la relajación al BNP y desplazó significativamente a la derecha la curva concentración-respuesta al BNP en los segmentos arteriales de ambos grupos de animales (Figura 49). En presencia de TEA la relajación inducida por el BNP fue significativamente menor en conejo diabético que en conejo control (Figura 50).

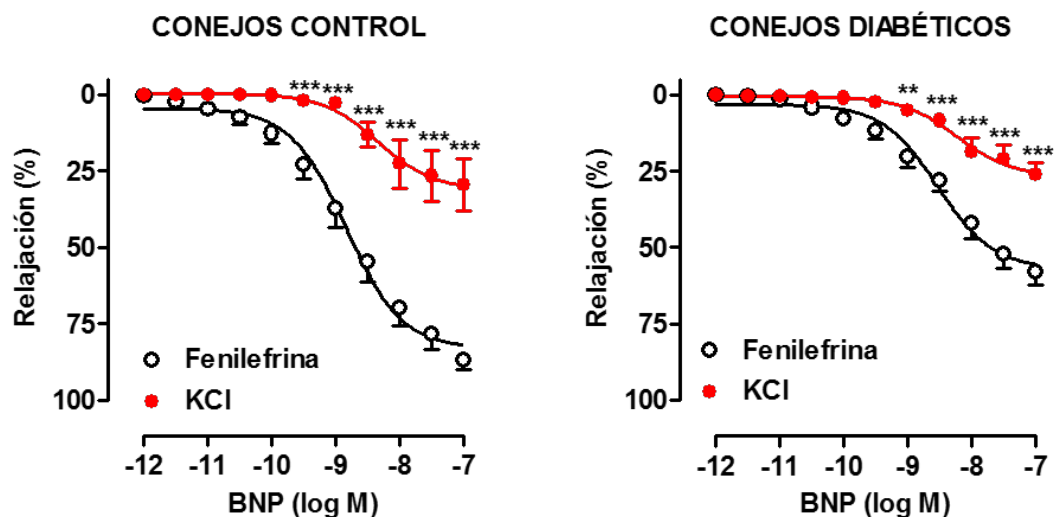


Figura 47. Curvas concentración-respuesta de BNP en segmentos de arteria carótida procedentes de conejos control y conejos diabéticos, en arterias precontraídas con fenilefrina o despolarizadas con KCl (50 mM), (n=11 en conejos control y n=14 en conejos diabéticos). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales. Significativamente diferente, ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

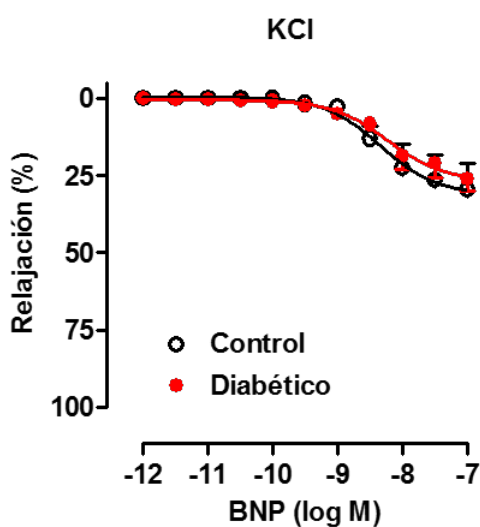


Figura 48. Curvas concentración-respuesta de BNP en segmentos de arteria carótida despolarizados con KCl (50 mM) procedentes de conejos control (n=11) y conejos diabéticos (n=14). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales.

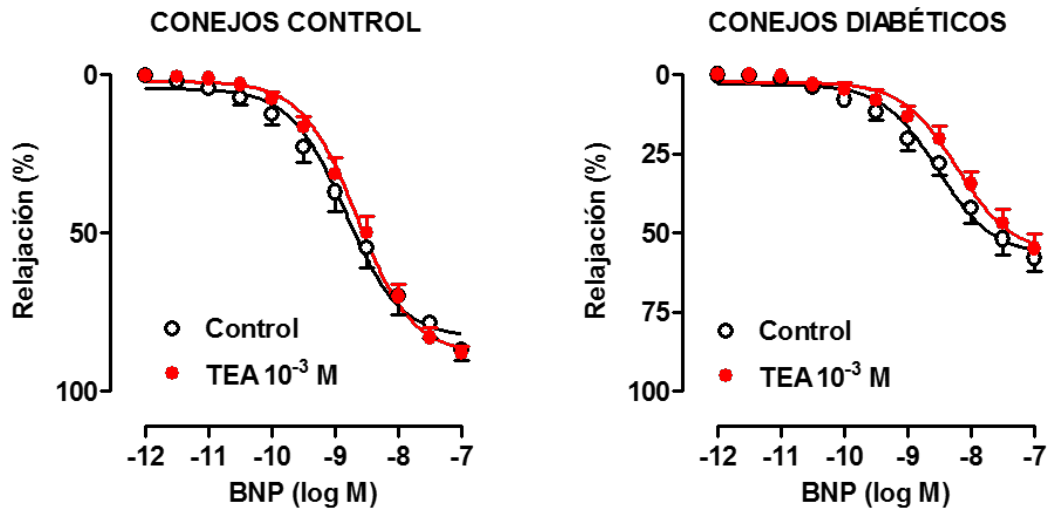


Figura 49. Curvas concentración-respuesta de BNP en segmentos de arteria carótida precontraídos con fenilefrina procedentes de conejos control y conejos diabéticos, en arterias control o incubadas con tetraetilamonio (TEA, 10^{-3} M), ($n=11$ en conejos control y $n=12$ en conejos diabéticos). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales.

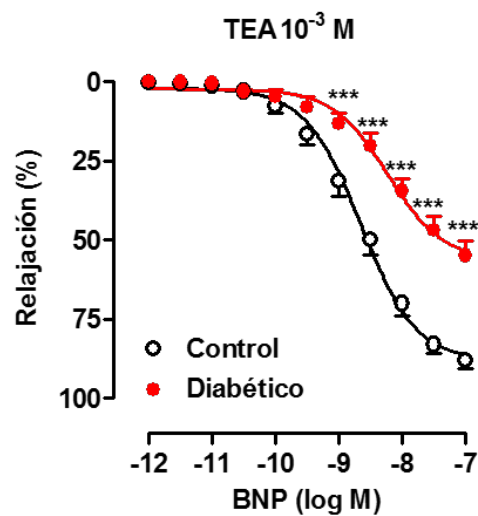


Figura 50. Curvas concentración-respuesta de BNP en segmentos de arteria carótida incubados con tetraetilamonio (TEA, 10^{-3} M) y precontraídos con fenilefrina, procedentes de conejos control ($n=11$) y conejos diabéticos ($n=12$). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales. Significativamente diferente, *** $P<0.001$.

La incubación de los segmentos arteriales con el inhibidor de los canales K_{ATP} glibenclamida (10^{-5} M), inhibió significativamente la respuesta relajante al BNP en los segmentos arteriales de ambos grupos de animales (Figura 51). En presencia de

glibenclamida la relajación inducida por el BNP fue significativamente menor en conejo diabético que en conejo control (Figura 52). Por otra parte, el activador de los canales K_{ATP} pinacidil (3×10^{-8} - 3×10^{-5} M) produjo una relajación de la arteria carótida de magnitud dependiente de la concentración, sin diferencias significativas entre arterias de conejos control y arterias de conejos diabéticos (Figura 53).

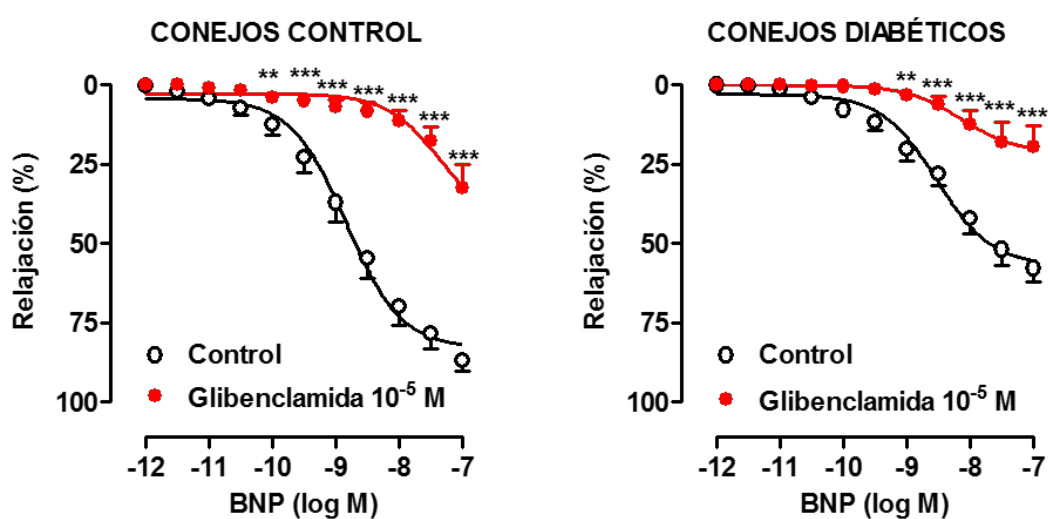


Figura 51. Curvas concentración-respuesta de BNP en segmentos de arteria carótida precontraídos con fenilefrina procedentes de conejos control y conejos diabéticos, en arterias control o incubadas con glibenclamida (10^{-5} M), ($n=17$ en conejos control y $n=12$ en conejos diabéticos). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales. Significativamente diferente, ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

La incubación de los segmentos arteriales con el inhibidor de los canales K_v 4-aminopiridina (10^{-4} M), inhibió significativamente la respuesta relajante al BNP en los segmentos arteriales de ambos grupos de animales (Figura 54). En presencia de 4-aminopiridina la relajación inducida por el BNP fue significativamente menor en conejo diabético que en conejo control (Figura 55).

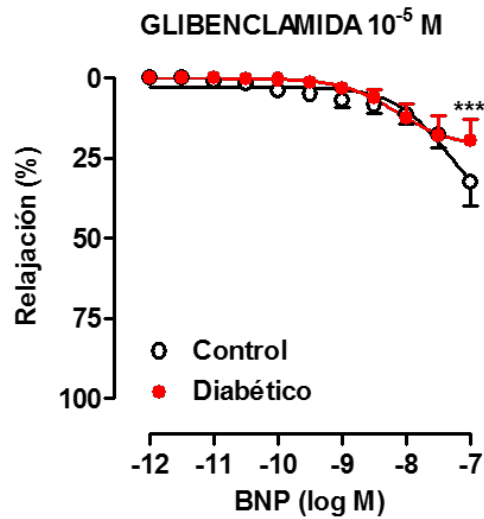


Figura 52. Curvas concentración-respuesta de BNP en segmentos de arteria carótida incubados con glibenclamida (10^{-5} M) y precontraídos con fenilefrina, procedentes de conejos control ($n=17$) y conejos diabéticos ($n=12$). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales. Significativamente diferente, *** $P<0.001$.

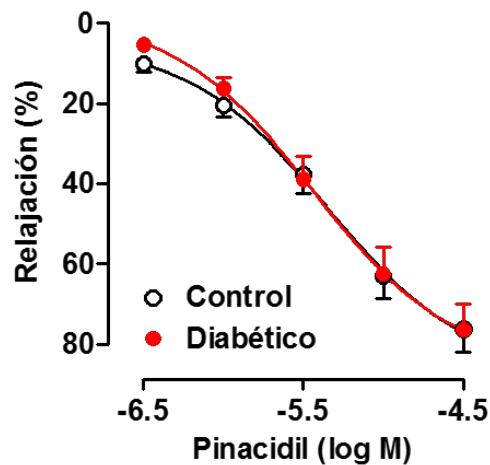


Figura 53. Curvas concentración-respuesta de pinacidil en segmentos de arteria carótida precontraídos con fenilefrina, procedentes de conejos control ($n=15$) y conejos diabéticos ($n=13$). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales.

Los valores de E_{max} y pD_2 ($-\log EC_{50}$) de las curvas concentración-respuesta de BNP en arteria carótida en las diferentes condiciones experimentales se incluyen en la Tabla 1.

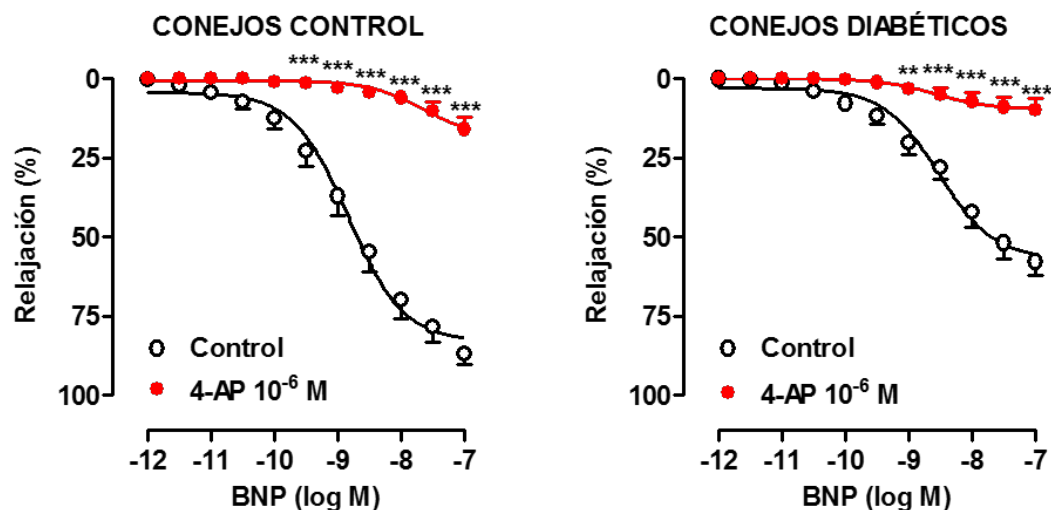


Figura 54. Curvas concentración-respuesta de BNP en segmentos de arteria carótida precontraídos con fenilefrina procedentes de conejos control y conejos diabéticos, en arterias control o incubadas con 4-aminopiridina (4-AP, 10^{-6} M), ($n=17$ en conejos control y $n=8$ en conejos diabéticos). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales. Significativamente diferente, ** $P<0.01$; *** $P<0.001$.

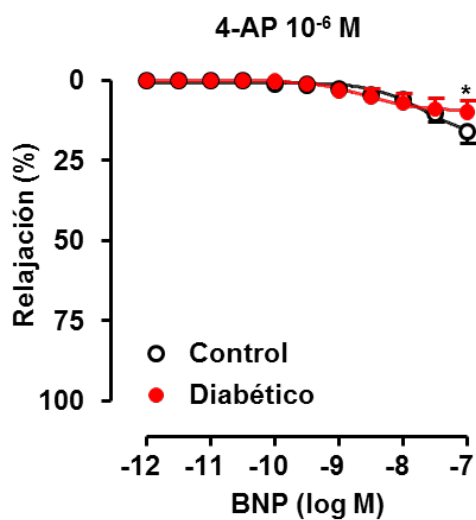


Figura 55. Curvas concentración-respuesta de BNP en segmentos de arteria carótida incubados con 4-aminopiridina (4-AP, 10^{-6} M) y precontraídos con fenilefrina, procedentes de conejos control ($n=17$) y conejos diabéticos ($n=8$). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales. Significativamente diferente, * $P<0.05$.

Tabla 1. Efecto máximo (E_{max}) y pD_2 de las curvas concentración-respuesta de BNP en arteria carótida de conejo.

	Conejos control			Conejos diabéticos		
	E_{max}	pD_2	n	E_{max}	pD_2	n
Control	87 ± 3	8.83 ± 0.02	13	58 ± 4 ^{aa}	8.52 ± 0.02 ^{aa}	18
Legrado	91 ± 3	9.14 ± 0.02 ^{**}	9	79 ± 4 ^{**}	9.32 ± 0.01 ^{**,aa}	17
Isatin 10 ⁻³ M	81 ± 6	8.21 ± 0.01 ^{**}	15	73 ± 4 [*]	8.14 ± 0.02 ^{**,aa}	16
Legrado isatin	43 ± 10 ^{**}	7.19 ± 0.04 ^{**}	9	39 ± 7 ^{**}	7.93 ± 0.02 ^{**,aa}	11
L-NA 10 ⁻⁵ M	90 ± 2	8.73 ± 0.01 [*]	13	57 ± 3 ^{aa}	8.44 ± 0.01 ^{*,aa}	9
Indometacina 10 ⁻⁵ M	68 ± 6	8.55 ± 0.02 ^{**}	21	65 ± 4	8.58 ± 0.02	17
Legrado indo 10 ⁻⁵ M	54 ± 5 ^{**}	8.17 ± 0.02 ^{**}	9	87 ± 4 ^{aa}	8.49 ± 0.03 ^{**,aa}	9
TEA 10 ⁻³ M	88 ± 2	8.65 ± 0.01 ^{**}	11	55 ± 5 ^{aa}	8.22 ± 0.02 ^{**,aa}	12
Glibenclamida 10 ⁻⁵ M	33 ± 7 ^{**}	7.32 ± 0.04 ^{**}	17	20 ± 7 ^{**,aa}	8.14 ± 0.01 ^{**,aa}	12
4-aminopiridina 10 ⁻⁶ M	16 ± 4 ^{**}	7.65 ± 0.03 ^{**}	17	10 ± 3 ^{**,a}	8.58 ± 0.02 ^{aa}	8

Los valores de E_{max} se expresan como porcentaje del tono activo inducido por la fenilefrina. Los valores se expresan como media ± EEM; n: número de segmentos arteriales. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ significativamente diferente de su correspondiente control. ^a $P < 0.05$, ^{aa} $P < 0.01$ significativamente diferente de su correspondiente valor en conejos control.

