



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología.

Departamento de Fisiología.

Programa de Doctorado en Fisiología.

Alteraciones vasculares inducidas por un modelo de síndrome metabólico en conejo

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Marc Gimeno Raga

Dirigida por:

Dra. María Dolores Mauricio Aviñó

Dr. Martín Aldasoro Celaya

Dra. Lilian Soraya Vallés Martí

Valencia, enero 2019

TESIS DOCTORAL

Alteraciones vasculares inducidas por un modelo de síndrome metabólico en conejo



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Programa de Doctorado en Fisiología.

Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina y Odontología.

Presentada por:

Marc Gimeno Raga

Dirigida por:

Dra. María Dolores Mauricio Aviñó

Dr. Martín Aldasoro Celaya

Dra. Lilian Soraya Vallés Martí

Valencia, enero 2019

Dña **María Dolores Mauricio Aviñó**, Profesora Contratada Doctora del Departamento de Fisiología de la Universitat de València.

D. **Martín Aldasoro Celaya**, Catedrático del Departamento de Fisiología de la Universitat de València.

Dña. **Lilian Soraya Vallés Martí**, Profesora Titular del Departamento de Fisiología de la Universitat de València.

CERTIFICAN:

Que la presente memoria, titulada *“Alteraciones vasculares inducidas por un modelo de síndrome metabólico en conejo”*, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por D. Marc Gimeno Raga, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Fisiología de la Universitat de València.

Y para que conste firman el presente certificado en Valencia, a 29 de enero de 2019.

Fdo.:

María Dolores Mauricio Aviñó

Fdo.:

Martín Aldasoro Celaya

Fdo.:

Lilian Soraya Vallés Martí

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi directora, la Dra. María Dolores Mauricio, por haberme introducido en el grupo de investigación, formado en el aprendizaje de la técnica de baño de órganos y guiado a lo largo de todo el período doctoral. A mis directores, el Dr. Martín Aldasoro y la Dra. Soraya Vallés por su atención, disponibilidad y aprendizaje durante las conversaciones vespertinas en el laboratorio.

Siguiendo con el equipo de trabajo, es necesario mencionar al Dr. José M. Vila, Catedrático de Fisiología y director científico del Grupo de Investigación Vascular por haberme permitido realizar la tesis doctoral en su equipo.

A mis compañeras, la Dra Patricia Marchio y Solanye Guerra, con quienes he pasado tantas horas en el laboratorio, por la ayuda prestada en los experimentos y especialmente porque me han hecho sentir bienvenido y respaldado en todo momento.

Merece una mención especial el Grupo de Electrofisiología Cardíaca Experimental (GRELCA) dirigido por el Dr. Luis Such. En particular, quiero agradecer al Dr. Manolo Zarzoso el habernos cedido el modelo experimental de síndrome metabólico, sin el cual, la realización de esta tesis hubiera sido imposible. Quiero expresar mi agradecimiento a cada uno de los integrantes de dicho grupo de investigación, los Dres. Antonio Alberola, Luis Such Miquel, Óscar Julián Arias-Mutis, Carlos Soler, Irene del Canto y Patricia Genovés, quienes tan afectuosamente me han recibido, haciéndome sentir uno más entre ellos.

También quiero agradecer al equipo de secretaría del departamento de Fisiología, en especial a Mari, por su atención y alegría, así como a Inma, por compartir tantas conversaciones conmigo.

Finalmente, me gustaría cerrar los agradecimientos con las personas más importantes en mi vida, sin las cuales esto no habría sido posible, mis padres, Juan y Mari, quienes han estado apoyándome en todo estos años y a quienes les debo todo en la vida.

Tabla de contenido

ABREVIATURAS.....	11
INTRODUCCIÓN	19
SÍNDROME METABÓLICO: HISTORIA Y ANTECEDENTES	21
EL ENDOTELIO Y LA HOMEOSTASIS VASCULAR	26
<i>Factores relajantes derivados del endotelio</i>	<i>26</i>
<i>Factores contráctiles derivados del endotelio</i>	<i>29</i>
<i>Disfunción endotelial</i>	<i>30</i>
FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR.....	31
<i>Obesidad central.....</i>	<i>31</i>
<i>Dislipemia</i>	<i>35</i>
<i>Hipertensión</i>	<i>38</i>
<i>Hiperglucemia.....</i>	<i>42</i>
<i>Resistencia a la insulina</i>	<i>45</i>
SÍNDROME METABÓLICO Y FUNCIÓN VASCULAR	48
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	51
METODOLOGÍA.....	55
GRUPOS DE ESTUDIO.....	57
MEDICIONES Y EXTRACCIÓN DE MUESTRAS	58
CARACTERIZACIÓN DEL MODELO.....	59
ESTUDIO DE LA REACTIVIDAD VASCULAR.....	62
<i>Preparación y aislamiento de las muestras para el estudio de la reactividad vascular.....</i>	<i>62</i>
<i>Determinación de la tensión pasiva óptima</i>	<i>63</i>
<i>Obtención de las curvas concentración-respuesta</i>	<i>64</i>
ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN PROTEICA POR WESTERN BLOT.....	64
<i>Separación y transferencia de las proteínas</i>	<i>65</i>
<i>Immunodetección</i>	<i>66</i>
ANÁLISIS DE LOS DATOS	68

RESULTADOS	69
ESTUDIO DE LA RESPUESTA VASCULAR CONTRÁCTIL EN AORTA, ARTERIA CARÓTIDA Y ARTERIA RENAL	71
<i>Respuesta al cloruro potásico (KCl)</i>	<i>71</i>
<i>Respuesta a la norepinefrina</i>	<i>73</i>
<i>Respuesta a la endotelina-1</i>	<i>75</i>
ESTUDIO DE LA RESPUESTA VASCULAR RELAJANTE EN AORTA, ARTERIA CARÓTIDA Y ARTERIA RENAL	77
<i>Respuesta a la acetilcolina</i>	<i>77</i>
<i>Respuesta al nitroprusiato sódico.....</i>	<i>80</i>
ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN PROTEICA.....	82
DISCUSIÓN.....	93
VENTAJAS Y LIMITACIONES	95
<i>Justificación de la elección de especie y de los vasos de estudio</i>	<i>95</i>
<i>Efectos de la dieta.....</i>	<i>97</i>
RESPUESTA CONTRÁCTIL	98
<i>Respuesta contráctil inespecífica.....</i>	<i>98</i>
<i>Respuesta contráctil específica.....</i>	<i>99</i>
RESPUESTA RELAJANTE	103
INFLAMACIÓN VASCULAR Y ESTRÉS OXIDATIVO.....	107
VÍA PPAR γ /AKT/eNOS/NO	108
PROGRESIÓN DEL SMET Y SU RELACIÓN CON LA DISFUNCIÓN VASCULAR	111
CONCLUSIONES	113
BIBLIOGRAFÍA.....	117

Abreviaturas

AACE	Asociación Americana de Endocrinólogos Clínicos
Ach	Acetilcolina
ADMA	Dimetilmetilarginina asimétrica
AGEs	Glicosilación avanzada de proteínas
AHA/NHLBI	Asociación Americana del Corazón e Instituto Nacional del Corazón, Pulmón y Sangre
AMP	Adenosin monofosfato
AMPC	Adenosin monofosfato cíclico
AMPK	Adenosin monofosfato cinasa
AR	Receptor adrenérgico
AT-II	Angiotensina II
AT1R	Receptor 1 de la angiotensina II
AT2R	Receptor 2 de la angiotensina II
ATP III	Panel de tratamiento para adultos III
BCA	Ácido bicinconínico
BH4	Tetrahidrobiopterina
BKCa	Canales de potasio activados por calcio de alta conductancia
BSA	Seroalbúmina bovina
CE ₅₀	Concentración eficaz ₅₀

Abreviaturas

cHDL	Lipoproteínas de colesterol de alta densidad
COX	Ciclooxigenasa
Cu/Zn-SOD	Cobre/zinc superóxido dismutasa
DAG	Diacilglicerol
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
EDH	Hiperpolarización derivada del endotelio
EDHF	Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
EGIR	Grupo Europeo para el Estudio de la Resistencia a la Insulina
eNOS / NOS I	Óxido nítrico sintasa endotelial
ERK	Proteína cinasa reguladora de señales extracelulares
ET-1	Endotelina-1
ET-A	Receptor A para la endotelina-1
ET-B	Receptor B para la endotelina-1
FID	Federación Internacional de Diabetes
GAA	Glucosa alterada en ayunas
GCs	Guanilato ciclasa soluble
GMP	Guanosín monofosfato
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GTP	Guanosín trifosfato
HTA	Hipertensión arterial

ICC	Índice cintura cadera
IKCa	Canales de potasio activados por calcio de intermedia conductancia
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de masa corporal
iNOS / NOS III	Óxido nítrico sintasa inducible
IP ₃	Inositol trifosfato
IRS-1	Sustrato 1 del receptor de insulina
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LDLox	Lipoproteínas de baja densidad oxidada
Lox-1	Receptor 1 de las LDLox
MAPK	Proteína cinasa activadora de mitogeno
MEK	Proteína activadora de la mitogen cinasa
Mn-SOD	Manganeso superóxido dismutasa
NADPH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato
NADPHox	Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato oxidasa
NCEP ATP III	Programa Nacional para la Educación en el Tratamiento del Colesterol en Adultos Panel III
NE	Norepinefrina

Abreviaturas

NF-KB	Factor nuclear potenciador de cadenas ligeras kappa de las células B activadas
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
NOS	Óxido nítrico sintasa
Nox-4	NADPH oxidasa 4
NP	Nitroprusiato sódico
OC	Obesidad central
OMS	Organización mundial de la salud
ONOO ⁻	Peroxinitrito
P-Akt	Akt fosforilada
PA	Presión arterial
PAD	Presión arterial diastólica
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno 1
PAM	Presión arterial media
PAS	Presión arterial sistólica
PC	Perímetro de la cintura
PCR	Proteína C reactiva
PD	Presión diastólica
pD2	-log CE ₅₀
PGI ₂	Prostaciclina

PIK-3	Fosfatidilinositol 3 cinasa
PKC	Proteína cinasa C
PPAR γ	Receptor gamma activado por proliferadores peroxisómicos
pro-ET	Proendotelina
PS	Presión sistólica
PVAT	Tejido adiposo perivascular
RAS	Sistema renina-angiotensina
RONS	Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno
SKCa	Canales de potasio activados por calcio de baja conductancia
SMet	Síndrome metabólico
SNS	Sistema nervioso simpático
SOD	Superóxido dismutasa
TG	Triglicéridos
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TP	Receptor del tromboxano A ₂
TXA ₂	Tromboxano A ₂

Introducción

Síndrome metabólico: historia y antecedentes

El síndrome metabólico (SMet) es un conjunto de factores que aumentan el riesgo de padecer diabetes y enfermedades cardiovasculares¹. La primera descripción del concepto actual de SMet tuvo lugar en 1922, cuando el médico sueco Eskil Kylin describió la relación entre la obesidad, las complicaciones metabólicas y el estilo de vida^{2,3}. Posteriormente, en 1947, Vague asoció la obesidad a enfermedades cardiovasculares⁴ y en 1965, Avogadro y Crepaldi describieron un síndrome que conjugaba hipertensión, hiperglucemia y obesidad⁵. Raven en 1988 definió el “Síndrome X”; una agrupación de factores de riesgo que predisponían para la diabetes y las enfermedades cardiovasculares⁶. Después, Kaplan le atribuyó el nombre de “El cuarteto mortal” a la combinación de obesidad central, intolerancia a la glucosa, hipertrigliceridemia e hipertensión⁷. El último nombre que recibió antes de “síndrome metabólico” fue el de “síndrome de resistencia a la insulina”⁸.

En 1998 la Organización Mundial de la Salud (OMS) emitió la primera definición de SMet⁹. Ésta recalca la importancia de la resistencia a la insulina, siendo necesaria para el diagnóstico, además de dos de los siguientes factores: obesidad, hipertensión, niveles altos de triglicéridos, niveles reducidos de lipoproteínas de alta densidad o microalbuminuria (tabla 1). La visión de la insulina como factor principal en el diagnóstico era compartida por el Grupo Europeo del Estudio de Resistencia a la Insulina¹⁰. Por el contrario, la presencia de resistencia a la insulina no se requería para el diagnóstico del SMet según los criterios del Panel de Tratamiento del Adulto III (ATP III) (Tabla 1)¹¹. En este caso, la presencia de tres de los cinco factores de riesgo sería suficiente para diagnosticarlo. Los factores son: la obesidad abdominal (directamente

Introducción

relacionada con la resistencia a la insulina), triglicéridos elevados, lipoproteínas de colesterol de alta densidad reducidas, presión arterial aumentada y niveles de glucosa elevados en ayunas (o diabetes mellitus tipo 2). Según estos criterios, un paciente podría ser diagnosticado de SMet sin ser diabético tipo 2, de hecho, en este caso o en ausencia de factores de riesgo cardiovascular, el estar diagnosticado con SMet supondría un factor de riesgo cardiovascular y de diabetes.