2.2. Arteria renal

El BNP (10^{-12} – 10^{-7} M) no modificó el tono basal de segmentos de arteria renal de conejos control o de conejos diabéticos. El tono activo inducido por fenilefrina (10^{-7} - 3×10^{-7} M) en arterias renales de conejos control (4150 ± 202 mg) no fue significativamente diferente al obtenido en arterias de conejos diabéticos (4582 ± 240 mg). La adición al baño de órganos de concentraciones acumulativas de BNP (10^{-12} - 10^{-7} M) produjo una relajación dependiente de concentración de las arterias renales precontraídas con fenilefrina (10^{-7} - 3×10^{-7} M), procedentes de los dos grupos de animales, aunque la relajación fue significativamente mayor en arterias de conejos diabéticos que en las de conejos control (Figura 56). El valor de EC_{50} de la curva concentración respuesta de BNP de arterias de conejo diabético [4.85 (4.51 - 5.21) $\times 10^{-9}$ M] fue significativamente menor (desplazada a la izquierda) que el obtenido en arterias de conejo control [9.62 (8.76 - 10.58) $\times 10^{-9}$ M].

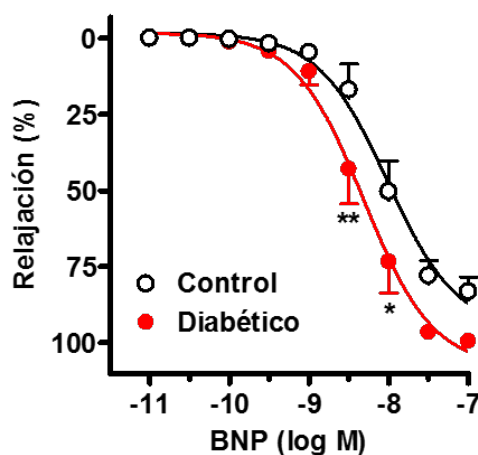


Figura 56. Curvas concentración-respuesta de BNP en segmentos de arteria renal precontraídos con fenilefrina, procedentes de conejos control (n=11) y conejos diabéticos (n=9). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales. Significativamente diferente, * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.

En comparación con el ANP, la relajación al BNP fue significativamente menor en conejos control, y significativamente mayor en conejos diabéticos, siendo la EC_{50} significativamente mayor (menor potencia) para el BNP en ambos grupos de animales (Figura 57).

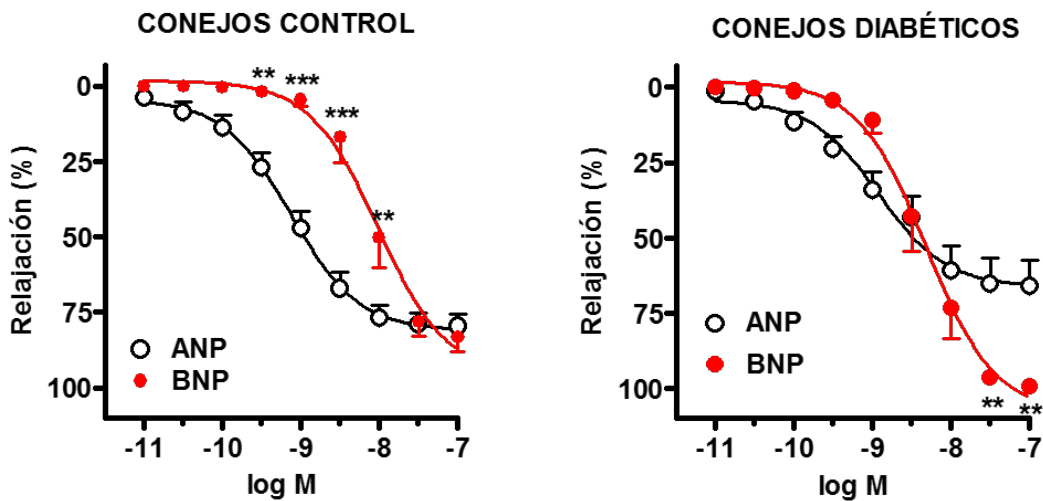


Figura 57. Curvas concentración-respuesta de ANP y BNP en segmentos de arteria renal precontraídos con fenilefrina, procedentes de conejos control (ANP, n=20; BNP, n=11) y conejos diabéticos (ANP, n=9; BNP, n=9). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales. Significativamente diferente, ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

La eliminación del endotelio aumentó la relajación arterial al BNP en arterias de conejos control, y la disminuyó significativamente en conejo diabético (Figura 58). En arterias sin endotelio la relajación al BNP de arterias de conejo diabético fue significativamente menor a la relajación de arterias procedentes de conejo control (Figura 59).

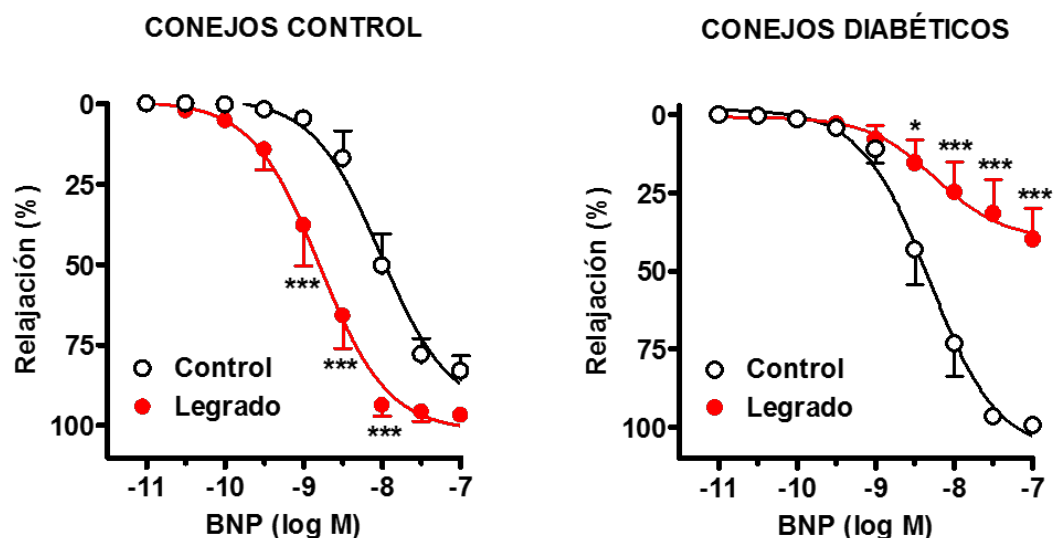


Figura 58. Curvas concentración-respuesta de BNP en segmentos de arteria renal precontraídos con fenilefrina, procedentes de conejos control y conejos diabéticos, en arterias control y sin endotelio (n=11 en conejos control y n=10 en conejos diabéticos). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales. Significativamente diferente, * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.

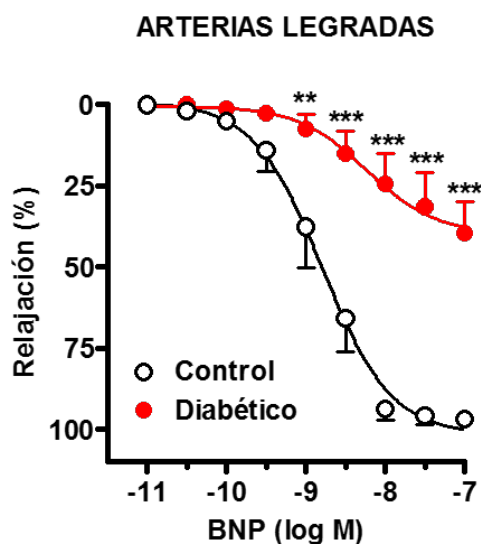


Figura 59. Curvas concentración-respuesta de BNP en segmentos de arteria renal legrados y precontraídos con fenilefrina, procedentes de conejos control (n=11) y conejos diabéticos (n=10). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales. Significativamente diferente, ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

La incubación de segmentos de arteria renal con el inhibidor de la NOS, L-NA (10^{-5} M) potenció la respuesta relajante arterial al BNP en arterias de conejos control y no la modificó significativamente en arterias de conejos diabéticos (Figura 60). En presencia de L-NA (10^{-5} M) la relajación arterial al BNP de arterias de conejos diabéticos no fue significativamente diferente que en arterias de conejos control (Figura 61).

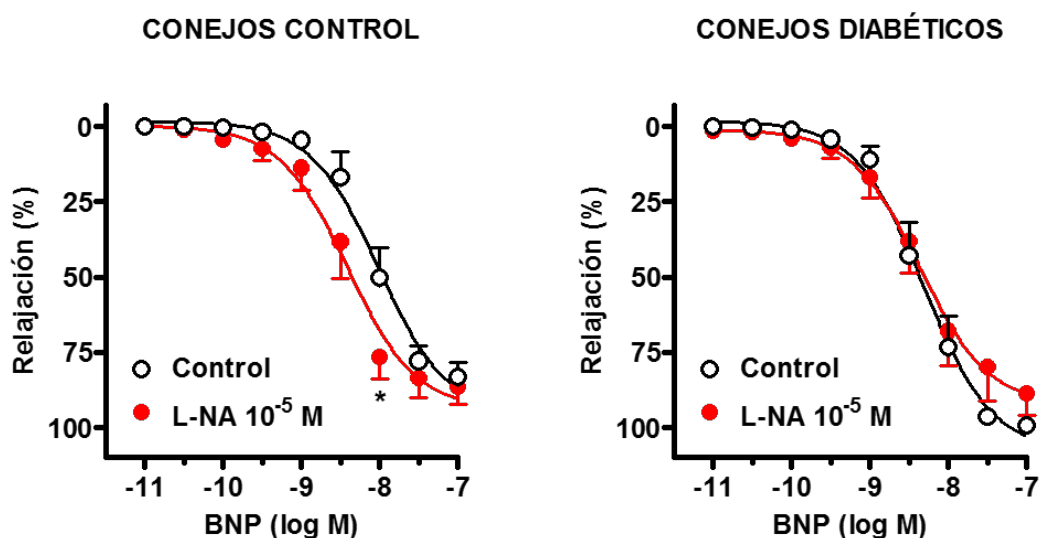


Figura 60. Curvas concentración-respuesta de BNP en segmentos de arteria renal precontraídos con fenilefrina, procedentes de conejos control y conejos diabéticos, en arterias control e incubadas con L-NA (10^{-5} M) ($n=10$ en conejos control y $n=11$ en conejos diabéticos). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales. Significativamente diferente, * $P<0.05$.

En arterias con endotelio, la incubación de los segmentos arteriales con el inhibidor de la ciclooxigenasa, indometacina (10^{-5} M), aumentó significativamente la relajación al BNP en arterias de conejos control, pero no la modificó en arterias de conejos diabéticos (Figura 62). En presencia de indometacina, la relajación inducida por el BNP fue significativamente menor en arterias de conejo diabético que en arterias de conejo control (Figura 63).

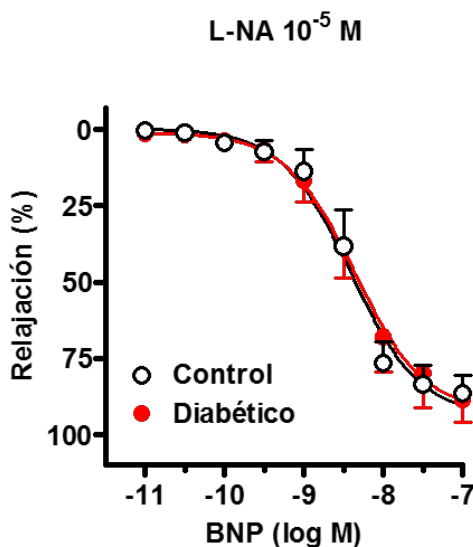


Figura 61. Curvas concentración-respuesta de BNP en segmentos de arteria renal incubados con L-NA (10^{-5} M) y precontraídos con fenilefrina, procedentes de conejos control (n=10) y conejos diabéticos (n=11). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales.

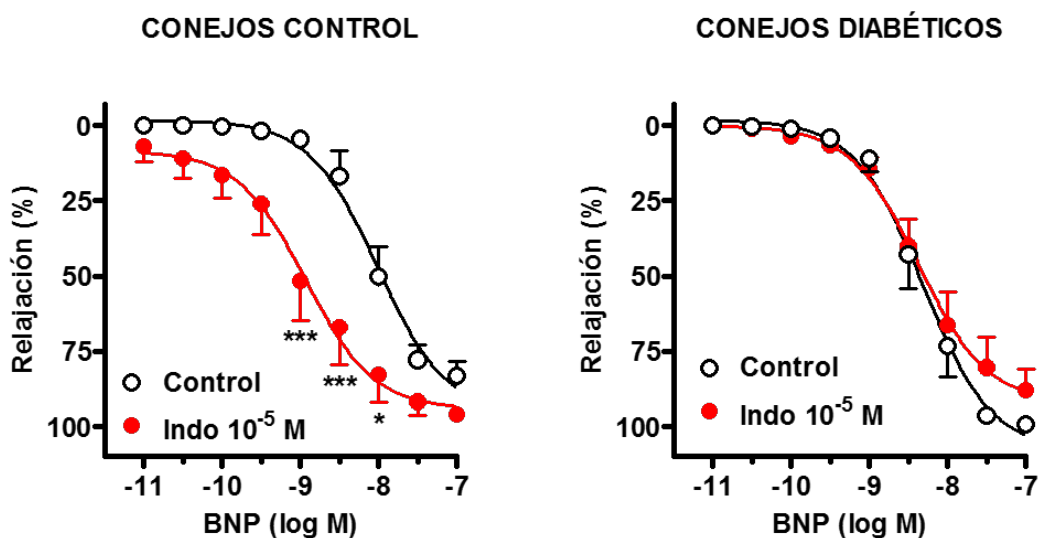


Figura 62. Curvas concentración-respuesta de BNP en segmentos de arteria renal precontraídos con fenilefrina, procedentes de conejos control y conejos diabéticos, en arterias control e incubadas con indometacina (10^{-5} M) (n=10 en conejos control y n=9 en conejos diabéticos). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales. Significativamente diferente, * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.

En arterias sin endotelio, la indometacina inhibió significativamente la relajación inducida por el BNP en conejos control y aumentó la relajación máxima con desplazamiento a la derecha de la curva concentración-respuesta al BNP en arterias de conejos diabéticos (Figura 64). En arterias sin endotelio incubadas con indometacina, la relajación inducida por el BNP fue significativamente mayor en conejos diabéticos que en conejos control (Figura 65).

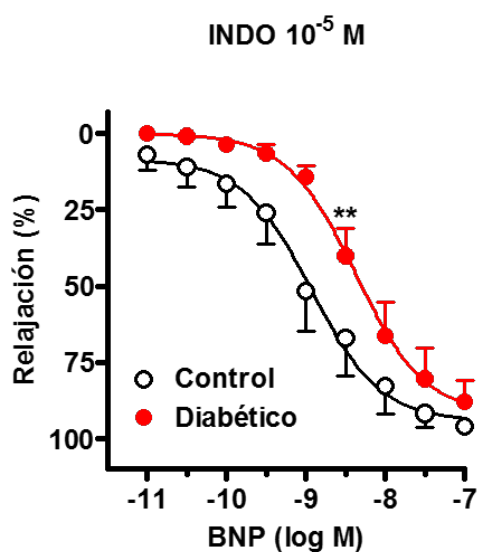


Figura 63. Curvas concentración-respuesta de BNP en segmentos de arteria renal incubados con indometacina (10^{-5} M) y precontraídos con fenilefrina, procedentes de conejos control ($n=10$) y conejos diabéticos ($n=9$). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales. Significativamente diferente, ** $P < 0.01$.

El inhibidor COX-2 nimesulide (10^{-5} M) potenció la relajación de la arteria renal al BNP en conejos control, pero inhibió la respuesta relajante arterial en conejos diabéticos (Figura 66). En presencia de nimesulide (10^{-5} M) la relajación arterial al BNP fue significativamente menor en arterias de conejos diabéticos que en arterias de conejos control (Figura 67).

CONEJOS CONTROL, ARTERIAS LEGRADAS

CONEJOS DIABÉTICOS, ARTERIAS LEGRADAS

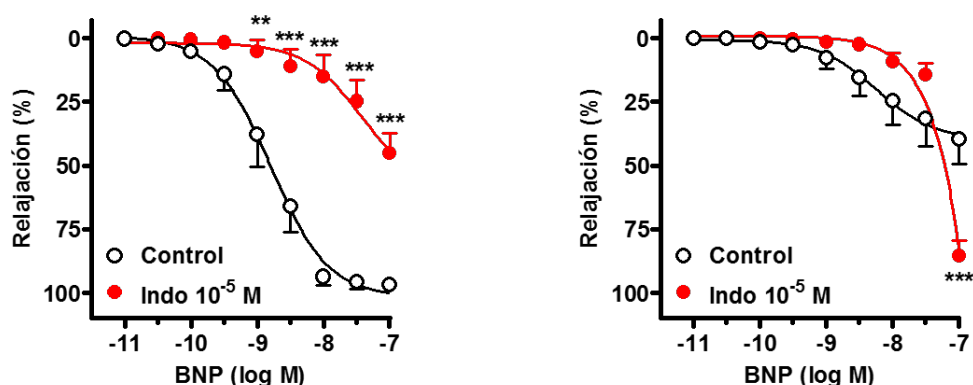


Figura 64. Curvas concentración-respuesta de BNP en segmentos de arteria renal legradas y precontraídos con fenilefrina, procedentes de conejos control y conejos diabéticos, en arterias control e incubadas con indometacina (10^{-5} M) ($n=11$ en conejos control y $n=9$ en conejos diabéticos). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales. Significativamente diferente, ** $P<0.01$; *** $P<0.001$.

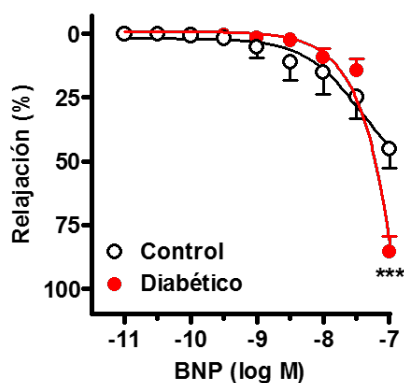
ARTERIAS LEGRADAS + INDOMETACINA 10^{-5} M

Figura 65. Curvas concentración-respuesta de BNP en segmentos de arteria renal legradas e incubados con indometacina (10^{-5} M) y precontraídos con fenilefrina, procedentes de conejos control ($n=11$) y conejos diabéticos ($n=9$). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales. Significativamente diferente, *** $P<0.001$.