Tabla 1: Principales criterios diagnósticos de síndrome metabólico según las diferentes organizaciones. DM2: Diabetes mellitus tipo 2; IR: Insulinorresistencia; IMC: índice de masa corporal; ICC: índice cintura cadera; TG: triglicéridos; PA: presión arterial; cHDL: lipoproteína de colesterol de alta densidad PC: perímetro de la cintura; GB: glucemia basal; IAG: intolerancia a la glucosa; GAA: glucosa en ayunas alterada; OC: obesidad central; HTA: hipertensión arterial; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; OMS: Organización Mundial de la Salud; EGIR: Grupo Europeo para el Estudio de la Resistencia a la Insulina; ATP III: Panel de tratamiento para adultos III; AACE: Asociación Americana de Endocrinólogos Clínicos; AHA/NHLBI: Asociación Americana del Corazón e Instituto Nacional del corazón, Pulmón y Sangre; FID: Federación Internacional de Diabetes

OMS (1999)	EGIR (1999)	ATPIII (2001)	AAACE (2003)	AHA/NHBLI (2004)	FID (2005)
<p>Presencia de DM2 o glucemia basal alterada.</p> <p>-Intolerancia a la glucosa o IR (captación de glucosa <25% tras clamp euglicémico hiperinsulinémico).</p> <p>Además, 2 ó más de estos factores:</p> <p>-IMC >30 y/o ICC >0,9 (varones) o >0,85 (mujeres),</p> <p>-TG≥150 mg/dl y/o CHDL<35 mg/dl (varones) <39 mg/dl (mujeres).</p> <p>-PA ≥140/90 mm/Hg.</p> <p>- Microalbuminuria 20 µg/min o albumina/creatinina 30 mg/g.</p>	<p>Presencia de IR (insulinemia basal > percentil 75), en población no diabética.</p> <p>Además, 2 o más de estos factores:</p> <p>-PC ≥94cm (varones) o ≥80cm (mujeres).</p> <p>-TG≥175 mg/dl o CHDL<40 mg/dl o tratamiento específico.</p> <p>-PA≥140/90mmHg, o normotensión debido a tratamiento específico.</p> <p>GB ≥ 110 mg/dl (no diabetes).</p>	<p>Presencia de 3 o más de estos factores:</p> <p>-PC >102 cm (varones) o >88 cm (mujeres).</p> <p>-TG ≥150 mg/dl</p> <p>-CHDL <40 mg/dl (varones) o <50 mg/dl (mujeres).</p> <p>-PA ≥130/85 mmHg.</p> <p>-GB ≥110 mg/dl.</p>	<p>IAG/GAA con cualquiera de los siguientes factores:</p> <p>IMC ≥25 kg/m²</p> <p>-TG≥150 mg/dl o CHDL <40 mg/dl en varones y <50 mg/dl en mujeres o tratamiento específico.</p> <p>-PA≥135 /85 mm/Hg o tratamiento específico.</p> <p>-GB≥110 mg/dl (no diabetes).</p>	<p>-OC (definida por PC>102cm en hombres y >88cm en mujeres)</p> <p>-TG (≥1.7 mmol/L),</p> <p>-cHDL ≤40 mg/dl en varones o ≤50 mg/dl en mujeres o con tratamiento específico para esta alteración lipídica.</p> <p>-HTA (≥135/85 mmHg)</p> <p>-GAA (≥6.1 mmol/L).</p>	<p>OC (definida por PC a partir de 94 cm para varones europeos y 80 cm para mujeres europeas).</p> <p>Además, 2 o más de los siguientes factores:</p> <p>-TG≥150 mg/dl o tratamiento específico de esta alteración lipídica.</p> <p>-cHDL<40 mg/dl (varones) o <50 mg/dl (mujeres) tratamiento específico para esta alteración lipídica.</p> <p>-PA≥130 mm/Hg o PAD≥85 mm/Hg o tratamiento de HTA diagnosticada previamente.</p> <p>-GB≥100 mg/dl o DM2 diagnosticada previamente.</p>

Introducción

Durante las últimas décadas ha habido varias definiciones de SMet según las distintas organizaciones (Tabla 1), generando controversia y dificultando su diagnóstico. Así pues, ante la necesidad de unificar criterios, en 2009 se publica una declaración científica conjunta en la que participan la Federación Internacional de Diabetes (IFD), la Asociación Americana del Corazón/ Instituto Nacional del Corazón, Pulmón y Sangre (AHA/NHLBI), la Federación Mundial del Corazón y la Sociedad Internacional de la Aterosclerosis y la Asociación Internacional para el estudio de la Obesidad¹. De este consenso se establece que, para diagnosticar el SMet son necesarios al menos tres de estos cinco factores:

1. Obesidad central, diagnosticada por el perímetro abdominal incrementado^{1,12}. Cabe recordar que los valores establecidos para el perímetro abdominal son diferentes según el género y la etnia¹³⁻¹⁶. También se modifican si la población abarca niños y adolescentes^{17,18}.
2. Disglucemia o prediabetes, establecida por la glucemia basal en ayunas >100 mg/dl.
3. Aumento de la presión sanguínea, sistólica ≥ 130 y/o diastólica ≥ 85 mm Hg. El tratamiento para la hipertensión es un indicador alternativo.
4. Niveles plasmáticos elevados de triglicéridos ≥ 150 mg/dl. El tratamiento para los triglicéridos elevados es un indicador alternativo.
5. Niveles plasmáticos bajos de lipoproteínas de alta densidad (cHDL). En varones <40 mg/dl y en mujeres <50 mg/dl.

Por otra parte, se estima que la prevalencia del SMet es alta en los países desarrollados y que tiene una fuerte conexión con la dieta y el estilo de vida. Sin embargo, a nivel mundial es difícil establecer qué prevalencia tiene el

SMet debido a los diferentes criterios de diagnóstico. La tabla 2 muestra algunos estudios que establecen la prevalencia del SMet en diferentes regiones del planeta^{13-16,19-21}.

Tabla 2: Prevalencia del SMet en función de la región.

Región	Año de Publicación	Prevalencia (%)	Criterios para el diagnóstico del SMet
Asia-Pacífico ¹³	2017	11,9 - 49,0	FID, NCEP ATP III, AHA/NHLBI
África ¹⁵	2012	12,5 - 63,6	FID, NCEP ATP III, OMS
América Central ¹⁹	2015	23,0 - 35,1	ATP III
Europa ¹⁶	2015	23,9 - 24,6	ATP III
Medio Este ¹⁴	2012	13,6 - 41,6	FID, NCEP ATP III, ATP III/AHA/NHLBI
América del Sur ²⁰	2009	14 - 27	NCEP ATP III
Estados Unidos ²¹	2017	34,2	Consenso de SMet

FID: Federación Internacional de Diabetes; NCEP ATP III: Programa nacional para la educación en el tratamiento del colesterol en Adultos Panel III; AHA/NHLBI Asociación Americana del Corazón e Instituto Nacional del corazón, Pulmón y Sangre; OMS: Organización Mundial de la Salud; SMet: Síndrome metabólico.

El endotelio y la homeostasis vascular

El endotelio es una monocapa de células que recubre la cara interna del sistema vascular y linfático²²⁻²⁴. Su función sobre el tono vascular fue descrita en 1980, por Robert F. Furchgott²⁵. El endotelio responde a estímulos físicos²⁶ y químicos²⁶⁻²⁹ liberando sustancias que regulan la homeostasis vascular. Por lo tanto, el endotelio controla el tono vascular, y como consecuencia el flujo sanguíneo, manteniendo el balance entre la liberación de sustancias contráctiles y relajantes. También regula la reactividad de las células circulantes e interviene en las respuestas inmune, inflamatoria y hemostática^{23,30}. Por consiguiente, la disfunción endotelial afecta negativamente a la homeostasis vascular ya que representa un desequilibrio en la producción de sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras derivadas del endotelio, con tendencia a la vasoconstricción.

Factores relajantes derivados del endotelio

Los principales factores involucrados en la relajación mediada por el endotelio son la prostaciclina (PGI_2), el óxido nítrico (NO) y la hiperpolarización derivada del endotelio (EDH).

Prostaciclina

La PGI_2 se forma a partir del ácido araquidónico, que por acción de las ciclooxigenasas (COXs) da lugar a la prostaglandina G_2 y posteriormente a la prostaglandina H_2 ³¹. A partir de aquí puede tomar dos caminos, si actúa la prostaciclina sintasa se forma la PGI_2 y si actúa la tromboxano sintasa se forma el tromboxano A_2 (TXA_2)³¹. La PGI_2 induce relajación del músculo liso vascular mediante la activación de los receptores IP, que son proteínas G ligadas a la

adenilato ciclasa, produciendo un aumento de adenosín monofosfato (AMP) cíclico (AMPC)³⁰.

Óxido nítrico

El NO es un radical libre²⁸ formado a partir de la L-arginina en un proceso mediado por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). La NOS precisa de oxígeno molecular, NADPH, tetrahidrobiopterina (BH₄), dinucleótido flavin-adenina y mononucleótido flavina para llevar a cabo este proceso^{28,32}.

Existen tres isoformas de la NOS: la neuronal (nNOS o NOS I), la inducible (iNOS o NOS II) y la endotelial (eNOS o NOS III)^{30,33}. La eNOS y la nNOS son constitutivas, mientras que la iNOS es inducible^{28,33}. La nNOS se expresa en neuronas y está implicada en la regulación a largo plazo de la transmisión sináptica y la regulación de la presión sanguínea^{34,35}. La expresión de la iNOS está mediada por citoquinas, bacterias, lipopolisacáridos y otros agentes, siendo un citotóxico en macrófagos, aunque pueda ser expresada por cualquier célula. Una vez expresada, la iNOS se mantiene activada y no está regulada por las concentraciones intracelulares de Ca²⁺³⁴. La eNOS se localiza principalmente en las células endoteliales, aunque también se puede encontrar en otros tejidos.

El endotelio sintetiza NO de un modo pulsátil ante un aumento de Ca⁺² intracelular que, unido a la calmodulina, regula tanto la actividad de la eNOS, como de la nNOS³⁴. El NO difunde hacia el músculo liso vascular, estimulando la guanilato ciclasa soluble (GCs) y produciendo un aumento de los niveles de guanosín monofosfato cíclico (GMPc), que disminuirán la concentración de Ca²⁺ en el citosol produciendo vasodilatación, o hacia el lado luminal, donde inhibirá

Introducción

la adhesión y agregación plaquetaria, previniendo la trombosis y protegiendo así de la aterosclerosis³⁴. El NO es el vasodilatador más potente derivado del endotelio y la disfunción endotelial está asociada a una disminución en su síntesis o a un aumento de su inactivación.

Hiperpolarización derivada del endotelio

La hiperpolarización derivada del endotelio (EDH) es un fenómeno que media vasodilatación una vez bloqueadas las vías de la COX y la NOS³⁶⁻³⁹.

El factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) es un factor difusible liberado por el endotelio que hiperpolariza el músculo liso causando una vasodilatación. La teoría más aceptada es que este factor es el ion potasio (K^+), que saldría de la célula endotelial hacia el espacio mioendotelial a través de los canales de K^+ activados por Ca^{+2} (K_{Ca}). Hay tres tipos de estos canales, según la conductancia: los de alta (BK_{Ca}), intermedia (IK_{Ca}) y baja conductancia (SK_{Ca}). Las arterias de resistencia poseen IK_{Ca} y SK_{Ca} ⁴⁰ pero en otros lechos vasculares el EDH puede actuar a través de los BK_{Ca} ⁴¹. Una vez en el espacio mioendotelial, el K^+ entraría a la célula muscular a través de la bomba Na^+-K^+ y los canales rectificadores de K^+ contribuirían al proceso de hiperpolarización haciendo salir más K^+ de la célula muscular⁴⁰. Sin embargo, esta concepción implica un factor que colabore en la propagación de la corriente hiperpolarizante procedente del endotelio hacia el músculo. Recientemente este concepto ha evolucionado hacia la denominación de hiperpolarización derivada del endotelio (EDH), indicando que no sería necesaria la contribución de un factor en particular en la propagación de esta corriente⁴². En este nuevo escenario, cobrarían importancia las uniones gap mioendoteliales, que se han propuesto como responsables de la relajación persistente del EDH⁴³,

permitiendo la difusión de la corriente hiperpolarizadora. Sin embargo, el funcionamiento exacto de este mecanismo está por esclarecer y todavía es necesaria más investigación al respecto⁴².

Factores contráctiles derivados del endotelio

Además, de las sustancias relajantes, el endotelio también es capaz de liberar sustancias contráctiles. En este sentido, el endotelio puede inducir la vasoconstricción mediante la liberación principalmente de TXA₂ y endotelina-1 (ET-1).

Tromboxano A₂

El TXA₂ se sintetiza a partir de la PGH₂ gracias a la tromboxano sintasa. Actúa sobre el receptor TP e induce vasoconstricción y agregación plaquetaria^{31,44}. En situaciones patológicas, se observa un desequilibrio en la vía de la COX, a favor de la producción de TXA₂⁴⁴. Además hay una interacción entre el receptor del TXA₂ (TP) y la PGI₂ (IP), de manera que cuando la función del receptor IP está alterada, la PGI₂ podría unirse al TP e inducir vasoconstricción⁴⁵.

Endotelina -1

La ET-1 es liberada por el endotelio, el músculo liso vascular y varios tipos de neuronas. A concentraciones elevadas produce un aumento de la inflamación y de la proliferación de las células del músculo liso vascular⁴⁶. Se considera el vasoconstrictor derivado del endotelio más potente y predominante en el ser humano^{46,47}.

La ET-1 actúa sobre los receptores de endotelina-1 A (ET-A) y B (ET-B). Los receptores de ET-A se localizan en las células musculares lisas vasculares y

Introducción

su activación inicia la cascada de señalización que incluye la fosfolipasa C (PLC) y el inositol trifosfato (IP₃) aumentando el Ca⁺² en el citosol y produciendo vasoconstricción⁴⁷. Además, el receptor ET-A activa la proteína cinasa C (PKC), relacionada con la vasoconstricción y el crecimiento de las células musculares lisas⁴⁷.

Los receptores ET-B tienen diferentes isoformas y están altamente expresados en el endotelio, mientras que lo están poco en la musculatura lisa vascular. Se distinguen los receptores ET-B₁, que se encuentra en las células endoteliales y promueven la vasodilatación y los ET-B₂, situados en la musculatura lisa vascular que facilitan la vasoconstricción⁴⁷. Los receptores ET-B₁ activan la eNOS mediante la vía PI3K/AKT, aunque se han descrito otros posibles mecanismos como la inducción de PGI₂, EDH o la interiorización y el metabolismo de la ET-1. Los receptores ET-B₂ siguen la misma ruta descrita para los ET-A⁴⁷.

Disfunción endotelial

Según Deanfield y colaboradores la disfunción endotelial representa un cambio de fenotipo que normalmente afecta la vía de señalización mediada por el NO²⁶. Cuando se produce un desequilibrio, en los estadios iniciales no se observan cambios en la estructura vascular, no obstante si estos cambios continúan desarrollándose originan la aterosclerosis, así como diferentes eventos clínicos, según la naturaleza, extensión, duración y combinación de los estímulos pro-inflamatorios^{26,29,48,49}.

La disfunción endotelial refleja un desequilibrio en las sustancias vasoactivas derivadas del endotelio con tendencia a la vasoconstricción,

especialmente por disminuir la biodisponibilidad del NO^{50,51}, aunque ésta no tiene por qué ser la única causa⁵¹ ya que podrían estar alteradas la producción de prostanoïdes o la vía de la EDH⁵². La disfunción endotelial desencadena lesiones aterogénicas⁵³, alteraciones de los factores de coagulación con tendencia a la hipercoagulabilidad, aumento del estrés oxidativo⁵⁴, alteraciones estructurales en la célula endotelial⁵¹ y se relaciona con enfermedades cardiovasculares^{55,56}.

Factores de riesgo cardiovascular

Existen una serie de factores que influyen negativamente en la función endotelial, entre los que podemos citar la obesidad⁵⁷, la dislipemia, con hipertrigliceridemia y/o niveles bajos de cHDL⁵⁸, la hipertensión⁵⁹, la hiperglucemia⁵⁹ o la resistencia a la insulina⁶⁰ y todos ellos pueden encontrarse en un paciente con SMet. A continuación, detallaremos los principales mecanismos patológicos que afectan a la función vascular en cada uno de los factores de riesgo que definen el SMet.

Obesidad central

Para la OMS la obesidad es una enfermedad crónica multifactorial caracterizada por acumulación de grasa en el cuerpo y considerada como una epidemia tanto en países industrializados como emergentes⁶¹.

Según la OMS el Índice de Masa Corporal (IMC) es un índice simple, utilizado para clasificar el bajo peso, el sobrepeso y la obesidad en adultos, que se define como el peso en kilogramos (kg) dividido entre el cuadrado de la altura en metros (kg/m²). Los valores del IMC se consideran normales cuando se sitúan entre 18,50 y 24,99. A partir de 30 indican obesidad. No obstante, según

Introducción

la definición actual de SMet, entre los factores que lo describen encontramos el perímetro abdominal y no el IMC. Un incremento del perímetro abdominal se relaciona con la obesidad central y un mayor riesgo cardiovascular⁶².

El tejido adiposo es un órgano endocrino activo, con función autocrina y paracrina llegando a secretar más de 50 hormonas y moléculas de señalización⁶³. Entre estas sustancias bioactivas denominadas adipocinas⁶⁴ destacan la adiponectina, la leptina, la resistina, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), las interleucinas 1 y 6 (IL-1, IL-6) y el inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1)⁶⁵. Además, el tejido adiposo regula el metabolismo de los carbohidratos, los lípidos⁶⁶, los procesos inflamatorios y la función endotelial^{67,68}. Por otra parte, se ha comprobado que la disfunción de los adipocitos y la liberación de sustancias proinflamatorias es independiente de las células inmunitarias, siendo más bien, mediado por un cambio en su metabolismo^{69,70}.

Alrededor de los vasos existe un depósito de grasa especializada, denominado tejido adiposo perivascular (PVAT), que es de gran importancia puesto que rodea a la mayoría de los vasos sanguíneos, liberando factores difusibles que modulan la reactividad vascular local y el estado inflamatorio, pudiendo contribuir a los cambios fisiopatológicos observados en las enfermedades cardiovasculares^{71,72}. Así pues, el endotelio y el PVAT participan conjuntamente regulando el tono vascular. En situaciones patológicas como la obesidad, el patrón de liberación de adipocinas por el PVAT se altera, así la adiponectina, que tiene efectos protectores contra la disfunción endotelial, la aterosclerosis y la hipertensión por activar la vía del NO, se encuentra disminuida⁷³. Por el contrario, la obesidad se relaciona con un aumento del

TNF- α que causa un aumento en la producción de ET-1⁷⁴. De hecho, la obesidad está asociada con una disrupción vascular causada por un desequilibrio en el sistema ET-1/NO⁷⁵, que dará lugar a una vasoconstricción mediada por ET-1.

Por otra parte, el exceso de adiposidad central crea un estado inflamatorio^{69,76} crónico de bajo grado que predispone a la resistencia a la insulina⁶⁸. Esto sumado a un sistema hemostático desordenado conforman los mecanismos clave para aumentar el riesgo de eventos aterotrombóticos⁷⁷. Además la proteína de unión a ácidos grasos en los adipocitos y la leptina median disfunciones vasculares relacionadas con la obesidad al potenciar la inflamación inducida por lípidos⁷⁸.

Por último, la obesidad favorece un estado prooxidante. El estrés oxidativo es un desequilibrio entre los sistemas oxidantes y antioxidantes que resulta en un exceso en la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (RONS). A nivel vascular la fuente más importante de RONS es la NADPH-oxidasa, que produce peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y anión superóxido (O₂⁻)⁷⁹. Este último se une al NO y forma peroxinitritos (ONOO⁻)⁸⁰ disminuyendo la cantidad de NO disponible para vasodilatar y causando disfunción endotelial⁸¹. Además, el estrés oxidativo favorece el desacoplamiento de la eNOS que dará lugar a la formación de O₂⁻ aumentando el grado de estrés oxidativo⁷⁴.

La figura 1 muestra la relación entre la obesidad y la disfunción endotelial.

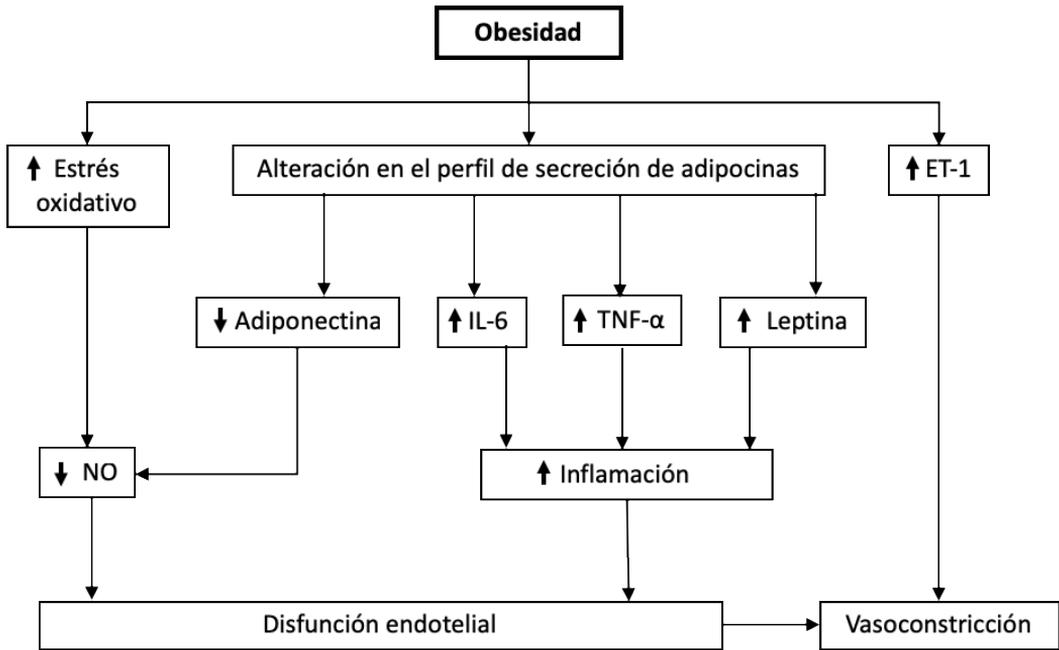


Figura 1: Disfunción endotelial causada por la obesidad. La obesidad provoca un aumento del estrés oxidativo que dará lugar a una disminución del óxido nítrico (NO). La obesidad induce una alteración en la secreción de adipocinas, con disminución de la adiponectina, que conllevará a una reducción de NO, y aumento de interleucina-6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la leptina, favoreciendo la inflamación. La obesidad también induce un aumento en la secreción de endotelina-1 (ET-1) y por ende la vasoconstricción. Todos estos mecanismos darán lugar a una disfunción endotelial.

Dislipemia

La alteración de la homeostasis atribuible a cambios patológicos en la utilización de lípidos o a cambios en la señalización intracelular debido a los lípidos, se denomina lipotoxicidad^{58,82}. En estados como la obesidad, la dislipemia se asocia a niveles altos de triglicéridos, reducción de lipoproteínas de colesterol de alta densidad (cHDL) y aumento de las lipoproteínas de baja densidad (LDL)⁸³, que pueden dañar el tejido vascular y sus funciones⁵⁸.

En la hipertrigliceridemia, se reduce la adherencia de la lipoproteína lipasa al LDL y triglicéridos en el endotelio, facilitando que el LDL se hidrolice en el hígado formando mayor cantidad de nuevas partículas de LDL más pequeñas y densas⁸³. Estas nuevas partículas de LDL tienen una mayor afinidad por los proteoglicanos endoteliales y facilitan su entrada al espacio subendotelial. Además, son más oxidables, en parte, debido a que no están unidas a una molécula de colesterol y tienen menor capacidad antioxidante, dando lugar al LDL oxidado (LDLox)⁸³.

La eNOS se infiltra en las caveolas (invaginaciones ricas en colesterol presentes en las células endoteliales) y el LDLox altera este complejo disminuyendo la actividad de la eNOS^{84,85}. Al contrario, el cHDL tiene efectos beneficiosos y se ha demostrado que previene el daño inducido por el LDLox sobre el complejo caveolar donando colesterol y estabilizando la caveola⁸⁶⁻⁸⁸. Estos eventos celulares son consistentes con los efectos proaterogénicos del LDLox y los efectos protectores del colesterol cHDL⁸⁹.

La lipotoxicidad puede crear disfunción endotelial favoreciendo la aparición de aterosclerosis⁹⁰. Por una parte, los ácidos grasos “in vitro” afectan

Introducción

al endotelio induciendo la liberación de moléculas pro-inflamatorias^{91,92}. Además, la acción de la lipoproteína lipasa en la superficie de la célula endotelial genera productos derivados de la lipólisis que afectan negativamente a la función del endotelio^{58,90}. Por otra parte, la cantidad de lípidos circulantes, especialmente de LDLox genera daño endotelial y predispone a la aterosclerosis. El receptor 1 de las LDLox (Lox-1) es el receptor primario en las células endoteliales y su activación produce apoptosis y disfunción endotelial mediada por estrés oxidativo. La activación de Lox-1 estimula la NADPH oxidasa y aumenta las cantidades de H₂O₂ y de O₂⁻. Ambos inducen apoptosis vía NF-KB. Además la activación de Lox-1 favorece el desacople de la eNOS y la consecuente disfunción endotelial (Figura 2)^{93,94}.

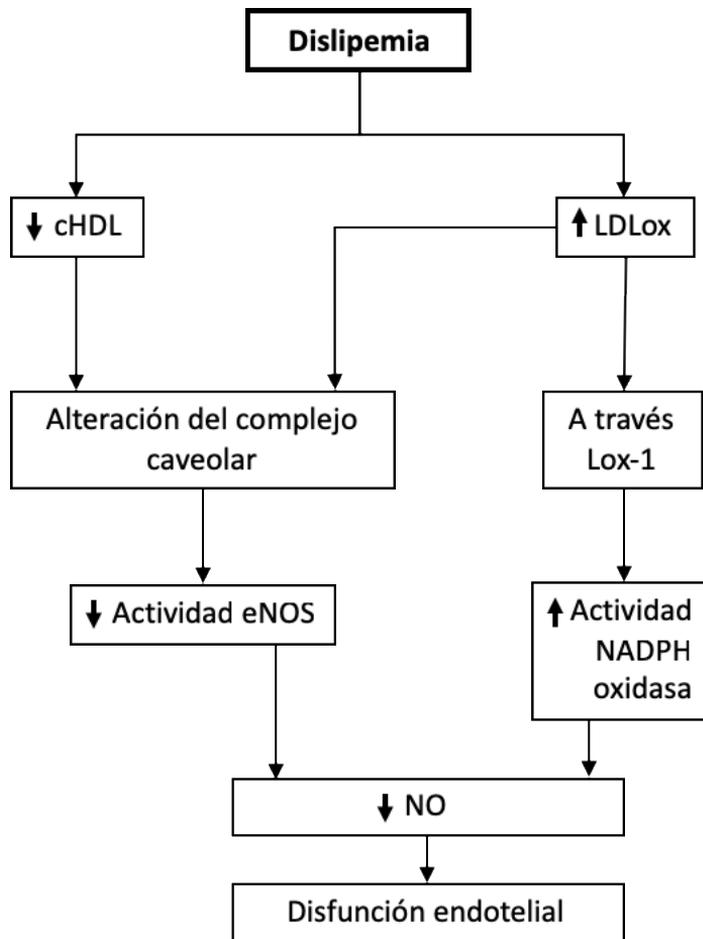


Figura 2: Mecanismos lipotóxicos que conducen a la disfunción endotelial. La dislipemia, caracterizada por disminución de las lipoproteínas de colesterol de alta densidad (cHDL) y el aumento de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDLox) provoca alteraciones en el complejo caveolar que reducen la actividad de la eNOS. Además, las LDLox a través del receptor Lox-1 aumentan la actividad de la NADPH oxidasa que contribuye al desacople de la eNOS, menor producción de óxido nítrico (NO) y por ende, disfunción endotelial.

Hipertensión

La disfunción endotelial no es una característica específica de la hipertensión, pues es común a la mayoría de los factores de riesgo cardiovascular⁹⁵. Sin embargo, es indudablemente un sello característico del paciente hipertenso^{96,97}.

El sistema renina-angiotensina (RAS) juega un papel primordial en el mantenimiento de la presión arterial a largo plazo y la activación crónica del mismo conduciría a un estado de hipertensión. El incremento en la vasoconstricción debido a la ET-1 o inducido por un exceso de actividad adrenérgica también se relaciona con la hipertensión.