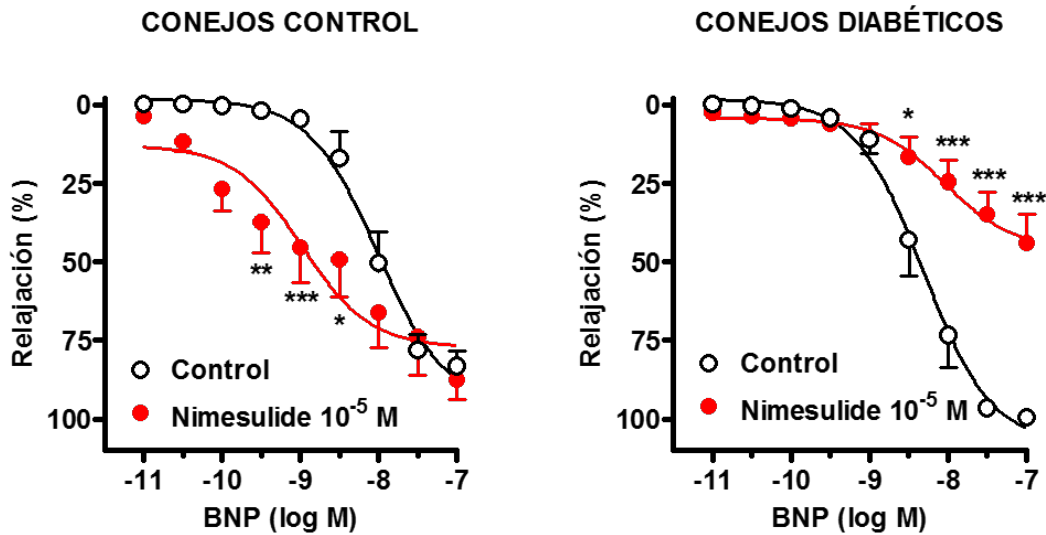


Figura 66. Curvas concentración-respuesta de BNP en segmentos de arteria renal precontraídos con fenilefrina, procedentes de conejos control y conejos diabéticos, en arterias control e incubadas con nimesulide (10^{-5} M) ($n=11$ en conejos control y $n=12$ en conejos diabéticos). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales. Significativamente diferente, * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$.

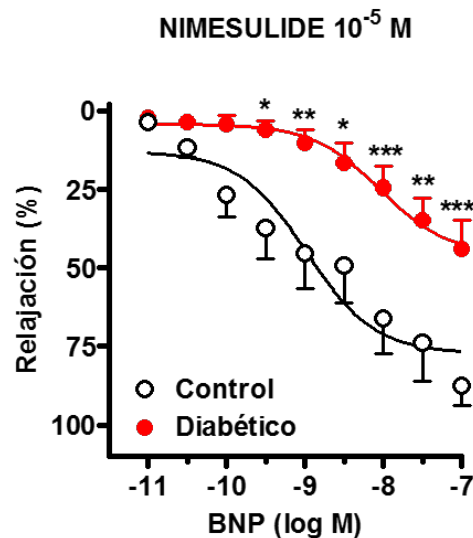


Figura 67. Curvas concentración-respuesta de BNP en segmentos de arteria renal incubados con nimesulide (10^{-5} M) y precontraídos con fenilefrina, procedentes de conejos control ($n=11$) y conejos diabéticos ($n=12$). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales. Significativamente diferente, * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$.

En arterias despolarizadas con KCl 50 mM la relajación al BNP fue significativamente menor que la observada en arterias precontraídas con fenilefrina,

tanto en conejos control como diabéticos (Figura 68). El tono activo inducido por el KCl 50 mM en arterias renales de conejos control (6029 ± 599 mg) no fue significativamente diferente del obtenido en arterias de conejos diabéticos (7062 ± 637 mg). En arterias despolarizadas con KCl 50 mM la curva concentración-respuesta al BNP en conejos diabéticos resultó desplazada a la derecha respecto a la curva obtenida en arterias de conejos control, sin cambios significativos en los valores de relajación (Figura 69).

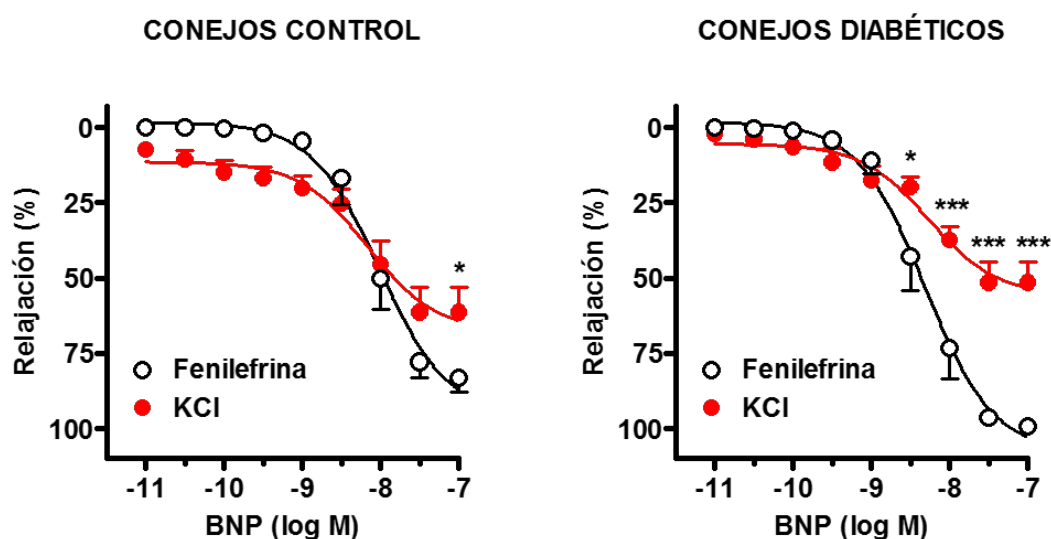


Figura 68. Curvas concentración-respuesta de BNP en segmentos de arteria renal procedentes de conejos control y conejos diabéticos, en arterias precontraídas con fenilefrina o despolarizadas con KCl (50 mM), ($n=11$ en conejos control y $n=11$ en conejos diabéticos). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales. Significativamente diferente, * $P<0.05$; *** $P<0.001$.

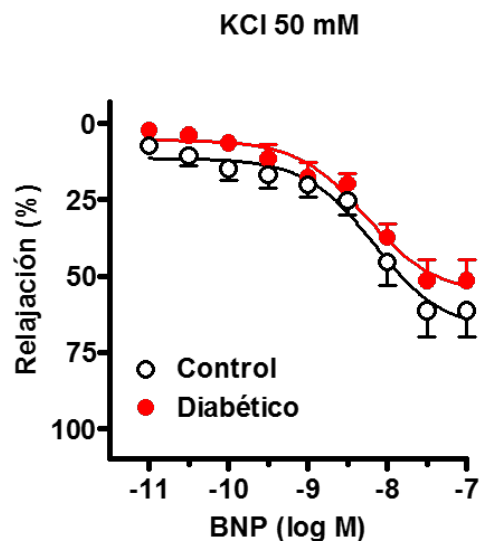


Figura 69. Curvas concentración-respuesta de BNP en segmentos de arteria renal despolariados con KCl (50 mM) procedentes de conejos control (n=11) y conejos diabéticos (n=11). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales.

La incubación de los segmentos arteriales con el inhibidor altamente selectivo de los canales BK_{Ca} iberiotoxina (5×10^{-8} M), no modificó significativamente la relajación al BNP y desplazó significativamente a la izquierda la curva concentración-respuesta al BNP en los segmentos arteriales de ambos grupos de animales (Figura 70). En presencia de iberiotoxina la curva de relajación al BNP resultó significativamente desplazada a la izquierda en arterias de conejo diabético en comparación a la curva obtenida en arterias de conejo control, sin cambios significativos en los valores de relajación (Figura 71; Tabla 2).

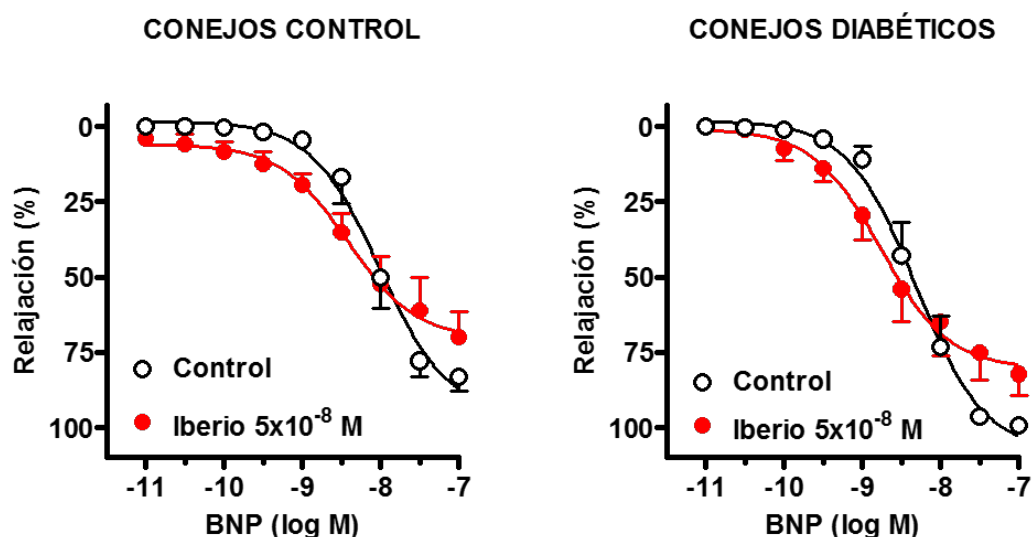


Figura 70. Curvas concentración-respuesta de BNP en segmentos de arteria renal precontraídos con fenilefrina procedentes de conejos control y conejos diabéticos, en arterias control o incubadas con iberiotoxina (5×10^{-8} M), ($n=11$ en conejos control y $n=9$ en conejos diabéticos). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales.

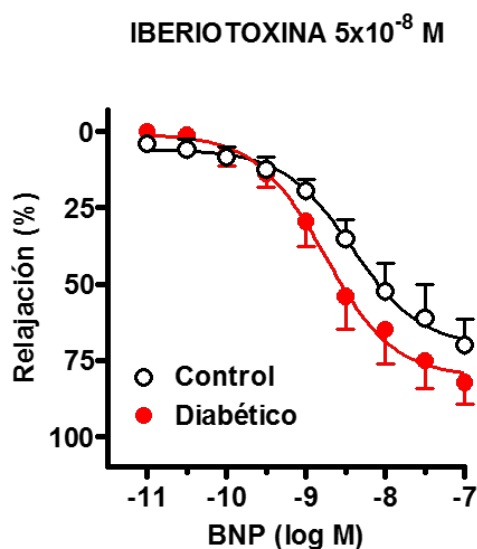


Figura 71. Curvas concentración-respuesta de BNP en segmentos de arteria renal incubados con iberiotoxina (5×10^{-8} M) y precontraídos con fenilefrina, procedentes de conejos control ($n=11$) y conejos diabéticos ($n=9$). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales.

La incubación de los segmentos arteriales con el inhibidor de los canales BK_{Ca} e IK_{Ca} charibdotoxina (10^{-8} M), no modificó significativamente la relajación al BNP en

arterias de conejos control pero inhibió significativamente dicha relajación en arterias de conejos diabéticos, y desplazó significativamente a la derecha la curva concentración-respuesta al BNP en los segmentos arteriales de ambos grupos de animales (Figura 72). En presencia de charibdotoxina la relajación al BNP fue significativamente menor en arterias de conejos diabéticos que en arterias de conejos control (Figura 73).

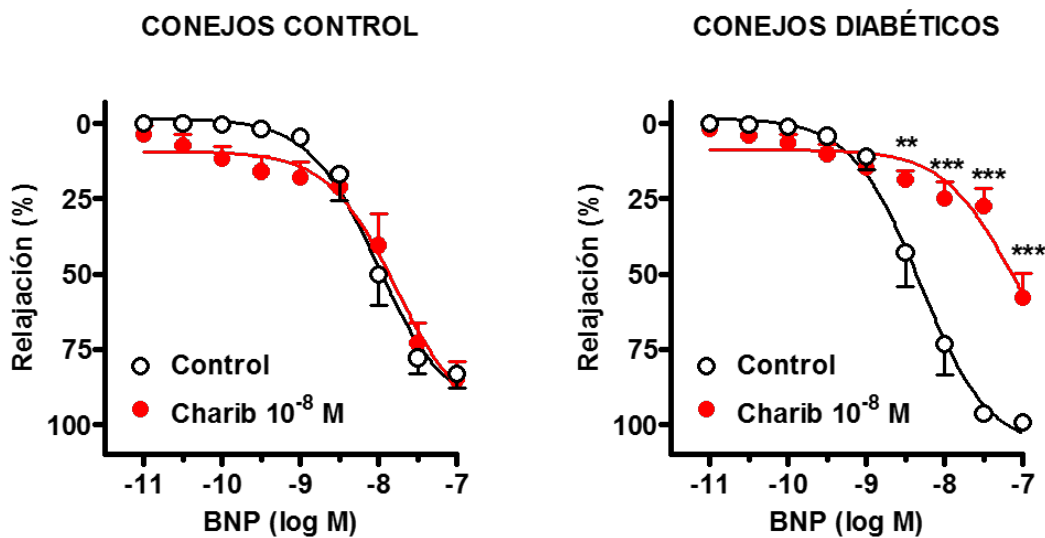


Figura 72. Curvas concentración-respuesta de BNP en segmentos de arteria renal precontractados con fenilefrina procedentes de conejos control y conejos diabéticos, en arterias control o incubadas con charibdotoxina (10^{-8} M), ($n=10$ en conejos control y en conejos diabéticos). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales. Significativamente diferente, ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

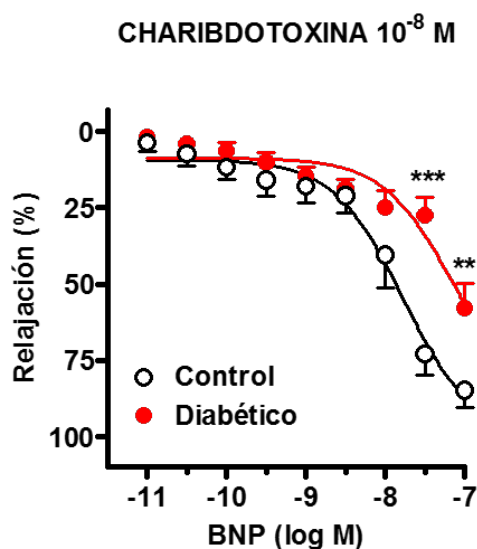


Figura 73. Curvas concentración-respuesta de BNP en segmentos de arteria renal incubados con charibdotoxina (10^{-8} M) y precontraídos con fenilefrina, procedentes de conejos control ($n=10$) y conejos diabéticos ($n=10$). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales. Significativamente diferente, ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

La incubación de los segmentos arteriales con el inhibidor de los canales K_{ATP} glibenclamida (10^{-5} M), no modificó significativamente la relajación inducida por el BNP en arterias de conejos control, pero la inhibió significativamente en los segmentos arteriales de conejos diabéticos (Figura 74). En presencia de glibenclamida la relajación inducida por el BNP fue significativamente menor en conejo diabético que en conejo control (Figura 75). Por otra parte, el activador de los canales K_{ATP} pinacidil (3×10^{-8} - 3×10^{-5} M) produjo una relajación de la arteria renal de magnitud dependiente de la concentración, sin diferencias significativas entre la relajación obtenida en arterias de ambos grupos de animales, aunque la potencia relajante del pinacidil en conejos diabéticos fue significativamente menor que en conejos control (Figura 76).

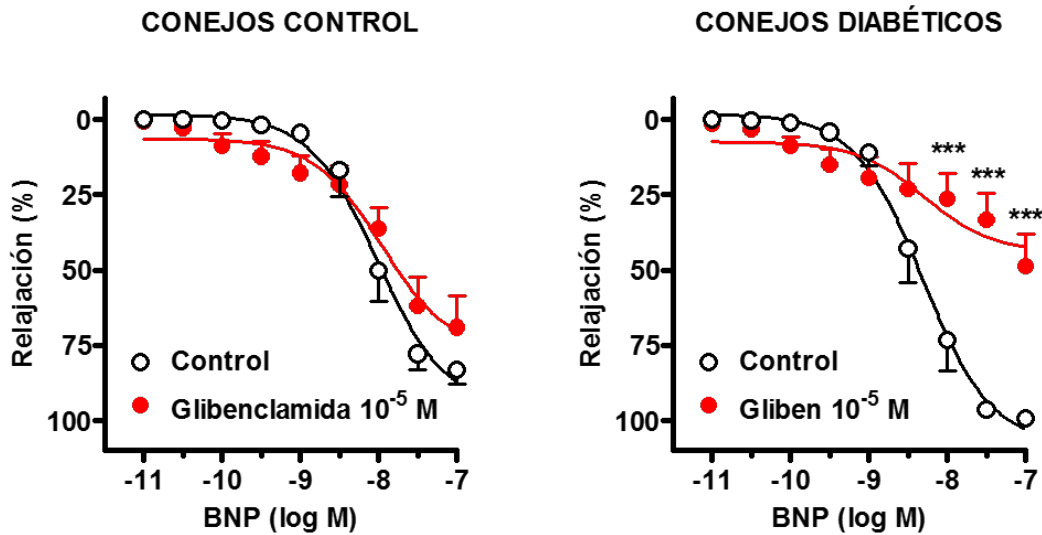


Figura 74. Curvas concentración-respuesta de BNP en segmentos de arteria renal precontraídos con fenilefrina procedentes de conejos control y conejos diabéticos, en arterias control o incubadas con glibenclamida (10^{-5} M), ($n=12$ en conejos control y $n=11$ en conejos diabéticos). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales. Significativamente diferente, *** $P<0.001$.