El RAS se ha asociado con estrés oxidativo vascular, ya sea por aumentar la función de sistemas prooxidantes como la xantina oxidasa^{80,98-102} o la NADPH oxidasa^{103,104} o por disminuir la de ciertos sistemas antioxidantes como la tioredoxina peroxidasa¹⁰⁵, la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa o la glutatión peroxidasa^{106,107}. Estos efectos son mediados por la angiotensina II (AT-II) a través de su receptor 1 (AT1R), sin embargo, la activación del receptor 2 de la AT-II (AT2R) se relacionaría con aumento de la actividad de eNOS¹⁰⁵, por lo que su efecto favorecería la función del endotelio. No obstante, la evidente relación entre la activación del RAS y el aumento de estrés oxidativo explicaría, al menos en parte, la disfunción endotelial presente en los pacientes hipertenso, que involucraría entre otros mecanismos, la producción de ONOO⁻ y la consecuente disminución en la biodisponibilidad de NO. Los ONOO⁻ también pueden contribuir a una menor vasodilatación por reducir la síntesis de PGI₂¹⁰⁸, tanto por parte del endotelio como de los adipocitos¹⁰⁹. Además, se activaría la prostaglandina H sintasa, lo que llevaría a un aumento de TXA₂¹¹⁰ y

por consiguiente a una mayor tendencia a la vasoconstricción, agravando la hipertensión.

La concentración plasmática de ET-1 aumenta conforme lo hace la severidad de la hipertensión¹¹¹. La ET-1 tiene efectos proinflamatorios e hipertróficos¹¹² y el bloqueo de sus receptores reduce la presión arterial y la resistencia periférica en pacientes con hipertensión leve o moderada^{113,114}.

Los efectos de la ET-1 se ven bloqueados por la acción del NO en estado fisiológico¹¹⁵, sin embargo en ciertas condiciones como la hiperinsulinemia, la ET-1 reduce la sensibilidad a la insulina, contribuyendo a la resistencia a la insulina y a la disfunción endotelial¹¹⁶.

El control del tono vascular supone un equilibrio entre los factores vasoconstrictores y los vasodilatadores. En pacientes hipertensos se rompe este equilibrio a favor de la vasoconstricción debido a una mayor estimulación de los receptores alfa-adrenérgicos¹¹⁷. Existen dos tipos de receptores adrenérgicos (AR), alfa (α) y beta (β)¹¹⁸. Los AR α se localizan en el endotelio, las células musculares lisas, la adventicia y las células nerviosas. La contracción se debe principalmente a los AR α_1 en arterias de conductancia y a los AR α_2 en arterias de resistencia¹¹⁸. La activación de los AR α_1 estimula la fosfolipasa C, que hidroliza el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato a inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El IP₃ aumenta la concentración de Ca⁺² intracelular produciendo contracción. Los AR α_2 están presentes en las uniones presinápticas y en las células musculares lisas y su activación produce la inhibición de la adenilato ciclasa.

Introducción

Los AR β se pueden encontrar en el endotelio y la musculatura lisa¹¹⁸⁻¹²⁰ siendo el AR β_2 el dominante en el endotelio^{119,121,122}. Los AR β causan vasodilatación a través de la activación de la adenilato ciclasa y aumento del AMPc. También pueden estimular la formación de NO¹¹⁸.

El aumento de la actividad adrenérgica se relaciona con la obesidad y con la hipertensión. La combinación de ambas, es decir de la obesidad y la hipertensión, contribuye a una mayor actividad simpática¹²³. Sin embargo, el aumento de la actividad simpática no está siempre unido a un aumento de la presión sanguínea. Un estudio reciente que utiliza un modelo de SMet en ratas muestra como a pesar del aumento de la actividad simpática, el endotelio es capaz de mantener la presión arterial dentro de los límites fisiológicos¹²⁴.

Por otra parte, se ha visto que la insulina plasmática, el índice de resistencia a la insulina y los triglicéridos se relacionan positivamente con los niveles de noradrenalina plasmáticos, mientras que se relaciona negativamente con el cHDL^{125,126}.

La figura 3 muestra como el aumento de AT-II, ET-1 o de tono simpático se relaciona con la disfunción endotelial y la hipertensión.

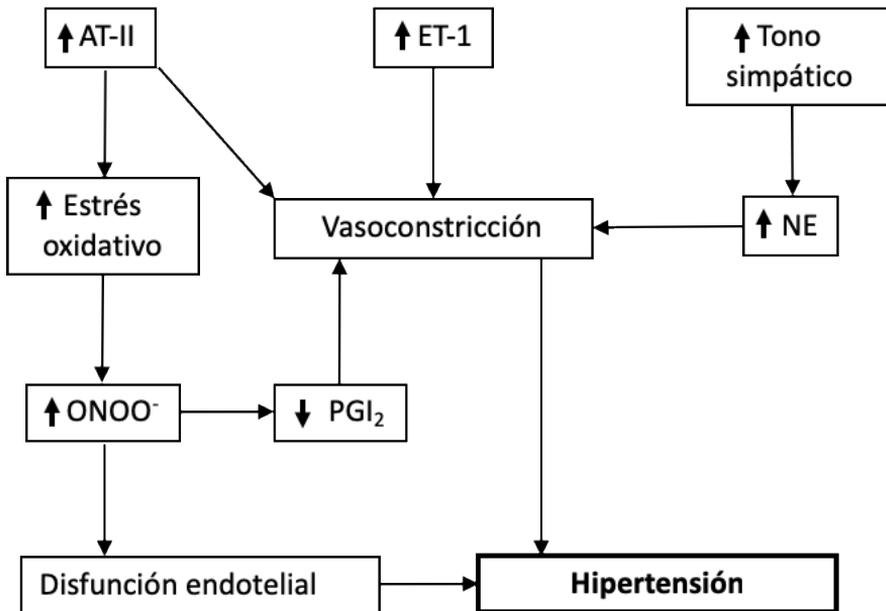


Figura 3: Relación entre la angiotensina II (AT-II), la endotelina-1 (ET-1) y el tono simpático con la disfunción endotelial y la hipertensión. El aumento de la angiotensina II (AT-II) favorece la vasoconstricción y el estrés oxidativo. Este último incrementa los niveles de peroxinitritos (ONOO⁻), reduciendo la biodisponibilidad de NO y llevando a la disfunción endotelial. Además de disminuir los niveles de prostaciclina (PGI₂), lo que producirá un incremento del tono vascular. Por otra parte, el aumento en la síntesis de endotelina-1 (ET-1) o el incremento del tono simpático, a través de la liberación de norepinefrina (NE), aumentarán la vasoconstricción.

Hiper glucemia

La hiper glucemia es el principal factor en el desarrollo de la disfunción endotelial en pacientes con diabetes mellitus^{89,127}. La disfunción endotelial inducida por la hiper glucemia se asocia a un incremento de las RONS¹²⁸, aumento de la activación de la proteína cinasa C (PKC) y glicosilación avanzada de proteínas (AGEs)¹²⁹.

El aumento de estrés oxidativo es un desencadenante clave de la disfunción endotelial al reducir la biodisponibilidad del NO¹³⁰.

La PKC reduce la actividad de la eNOS a través de la inhibición de la fosforilación de treonina⁴⁹⁵ y serina¹⁷⁷. También aumenta la actividad de la unidad p65 del factor nuclear potenciador de cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-kB) que regulará al alza la transcripción de genes proinflamatorios.

La formación de precursores de AGEs es un proceso que ocurre en situaciones fisiológicas, pero su exceso debido a la hiper glucemia da lugar a un exceso de glicosilación de proteínas celulares y plasmáticas, que modifica y activa los receptores de las AGEs, favoreciendo la inflamación.

Además, los niveles vasculares de proteína C reactiva (PCR) están elevados en la hiper glucemia, lo cual es importante porque la PCR disminuye la estabilidad del mRNA para la eNOS, reduciendo así la síntesis de NO^{131,132}.

Por otra parte, la dimetilmetilarginina asimétrica (ADMA), un inhibidor endógeno de la eNOS, aumenta en la hipercolesterolemia, hipertensión o diabetes mellitus causando baja biodisponibilidad de NO¹³³.

Por último, la actividad del EDH se altera en estados de enfermedad tales como hipertensión o diabetes¹³⁴⁻¹³⁷. De hecho, las concentraciones elevadas de glucosa pueden reducir la vasodilatación mediada por la hiperpolarización en arterias de resistencia¹³⁸ y de conductancia¹³⁹. No obstante, el papel del EDH es más importante en vasos de resistencia que en los de conductancia, ya que en estos últimos la vasodilatación depende fundamentalmente del NO¹³⁷. Todavía están por esclarecer los mecanismos por los cuales la hiperglucemia produce la inhibición de la propagación de la corriente hiperpolarizante entre las células endoteliales^{138,140}.

La figura 4 resume los principales mecanismos por los cuales la hiperglucemia conduce a disfunción endotelial.

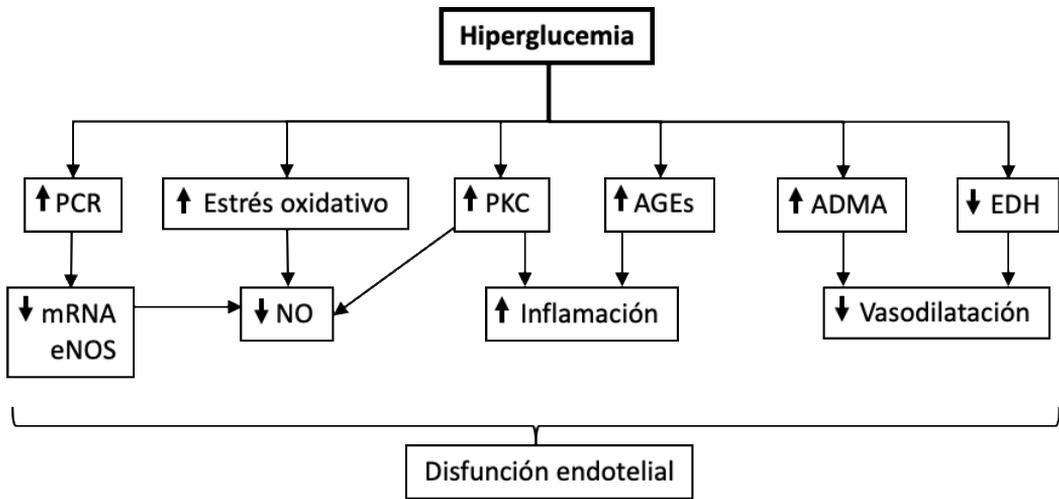


Figura 4: Disfunción endotelial inducida por la hiperglucemia. Concentraciones elevadas de glucosa cursan con aumento de la proteína C reactiva (PCR), que reduce la estabilidad del mRNA de la eNOS, y consigo la producción de óxido nítrico (NO). A su vez, la hiperglucemia produce un aumento del estrés oxidativo y la proteína cinasa C (PKC), que reducen el NO. La PKC junto con el aumento de los productos de glicosilación avanzada (AGEs) favorecen la inflamación. Los niveles de la dimetilarginina asimétrica (ADMA) se elevan y se reduce la hiperpolarización derivada del endotelio (EDH), reduciendo la vasodilatación.

Resistencia a la insulina

Clínicamente la resistencia a la insulina es la incapacidad para aumentar la captación y utilización de glucosa dependiente de insulina (exógena o endógena) en los tejidos, así como suprimir la producción de glucosa hepática¹⁴¹. En los seres humanos, la resistencia a la insulina se empieza a desarrollar mucho antes de que aparezca la diabetes mellitus tipo 2^{142,143} y está asociada claramente a un aumento de riesgo cardiovascular¹⁴⁴. La hiperinsulinemia es el factor clave en la resistencia a la insulina en pacientes normoglicémicos y no diabéticos, siendo causa de la disfunción endotelial en individuos sanos¹⁴⁵. La insulina induce relajación de los vasos y consigo un aumento en general del flujo sanguíneo, incrementando la perfusión microvascular¹⁴⁶.

El mecanismo por el cual la resistencia a la insulina conduce a la disfunción endotelial es complejo e implica la acción de mediadores de la inflamación derivados de la grasa visceral, hígado y músculo. Por tanto, la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia compensatoria poseen también un efecto de toxicidad vascular, principalmente a nivel endotelial¹⁴⁷.

La vasodilatación inducida por la insulina empieza con la unión de ésta a su receptor (IR), que produce la autofosforilación de los residuos de tirosina de la subunidad β . El receptor fosforilado hace que se incorpore fosfato a otra molécula llamada sustrato 1 del receptor de insulina (IRS-1). El IRS-1 fosforilado activa la fosfatidilinositol 3 cinasa (PIK-3), que estimula la cascada de señalización que produce IP_3 , que a su vez activa la proteína cinasa dependiente de fosfoinositol, que fosforila y activa el Akt. El Akt fosforilado activa la eNOS

Introducción

por fosforilación de la serina¹¹⁷⁷, incrementando la actividad enzimática y la producción de NO¹⁴⁸.

A su vez, la estimulación del IR activa el factor intercambiador de nucleótidos de guanina SOS, que produce la conversión de guanósín monofosfato (GDP) a guanósín trifosfato (GTP) activando la vía de la proteína cinasa activadora de mitogeno (MAPK)⁴⁷. La vía MAPK induce señales de cinasas como la proteína activadora de la mitogen cinasa (MEK)⁴⁷ y la proteína cinasa reguladora de señales extracelulares (ERK) $\frac{1}{2}$ ¹⁴⁹, que regulan el crecimiento, proliferación, diferenciación y secreción de proendotelina (pro-ET), y que generan ET-1 mediante la activación de la vía enzima convertidora del endotelio⁴⁷.

En condiciones fisiológicas, la insulina produce vasodilatación mediante la liberación de NO, pero en estado de resistencia a la insulina, el mecanismo que predomina es a favor de la síntesis de ET-1 y, por tanto, vasoconstricción^{47,115,144} (Figura 5).

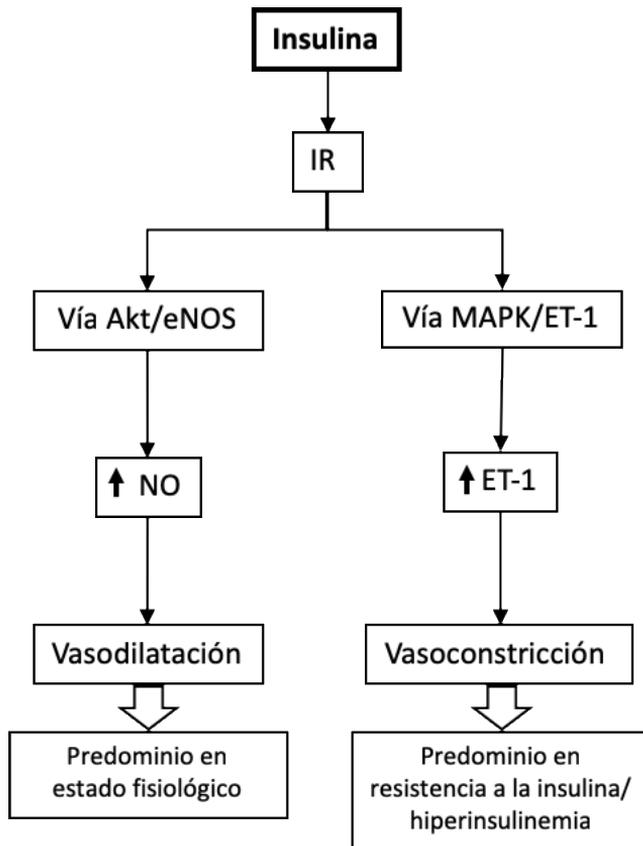


Figura 5: Vías de señalización a nivel endotelial debidas a la activación del receptor de insulina. En situación fisiológica, la insulina activa la vía Akt/eNOS dando lugar a la formación de óxido nítrico (NO), produciendo un aumento de la vasodilatación. Por otro lado, en condiciones de resistencia a la insulina, se activa la vía MAPK/ET-1 y consigo la vasoconstricción

Síndrome metabólico y función vascular

El SMet se relaciona con un mayor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y la disfunción vascular en general y la endotelial en particular, supone uno de los mecanismos patológicos subyacentes en la enfermedad cardiovascular.

Como ya hemos mencionado al inicio de esta tesis, un paciente sería diagnosticado de SMet si padeciera tres de los cinco factores siguientes: obesidad abdominal, triglicéridos elevados, cHDL reducido, presión arterial aumentada y niveles de glucosa elevados en ayunas o diabetes mellitus tipo 2. Todos estos factores tienen en común un daño a nivel vascular que se inicia en el endotelio y que producirá complicaciones cardiovasculares a la larga. El estrés oxidativo está presente en todos los factores que se dan cita en el SMet y conduce a la disfunción endotelial, considerada el primer paso hacia la aterosclerosis¹⁵⁰. En el SMet también está presente la inflamación y como mecanismo relacionado con ésta cabe mencionar el papel del receptor activado por proliferadores peroxisómicos γ (PPAR γ) que puede mejorar el metabolismo de los lípidos^{151–153} en la obesidad, hiperglicemia o resistencia a la insulina^{154–156}.

En la presente tesis estudiamos la reactividad de tres arterias: aorta, carótida y renal, procedentes de conejos con SMet inducido por la dieta. El objetivo general es esclarecer los mecanismos responsables de las posibles alteraciones vasculares que explicarían el alto riesgo cardiovascular presente en estos pacientes.

Existen diferentes protocolos experimentales para inducir un SMet mediante la dieta. Evidentemente, el tipo de SMet que se desarrolle dependerá de la especie escogida para el estudio. Las dietas pueden ser altas en grasas, en azúcares o en ambos. La fructosa es el carbohidrato más eficaz en la inducción del SMet en la rata¹⁵⁷. Respecto a las grasas, se remarca su papel dosis-dependiente en el desarrollo del síndrome metabólico¹⁵⁷, concluyendo que la dieta alta en grasa y alta en fructosa en animales de experimentación es la que induce cambios más similares a los descritos en humanos con SMet¹⁵⁷.

Hipótesis y objetivos

Hipótesis

El SMet es un conjunto de factores que incrementa el riesgo cardiovascular, por lo que cabría esperar una alteración endotelial, con una menor tendencia a la vasodilatación y/o mayor tendencia a la vasoconstricción.

Objetivo general

Nuestro estudio se centra en analizar la reactividad vascular en las arterias aorta, carótida y renal de conejos con SMet y compararla con conejos control, con la finalidad de estudiar si existen alteraciones de la función vascular. Para ello, se analiza la respuesta a diferentes agonistas contráctiles y relajantes. Además con el fin de profundizar en los mecanismos subyacentes a nivel vascular que pudiesen ser los responsables de los cambios observados en la reactividad vascular se analiza la expresión proteica relacionada con algunas de las vías clave que se alteran en las enfermedades que cursan con disfunción vascular.

Objetivos específicos

1. Estudiar la respuesta contráctil al KCl, norepinefrina y ET-1 en aorta abdominal, arteria carótida y renal procedentes de conejos control y con SMet.
2. Estudiar la respuesta relajante dependiente (respuesta a la Ach) e independiente (respuesta al NP) de endotelio en aorta abdominal, arteria carótida y renal procedentes de conejos control y con SMet.
3. Determinar la expresión proteica de los receptores adrenérgicos α_1 y β_2 , así como la expresión de ambos receptores para la ET-1, A y B (R ET-A, R ET-B) en aorta abdominal de conejos control y con SMet con el fin de

profundizar en dos posibles mecanismos que pudieran estar alterado en el SMet (el sistema adrenérgico y la vía de la ET-1).

4. Determinar la expresión proteica de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), los canales de potasio activados por calcio de alta conductancia (BKCa), la cobre/zinc superóxido dismutasa (Cu/Zn-SOD), la manganeso superóxido dismutasa (Mn-SOD), la NADPH oxidasa 4 (Nox-4) en aorta abdominal de conejos control y con SMet con el fin de analizar las vías de relajación dependientes de NO, hiperpolarización relacionada con canales de K⁺ y estrés oxidativo.
5. Determinar la expresión proteica de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la ciclooxigenasa 2 (COX-2) en aorta abdominal de conejos control y con SMet, con el fin de determinar indicios de inflamación a nivel vascular.
6. Determinar la expresión proteica del receptor gamma activado por proliferadores peroxisómicos (PPAR γ), la serina- treonina cinasa Akt y Akt fosforilada (P-Akt) en aorta abdominal de conejos control y con SMet con el fin de valorar la activación de la eNOS por medio de esta vía.

Metodología

Grupos de estudio

Para la realización de este estudio se usaron 24 conejos macho de la raza New Zealand White, de 16-18 semanas y peso medio de 4550 ± 180 g al inicio del estudio. Los animales estuvieron estabulados durante veintiocho semanas en la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universitat de València a una temperatura de 20 ± 1.5 °C, una humedad de 50 ± 5 % y con 12 horas de luz. Los animales fueron divididos aleatoriamente en dos grupos alimentados *ad libitum* con dos dietas diferentes: el grupo control alimentado con una dieta apropiada para el mantenimiento de un conejo adulto (23.4% de proteínas, 11.1% de grasa y 65% de carbohidratos)¹⁵⁸, y el grupo SMet alimentado con una dieta alta en grasa y en fructosa con un 43,1% de grasa (10% de aceite de coco hidrogenado y 5% manteca de cerdo), un 42,2% de carbohidratos (15% de sucrosa disuelta en agua) y un 15,7% de proteínas (S9052-E020, Sniff, Soest, Germany). La ingesta calórica del grupo SMet fue un 66,7% mayor que la del grupo control. La puesta a punto del modelo experimental se puede consultar en Arias-Mutis et al. (2017)¹⁵⁹.

Los experimentos se realizaron cumpliendo la normativa ética establecida por la Comunidad Europea (Directiva 2010/63/EU) y bajo la previa aprobación del Comité de ética de la Universitat de València. El presente trabajo experimental se desarrolló haciendo uso de aprovechamiento de especie bajo la autorización de los procedimientos 2014/074 tipo 2 y 2015/VSC/PEA/00049 tipo 2.

Mediciones y extracción de muestras

La medición de los parámetros morfológicos (longitud, altura, peso y circunferencia abdominal) se realizó antes de empezar el estudio y a las 28 semanas del protocolo experimental. El IMC se midió dividiendo la masa (en kilogramos) entre la multiplicación de la longitud por la altura (en metros).

Se midió la glucosa, triglicéridos, cHDL y LDL en plasma y se realizó un test intravenoso de tolerancia a la glucosa. Todas las pruebas tuvieron lugar antes de empezar la dieta y a las 28 semanas, después de 7 horas de ayuno. La extracción de muestras para evaluar estos parámetros se realizó mediante la canulación de la vena auricular y el test de tolerancia a la glucosa se midió antes y a los 180 minutos de la ingesta de un bolo con el 60% de glucosa (0.6g Kg^{-1}). La glucosa fue determinada mediante un glucómetro (Contour Next, Bayer, Leverkusen, Alemania)¹⁵⁹. La recolección de muestras se hizo en tubos EDTA (BD Vacutainer, Plymouth, Reino Unido), guardados en hielo y centrifugados a 1500 g durante 15 minutos a 4°C, para posteriormente, extraer y guardar el plasma a -80°C. Las muestras fueron analizadas por un laboratorio externo realizando procedimientos enzimáticos estandarizados (Immunovet, Barcelona, España).

Para evaluar la presión sanguínea se sujetó a los animales en un retenedor de plástico y se realizó el mismo proceso de canulación descrito previamente, después de ser anestesiados localmente (EMLA, Astra Zeneca, Madrid, España). A través del catéter y mediante un transductor de presiones (Model 60–3003, Harvard Apparatus, Holliston, MA), la señal fue enviada a la unidad Power Lab (Power Lab 2/26, AD Instruments, Oxford, UK) y

posteriormente analizada mediante Labchart (AD Instruments, Oxford, UK), a una frecuencia de 1KHz. El análisis de los registros para procesar y calcular la presión media, sistólica y diastólica se produjo en los últimos 5 minutos de un registro de 20 minutos.

Una vez sacrificado el animal, se extrajeron las arterias (aorta abdominal, carótida y renal), mediante laparotomía abdominal y sección longitudinal anterior del cuello, para ser guardadas en una solución salina (NaCl 0.9%) a 4°C de temperatura hasta su montaje en el baño de órganos para el registro de la tensión isométrica.

Dos segmentos de aproximadamente 5 mm de cada uno de los especímenes vasculares se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -20°C para el estudio posterior de la expresión proteica mediante western blot (WB).

Caracterización del modelo

El modelo fue efectivo para inducir un SMet, tal y como lo indican los parámetros morfológicos y bioquímicos (Tabla 3).

La longitud y altura no varió entre ambos grupos, no obstante, el aumento de peso en el grupo SMet fue del 23,9% respecto al control, pasando de $4,6 \pm 0,3$ kg a $5,7 \pm 0,4$ kg ($P < 0,05$). El IMC pasó de $32,9 \pm 2,5$ en el grupo control a $40,2 \pm 4,2$ en el SMet ($P < 0,05$). La circunferencia abdominal pasó de $40,0 \pm 1,2$ cm a $49,0 \pm 3,1$ cm ($P < 0,05$). La presión sanguínea media (PAM), sistólica (PS) y diastólica (PD) también se vieron afectadas por la dieta, aumentando sus valores en el SMet ($94,4 \pm 5,3$ vs $82,1 \pm 3,2$ mmHg, $P < 0,05$ para la PAM en SMet y control respectivamente; $110,4 \pm 9,3$ vs $98,3 \pm 9,8$

Metodología

mmHg, $P < 0,05$ para la PS en SMet y control respectivamente y $84,3 \pm 6,5$ vs $72,5 \pm 4,7$ mmHg, $P < 0,05$ mmHg para la PD en SMet y control respectivamente). Tras la evaluación del metabolismo de la glucosa, se observó que el SMet tenía aumentada tanto la glucosa sanguínea en ayunas (117 ± 11 vs 101 ± 10 mg/dl, $P < 0,05$, para el SMet y control respectivamente) como los valores de esta tras la ingesta del bolo (110 ± 12 vs 96 ± 6 mg/dl, $P < 0,05$, para el SMet y control respectivamente) indicativos de un estado de prediabetes. Por último, el análisis del perfil lipídico mostró un aumento plasmático de triglicéridos ($73,6 \pm 32,3$ vs $29,8 \pm 13,4$ mg/dl para el SMet y control respectivamente $P < 0,05$) y LDL ($10,7 \pm 3,8$ vs $5,3 \pm 2,1$ mg/dl para el SMet y control respectivamente), un descenso del cHDL ($7,8 \pm 5,7$ vs $13,3 \pm 5,3$ para SMet y control respectivamente) y sin cambios en el colesterol total.

Por tanto, acorde con los criterios establecidos por el consenso de 2009 para el diagnóstico del SMet, nuestro modelo cumple con al menos 3 de los factores de riesgo, de hecho, obtenemos los cinco factores: obesidad central, disglucemia o estado de prediabetes, hipertensión arterial, hipertrigliceridemia y bajos niveles de HDL.

Tabla 3: Características del modelo de síndrome metabólico (SMet). Las medidas se expresan como la media \pm desviación estándar.

	Control	MetS
Longitud	53,8 \pm 1,1	54,4 \pm 1,9
Altura	26,1 \pm 1,3	25,9 \pm 1,5
Masa (Kg)	4,6 \pm 0,3	5,7 \pm 0,4*
Circunferencia (cm)	40,0 \pm 1,2	49,0 \pm 3,1*
IMC (Kg/m ²)	32,9 \pm 2,5	40,2 \pm 4,2*
Energía consumida por día (Kcal)	322 \pm 8	537 \pm 41*
Presión sanguínea media (mmHg)	82,1 \pm 3,2	94,4 \pm 5,3*
Presión sistólica (mmHg)	98,3 \pm 9,8	110,4 \pm 9,3*
Presión diastólica (mmHg)	72,5 \pm 4,7	84,3 \pm 6,5*
Glucosa en ayunas (mg/dl)	101 \pm 10	117 \pm 11*
Test de tolerancia a la glucosa (mg/dl)	96 \pm 6	110 \pm 12*
Triglicéridos (mg/dl)	29,8 \pm 13,4	73,6 \pm 32,3*
cHDL (mg/dl)	13,3 \pm 5,3	7,8 \pm 5,7*
cLDL (mg/dl)	5,3 \pm 2,1	10,7 \pm 3,8*

* $P < 0,05$ vs control. IMC: índice de masa corporal; cHDL: lipoproteínas de colesterol de alta densidad; LDL: lipoproteínas de colesterol de baja densidad.