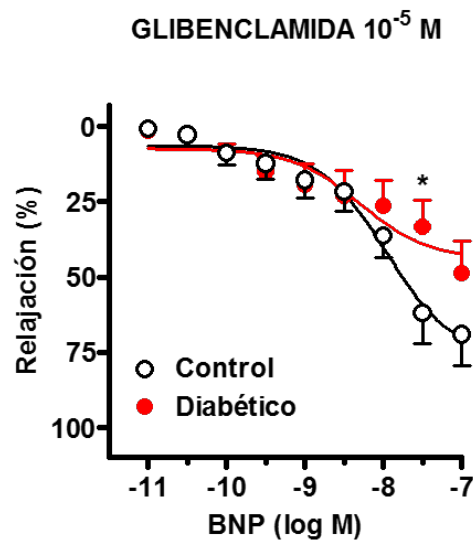


Figura 75. Curvas concentración-respuesta de BNP en segmentos de arteria renal incubados con glibenclamida (10^{-5} M) y precontraídos con fenilefrina, procedentes de conejos control ($n=12$) y conejos diabéticos ($n=11$). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales. Significativamente diferente, * $P<0.05$.

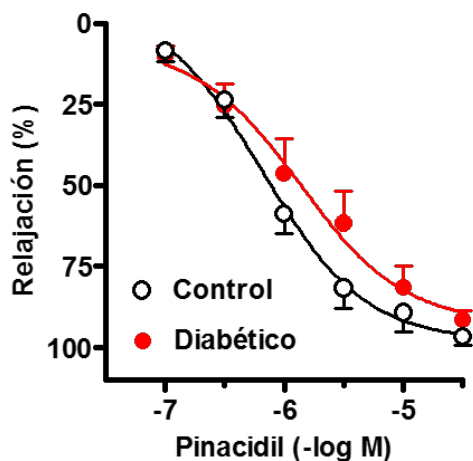


Figura 76. Curvas concentración-respuesta de pinacidil en segmentos de arteria renal precontraídos con fenilefrina, procedentes de conejos control (n=13) y conejos diabéticos (n=13). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales.

La incubación de los segmentos arteriales con el inhibidor de los canales K_v 4-aminopiridina ($10^{-4} M$), inhibió significativamente la respuesta relajante al BNP en los segmentos arteriales de ambos grupos de animales (Figura 77). En presencia de 4-aminopiridina la EC_{50} de la curva concentración-respuesta al BNP en arterias de conejos diabético fue significativamente menor (desplazada a la izquierda) que la obtenida en arterias de conejo control, sin diferencias significativas en los valores de relajación (Figura 78; Tabla 2).

Los valores de E_{max} y pD_2 ($-\log EC_{50}$) de las curvas concentración-respuesta de BNP en arteria renal en las diferentes condiciones experimentales se incluyen en la Tabla 2.

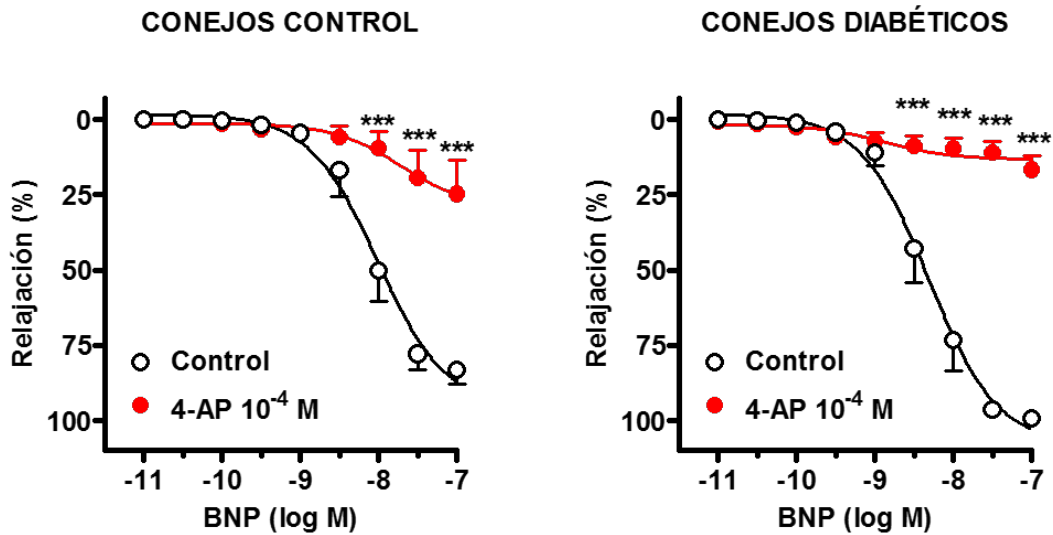


Figura 77. Curvas concentración-respuesta de BNP en segmentos de arteria renal precontraídos con fenilefrina procedentes de conejos control y conejos diabéticos, en arterias control o incubadas con 4-aminopiridina (4-AP, 10^{-4} M), ($n=10$ en conejos control y en conejos diabéticos). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales. Significativamente diferente, *** $P<0.001$.

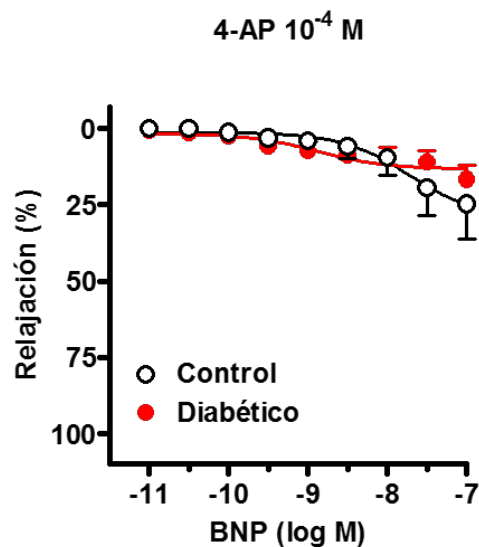


Figura 78. Curvas concentración-respuesta de BNP en segmentos de arteria renal incubados con 4-aminopiridina (4-AP, 10^{-4} M) y precontraídos con fenilefrina, procedentes de conejos control ($n=10$) y conejos diabéticos ($n=10$). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales.

Tabla 2. Efecto máximo (E_{max}) y pD_2 de las curvas concentración-respuesta de BNP en arteria renal de conejo.

	Conejos control			Conejos diabéticos		
	E_{max}	pD_2	n	E_{max}	pD_2	n
Control	83 ± 5	8.02 ± 0.02	11	99 ± 1	8.31 ± 0.01 ^{aa}	9
Legrado	97 ± 2	8.79 ± 0.01 ^{**}	11	40 ± 10 ^{**aa}	8.23 ± 0.02 ^{aa}	10
L-NA 10 ⁻⁵ M	87 ± 6	8.41 ± 0.02 ^{**}	10	89 ± 7	8.36 ± 0.01	11
Indometacina 10 ⁻⁵ M	96 ± 2	8.93 ± 0.01 ^{**}	10	88 ± 7	8.37 ± 0.01 ^{aa}	9
Legrado indo 10 ⁻⁵ M	45 ± 8 ^{**}	7.41 ± 0.04 ^{**}	11	85 ± 6 ^{**aa}	7.31 ± 0.02 ^{**}	9
Nimesulide 10 ⁻⁵ M	88 ± 6	8.98 ± 0.06 ^{**}	11	44 ± 9 ^{**aa}	8.04 ± 0.02 ^{**aa}	12
Iberiotoxina 5x10 ⁻⁸ M	70 ± 9	8.42 ± 0.01 ^{**}	11	82 ± 7	8.76 ± 0.01 ^{**aa}	9
Charibdotoxina 10 ⁻⁸ M	85 ± 6	7.78 ± 0.03 ^{**}	10	58 ± 8 ^{**aa}	7.16 ± 0.10 ^{**a}	10
Glibenclamida 10 ⁻⁵ M	69 ± 10	7.96 ± 0.03	12	49 ± 11 ^{**}	8.29 ± 0.08 ^{aa}	11
4-aminopiridina 10 ⁻⁴ M	25 ± 11 ^{**}	7.72 ± 0.03 ^{**}	10	17 ± 5 ^{**}	8.88 ± 0.08 ^{aa}	10

Los valores de E_{max} se expresan como porcentaje del tono activo inducido por la fenilefrina. Los valores se expresan como media ± EEM; n: número de segmentos arteriales. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ significativamente diferente de su correspondiente control. ^a $P < 0.05$, ^{aa} $P < 0.01$ significativamente diferente de su correspondiente valor en conejos control.

3. WESTERN BLOT

El análisis de Western blot reveló que la arteria carótida de conejo expresa los receptores de los péptidos natriuréticos NPR-A y NPR-C. En la arteria carótida de conejo diabético, la expresión del receptor NPR-A fue significativamente menor (Figura 79) y la expresión del NPR-C fue significativamente mayor (Figura 80) que en arterias de conejo control.

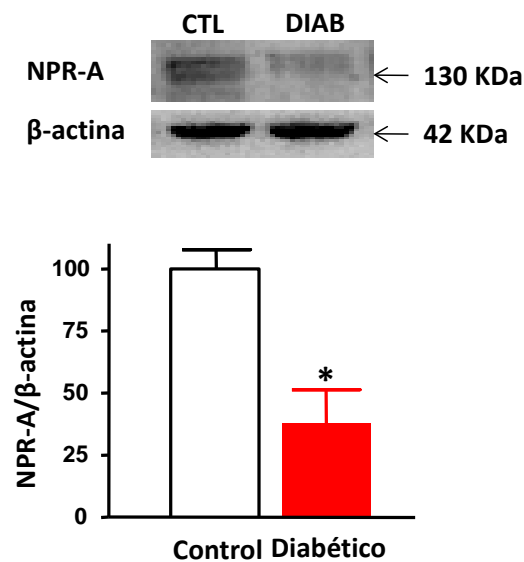


Figura 79. Western blot representativo y expresión relativa de NPR-A en arteria carótida de conejo control (n=4) y conejo diabético (n=5). La β-actina se muestra como control de la carga de proteína. La densidad relativa de las bandas inmunorreactivas se han normalizado respecto de la densidad de las correspondientes bandas de β-actina y los valores representan la media ± EEM de "n" conejos. Significativamente diferente, * P<0.05

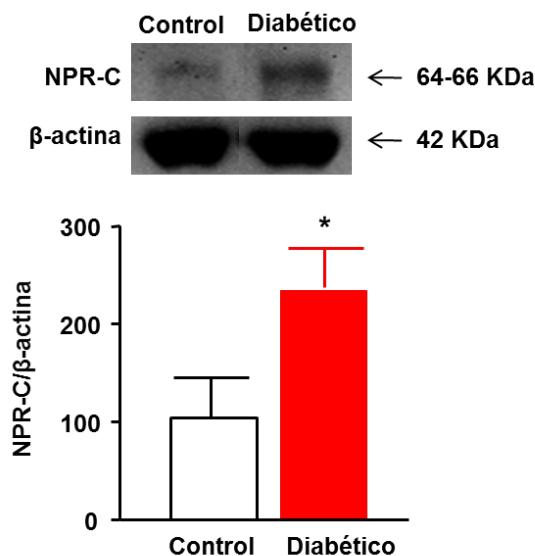


Figura 80. Western blot representativo y expresión relativa de NPR-C en arteria carótida de conejo control (n=4) y conejo diabético (n=5). La β -actina se muestra como control de la carga de proteína. La densidad relativa de las bandas inmunorreactivas se han normalizado respecto de la densidad de las correspondientes bandas de β -actina y los valores representan la media \pm EEM de "n" conejos. Significativamente diferente, * P<0.05.

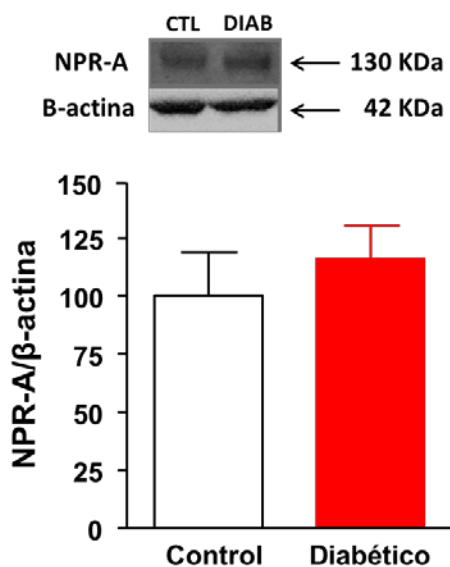


Figura 81. Western blot representativo y expresión relativa de NPR-A en arteria renal de conejo control (n=4) y conejo diabético (n=5). La β -actina se muestra como control de la carga de proteína. La densidad relativa de las bandas inmunorreactivas se han normalizado respecto de la densidad de las correspondientes bandas de β -actina y los valores representan la media \pm EEM de "n" conejos.

En la arteria renal también se expresan los receptores NPR-A (Figura 81) y NPR-C (Figura 82), pero a diferencia de la arteria carótida, no encontramos diferencias significativas en la expresión de dichos receptores entre las arterias de conejos control y conejos diabéticos.

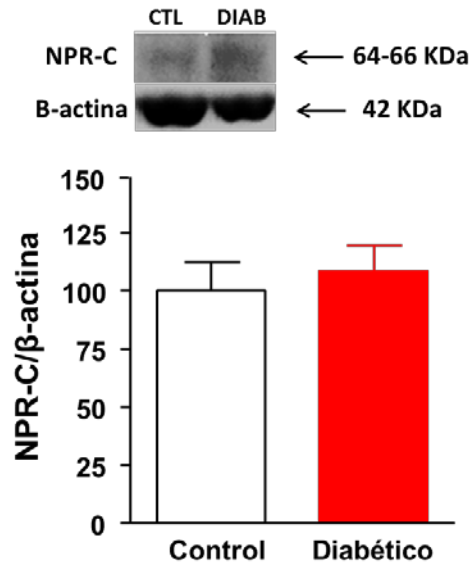


Figura 82. Western blot representativo y expresión relativa de NPR-C en arteria renal de conejo control (n=4) y conejo diabético (n=5). La β -actina se muestra como control de la carga de proteína. La densidad relativa de las bandas inmunorreactivas se han normalizado respecto de la densidad de las correspondientes bandas de β -actina y los valores representan la media \pm EEM de "n" conejos.

4. ENZIMOIMUNOANÁLISIS (EIA)

En presencia de BNP (10^{-8} M) la liberación de tromboxano A_2 en arterias carótidas de conejos diabéticos no fue significativamente diferente a la liberación observada en arterias de conejos control (Figura 83). La eliminación del endotelio de los segmentos arteriales no modificó la liberación de tromboxano A_2 ni en arterias de conejos control ni en arterias de conejos diabéticos (Figura 83).

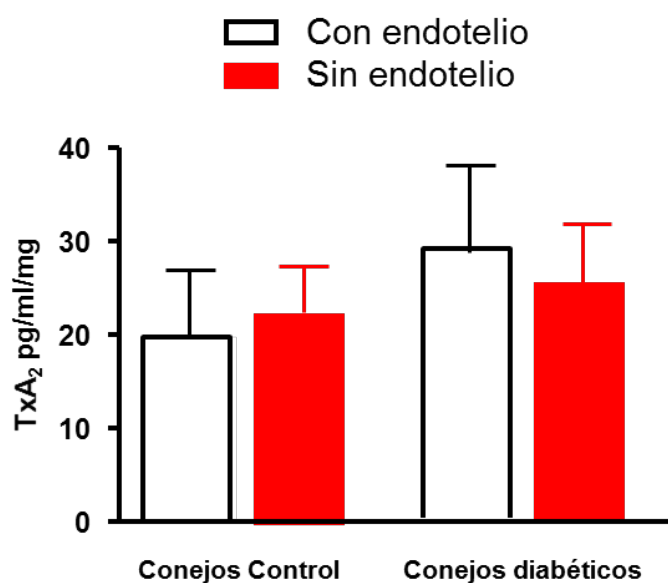


Figura 83. Liberación de tromboxano A_2 (Tx A_2) liberado en presencia de BNP (10^{-8} M) en arteria carótida con endotelio y sin endotelio, de conejo control (n=4) y conejo diabético (n=5). Los valores representan la media \pm EEM de "n" conejos.

En presencia de BNP (10^{-8} M) la liberación de prostaciclina (PGI $_2$) en arterias carótidas de conejos diabéticos fue significativamente menor a la liberación observada en arterias de conejos control (Figura 84). La eliminación del endotelio de los segmentos arteriales disminuyó significativamente la liberación de prostaciclina en arterias de

conejos control pero no modificó dicha liberación en arterias de conejos diabéticos (Figura 84).

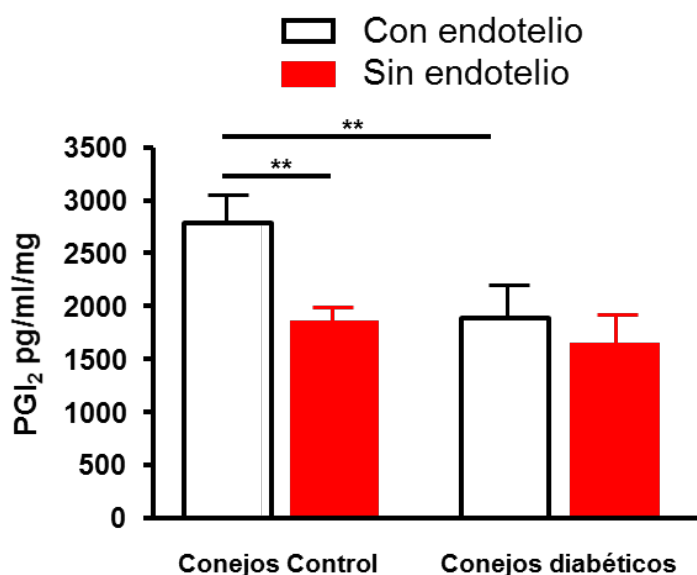


Figura 84. Liberación de prostaciclina (PGI₂) liberada en presencia de BNP (10⁻⁸ M) en arteria carótida con endotelio y sin endotelio, de conejo control (n=4) y conejo diabético (n=5). Los valores representan la media ± EEM de "n" conejos. Significativamente diferente, ** P<0.01.