Estudio de la reactividad vascular

Preparación y aislamiento de las muestras para el estudio de la reactividad vascular

Los vasos fueron aislados en una placa Petri con solución de suero salino fisiológico (NaCl al 0.9%), donde se limpiaron cuidadosamente, eliminando los restos de tejido conectivo y grasa adheridos y evitando dañar la arteria. Después se cortaron en anillos de 3 mm de longitud. A continuación, los segmentos vasculares se montaron en un baño de órganos, colocando, a través de la luz del vaso, dos alambres de acero inoxidable con un diámetro de 1,5 mm: uno de los alambres se sujetaba a la estructura de forma fija, mientras que el otro era móvil, con desplazamiento paralelo al primero y unido a un transductor de fuerza (FT 03 Grass). Este montaje se sumergió en una solución modificada de Krebs Henseleit, compuesta por (mmol/l): NaCl, 115; KCl, 4,6; MgCl₂·6H₂O, 1,2; CaCl₂, 2,5; NaHCO₃, 25; glucosa, 11,1; EDTA disódico, 0,01; ácido ascórbico 0,014; y un tampón orgánico (MOPS,) 6,5). La solución estuvo constantemente burbujeada con carbógeno (95% de O₂ y 5% de CO₂), manteniendo un pH entre 7,3 y 7,4 y una temperatura constante de 37°C gracias a un circuito de agua cerrado que rodea todo el sistema. Una vez montadas las arterias se aplicó la tensión pasiva óptima usando el tornillo micrométrico unido al transductor isométrico (UF1 Pioden Controls Ltd), que tiraba del alambre móvil. Los cambios en la tensión se registraron en un ordenador utilizando el programa informático Chart, versión 7, y mediante el sistema de adquisición de datos MacLab/8e (ADInstruments, Mountain View, California, Estados Unidos).

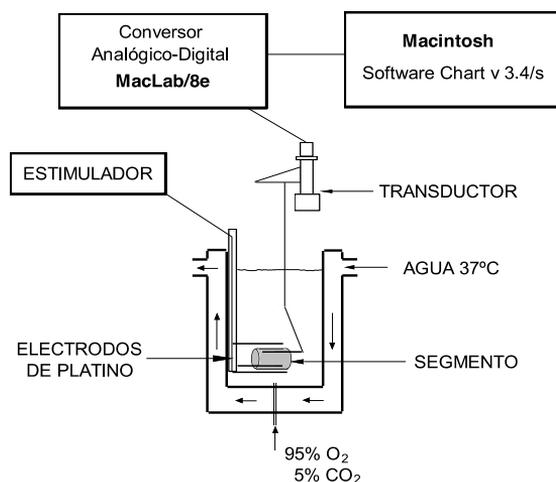


Figura 6: Sistema de baño de órganos para el registro de la tensión isométrica y análisis de la reactividad vascular.

Determinación de la tensión pasiva óptima

En un grupo de experimentos preliminares se procedió a determinar la tensión basal pasiva óptima para cada una de las arterias estudiadas. El procedimiento consiste en inducir una contracción máxima con KCl (60 mM) después de exponer los anillos a diversas tensiones pasivas (1, 2, 3 y 4 g). La tensión pasiva a la que se obtuvo la máxima respuesta fue considerada como la tensión óptima de reposo. La tensión pasiva óptima para la aorta abdominal fue de 3g y para las arterias carótida y renal de 1g.

Una vez montados los segmentos vasculares se dejaron estabilizar durante una hora, renovando la solución de Krebs-Henseleit cada 15 minutos.

Metodología

Transcurrido ese tiempo, se inició el protocolo experimental con la obtención de las curvas concentración-respuesta para cada uno de los agonistas estudiados.

Obtención de las curvas concentración-respuesta

Agonistas contráctiles

Se construyeron curvas concentración-respuesta al KCl (5-100 mM) en los tres lechos vasculares de los dos grupos de estudio para determinar si el SMet alteraba la respuesta contráctil no dependiente de receptor. También se realizaron curvas concentración-respuesta a agonistas contráctiles dependientes de receptor como la NE (10^{-9} - 3×10^{-5} M) y la ET-1 (10^{-12} - 10^{-7} M).

Agonistas relajantes

Las curvas concentración-respuesta a agonistas relajantes fueron realizadas en presencia de un tono de contracción obtenido con una concentración de NE tal que produjese aproximadamente el 70% de la contracción máxima al KCl (60 mM) en cada segmento vascular estudiado. En esta situación se analizó el efecto vascular de los agonistas relajantes añadiendo al baño concentraciones crecientes de Ach (10^{-9} - 3×10^{-5} M) y NP (10^{-9} - 3×10^{-6} M).

Para construir todas las curvas concentración-respuesta, las dosis administradas fueron acumulativas y se dio la siguiente dosis cuando la anterior había alcanzado su efecto máximo.

Estudio de la expresión proteica por western blot

El WB es una técnica de biología molecular para identificar proteínas extraídas de células o tejidos y analizarlas según su peso molecular¹⁶⁰. Las muestras

extraídas se descongelaron en hielo para dividir las en porciones de 50 mg, sumergirlas en un regulador de degradación proteica (“buffer de lisis”) (0,125 M, pH 6,8, 2% SDS, 19% glicerol y 1% inhibidor de proteasas) en un microtubo de 1,5 ml. A continuación, los microtubos se centrifugaron a 10.000 rpm durante 20 minutos a una temperatura de 4°C. Se recogió el sobrenadante y se determinó la concentración proteica total mediante el método de ácido bicinonínico (BCA), usando una curva estándar de seroalbumina bovina (BSA).

Separación y transferencia de las proteínas

Tras conocer la concentración proteica de las muestras, se añadió 0,5% de la fracción volumétrica (V/V) de 2-mercaptoetanol y 1% de azul de bromofenol, para seguidamente calentar durante 5 minutos a 95°C. La separación de proteínas se realizó mediante electroforesis desnaturizante SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*). Para ello, se añadieron entre 20 - 30 µg de proteína (que según estudios previos de nuestro laboratorio estarían dentro del intervalo de linealidad) de cada muestra en geles de resolución, con un gradiente de poliacrilamida de 4 al 15%, dependiendo del peso molecular a estudiar.

La electroforesis se realizó en el sistema Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio Rad), que contenía el amortiguador de migración (Tris 25mM, glicina 200mM y SDS al 0.1% p/v, pH 8,3). Para la electroforesis se aplicó un voltaje constante de 140 voltios durante 50-60 minutos. Una vez terminada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas en un medio húmedo a una membrana de difloruro de polivinidileno (Bio.Red, Hércules, CA, EE.UU.), activada previamente con metanol. Para la transferencia se usó un tampón de transferencia (Tris 25mM, 190mM glicina y 20% de metanol), aplicando durante

Metodología

1 hora un voltaje de 40 voltios a 4°C. Para verificar la eficacia de la transferencia y determinar el tamaño de las proteínas se usó una proteína estándar multicolor (Broad Multi Color Pre-Stained Protein Standard , GenScript).

Immunodetección

Las membranas se incubaron con una solución de bloqueo de las uniones inespecíficas. La solución estaba compuesta por BSA al 5% en TBS-Tween (Tris-Cl 20mM, NaCl 150mM, Tween-20 0,1%, pH 7,5). Durante el bloqueo, las incubaciones permanecieron en agitación suave durante 1 hora a temperatura ambiente. Seguidamente, las membranas se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo primario (Tabla 3), diluido en la solución de bloqueo.

Al día siguiente, las membranas se lavaron con TBS-Tween (3 lavados de 10 minutos) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente (anti-conejo, Ref. 7074; Cell Signaling Technology, dilución 1:1000 o anti-ratón, Ref. 31430; Thermo Fisher Scientific, dilución 1:10000,), junto con la encima peroxidasa de rábano picante (HRP), diluida en la solución de bloqueo.

Para finalizar, se lavaron las membranas con TBS-Tween tres veces durante 10 minutos para eliminar el exceso de anticuerpo secundario. A continuación, se incubaron con el reactivo comercial ECL (Pierce, Thermo Scientific), para detectar mediante quimioluminiscencia los anticuerpos unidos a HRP. La actividad de la peroxidasa se valoró mediante el sistema ImageQuant LAS-4000 (GE Healthcare Life Science, Barcelona, España) y la señal obtenida se cuantificó por densitometría utilizando el programa informático Image J.

La Tabla 4 recoge la información relativa a los anticuerpos primarios utilizados en este estudio.

Tabla 4: Anticuerpos primarios usados para la determinación de la expresión proteica por western blot.

Anticuerpo	Peso molecular (KDa)	Dilución	Referencia	Lote	Casa comercial
R α_1	50	1:500	NB100-78585	39391	Novus Biologicals
R β_2	48	1:1000	NBP1-19562	CJ36131	Novus Biologicals
R ET-A	48	1:1000	Ab85163	GR280421-1	Abcam
R ET-B	50	1:5000	Ab117529	GR258859-8	Abcam
eNOS	130	1:500	21170-2	8715	Signalway
BK _{Ca}	115	1:500	Ab3586	GR3172863-10	Abcam
Cu/Zn-SOD	16	1:500	MA1-105	RJ242216	Thermo Fisher Scientific
Mn-SOD	26	1:500	PAS-30604	SD2376843	Thermo Fisher Scientific
NOX-4	67	1:500	NB110-58849SS	P-1	Novus Biologicals
iNOS	130	1:1000	PA5-17106	NE1552939	Thermo Fisher Scientific
COX-2	70	1:100	PA5-17614	RK2295111	Thermo Fisher Scientific
PPAR γ	50	1:1000	MA5-14889	SD2365741A	Thermo Fisher Scientific
Akt1	62	1:500	Sc-5298	L0114	Santa Cruz
P-Akt1	60	1:500	Sc-293125	D0114	Santa Cruz
α -tubulina	55	1:1000	SC-5286	K0215	Santa Cruz

R α_1 : Receptor adrenérgico alfa 1; R β_2 : Receptor adrenérgico beta 2; R ET-A: Receptor endotelina A; R ET-B: Receptor endotelina B; eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial; BK_{Ca}: Canales de potasio activados por calcio de alta

Metodología

conductancia; Cu/Zn-SOD: /Cobre/Zinc superóxido dismutasa; Mn-SOD: Manganese superóxido dismutasa; NOX-4: NADPH oxidasa 4; COX-2: Ciclooxygenasa 2; PPAR γ : receptor gamma activado por proliferadores peroxisómicos; P-Akt: Akt fosforilada.

Análisis de los datos

La concentración eficaz 50 (CE₅₀), es decir, la concentración que produjo la mitad del efecto máximo (E_{max}), fue determinada por las curvas de concentración respuesta mediante un análisis de regresión no lineal y expresada como pD₂ (-logEC₅₀). Las diferencias entre grupos se determinaron mediante el estadístico T Student con una significancia estadística de $P < 0,05$.

Los resultados de reactividad vascular se presentan como la media \pm error estándar (e.e.) y los de expresión proteica como la media \pm la desviación estándar.

La contracción al KCl se representa como mg de contracción y a la NE y a la ET-1 se expresa como el porcentaje de contracción con respecto al KCl 100 mM. La relajación a la Ach y al NP se expresan como porcentaje de relajación con respecto a un estado de precontracción previo que se obtiene con NE (concentración suficiente para producir un 75% de la contracción máxima al KCl 100 mM).

Resultados

Estudio de la respuesta vascular contráctil en aorta, arteria carótida y arteria renal

Respuesta al cloruro potásico (KCl)

Con el objetivo de estudiar la capacidad contráctil de cada uno de los lechos vasculares utilizados en el presente estudio, aorta, arteria carótida y arteria renal, se realizaron curvas concentración-respuesta al KCl (5-100 mM). El resultado fue una contracción dependiente de la concentración, que no se modificó en presencia de SMet en ninguno de los tres lechos arteriales estudiados (Tabla 5 y Figura 7).

El mecanismo de contracción del KCl es independiente de receptor e involucra la entrada de Ca^{+2} a la célula muscular lisa a través de canales de Ca^{+2} voltaje-dependientes. Por lo que nuestros resultados indican que el SMet no altera la entrada de Ca^{+2} al músculo liso vascular.

Tabla 5: Valores de concentración eficaz 50 (CE_{50} , molar, M), su intervalo de confianza del 95% (IC 95%) y del efecto máximo (E_{max}) \pm error estándar (e.e.) en respuesta al cloruro potásico en segmentos de aorta, carótida y renal procedentes de conejos control y con síndrome metabólico (SMet).

Cloruro potásico	Control			SMet		
	n	CE_{50} (IC 95%)	$E_{max} \pm e.e.$	n	CE_{50} (IC 95%)	$E_{max} \pm e.e.$
Aorta	5	36,17 (28,94 - 45,21)	6357 \pm 251	5	37,22 (31,93 - 43,38)	6249 \pm 919
Carótida	8	36,08 (31,85 - 40,87)	4315 \pm 251	8	41,44 (36,77 - 46,70)	4086 \pm 214
Renal	7	30,78 (30,83 - 43,68)	7937 \pm 986	7	47,74 (44,21 - 51,55)	9087 \pm 1149

n: número de conejos.

Resultados

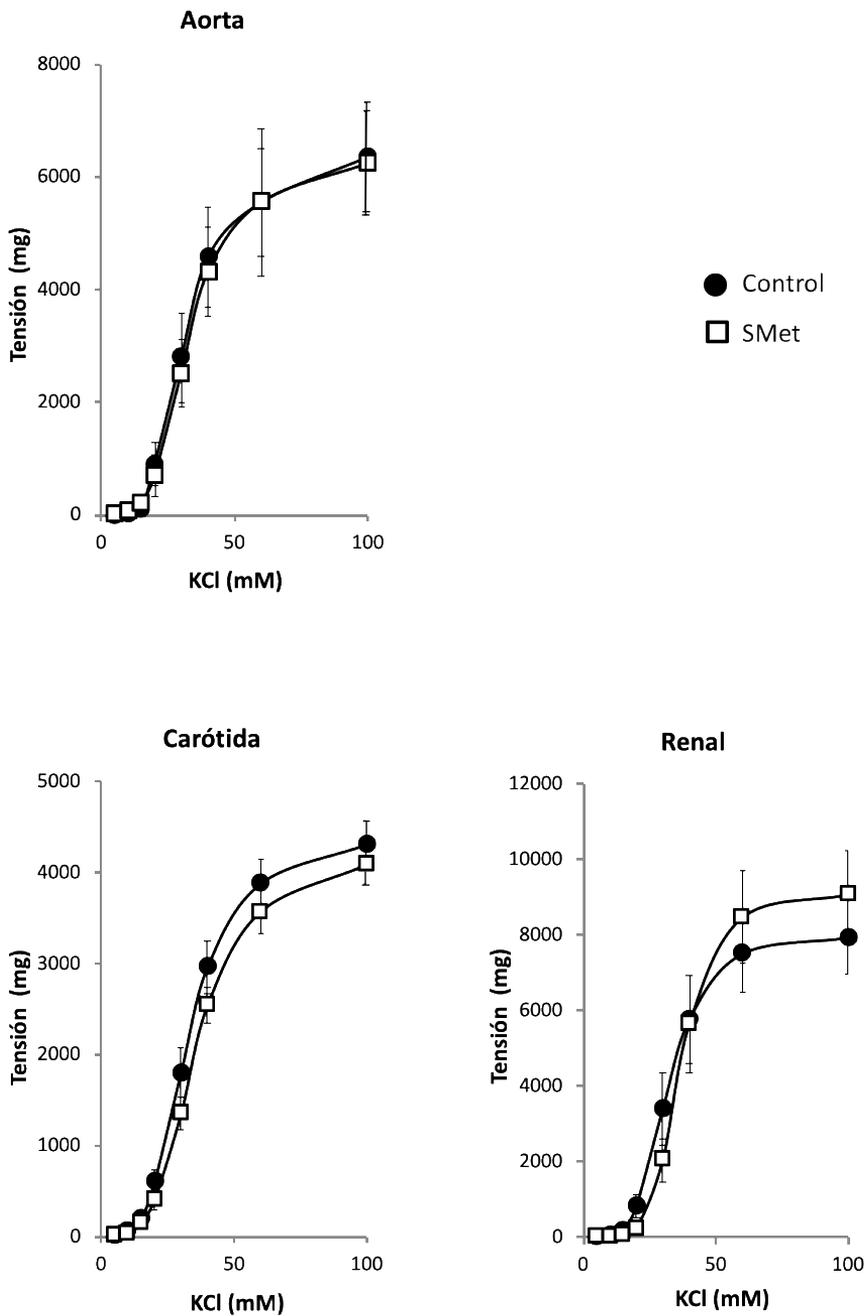


Figura 7: Respuesta al cloruro potásico (KCl) en anillos de aorta, carótida y renal de conejos control y con síndrome metabólico (SMet).

Respuesta a la norepinefrina

Para estudiar si la respuesta adrenérgica se modificaba en presencia del SMet se realizaron curvas concentración-respuesta a la NE (10^{-9} - 3×10^{-5} M) en los tres segmentos vasculares estudiados. La NE indujo una contracción que fue dependiente de la concentración y que no se alteró en presencia del SMet en ninguna de las tres arterias estudiadas. Estos resultados indican que la respuesta vascular mediada por los AR no es modificada por el SMet (Tabla 6 y Figura 8).

Tabla 6: Valores de $pD_2 \pm$ error estándar (e.e.) y del efecto máximo (E_{max}) \pm error estándar (e.e.), en respuesta a la norepinefrina en segmentos de aorta, carótida y renal procedentes de conejos control y con síndrome metabólico (SMet).

Norepinefrina	Control			SMet		
	n	$pD_2 \pm$ e.e.	$E_{max} \pm$ e.e.	n	$pD_2 \pm$ e.e.	$E_{max} \pm$ e.e.
Aorta	3	$6,70 \pm 0,16$	210 ± 9	3	$6,46 \pm 0,17$	194 ± 18
Carótida	7	$5,63 \pm 0,13$	137 ± 15	7	$5,40 \pm 0,09$	145 ± 18
Renal	5	$6,49 \pm 0,10$	181 ± 23	5	$6,35 \pm 0,12$	196 ± 23

n: número de conejos.

Resultados

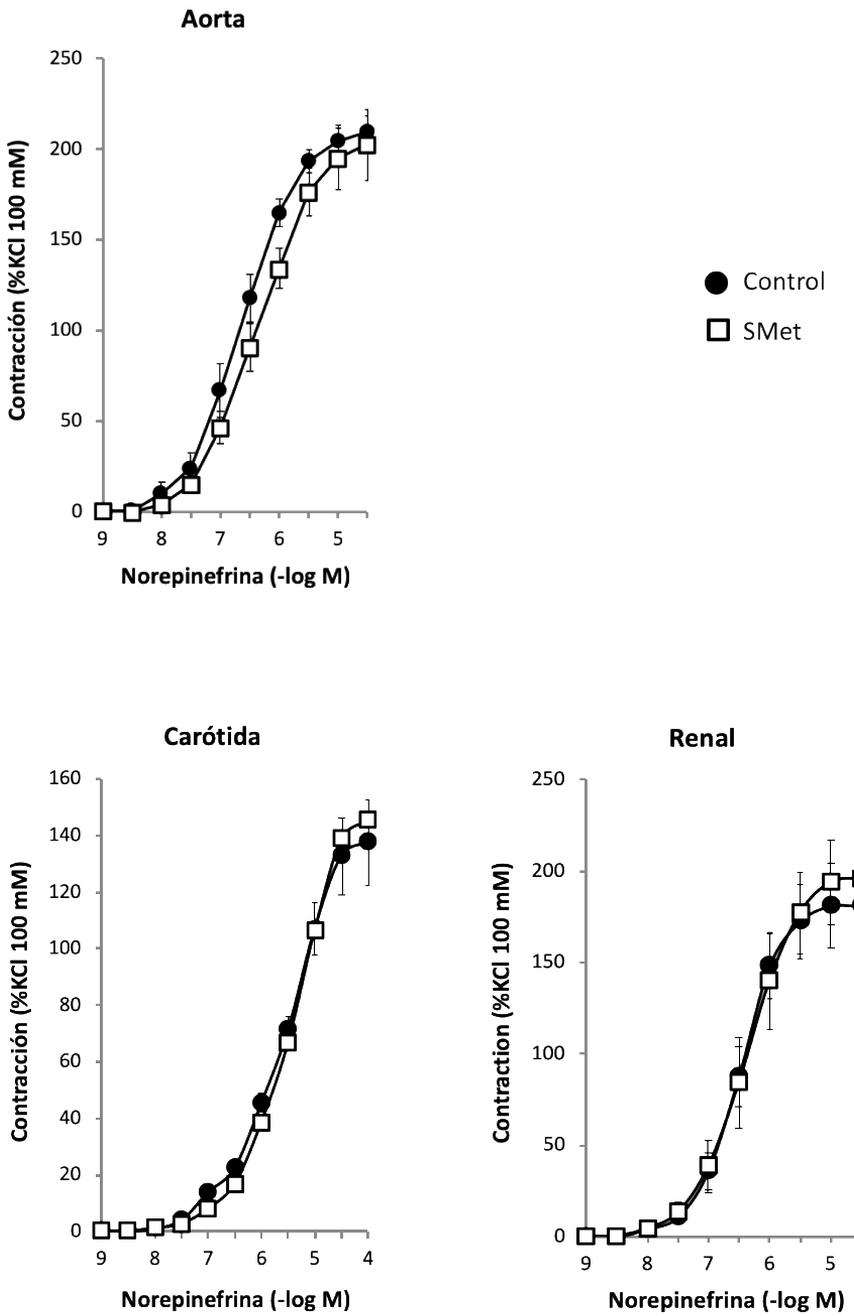


Figura 8: Respuesta a la norepinefrina en segmentos de aorta, carótida y renal de conejos control y con síndrome metabólico (SMet).

Respuesta a la endotelina-1

Se realizaron curvas concentración-respuesta a la ET-1 (10^{-12} - 10^{-6} M), obteniendo una contracción dependiente de la concentración que no se modificó en presencia del SMet en ninguno de los tres lechos arteriales estudiados (Tabla 7 y Figura 9). Por lo tanto, el SMet no altera la contractilidad vascular dependiente de ET-1, así como tampoco se altera la contracción independiente de receptor o dependiente de AR.

Tabla 7: Valores de $pD_2 \pm$ error estándar (e.e.) y del efecto máximo (E_{max}) \pm error estándar (e.e.), en respuesta a la endotelina-1 en segmentos de aorta, carótida y renal procedentes de conejos control y con síndrome metabólico (SMet).

Endotelina-1	Control			SMet		
	n	$pD_2 \pm$ e.e.	$E_{max} \pm$ e.e.	n	$pD_2 \pm$ e.e.	$E_{max} \pm$ e.e.
Aorta	3	$9,05 \pm 0,25$	119 ± 9	3	$8,86 \pm 0,02$	106 ± 6
Carótida	7	$8,54 \pm 0,13$	118 ± 15	7	$8,39 \pm 0,16$	133 ± 13
Renal	5	$8,69 \pm 0,30$	116 ± 5	5	$8,84 \pm 0,19$	119 ± 14

n: número de conejos.

Resultados

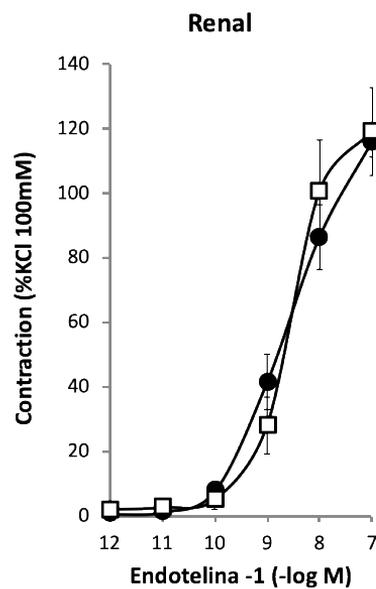
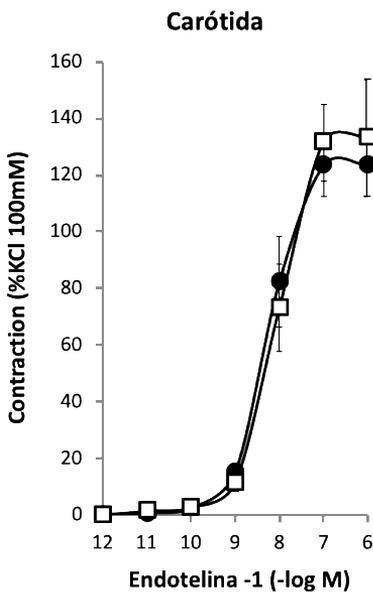
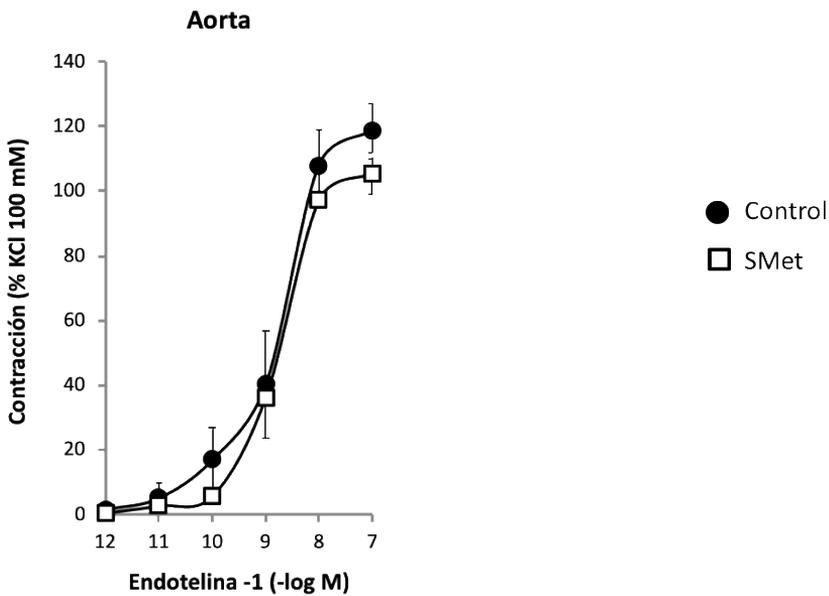


Figura 9: Respuesta a la endotelina-1 en segmentos de los tres lechos arteriales estudiados en el grupo control y con síndrome metabólico (SMet).

Estudio de la respuesta vascular relajante en aorta, arteria carótida y arteria renal

Respuesta a la acetilcolina

Para estudiar la relajación dependiente del endotelio, se realizaron curvas concentración-respuesta a la Ach. La Ach es un estimulante de la eNOS, y por tanto de la relajación, a través de su unión a los receptores muscarínicos M_3 situados en el endotelio. Aunque esta es la principal vía de relajación en arterias de conductancia, la Ach también puede activar otras vías que median relajación.

En los tres segmentos vasculares analizados, la Ach indujo una relajación dependiente de la concentración (10^{-9} - 10^{-5} M) (Tabla 8 y Figura 10). En la aorta, el SMet disminuyó significativamente la pD_2 , lo que indica una menor sensibilidad a la Ach, mientras que en las arterias carótida y renal el SMet no modificó el valor de pD_2 de la curva concentración-respuesta a la Ach. Por otra parte, el E_{max} no se alteró en ninguno de los tres lechos vasculares en presencia de SMet.

Una alteración en la respuesta a la Ach se relaciona con la disfunción endotelial, por lo que podemos asumir que el modelo de SMet induce un daño endotelial en aorta sin afectar a las arterias carótida y renal.

Resultados

Tabla 8: Valores de $pD_2 \pm$ error estándar (e.e.) y del efecto máximo (E_{max}) \pm error estándar (e.e.), en respuesta a la acetilcolina en segmentos de aorta, carótida y renal procedentes de conejos control y con síndrome metabólico (SMet).

Acetilcolina	Control			SMet		
	n	$pD_2 \pm$ e.e.	$E_{max} \pm$ e.e.	n	$pD_2 \pm$ e.e.	$E_{max} \pm$ e.e.
Aorta	7	$7,62 \pm 0,13$	81 ± 3	7	$6,82 \pm 0,21^*$	80 ± 4
Carótida	8	$7,15 \pm 0,14$	81 ± 2	8	$7,08 \pm 0,11$	84 ± 3
Renal	9	$7,56 \pm 0,13$	80 ± 5	9	$7,61 \pm 0,10$	86 ± 5

* $P < 0,05$ respecto al grupo control

n: número de conejos.