En arteria renal incubada con BNP (10⁻⁸ M), la liberación de tromboxano A₂ (Figura 85) y prostaciclina (Figura 86) de arterias de conejos diabéticos no fue significativamente diferente a la observada en arterias de conejos control. La eliminación del endotelio inhibió significativamente la liberación de tromboxano A₂ (Figura 85) y prostaciclina (Figura 86) en ambos grupos de animales, sin diferencias significativas entre las arterias sin endotelio de ambos grupos.

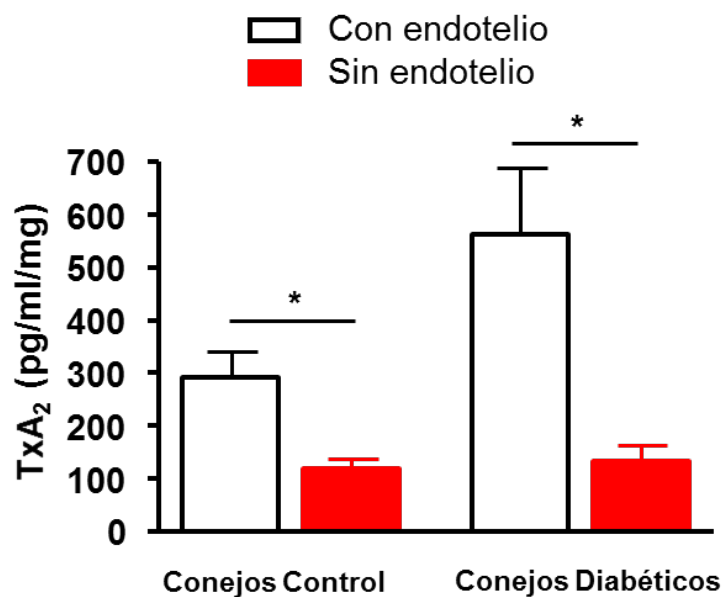


Figura 85. Liberación de tromboxano A₂ (TxA₂) liberado en presencia de BNP (10⁻⁸ M) en arteria renal con endotelio y sin endotelio, de conejo control (n=4) y conejo diabético (n=4). Los valores representan la media ± EEM de "n" conejos.

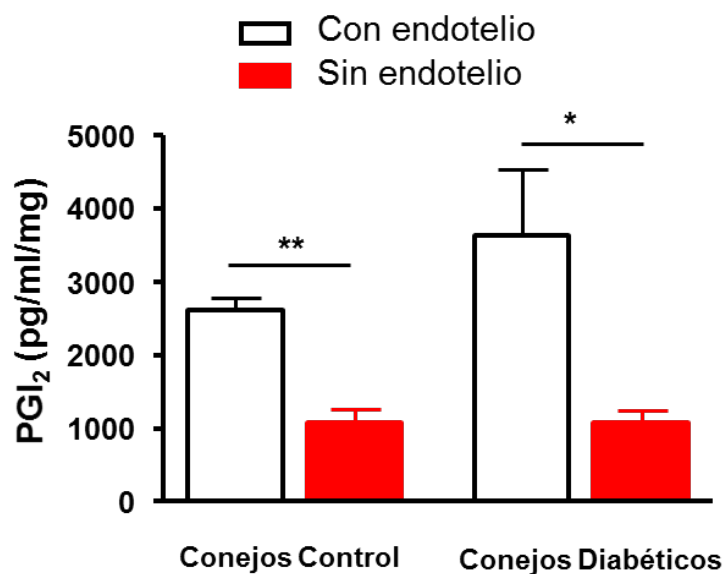


Figura 86. Liberación de prostaciclina (PGI₂) liberada en presencia de BNP (10⁻⁸ M) en arteria renal con endotelio y sin endotelio, de conejo control (n=4) y conejo diabético (n=4). Los valores representan la media ± EEM de "n" conejos. Significativamente diferente, ** P<0.01.

DISCUSIÓN

Para el estudio de la diabetes se han utilizado a lo largo de las últimas décadas diferentes modelos experimentales (Rees y Alcolado, 2005; Sakata et al., 2012; Fuentes-Antrás et al., 2015; Srinivas, 2015). Los experimentos pioneros en este campo datan de finales del siglo XIX, cuando Minkowski extirpó el páncreas a un perro y comprobó que se le producía un cuadro similar a la diabetes. Los animales usados pueden tener diabetes espontánea, o bien secundaria a la extirpación quirúrgica, a diversas drogas (diabetes química), o a métodos biomoleculares (modelos transgénicos). Entre los modelos más utilizados están los de diabetes química. Entre las distintas drogas y sustancias químicas, los diabetógenos más usados y eficaces son el aloxano y la estreptozotocina (Lenzen, 2008). Otros compuestos tienen una actividad diabetógena débil y su efecto no es específico de las células beta pancreáticas. Desde que en 1943 se descubrió la capacidad del aloxano para destruir las células beta productoras de insulina del páncreas del conejo, se ha usado en infinidad de trabajos para conseguir un modelo experimental de diabetes. Se trata de un compuesto hidrofílico que a pH neutro se reduce rápidamente a ácido dialúrico, que es la forma tóxica del compuesto. Inhibe enzimas dependientes de grupos tiol como la glucoquinasa y la hexoquinasa y sufre ciclaciones redox en presencia de agentes reductores fisiológicos, generando especies reactivas del oxígeno. Se piensa que son estas últimas las implicadas en el comienzo de los cambios tóxicos que llevan a la muerte de las células beta pancreáticas. Tras la inyección vía intravenosa de aloxano, los animales muestran una hipoglucemia transitoria las primeras 12-24 h, que revierte a hiperglucemia crónica a partir de 3-4 días. Teóricamente se esperaría que los animales inyectados con aloxano o estreptozotocina mostraran una falta total de insulina proveniente de sus células beta pancreáticas y necesitaran obligatoriamente la administración exógena de insulina para vivir. Sin embargo, a pesar de presentar niveles insignificantes de insulina endógena, pueden sobrevivir durante meses sin tratamiento. La administración de aloxano o

estreptozotocina al animal adulto ha sido ampliamente aceptada por causar en el animal de experimentación un estado similar al visto en pacientes con diabetes tipo 1: hiperglucemia, polidipsia, polifagia, poliuria, así como la mayoría de las complicaciones asociadas a la diabetes como son las cardiomiopatías, neuropatías, disfunciones coronarias, alteraciones hepáticas, traqueales, del tejido conectivo, etc. Cuando estos agentes químicos se administran a animales neonatos en dosis bajas y repetidas, muchas veces combinado con dietas ricas en grasa e hipercalóricas, producen un modelo que se asemeja a la diabetes tipo 2. El aloxano tiene la desventaja frente a la estreptozotocina que el porcentaje de incidencia de la diabetes es bastante variable y la incidencia de cetosis y consiguiente mortalidad es relativamente alta. Además, en algunos animales la hiperglucemia revierte espontáneamente al cabo de unas semanas. No obstante, el aloxano es el diabetógeno más comúnmente usado en el conejo, y es el modelo experimental de diabetes usado en el presente trabajo. Los conejos diabéticos utilizados en nuestro estudio presentan poliuria, polidipsia, hiperglucemia y menor aumento ponderal que los conejos del grupo control.

Nuestro estudio muestra que los valores plasmáticos de ANP y NT-proBNP están elevados en conejos diabéticos. El BNP y el NT-proBNP se forman en cantidades equimolares a partir del proBNP, por lo que las concentraciones plasmáticas de ambos péptidos están relacionadas. Aunque el BNP es la neurohormona activa, el NT-proBNP tiene mayor vida media, concentración plasmática más elevada y mayor estabilidad en la muestra. La elevación plasmática de cualquiera de los dos péptidos se usa en clínica para evaluar el riesgo cardiovascular en pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva, ayudando al diagnóstico, a la estratificación del riesgo, a la monitorización de los tratamientos y como indicador de la evolución (Böhm et al., 2011; Kelder et al., 2011). Otros estudios han descrito valores plasmáticos de ANP y BNP elevados en ratas diabéticas (Obineche et al., 2006; Howarth et al., 2006) y en pacientes diabéticos

(McKenna et al., 2005; Görmüş et al., 2010). La concentración plasmática aumentada de MR-proANP se asocia con alteración de la función renal y con mayor riesgo de insuficiencia renal terminal y mortalidad en pacientes con diabetes tipo 1 (Theilade et al., 2015). Además, también se ha observado que la diabetes aumenta la expresión cardíaca de BNP (Walther et al., 2000). En los pacientes con diabetes tipo 2 el aumento de la concentración plasmática de BNP se asocia, frecuentemente, a cardiopatía subclínica (Asakawa et al., 2002; Igarashi et al., 2005). El NT-proBNP puede ser un marcador de aterosclerosis subclínica y puede ser útil en la detección precoz de la isquemia miocárdica (Wiersma et al., 2010; Senmaru et al., 2013) y de la disfunción diastólica ventricular izquierda (Görmüş et al., 2010) y de daño renal (Taskapan et al., 2013) en pacientes con diabetes tipo 2. Se ha sugerido que los niveles plasmáticos aumentados de péptidos natriuréticos pueden contribuir a la hiperfiltración glomerular que aparece en las fases tempranas de la nefropatía diabética (Vesely et al., 1999; Vallon y Thomson, 2012). Sin embargo, otros estudios no apoyan esta función de los péptidos natriuréticos y atribuyen la hiperfiltración glomerular en la diabetes a cambios en el manejo tubular del sodio y al consecuente feedback túbulo-glomerular (Thomson et al., 2004; Vervoort et al., 2005; Vallon y Thomson, 2012).

1. EFECTO DEL BNP SOBRE LA ARTERIA CARÓTIDA

El BNP tiene acción relajante de la arteria carótida, tanto en conejos control como en diabéticos, y esa relajación fue menor en conejos diabéticos. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio describen que la diabetes induce hiporreactividad de las arterias carótida (Marrachelli et al., 2011) y renal (Marrachelli et al., 2012) de conejo al ANP. La potencia del BNP en la arteria carótida, aunque ligeramente menor, está en el mismo rango a la observada para el ANP en nuestros estudios, y es similar a lo descrito en las arterias aorta, renal y mesentérica de rata (Zhou y Fiscus, 1989). En este estudio

se ha investigado la participación de los receptores de los péptidos natriuréticos NPR-A y NPR-C en la respuesta relajante de la arteria carótida de conejo al BNP. Lamentablemente no hay un antagonista específico que bloquee completamente la actividad de dichos receptores (Potter et al., 2006). En presencia de endotelio, el inhibidor no selectivo de los receptores NPR-A, NPR-B y NPR-C isatin (Medvedev et al., 2007) disminuyó la potencia relajante del BNP. En ausencia de endotelio, isatin inhibió fuertemente la relajación arterial al BNP, tanto en arterias de conejos control como en arterias de conejos diabéticos. Por otra parte, el presente trabajo muestra que en la arteria carótida de conejo diabético está disminuida la expresión del receptor NPR-A y aumentada la expresión del NPR-C. La menor expresión de los receptores NPR-A y la mayor expresión de los receptores NPR-C podría producirse tal como se ha sugerido (Flora y Potter, 2010) por un mecanismo de regulación a la baja (downregulation) o al alza (upregulation) respectivamente, en respuesta al aumento de las concentraciones plasmáticas de ANP y BNP observadas en nuestros conejos diabéticos. Como el BNP realiza su acción relajante actuando sobre receptores NPR-A localizados principalmente en el músculo liso vascular (Potter et al., 2006; Pandey, 2008), y teniendo en cuenta que la función de los receptores NPR-C es fundamentalmente de aclaramiento del péptido, nuestros resultados sugieren que el receptor NPR-A probablemente media la acción relajante del BNP en arteria carótida de conejo, y que estos receptores NPR-A están localizados en el músculo liso vascular. Debido a que el NPR-C se expresa principalmente en el endotelio vascular (Potter et al., 2006), la eliminación del endotelio en nuestras arterias legradas podría implicar un menor aclaramiento del BNP, y podría explicar la mayor actividad inhibidora del isatin sobre la relajación inducida por el BNP en arterias legradas. Con todo lo anterior, podríamos especular que estos cambios en la expresión en los receptores podrían contribuir a la hiporreactividad de la arteria carótida

de conejo diabético al BNP, de manera similar a lo que se ha sugerido en riñones de ratas diabéticas (Bryan et al., 2007).

En conejos control, la eliminación del endotelio potenció (desviación a la izquierda) la respuesta relajante arterial al BNP, y aumentó la relajación inducida por el BNP en la mayoría de las dosis en conejos diabéticos. En estudios previos hemos observado que la eliminación del endotelio aumenta la relajación de la arteria carótida del conejo al ANP (Marrachelli et al., 2011), pero la inhibe en la arteria renal (Marrachelli et al., 2012). El BNP causa relajación independiente de endotelio en las arterias aorta, mesentérica y renal de rata (Zhou y Fiscus, 1989). La hiporreactividad al BNP observada en arterias de conejos diabéticos desapareció en arterias sin endotelio, lo que sugiere que esta hiporreactividad está relacionada con factores endoteliales. El aumento de la relajación arterial al BNP que hemos observado en arterias de conejos diabéticos al eliminar el endotelio podría estar relacionada con el aumento de la expresión arterial del receptor NPR-C comentada anteriormente.

La inhibición de la síntesis de NO no modificó significativamente la relajación arterial al BNP, aunque produjo un ligero pero significativo desplazamiento a la derecha de la curva concentración-respuesta al BNP en ambos grupos de animales. Estos resultados sugieren que la relajación arterial al BNP no depende de la liberación de NO. En ausencia de NO persiste la hiporreactividad arterial al BNP en arterias de conejos diabéticos, lo que indica que esta hiporreactividad no está relacionada con el NO. Existe poca información acerca de los mecanismos nitrérgicos potencialmente implicados en la acción relajante del BNP. La respuesta vasodilatadora al BNP de vasos humanos de placenta (Holcberg et al., 1995) y de antebrazo (van der Zander et al., 2002) está mediada por NO. Sin embargo, nuestros resultados están más en la línea de los obtenidos en la arteria carótida (Marrachelli et al., 2011) y renal (Marrachelli et al., 2012)

de conejo, en el lecho vascular pulmonar de gato (Hyman et al., 2001) o en las arterias carótida, pulmonar y aorta de ratón (Sabrane et al., 2009), donde se observó una ausencia de mediación nitrérgica de la respuesta relajante inducida por el ANP.

En este trabajo también hemos estudiado la participación de los derivados del ácido araquidónico por la vía de la ciclooxigenasa en la modulación de la respuesta arterial al BNP y los posibles cambios inducidos por la diabetes. En general, se acepta que la diabetes disminuye la actividad de la prostaciclina, y que el cociente tromboxano A_2 /prostaciclina está aumentado en la diabetes (Stitham y Hwa, 2016). En estudios previos habíamos publicado que tanto el tromboxano A_2 como la prostaciclina modulan la acción relajante del ANP en arteria carótida (Marrachelli et al., 2011) y renal (Marrachelli et al., 2012) del conejo, y que la diabetes modifica la actividad vasoconstrictora/vasodilatadora neta de los prostanoides. En conejos control, la indometacina inhibió la acción relajante del BNP tanto en arterias con endotelio como en arterias sin endotelio, siendo esta inhibición mayor en ausencia de endotelio. En conejos diabéticos, la influencia inhibitoria de la indometacina solo se manifestó en arterias sin endotelio, con un fuerte desplazamiento a la derecha de la curva concentración-respuesta al BNP. Estos resultados sugieren que los prostanoides modulan la respuesta de la arteria carótida de conejo al BNP con una influencia neta vasodilatadora, que está disminuida en la diabetes. En ausencia de prostanoides desaparece la hiporreactividad al BNP en arterias de conejos diabéticos, lo que sugiere que esta hiporreactividad puede estar relacionada con cambios en los prostanoides. Para profundizar más en la participación de los prostanoides en la acción relajante del BNP se midió por enzoinmunoensayo la liberación de tromboxano A_2 y prostaciclina en arterias con y sin endotelio incubadas con BNP, observando que: 1) ambos prostanoides se liberaron en presencia de BNP; 2) el tromboxano A_2 liberado tiene un origen en las células musculares lisas perivasculares, y no se libera desde el endotelio; 3) la diabetes no modificó la

liberación de tromboxano A_2 en presencia de BNP; 4) la prostaciclina se libera desde el endotelio y el músculo liso en conejos control; y 5) la diabetes disminuyó la liberación endotelial de prostaciclina, y no modificó la liberación de prostaciclina de origen muscular. Esta menor liberación de prostaciclina endotelial podría contribuir a la hiporreactividad arterial al BNP observada en la arteria carótida de conejos diabéticos. Es sorprendente que el efecto de la indometacina fue menos pronunciado en arterias legradas de conejos diabéticos que en arterias legradas de conejos control, a pesar de que la liberación de prostaciclina en arterias legradas fue similar en ambos grupos de conejos. Podría especularse que los mecanismos implicados en la regulación de la reactividad vascular en el baño de órganos no están necesariamente activados en los pocillos de la placa de enzimoimmunoensayo durante la incubación con BNP. Además, mientras que en los estudios de tensión isométrica todos los prostanoides derivados de la COX están inhibidos con la indometacina, los experimentos de enzimoimmunoensayo se focalizan en el tromboxano A_2 o en la prostaciclina. Por ello, la posible participación de otros prostanoides distintos al tromboxano A_2 y la prostaciclina en la mediación de la respuesta relajante arterial al BNP no puede ser descartada.

Finalmente, hemos estudiado la participación de canales de potasio en la relajación inducida por el BNP en la arteria carótida del conejo. Nuestros resultados muestran que la acción relajante del BNP se vio fuertemente inhibida en arterias despolarizadas, tanto en conejos control como diabéticos, confirmando por lo tanto que esta relajación está mediada por canales de potasio, tal como ha sido descrito en aorta de cobaya (Otsuka et al., 2002) y en vasos del antebrazo humano (van der Zander et al., 2002). En arterias despolarizadas desapareció la hiporreactividad arterial al BNP observada en arterias de conejos diabéticos, lo cual sugiere que esta hiporreactividad podría estar relacionada, al menos parcialmente, con cambios en la actividad de los canales de K^+ . La incubación con tetraetilamonio, un inhibidor de los canales K_{Ca} y K_v no

modificó la relajación arterial al BNP, ni en conejos control ni en diabéticos. La incubación de los segmentos arteriales con el inhibidor de los canales K_{ATP} glibenclamida, o con el inhibidor de los canales K_V 4-aminopiridina inhibió significativamente la relajación arterial al BNP, siendo esa inhibición, en ambos casos, mayor en conejos control que en conejos diabéticos. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la acción relajante del BNP en arteria carótida de conejo está mediada por la activación de canales K_{ATP} y K_V , pero no por canales K_{Ca} , y que la diabetes disminuye la participación de dichos canales. Esta alteración podría contribuir a explicar la hiporreactividad de la arteria carótida de conejo en las arterias de animal diabético. Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en la respuesta relajante arterial al activador de los canales K_{ATP} pinacidil entre arterias de conejos control y arterias de conejos diabéticos, lo que sugiere que esta disminución del papel de los K_{ATP} en la mediación de la respuesta relajante al BNP es selectiva del estímulo, ya que la respuesta al pinacidil no se modifica en conejos diabéticos. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio indican que la hiporreactividad de la arteria carótida de conejo al ANP en la diabetes está relacionada con una menor participación de los canales de potasio K_{Ca} (Marrachelli et al., 2011). Además, la hiporreactividad de la arteria renal de conejo al ANP en la diabetes está relacionada con una menor participación de los canales K_{Ca} , K_{ATP} y K_V (Marrachelli et al., 2012). La hiperglucemia aguda inhibe la relajación independiente de endotelio de la arteria omental humana mediada por canales K_V (Kinoshita et al., 2004). En otros estudios se ha observado que la diabetes altera el papel de los canales K_V que median la vasodilatación independiente de endotelio de la arteria coronaria de rata (Chai et al., 2007). Asimismo, también se ha descrito que la diabetes altera los canales de potasio activados por calcio del músculo liso de arterias cerebrales (Dong et al., 2008) y que inhibe la vasodilatación mediada por dichos canales en arterias coronarias (Dick y Tune, 2010; Lu et al., 2010) y arteriolas retinianas (Mori et al., 2011).

De todo lo anterior se confirma, por lo tanto, que los cambios inducidos por la diabetes en los mecanismos que regulan la reactividad vascular dependen del lecho vascular, de la sustancia vasoactiva, y de la especie animal estudiada. El conocimiento de estos cambios y de las relaciones existentes entre los diversos sistemas reguladores de la reactividad vascular, como los péptidos natriuréticos, los prostanoides y los canales de potasio, podría contribuir al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

2. EFECTO DEL BNP SOBRE LA ARTERIA RENAL

En la presente Tesis Doctoral también hemos examinado los mecanismos que regulan la respuesta de la arteria renal de conejo al BNP, y la influencia que tiene la diabetes experimental sobre esta respuesta. Nuestros resultados indican que el BNP relajó la arteria renal de conejo, y que la potencia relajante del BNP fue mayor en la arteria renal de conejos diabéticos en comparación con arterias de conejos control. Este resultado contrasta con lo observado en la arteria carótida, donde como se ha descrito anteriormente la diabetes induce una hiporreactividad al ANP (Marrachelli et al., 2011) y al BNP. También contrasta con otros estudios del grupo de investigación donde se había observado que la diabetes experimental induce hiporreactividad de la arteria renal de conejo al ANP (Marrachelli et al., 2012). Por otra parte, la potencia relajante del BNP en arteria renal fue menor que la del ANP, al igual de lo observado en la arteria carótida, sin cambios significativos en la relajación máxima, en conejos control; sin embargo, en el conejo diabético la relajación de la arteria renal al BNP fue significativamente mayor que al ANP. Como se ha comentado anteriormente, se ha sugerido que los niveles plasmáticos aumentados de péptidos natriuréticos pueden contribuir a la hiperfiltración glomerular que aparece en las fases tempranas de la nefropatía diabética (Vesely et al., 1999; Vallon y Thomson, 2012). En este sentido, la hiperreactividad de la arteria renal al BNP, que además está aumentado en plasma en nuestros animales diabéticos, podría

contribuir a la hiperfiltración glomerular. En este trabajo hemos estudiado la expresión de los receptores NPR-A y NPR-C en la arteria renal de conejo; ambos receptores se expresaron en la arteria renal, y la diabetes no modificó significativamente la expresión de dichos receptores. Por ello, nuestros resultados sugieren que la hiperreactividad de la arteria renal al BNP en diabetes no se debe a cambios en la expresión de los receptores NPR-A y NPR-C.

En la presente Tesis Doctoral hemos estudiado el papel modulador del endotelio en la acción relajante del BNP en la arteria renal. La eliminación del endotelio significativamente aumentó la respuesta relajante de la arteria renal al BNP en conejos control, pero inhibió la relajación arterial al BNP en conejos diabéticos. Nuestros resultados sugieren que el endotelio modula la respuesta arterial al BNP con una influencia neta vasoconstrictora, y que la diabetes modifica la función moduladora endotelial, disminuyendo la producción de vasoconstrictores endoteliales. Considerando como se ha comentado anteriormente que la acción relajante del BNP se lleva a cabo por su acción sobre receptores NPR-A, localizados principalmente en el músculo liso, y que la función fundamental del receptor NPR-C, que se localiza fundamentalmente en el endotelio, es eliminar el BNP circulante (Potter et al., 2006; Pandey, 2008), la eliminación del endotelio implicaría un menor aclaramiento del BNP que ocasionaría la mayor acción relajante observada en las arterias legradas, al igual que se ha comentado anteriormente para la arteria carótida. En ausencia de endotelio, la relajación arterial al BNP fue menor en conejos diabéticos que en conejos control, sugiriendo que la hiperreactividad de la arteria renal al BNP en la diabetes podría estar relacionada con cambios en la actividad moduladora endotelial. La eliminación del endotelio no modifica la respuesta relajante de la arteria carótida al BNP en conejos control, pero la aumenta en conejos diabéticos (Centeno et al., 2013), confirmando la existencia de profundas diferencias regionales en los mecanismos reguladores de la respuesta vascular a agentes vasoactivos. Tanto en

conejos control como diabéticos, la ausencia de endotelio aumenta la respuesta de la arteria carótida de conejo al ANP (Marrachelli et al., 2011) pero inhibe la relajación de la arteria renal de conejo al ANP (Marrachelli et al., 2012). El BNP causa relajación independiente de endotelio en arterias aorta, mesentérica y renal de rata (Zhou and Fiscus, 1989). El inhibidor de la síntesis de óxido nítrico L-NA no inhibió significativamente la relajación de la arteria renal al BNP, ni en conejos control ni en conejos diabéticos, sugiriendo que la respuesta relajante de la arteria renal al BNP no está mediada por NO, de forma similar a lo observado en la arteria carótida en la presente Tesis. La respuesta vasodilatadora al BNP de vasos humanos de placenta (Holcberg et al., 1995) y de antebrazo (van der Zander et al., 2002) está mediada por NO. Sin embargo, nuestros resultados están más en la línea de los obtenidos en la arteria carótida (Marrachelli et al., 2011) y renal (Marrachelli et al., 2012) de conejo, en el lecho vascular pulmonar de gato (Hyman et al., 2001) o en las arterias carótida, pulmonar y aorta de ratón (Sabrane et al., 2009), donde se observó una ausencia de mediación nitrérgica de la respuesta relajante inducida por el ANP.

En este trabajo también hemos estudiado la participación de los derivados del ácido araquidónico por la vía de la ciclooxygenasa en la regulación de la respuesta de la arteria renal al BNP y los posibles cambios inducidos por la diabetes. Como se ha comentado en párrafos anteriores, en general se acepta que la diabetes disminuye la actividad de la prostaciclina, y que el cociente tromboxano A_2 /prostaciclina está aumentado en la diabetes (Stitham y Hwa, 2016). Nuestros resultados muestran que en presencia de endotelio los prostanoides modulan la respuesta de la arteria renal al BNP, con una influencia vasoconstrictora neta, y que la diabetes disminuye esta modulación vasoconstrictora. El inhibidor de la COX-2 nimesulide significativamente potenció la respuesta relajante de la arteria renal al BNP, sugiriendo que los derivados COX-2 modulan dicha respuesta arterial con una influencia vasoconstrictora, que también está

afectada en conejos diabéticos. La alteración de la vasoconstricción prostanoidérgica que modula la respuesta de la arteria renal al BNP en conejos diabéticos podría contribuir a la hiperreactividad de la arteria renal al BNP de los conejos diabéticos. En arterias sin endotelio, la indometacina significativamente inhibió la relajación arterial al BNP en conejos control, pero aumentó dicha relajación en conejos diabéticos. Por tanto, nuestros resultados sugieren que en conejos control los prostanoídes musculares tienen una influencia neta vasodilatadora que estaría contrarrestada por la influencia vasoconstrictora de los prostanoídes endoteliales; por el contrario, en conejos diabéticos los prostanoídes musculares tendrían una influencia neta vasoconstrictora que estaría contrarrestada con la influencia neta vasodilatadora de los prostanoídes endoteliales. En nuestro trabajo también se ha medido la liberación arterial de tromboxano A₂ y prostaciclina por enzimoimmunoensayo. Nuestros resultados indican que: 1) tanto el tromboxano A₂ como la prostaciclina se liberan en la arteria renal en presencia de BNP; 2) ambos prostanoídes se liberan desde el endotelio y desde las células musculares lisas; y 3) la diabetes no modificó la liberación endotelial o muscular de dichos prostanoídes. Por tanto, la alteración de la influencia vasoconstrictora prostanoidérgica en la modulación de la respuesta de la arteria renal al BNP en conejos diabéticos no estaría relacionada con cambios en la liberación de estos metabolitos. Podríamos especular que este cambio podría estar relacionado con cambios en otros prostanoídes distintos de tromboxano A₂ y prostaciclina, con cambios a nivel del efector, o con cambios en el equilibrio dinámico y en las interacciones entre prostanoídes, óxido nítrico y EDH (McNeish et al., 2012; Ellinworth et al., 2014).

Finalmente, en este trabajo hemos investigado si la acción relajante del BNP en la arteria renal está mediada por canales de potasio, como se ha descrito en aorta de cobaya (Otsuka et al., 2002) y en los vasos del antebrazo humano (van der Zander et al., 2002). Los canales de potasio juegan un importante papel en la regulación del tono

vascular renal, y por tanto en el control de la resistencia hemodinámica en la microcirculación renal (Carmines, 2010; Sorensen et al., 2012). Nuestros resultados muestran que la acción relajante del BNP en la arteria renal se vio inhibida en arterias despolarizadas, tanto en conejos control como en conejos diabéticos, lo que confirma que la respuesta relajante de la arteria renal al BNP está mediada por canales de potasio. La incubación con el bloqueante altamente selectivo de los canales BK_{Ca} iberiotoxina no modificó la relajación arterial al BNP. La incubación con el bloqueante de los canales BK_{Ca} e IK_{Ca} charibdotoxina desplazó a la derecha la curva concentración-respuesta al BNP en ambos grupos de animales, y significativamente inhibió la relajación solo en arterias de conejos diabéticos, lo que sugiere que los canales IK_{Ca} median la relajación de la arteria renal de conejo al BNP, y que la diabetes aumenta la actividad moduladora de estos canales. Como en presencia de charibdotoxina desapareció la hiperreactividad al BNP observada en arterias de conejos diabéticos, podríamos sugerir que esta hiperreactividad está relacionada, al menos parcialmente, con un aumento de la actividad moduladora de los canales IK_{Ca} . Estos canales están principalmente localizados en el endotelio y están implicados en las respuestas dependientes de EDH (hiperpolarización dependiente de endotelio) (Dong et al., 2016; Garland y Dora, 2016). La mayor participación endotelial en la mediación de la respuesta relajante arterial al BNP podría estar relacionada con la mayor actividad de los canales IK_{Ca} endoteliales. Los productos finales de la glucosilación avanzada (AGEs) aumentan la expresión de los canales IK_{Ca} en el sistema cardiovascular (Zhao et al., 2012; Zhao et al., 2013). La alteración de estos canales podría contribuir a la disfunción endotelial en la diabetes (Gokina et al., 2015; Liu et al., 2015). Por otro lado, el bloqueante selectivo de los canales K_{ATP} glibenclamida no modificó significativamente la relajación arterial al BNP en conejos control, pero la inhibió en conejos diabéticos. En presencia de glibenclamida la acción relajante del BNP fue menor en arterias de conejos diabéticos que en arterias de conejos control, es decir,

desapareció la hiperreactividad arterial al BNP en la diabetes. La curva concentración-respuesta al pinacidil, un bloqueante selectivo de los canales K_{ATP} , resultó desplazada a la derecha en arterias de conejos diabéticos en comparación con arterias de conejos control, sin observarse diferencias significativas en los valores de relajación entre ambos grupos de animales. Estos resultados sugieren que la diabetes aumenta la acción mediadora de los canales K_{ATP} en la respuesta relajante de la arteria renal al BNP. En el riñón de rata se ha descrito un aumento de la influencia tónica vasodilatadora de los canales K_{ATP} que contribuye a la hiperfiltración glomerular que aparece en las fases iniciales de la diabetes mellitus (Carmines and Fujiwara, 2002; Carmines, 2010; Troncoso Brindeiro et al., 2012). Por último, el bloqueante selectivo de los canales K_V 4-AP inhibió fuertemente la respuesta relajante de la arteria renal al BNP, tanto en conejos control como en conejos diabéticos. En presencia de 4-AP persistió la mayor potencia del BNP en conejos diabéticos. Estos resultados sugieren que los canales K_V median la respuesta relajante de la arteria renal al BNP, y que la diabetes no modifica la actividad moduladora de estos canales. Aunque los canales K_V contribuyen de forma importante al tono de la arteriola aferente en el riñón normal, no están implicados en la mayor dilatación arteriolar que ocurre durante la diabetes (Troncoso Brindeiro et al., 2008).

3. CONSIDERACIONES FINALES

Como en todo trabajo de investigación experimental, los resultados que se presentan en esta Tesis Doctoral y las conclusiones que se derivan de los mismos están condicionados por el modelo animal y por la metodología utilizada en el estudio, por lo que la extrapolación al paciente es limitada. Los modelos animales permiten un abordaje que sería imposible en pacientes, intentan reproducir la enfermedad, en nuestro caso la diabetes, pero los resultados obtenidos no siempre son extrapolables a la especie humana. La metodología también condiciona los resultados. Los estudios de reactividad

vascular *in vitro* permiten hacer análisis farmacológicos e identificar los mecanismos implicados de la manera más independiente posible. Pero eso mismo, que en principio es una ventaja, puede constituir un inconveniente a la hora de extrapolar los resultados al individuo vivo, donde intervienen una serie de mecanismos reguladores sistémicos que no aparecen en el baño de órganos. El mismo argumento o parecido podría aplicarse a los estudios moleculares. Una cosa es que cambie la expresión de una determinada proteína, y otra bien distinta es que ese cambio tenga importancia fisiológica o fisiopatológica. En cualquier caso, lo que es innegable es que este tipo de estudios permite avanzar en el conocimiento de los mecanismos implicados en los procesos fisiológicos y fisiopatológicos, y permiten identificar posibles dianas terapéuticas.

El estudio que presentamos en esta Tesis Doctoral nos muestra que la diabetes modifica los mecanismos implicados en la regulación de la respuesta relajante de las arterias carótida y renal al BNP. Resulta difícil definir hasta qué punto parte de los cambios observados son responsables de la fisiopatología del daño vascular en la diabetes, o son cambios que reflejan la respuesta del organismo que pone en marcha mecanismos compensadores para intentar recuperar la homeostasis. No obstante, el conocimiento de los mecanismos por los cuales la diabetes produce cambios en la reactividad vascular en los lechos vasculares carotídeo y renal, y las relaciones existentes entre los diversos sistemas reguladores, como los péptidos natriuréticos, el óxido nítrico, los prostanoides o los canales de potasio, podría contribuir al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. También habría que tenerlos en cuenta a la hora de usar fármacos antiinflamatorios, etc., que podrían estar inhibiendo mecanismos protectores dependientes de la COX, por ejemplo.

CONCLUSIONES

La diabetes modifica los mecanismos implicados en la respuesta de la arterias carótida y renal de conejo al BNP:

1. La diabetes produce hiporreactividad de la arteria carótida de conejo al BNP, que puede estar relacionada, por un lado, con una disminución de la expresión de los receptores musculares NPR-A y un aumento de la expresión de los receptores endoteliales NPR-C y, por otro, con una disminución de la liberación de prostaciclina endotelial y una menor participación de los canales de potasio dependientes de ATP K_{ATP} y de los canales de potasio dependientes de voltaje K_V . Considerando que la concentración plasmática de NT-proBNP está aumentada en la diabetes, la hiporreactividad de la arteria carótida al BNP podría ser la expresión de la puesta en marcha de mecanismos compensadores tendentes a mantener constante el flujo sanguíneo cerebral.
2. La diabetes produce hiperreactividad de la arteria renal de conejo al BNP por mecanismos que, al menos, incluyen una menor influencia vasoconstrictora de los prostanoides, que no está relacionada con cambios en la liberación de tromboxano A_2 o prostaciclina, y una mayor actividad moduladora de los canales de potasio dependientes de ATP K_{ATP} y de los canales endoteliales de potasio de intermedia conductancia dependientes del calcio IK_{Ca} .
3. El conocimiento de los cambios que produce la diabetes en los mecanismos que regulan la reactividad de las arterias carótida y renal al BNP puede ayudar a entender las relaciones existentes entre los distintos sistemas reguladores de la fisiología cardiovascular, como los péptidos natriuréticos, los prostanoides o los canales de potasio, y podría contribuir al conocimiento de la fisiopatología de la vasculopatía diabética y al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad J. Management of diabetic nephropathy: Recent progress and future perspective. *Diabetes Metab Syndr.* 2015;9:343-58.
- Alabadí JA, Miranda FJ, Lloréns S, Ruiz de Apodaca RF, Centeno JM, Alborch E. Diabetes potentiates acetylcholine-induced relaxation in rabbit renal arteries. *Eur J Pharmacol* 2001;415:225-32.
- American Diabetes Association. (8) Cardiovascular disease and risk management. *Diabetes Care.* 2015;38 Suppl:S49-57.
- Alexander SPH, Mathie A, Peters JA. Guide to Receptors and Channels (GRAC), 5th edition. *Br J Pharmacol* 2011;164 (Suppl. 1):S1–S324.
- Asakawa H, Fukui T, Tokunaga K, Kawakami F. Plasma brain natriuretic peptide levels in normotensive Type 2 diabetic patients without cardiac disease and macroalbuminuria. *J Diabetes Complications.* 2002;16:209-13.
- Balion C, McKelvie R, Don-Wauchope AC, Santaguida PL, Oremus M, Keshavarz H, Hill SA, Booth RA, Ali U, Brown JA, Bustamam A, Sohel N, Raina P. B-type natriuretic peptide-guided therapy: a systematic review. *Heart Fail Rev.* 2014;19:553-64.
- Bauer J, Ripperger A, Frantz S, Ergün S, Schwedhelm E, Benndorf RA. Pathophysiology of isoprostanes in the cardiovascular system: implications of isoprostane-mediated thromboxane A2 receptor activation. *Br J Pharmacol.* 2014;171:3115-31.
- Bhatraju P, Crawford J, Hall M, Lang JD Jr. Inhaled nitric oxide: Current clinical concepts. *Nitric Oxide.* 2015;50:114-128.
- Böhm M, Voors AA, Ketelslegers JM, Schirmer SH, Turgonyi E, Bramlage P, Zannad F. Biomarkers: optimizing treatment guidance in heart failure. *Clin Res Cardiol.* 2011;100:973-81.

- Bryan PM, Xu X, Dickey DM, Chen Y, Potter LR. Renal hyporesponsiveness to atrial natriuretic peptide in congestive heart failure results from reduced atrial natriuretic peptide receptor concentrations. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;292:F1636-44.
- Capra V, Bäck M, Angiolillo DJ, Cattaneo M, Sakariassen KS. Impact of vascular thromboxane prostanoid receptor activation on hemostasis, thrombosis, oxidative stress, and inflammation. *J Thromb Haemost*. 2014;12:126-37.
- Carmines PK, Fujiwara K. Altered electromechanical coupling in the renal microvasculature during the early stage of diabetes mellitus. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2002;29:143-8.
- Carmines PK. The renal vascular response to diabetes. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2010;19:85-90.
- Carpenter AW, Schoenfisch MH. Nitric oxide release: part II. Therapeutic applications. *Chem Soc Rev*. 2012;41:3742-52.
- Castilla-Guerra L, Fernández-Moreno MC, Hewitt J. Treatment of hyperglycaemia in patients with acute stroke. *Rev Clin Esp*. 2016;216:92-8.
- Chai Q, Xu X, Jia Q, Dong Q, Liu Z, Zhang W, Chen L. Molecular basis of dysfunctional Kv channels in small coronary artery smooth muscle cells of streptozotocin-induced diabetic rats. *Chin J Physiol*. 2007;50:171-7.
- Chiurchiù V, Izzi V, D'Aquilio F, Carotenuto F, Di Nardo P, Baldini PM. Brain Natriuretic Peptide (BNP) regulates the production of inflammatory mediators in human THP-1 macrophages. *Regul Pept*. 2008;148:26-32.
- Cossenza M, Socodato R, Portugal CC, Domith IC, Gladulich LF, Encarnação TG, Calaza KC, Mendonça HR, Campello-Costa P, Paes-de-Carvalho R. Nitric oxide in the

- nervous system: biochemical, developmental, and neurobiological aspects. *Vitam Horm.* 2014;96:79-125.
- de Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci.* 1981;28:89-94.
- de Bold ML, Etchepare A, Martinuk A, de Bold AJ. Cardiac hormones ANF and BNP modulate proliferation in the unidirectional mixed lymphocyte reaction. *J Heart Lung Transplant.* 2010;29:323-6.
- De Paolis P, Nobili V, Lombardi A, Tarasi D, Barbato D, Marchitti S, Ganten U, Brunetti E, Volpe M, Rubattu S. Role of a molecular variant of rat atrial natriuretic Peptide gene in vascular remodeling. *Ann Clin Lab Sci.* 2007;37:135-40.
- De Vito P. Atrial natriuretic peptide: an old hormone or a new cytokine? *Peptides.* 2014;58:108-16.
- Dias RG, Negrão CE, Krieger MH. Nitric oxide and the cardiovascular system: cell activation, vascular reactivity and genetic variant. *Arq Bras Cardiol.* 2011;96:68-75.
- Dick GM, Tune JD. Role of potassium channels in coronary vasodilation. *Exp Biol Med (Maywood)* 2010;235:10-22.
- Ding H, Triggle CR. Endothelial dysfunction in diabetes: multiple targets for treatment. *Pflugers Arch.* 2010;459:977-94.
- Domingueti CP, Dusse LM, Carvalho Md, de Sousa LP, Gomes KB, Fernandes AP. Diabetes mellitus: The linkage between oxidative stress, inflammation, hypercoagulability and vascular complications. *J Diabetes Complications.* 2016;30:738-45.

- Dong DL, Bai YL, Cai BZ. Calcium-Activated Potassium Channels: Potential Target for Cardiovascular Diseases. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2016;104:233-61.
- Dong L, Zheng YM, Van Riper D, Rathore R, Liu QH, Singer HA, et al. Functional and molecular evidence for impairment of calcium-activated potassium channels in type-1 diabetic cerebral artery smooth muscle cells. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008;28:377-86.
- Edelson JD, Makhlina M, Silvester KR, Vengurlekar SS, Chen X, Zhang J, Koziol-White CJ, Cooper PR, Hallam TJ, Hay DW, Panettieri RA Jr. In vitro and in vivo pharmacological profile of PL-3994, a novel cyclic peptide (Hept-cyclo(Cys-His-Phe-d-Ala-Gly-Arg-d-Nle-Asp-Arg-Ile-Ser-Cys)-Tyr-[Arg mimetic]-NH₂) natriuretic peptide receptor-A agonist that is resistant to neutral endopeptidase and acts as a bronchodilator. *Pulm Pharmacol Ther.* 2013;26:229-38.
- Ellinsworth DC, Shukla N, Fleming I, Jeremy JY. Interactions between thromboxane A₂, thromboxane/prostaglandin (TP) receptors, and endothelium-derived hyperpolarization. *Cardiovasc Res.* 2014;102:9-16.
- Ergul, A., Kelly-Cobbs, A., Abdalla, M., Fagan, S.C., 2012. Cerebrovascular complications of diabetes: focus on stroke. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* 12, 148-158.
- Féletou M, Huang Y, Vanhoutte PM. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br J Pharmacol.* 2011;164:894-912.
- Fioretto P, Barzon I, Mauer M. Is diabetic nephropathy reversible? *Diabetes Res Clin Pract.* 2014;104:323-8.
- Fischer M, Katan M, Morgenthaler NG, Seiler M, Müller B, Lackner P, Errath M, Helbok R, Pfausler B, Beer R, Schmutzhard E, Broessner G. The prognostic value of

- midregional proatrial natriuretic peptide in patients with hemorrhagic stroke. *Cerebrovasc Dis.* 2014;37:128-33.
- Flora DR, Potter LR. Prolonged atrial natriuretic peptide exposure stimulates guanylyl cyclase-a degradation. *Endocrinology.* 2010;151:2769-76.
- Fonseca, A.C., Matias, J.S., Pinho e Melo, T., Falcão, F., Canhão, P., Ferro, J.M., 2011. N-terminal probrain natriuretic peptide as a biomarker of cardioembolic stroke. *Int. J. Stroke* 6, 398-403.
- Fuentes-Antrás J, Picatoste B, Gómez-Hernández A, Egido J, Tuñón J, Lorenzo Ó. Updating experimental models of diabetic cardiomyopathy. *J Diabetes Res.* 2015;2015:656795.
- Fuentes B, Castillo J, San José B, Leira R, Serena J, Vivancos J, Dávalos A, Nuñez AG, Egido J, Díez-Tejedor E; Stroke Project of the Cerebrovascular Diseases Study Group, Spanish Society of Neurology. The prognostic value of capillary glucose levels in acute stroke: the GLyemia in Acute Stroke (GLIAS) study. *Stroke.* 2009;40:562-8.
- García-Berrocoso T, Giralt D, Bustamante A, Etgen T, Jensen JK, Sharma JC, Shibazaki K, Saritas A, Chen X, Whiteley WN, Montaner J. B-type natriuretic peptides and mortality after stroke: a systematic review and meta-analysis. *Neurology.* 2013;81:1976-85.
- Gargiulo R, Suhail F, Lerma EV. Cardiovascular disease and chronic kidney disease. *Dis Mon.* 2015;61:403-13.
- Garland CJ, Dora KA. EDH: Endothelium-dependent hyperpolarization and microvascular signaling. *Acta Physiol (Oxf).* 2016 Jan 11. doi: 10.1111/apha.12649. [Epub ahead of print]

- Giannini C, Mohn A, Chiarelli F, Kelnar CJ. Macrovascular angiopathy in children and adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2011;27:436-60.
- Gokina NI, Bonev AD, Phillips J, Gokin AP, Veilleux K, Oppenheimer K, Goloman G. Impairment of IKCa channels contributes to uteroplacental endothelial dysfunction in rat diabetic pregnancy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015;309:H592-604.
- Gollasch M. Vasodilator signals from perivascular adipose tissue. *Br J Pharmacol.* 2012;165:633-42.
- Görmüş U, Ozmen D, Ozmen B, Parildar Z, Ozdoğan O, Mutaf I, Bayindir O. Serum N-terminal-pro-brain natriuretic peptide (NT-pro-BNP) and homocysteine levels in type 2 diabetic patients with asymptomatic left ventricular diastolic dysfunction. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010;87:51-6.
- Gruden G, Landi A, Bruno G. Natriuretic peptides, heart, and adipose tissue: new findings and future developments for diabetes research. *Diabetes Care.* 2014;37:2899-908.
- Guo S, Barringer F, Zois NE, Goetze JP, Ashina M. Natriuretic peptides and cerebral hemodynamics. *Regul Pept.* 2014;192-193:15-23.
- Guo S, Goetze JP, Jeppesen JL, Burnett JC, Olesen J, Jansen-Olesen I, Ashina M. Effect of natriuretic peptides on cerebral artery blood flow in healthy volunteers. *Peptides.* 2015;74:33-42.
- Kizub IV, Klymenko KI, Soloviev AI. Protein kinase C in enhanced vascular tone in diabetes mellitus. *Int J Cardiol.* 2014;174:230-42.
- Hafez S, Coucha M, Bruno A, Fagan SC, Ergul A. Hyperglycemia, acute ischemic stroke, and thrombolytic therapy. *Transl Stroke Res.* 2014;5:442-53.

- Harada S, Fujita-Hamabe W, Tokuyama S. Ischemic stroke and glucose intolerance: a review of the evidence and exploration of novel therapeutic targets. *J Pharmacol Sci.*;118:1-13.
- Heinisch BB, Vila G, Resl M, Riedl M, Dieplinger B, Mueller T, Luger A, Pacini G, Clodi M. B-type natriuretic peptide (BNP) affects the initial response to intravenous glucose: a randomised placebo-controlled cross-over study in healthy men. *Diabetologia.* 2012;55:1400-5.
- Hodes A, Lichtstein D. Natriuretic hormones in brain function. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2014;5:201.
- Högström G, Nordström A, Eriksson M, Nordström P. Risk factors assessed in adolescence and the later risk of stroke in men: a 33-year follow-up study. *Cerebrovasc Dis.* 2015;39:63-71.
- Holcberg G, Kossenjans W, Brewer A, Miodovnik M, Myatt L. The action of two natriuretic peptides (atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide) in the human placental vasculature. *Am J Obstet Gynecol.* 1995;172:71-7.
- Hong DH, Li H, Kim HW, Kim HS, Son YK, Yang SR, Park JR, Ha KS, Han ET, Hong SH, Firth AL, Na SH, Park WS. Alterations of voltage-dependent K⁺ channels in the mesenteric artery during the early and chronic phases of diabetes. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2016 May 24. doi: 10.1111/1440-1681.12599. [Epub ahead of print]
- Horowitz JD, Chong CR, Ngo DT, Sverdlov AL. Effects of acute hyperglycaemia on cardiovascular homeostasis: does a spoonful of sugar make the flow-mediated dilatation go down? *J Thorac Dis.* 2015;7:E607-11.
- Howarth FC, Al-Shamsi N, Al-Qaydi M, Al-Mazrouei M, Qureshi A, Chandranath SI, Kazzam E, Adem A. Effects of brain natriuretic peptide on contraction and

- intracellular Ca^{2+} in ventricular myocytes from the streptozotocin-induced diabetic rat. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1084:155-65.
- Huang C, Pollock CA, Chen XM. $\text{KCa}_3.1$: a new player in progressive kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2015;24:61-6.
- Hubers SA, Brown NJ. Combined Angiotensin Receptor Antagonism and Neprilysin Inhibition. *Circulation.* 2016;133:1115-24.
- Humphries ES, Dart C. Neuronal and Cardiovascular Potassium Channels as Therapeutic Drug Targets: Promise and Pitfalls. *J Biomol Screen.* 2015;20:1055-73.
- Hyman AL, De Witt BJ, Gumusel B, Hao Q, Kadowitz PJ, Lipton HL. L-NAME enhances responses to atrial natriuretic peptide in the pulmonary vascular bed of the cat. *J Appl Physiol (1985).* 2001;90:2101-8.
- IDF Diabetes Atlas, Seventh Edition, 2015. International Diabetes Federation. Online version: www.diabetesatlas.org.
- Igarashi M, Jimbu Y, Hirata A, Tominaga M. Characterization of plasma brain natriuretic peptide level in patients with type 2 diabetes. *Endocr J.* 2005;52:353-62.
- James ML, Wang H, Venkatraman T, Song P, Lascola CD, Laskowitz DT. Brain natriuretic peptide improves long-term functional recovery after acute CNS injury in mice. *J Neurotrauma.* 2010;27:217-28.
- Khan SS, Quaggin SE. Therapies on the Horizon for Diabetic Kidney Disease. *Curr Diab Rep.* 2015;15:111.
- Kelder JC, Cowie MR, McDonagh TA, Hardman SM, Grobbee DE, Cost B, Hoes AW. Quantifying the added value of BNP in suspected heart failure in general practice: an individual patient data meta-analysis. *Heart.* 2011;97:959-63.

- Kim SF. The role of nitric oxide in prostaglandin biology; update. *Nitric Oxide*. 2011;25:255-64.
- Kim SF. The nitric oxide-mediated regulation of prostaglandin signaling in medicine. *Vitam Horm*. 2014;96:211-45.
- Kinoshita H, Azma T, Nakahata K, Iranami H, Kimoto Y, Dojo M, Yuge O, Hatano Y. Inhibitory effect of high concentration of glucose on relaxations to activation of ATP-sensitive K⁺ channels in human omental artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:2290-5.
- Kishimoto I, Tokudome T, Nakao K, Kangawa K. Natriuretic peptide system: an overview of studies using genetically engineered animal models. *FEBS J*. 2011;278:1830-41.
- Korbecki J, Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, Chlubek D. Cyclooxygenase pathways. *Acta Biochim Pol*. 2014;61:639-49.
- Lei C, Wu B, Liu M, Chen Y. Association between hemoglobin A_{1c} levels and clinical outcome in ischemic stroke patients with or without diabetes. *J Clin Neurosci*. 2015;22:498-503.
- Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2008;51:216-26.
- Liu Y, Xie A, Singh AK, Ehsan A, Choudhary G, Dudley S, Sellke FW, Feng J. Inactivation of Endothelial Small/Intermediate Conductance of Calcium-Activated Potassium Channels Contributes to Coronary Arteriolar Dysfunction in Diabetic Patients. *J Am Heart Assoc*. 2015;4:e002062.
- Lloréns S, Miranda FJ, Alabadi JA, Marrachelli VG, Alborch E. Different role of endothelin ETA and ETB receptors and endothelial modulators in diabetes-induced

- hyperreactivity of the rabbit carotid artery to endothelin-1. *Eur J Pharmacol* 2004; 486:43-51.
- Loader J, Montero D, Lorenzen C, Watts R, Méziat C, Reboul C, Stewart S, Walther G. Acute Hyperglycemia Impairs Vascular Function in Healthy and Cardiometabolic Diseased Subjects: Systematic Review and Meta-Analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35:2060-72.
- Lu T, Zhang DM, Wang XL, He T, Wang RX, Chai Q, et al. Regulation of coronary arterial BK channels by caveolae-mediated angiotensin II signaling in diabetes mellitus. *Circ Res.* 2010;106:1164-73.
- Luitse MJ, Biessels GJ, Rutten GE, Kappelle LJ. Diabetes, hyperglycaemia, and acute ischaemic stroke. *Lancet Neurol.* 2012;11:261-71.
- Luo W, Liu B, Zhou Y. The endothelial cyclooxygenase pathway: Insights from mouse arteries. *Eur J Pharmacol.* 2016;780:148-58.
- Madamanchi C, Alhosaini H, Sumida A, Runge MS. Obesity and natriuretic peptides, BNP and NT-proBNP: mechanisms and diagnostic implications for heart failure. *Int J Cardiol.* 2014;176:611-7.
- Majesky MW. Adventitia and perivascular cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35:e31-5.
- Marrachelli VG, Miranda FJ, Alabadí JA, Lloréns S, Alborch E. Contribution of endothelin receptors and cyclooxygenase-derivatives to the altered response of the rabbit renal artery to endothelin-1 in diabetes. *Eur J Pharmacol* 2006;534:178-86.
- Marrachelli VG, Miranda FJ, Centeno JM, Burguete MC, Castelló-Ruiz M, Jover-Mengual T, Pérez AM, Salom JB, Torregrosa G, Alborch E. Mechanisms involved in the

- relaxant action of testosterone in the renal artery from male normoglycemic and diabetic rabbits. *Pharmacol Res.* 2010a;61:149-56.
- Marrachelli VG, Miranda FJ, Centeno JM, Salom JB, Torregrosa G, Jover-Mengual T, Pérez AM, Moro MA, Alborch E. Role of NO-synthases and cyclooxygenases in the hyperreactivity of male rabbit carotid artery to testosterone under experimental diabetes. *Pharmacol Res.* 2010b;61:62-70.
- Marrachelli VG, Centeno JM, Miranda I, Castelló-Ruiz M, Burguete MC, Jover-Mengual T, Salom JB, Torregrosa G, Miranda FJ, Alborch E. Diabetes impairs the atrial natriuretic peptide relaxant action mediated by potassium channels and prostacyclin in the rabbit renal artery. *Pharmacol Res.* 2012;66:392-400.
- Marrachelli VG, Miranda FJ, Centeno JM, Miranda I, Castelló-Ruiz M, Burguete MC, Jover-Mengual T, Salom JB, Torregrosa G, Alborch E. Mechanisms underlying the diabetes-induced hyporeactivity of the rabbit carotid artery to atrial natriuretic peptide. *Pharmacol Res.* 2011;63:190-8.
- Maruyama K, Shiga T, Iijima M, Moriya S, Mizuno S, Toi S, Arai K, Ashihara K, Abe K, Uchiyama S. Brain natriuretic peptide in acute ischemic stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2014;23:967-72.
- McCormack PL. Sacubitril/Valsartan: A Review in Chronic Heart Failure with Reduced Ejection Fraction. *Drugs.* 2016;76:387-96.
- McKenna K, Smith D, Sherlock M, Moore K, O'Brien E, Tormey W, Thompson CJ. Elevated plasma concentrations of atrial and brain natriuretic peptide in type 1 diabetic subjects. *Ir J Med Sci.* 2005;174:53-7.
- McNeish AJ, Jimenez-Altayo F, Cottrell GS, Garland CJ. Statins and selective inhibition of Rho kinase protect small conductance calcium-activated potassium channel function ($K_{Ca2.3}$) in cerebral arteries. *PLoS One.* 2012;7:e46735.

- Medvedev A, Buneeva O, Glover V. Biological targets for isatin and its analogues: Implications for therapy. *Biologics*. 2007;1:151-62.
- Miranda FJ, Alabadí JA, Llorens S, Ruiz de Apodaca RF, Centeno JM, Alborch E. Influence of experimental diabetes on regulatory mechanisms of vascular response of rabbit carotid artery to acetylcholine. *Life Sci* 2000a;66:2071-2080.
- Miranda FJ, Alabadí JA, Lloréns S, Ruiz de Apodaca RF, Centeno JM, Alborch E. Diabetes-induced changes in endothelial mechanisms implicated in rabbit carotid arterial response to 5-hydroxytryptamine. *Eur J Pharmacol* 2000b;401:397-402.
- Miranda FJ, Alabadí JA, Lloréns S, Ruiz de Apodaca RF, Centeno JM, Alborch E. Experimental diabetes induces hyperreactivity of rabbit renal artery to 5-hydroxytryptamine. *Eur J Pharmacol* 2002;439:121-7.
- Mitchell JA, Ahmetaj-Shala B, Kirkby NS, Wright WR, Mackenzie LS, Reed DM, Mohamed N. Role of prostacyclin in pulmonary hypertension. *Glob Cardiol Sci Pract*. 2014;2014:382-93.
- Montaner J, García-Berrocoso T, Mendioroz M, Palacios M, Perea-Gainza M, Delgado P, Rosell A, Slevin M, Ribó M, Molina CA, Alvarez-Sabín J. Brain natriuretic peptide is associated with worsening and mortality in acute stroke patients but adds no prognostic value to clinical predictors of outcome. *Cerebrovasc Dis*. 2012;34:240-5.
- Mori A, Suzuki S, Sakamoto K, Nakahara T, Ishii K. Vasodilation of retinal arterioles induced by activation of BK_{Ca} channels is attenuated in diabetic rats. *Eur J Pharmacol*. 2011;669:94-9.
- Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, de Ferranti S, Després JP, Fullerton HJ, Howard VJ, Huffman MD, Judd SE, Kissela BM, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Liu S, Mackey RH, Matchar DB, McGuire DK, Mohler

- ER 3rd, Moy CS, Muntner P, Mussolino ME, Nasir K, Neumar RW, Nichol G, Palaniappan L, Pandey DK, Reeves MJ, Rodriguez CJ, Sorlie PD, Stein J, Towfighi A, Turan TN, Virani SS, Willey JZ, Woo D, Yeh RW, Turner MB; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2015;131:e29-322.
- Muzaffar S, Shukla N, Massey Y, Angelini GD, Jeremy JY. NADPH oxidase 1 mediates upregulation of thromboxane A2 synthase in human vascular smooth muscle cells: inhibition with iloprost. *Eur J Pharmacol*. 2011;658:187-92.
- Nakagawa K, Vento MA, Ing MM, Asai SM. Impact of diabetes on prolonged hospital stay among Native Hawaiians and other Pacific Islanders with ischemic stroke. *Hawaii J Med Public Health*. 2014;73(12 Suppl 3):4-7.
- Nannipieri M, Seghieri G, Catalano C, Prontera T, Baldi S, Ferrannini E. Defective regulation and action of atrial natriuretic peptide in type 2 diabetes. *Horm Metab Res*. 2002;34:265-270.
- Nieves-Cintrón M, Nystoriak MA, Prada MP, Johnson K, Fayer W, Dell'Acqua ML, Scott JD, Navedo MF. Selective down-regulation of KV2.1 function contributes to enhanced arterial tone during diabetes. *J Biol Chem*. 2015;290:7918-29.
- Nystoriak MA, Nieves-Cintrón M, Nygren PJ, Hinke SA, Nichols CB, Chen CY, Puglisi JL, Izu LT, Bers DM, Dell'acqua ML, Scott JD, Santana LF, Navedo MF. AKAP150 contributes to enhanced vascular tone by facilitating large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel remodeling in hyperglycemia and diabetes mellitus. *Circ Res*. 2014;114:607-15.

- Obineche E, Chandranath I, Adeghate E, Benedict S, Fahim M, Adem A. Alterations in atrial natriuretic peptide and its receptor levels in long-term, streptozotocin-induced, diabetes in rats. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1084:223-34.
- Oliveira-Paula GH, Lacchini R, Tanus-Santos JE. Endothelial nitric oxide synthase: From biochemistry and gene structure to clinical implications of NOS3 polymorphisms. *Gene.* 2016;575:584-99.
- Orasanu G, Plutzky J. The pathologic continuum of diabetic vascular disease. *J Am Coll Cardiol.* 2009;53(5 Suppl):S35-42.
- Otsuka K, Tanaka H, Horinouchi T, Koike K, Shigenobu K, Tanaka Y. Functional contribution of voltage-dependent and Ca^{2+} activated K^+ (BK_{Ca}) channels to the relaxation of guinea-pig aorta in response to natriuretic peptides. *J Smooth Muscle Res.* 2002;38:117-29.
- Pandey KN. Emerging Roles of Natriuretic Peptides and their Receptors in Pathophysiology of Hypertension and Cardiovascular Regulation. *J Am Soc Hypertens.* 2008;2:210-26.
- Pandey KN. Guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor-A signaling antagonizes phosphoinositide hydrolysis, Ca^{2+} release, and activation of protein kinase C. *Front Mol Neurosci.* 2014;7:75.
- Pereira NL, Tosakulwong N, Scott CG, Jenkins GD, Prodduturi N, Chai Y, Olson TM, Rodeheffer RJ, Redfield MM, Weinshilboum RM, Burnett JC Jr. Circulating ANP Genetic Association Study Identifies a Novel Gene Cluster Associated with Stroke in Caucasians. *Circ Cardiovasc Genet.* 2014 Dec 1. pii: CIRCGENETICS.114.000624. [Epub ahead of print]
- Pereira NL, Tosakulwong N, Scott CG, Jenkins GD, Prodduturi N, Chai Y, Olson TM, Rodeheffer RJ, Redfield MM, Weinshilboum RM, Burnett JC. Circulating atrial

- natriuretic peptide genetic association study identifies a novel gene cluster associated with stroke in whites. *Circ Cardiovasc Genet*. 2015;8:141-9.
- Petkov GV. Ion channels (chapter 16). En: *Pharmacology, Principles and Practice*. Miles Hacker, William Messer and Kenneth Bachmann (Eds.). Elsevier Inc. 2009.
- Poggesi A, Pasi M, Pescini F, Pantoni L, Inzitari D. Circulating biologic markers of endothelial dysfunction in cerebral small vessel disease: a review. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2016;36:72-94.
- Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev*. 2006;27:47-72.
- Pries AR, Secomb TW and Gaehtgens P. The endothelial surface layer. *Pflugers Arch*. 2000; 440: 653–666.
- Qian L, Liu X, Wang R. Role of BK_{Ca} channels in diabetic vascular complications. *Chin Med J (Engl)*. 2014;127:1775-81.
- Ramos HR, Birkenfeld AL, de Bold AJ. INTERACTING DISCIPLINES: Cardiac natriuretic peptides and obesity: perspectives from an endocrinologist and a cardiologist. *Endocr Connect*. 2015;4:R25-36.
- Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med*. 2005;22:359-70.
- Ronco C. Cardiorenal syndromes: definition and classification. *Contrib Nephrol*. 2010;164:33-8.
- Rost, N.S., Biffi, A., Cloonan, L., Chorba, J., Kelly, P., Greer, D., Ellinor, P., Furie, K.L., 2012. Brain natriuretic peptide predicts functional outcome in ischemic stroke. *Stroke* 43, 441-445.

- Rubattu S, Stanzione R, Di Angelantonio E, Zanda B, Evangelista A, Tarasi D, Gigante B, Pirisi A, Brunetti E, Volpe M. Atrial natriuretic peptide gene polymorphisms and risk of ischemic stroke in humans. *Stroke*. 2004;35:814-8.
- Sabrane K, Kruse MN, Gazinski A, Kuhn M. Chronic endothelium-dependent regulation of arterial blood pressure by atrial natriuretic peptide: role of nitric oxide and endothelin-1. *Endocrinology*. 2009;150:2382-7.
- Said A, Desai C, Lerma EV. Chronic kidney disease. *Dis Mon*. 2015;61:374-7.
- Saito Y. Roles of atrial natriuretic peptide and its therapeutic use. *J Cardiol*. 2010;56:262-70.
- Sakata N, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, Egawa S, Unno M. Animal models of diabetes mellitus for islet transplantation. *Exp Diabetes Res*. 2012;2012:256707.
- Santamarina E, Penalba A, García-Berrocoso T, Delgado P, Quintana M, González-Alujas T, Ribó M, Maisterra O, Molina CA, Evangelista A, Alvarez-Sabín J, Montaner J. Biomarker level improves the diagnosis of embolic source in ischemic stroke of unknown origin. *J Neurol*. 2012;259:2538-45.
- Satirapoj B, Adler SG. Comprehensive approach to diabetic nephropathy. *Kidney Res Clin Pract*. 2014;33:121-31.
- Schach C, Resch M, Schmid PM, Riegger GA, Endemann DH. Type 2 diabetes: increased expression and contribution of IKCa channels to vasodilation in small mesenteric arteries of ZDF rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014;307:H1093-102.
- Schlueter N, de Sterke A, Willmes DM, Spranger J, Jordan J, Birkenfeld AL. Metabolic actions of natriuretic peptides and therapeutic potential in the metabolic syndrome. *Pharmacol Ther*. 2014;144:12-27.

- Seki N, Matsumoto T, Fukazawa M. Relationship between the brain natriuretic peptide (BNP) level and remission of diabetic nephropathy with microalbuminuria: a 3-year follow-up study. *Horm Metab Res.* 2015;47:138-44.
- Seki N, Nishimura M, Matsumoto T, Fukazawa M, Kenmochi T. Relationship between BNP level and renal function in diabetic nephropathy with microalbuminuria. *J Diabetes Complications.* 2013;27:92-7.
- Senmaru T, Fukui M, Tanaka M, Sakabe K, Ushigome E, Asano M, Yamazaki M, Hasegawa G, Nakamura N. N-terminal pro-brain natriuretic peptide could be a marker of subclinical atherosclerosis in patients with type 2 diabetes. *Heart Vessels.* 2013;28:151-6.
- Song W, Wang H, Wu Q. Atrial natriuretic peptide in cardiovascular biology and disease (NPPA). *Gene.* 2015;569:1-6.
- Sorensen CM, Braunstein TH, Holstein-Rathlou NH, Salomonsson M. Role of vascular potassium channels in the regulation of renal hemodynamics. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012;302:F505-18.
- Srinivas NR. Strategies for preclinical pharmacokinetic investigation in streptozotocin-induced diabetes mellitus (DMIS) and alloxan-induced diabetes mellitus (DMIA) rat models: case studies and perspectives. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2015;40:1-12.
- Stenmark KR, Yeager ME, El Kasmi KC, Nozik-Grayck E, Gerasimovskaya EV, Li M, Riddle SR, Frid MG. The adventitia: essential regulator of vascular wall structure and function. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:23-47.
- Stitham J, Hwa J. Prostacyclin, Atherothrombosis and Diabetes Mellitus: Physiologic and Clinical Considerations. *Curr Mol Med.* 2016;16:328-42.

- Taskapan H, Taskapan MC, Orman I, Ulutas O, Yigit A, Ozyalin F, Yologlu S. NGAL and NT-proBNP levels in diabetic patients with macroproteinuria. *Ren Fail.* 2013;35:1273-7.
- Theilade S, Hansen TW, Goetze JP, Rossing P. Increased plasma concentrations of midregional proatrial natriuretic Peptide is associated with risk of cardiorenal dysfunction in type 1 diabetes. *Am J Hypertens.* 2015;28:772-9.
- Thomson SC, Vallon V, Blantz RC. Kidney function in early diabetes: the tubular hypothesis of glomerular filtration. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004;286:F8-15.
- Toth-Manikowski S, Atta MG. Diabetic Kidney Disease: Pathophysiology and Therapeutic Targets. *J Diabetes Res.* 2015;2015:697010.
- Troncoso Brindeiro CM, Fallet RW, Lane PH, Carmines PK. Potassium channel contributions to afferent arteriolar tone in normal and diabetic rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008;295:F171-8.
- Troncoso Brindeiro CM, Lane PH, Carmines PK. Tempol prevents altered K⁺ channel regulation of afferent arteriolar tone in diabetic rat kidney. *Hypertension.* 2012;59:657-64.
- Tummala R, Bhadra R, Gupta A, Ghosh RK. Combined neprilysin and RAS inhibition in cardiovascular diseases: A review of clinical studies. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2016 Apr 15. [Epub ahead of print].
- Vallon V, Thomson SC. Renal function in diabetic disease models: the tubular system in the pathophysiology of the diabetic kidney. *Annu Rev Physiol.* 2012;74:351-75.
- van der Zander K, Houben AJ, Kroon AA, De Mey JG, Smits PA, de Leeuw PW. Nitric oxide and potassium channels are involved in brain natriuretic peptide induced vasodilatation in man. *J Hypertens.* 2002;20:493-9.

- Vervoort G, Veldman B, Berden JH, Smits P, Wetzels JF. Glomerular hyperfiltration in type 1 diabetes mellitus results from primary changes in proximal tubular sodium handling without changes in volume expansion. *Eur J Clin Invest.* 2005;35:330-6.
- Vesely DL, Gower WR Jr, Dietz JR, Overton RM, Clark LC, Antwi EK, Farese RV. Elevated atrial natriuretic peptides and early renal failure in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Metabolism.* 1999;48:771-8.
- Volpe M. Natriuretic peptides and cardio-renal disease. *Int J Cardiol.* 2014;176:630-9.
- Walther T, Heringer-Walther S, Tschöpe R, Reinecke A, Schultheiss HP, Tschöpe C. Opposite regulation of brain and C-type natriuretic peptides in the streptozotocin-diabetic cardiopathy. *J Mol Endocrinol.* 2000;24:391-5.
- Welsh, P., McMurray, J.J., 2012. B-type natriuretic peptide and glycaemia: an emerging cardiometabolic pathway? *Diabetologia* 55, 1240-1243.
- Wiersma JJ, van der Zee PM, van Straalen JP, Fischer JC, van Eck-Smit BL, Tijssen JG, Trip MD, Piek JJ, Verberne HJ. NT-pro-BNP is associated with inducible myocardial ischemia in mildly symptomatic type 2 diabetic patients. *Int J Cardiol.* 2010;145:295-6.
- Xu RS. Pathogenesis of diabetic cerebral vascular disease complication. *World J Diabetes.* 2015;6:54-66.
- Yeğen E, Akçay F, Yiğitoğlu MR, Celik I, Suzek H, Odabaşioğlu F. Plasma atrial natriuretic peptide levels in rabbits with alloxan monohydrate-induced diabetes mellitus. *Jpn Heart J* 1995; 36:789-795.
- Zhao LM, Su XL, Wang Y, Li GR, Deng XL. KCa3.1 channels mediate the increase of cell migration and proliferation by advanced glycation end products in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Lab Invest.* 2013;93:159-67.

Zhao LM, Zhang W, Wang LP, Li GR, Deng XL. Advanced glycation end products promote proliferation of cardiac fibroblasts by upregulation of KCa3.1 channels. *Pflugers Arch.* 2012;464:613-21.

Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SW. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J Pharmacol Sci.* 2015;129:83-94.

Zhou HL, Fiscus RR. Brain natriuretic peptide (BNP) causes endothelium-independent relaxation and elevation of cyclic GMP in rat thoracic aorta. *Neuropeptides.* 1989;14:161-9.