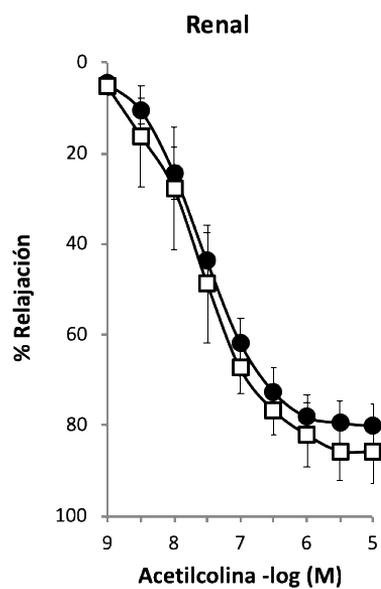
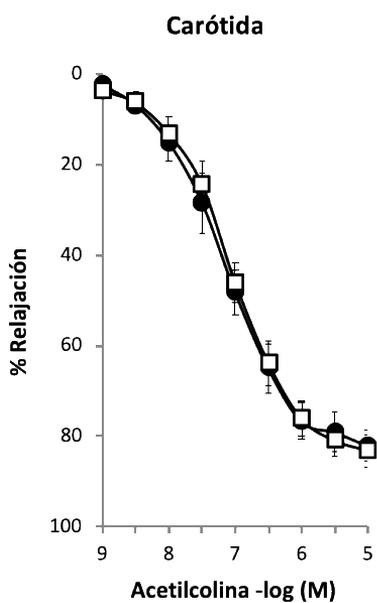
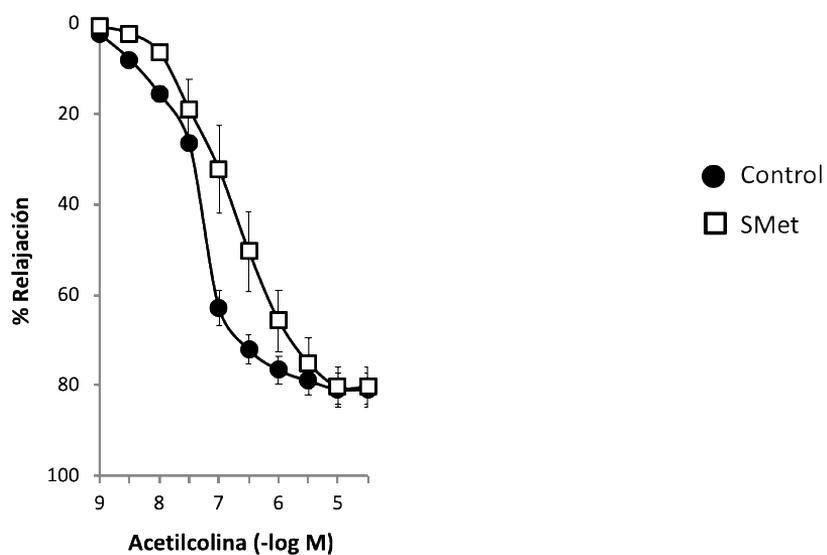


Figura 10: Respuesta a la acetilcolina en segmentos de los tres lechos arteriales estudiados previamente contraídos con norepinefrina en conejos control y con síndrome metabólico (SMet).

Respuesta al nitroprusiato sódico

Según Paul Vanhoutte¹⁶¹ no se puede concluir que exista una disfunción endotelial sin comprobar que la función del músculo liso vascular a dadores exógenos de NO esté inalterada. Es por ello que, con el fin de estudiar la capacidad relajante del músculo liso vascular independiente del endotelio, se realizaron curvas concentración-respuesta al NP (10^{-9} - 3×10^{-6} M).

El NP, dador directo de NO, produjo una relajación dependiente de la concentración en todas las arterias estudiadas (Tabla 9 y Figura 11). El SMet no modificó el valor de pD_2 en aorta, pero sí que disminuyó el valor de E_{max} indicando que la capacidad de relajación del músculo liso vascular se ve comprometida. Sin embargo, en las arterias carótida y renal no se observaron cambios respecto al E_{max} , pero el valor de pD_2 aumentó en presencia del SMet indicando que en estos dos lechos vasculares la sensibilidad al dador de NO es mayor.

Tabla 9: Valores de $pD_2 \pm$ error estándar (e.e.) y del efecto máximo (E_{max}) \pm error estándar (e.e.), en respuesta al nitroprusiato sódico en segmentos de aorta, carótida y renal procedentes de conejos control y con síndrome metabólico (SMet).

Nitroprusiato	Control			SMet		
	n	$pD_2 \pm$ e.e.	$E_{max} \pm$ e.e.	n	$pD_2 \pm$ e.e.	$E_{max} \pm$ e.e.
Aorta	4	$7,66 \pm 0,16$	98 ± 1	4	$7,49 \pm 0,08$	$89 \pm 2^*$
Carótida	6	$6,85 \pm 0,05$	84 ± 2	6	$7,13 \pm 0,09^*$	87 ± 4
Renal	5	$7,34 \pm 0,13$	97 ± 1	5	$7,78 \pm 0,10^*$	99 ± 1

* $P < 0,05$ respecto al grupo control

n: número de conejos.

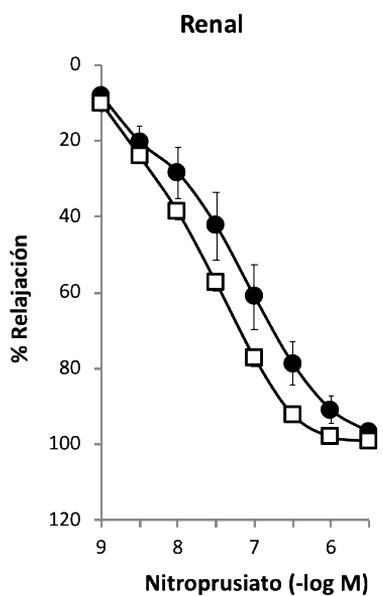
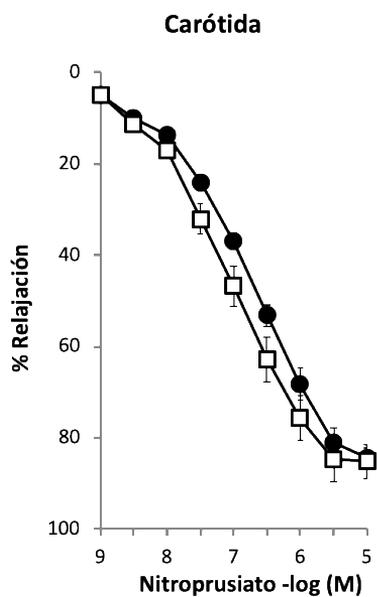
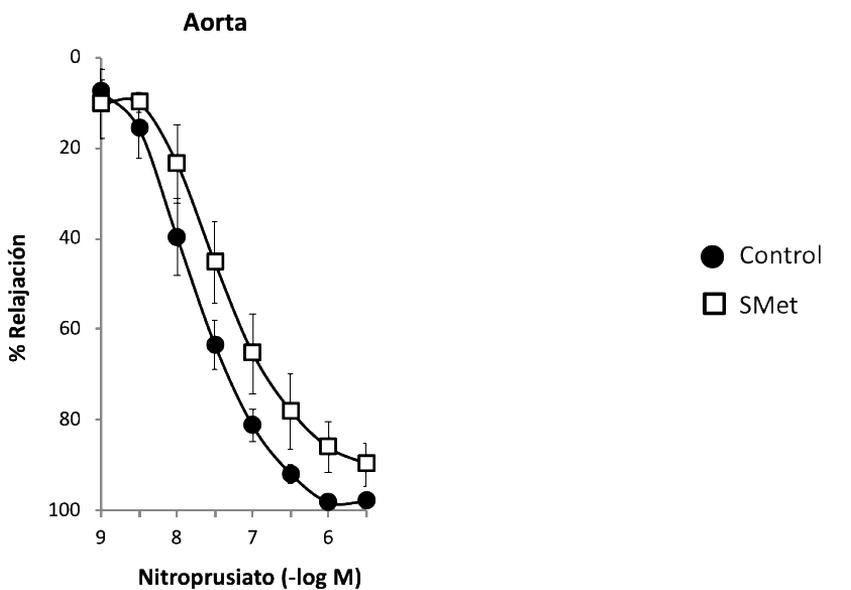


Figura 11: Respuesta al nitroprusiato sódico en segmentos de los tres lechos arteriales estudiados previamente contraídos con norepinefrina.

Estudio de la expresión proteica

Los resultados obtenidos en reactividad indicaron que el SMet induce alteraciones vasculares en aorta, sin afectar a la vasoconstricción, pero comprometiendo la vasodilatación, tanto dependiente como independiente de endotelio. En cambio, en las arterias carótida y renal, el SMet no alteró negativamente la función vascular. En estos dos lechos vasculares no se observó disfunción endotelial e incluso se obtuvo mayor vasodilatación no dependiente de endotelio. Es por ello, que el estudio de expresión proteica por WB se realizó en aorta, buscando la causa de la alteración vascular.

Se midió la expresión proteica por WB de los AR α_1 y β_2 observándose una disminución en la expresión de los β_2 en el SMet y sin cambios en la expresión del α_1 (Figura 12).

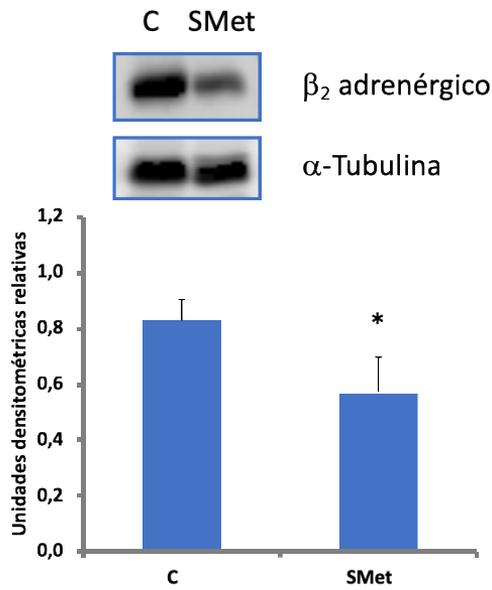
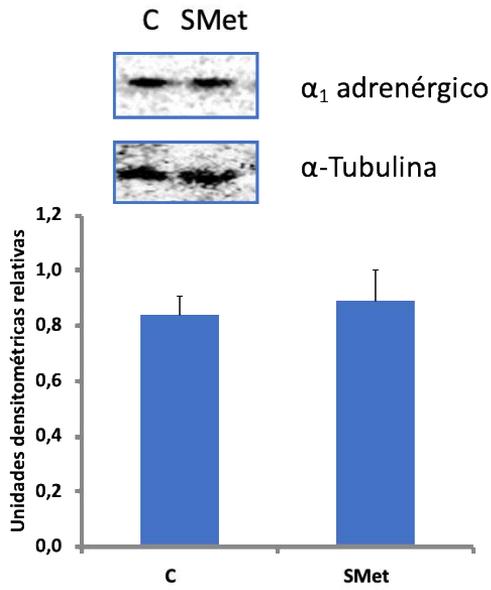


Figura 12: Expresión proteica de los receptores adrenergicos α_1 y β_2 en aorta de conejo control (C) y con síndrome metabólico (SMet).

Resultados

La expresión de los receptores ET-A y ET-B no se modificó en presencia del SMet, como ya apuntaban los resultados de reactividad vascular (Figura 13).

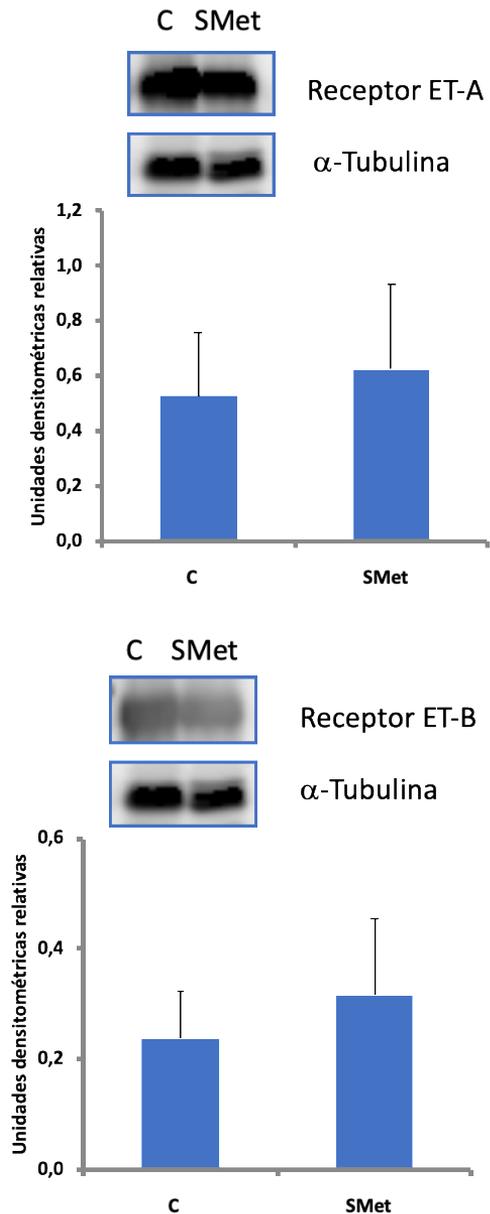


Figura 13: Expresión proteica de los receptores de endotelina-1 A (ET-A) y B (ET-B) en aorta de conejos control (C) y con síndrome metabólico (SMet).

Para comprobar el principal componente en la relajación mediada por el endotelio, se midió la expresión proteica de la eNOS. Los resultados mostraron que el SMet no modificó la expresión de esta proteína. Así que, la menor sensibilidad a la Ach observada en la aorta de los conejos con SMet no es debida a la menor expresión de eNOS (Figura 14).

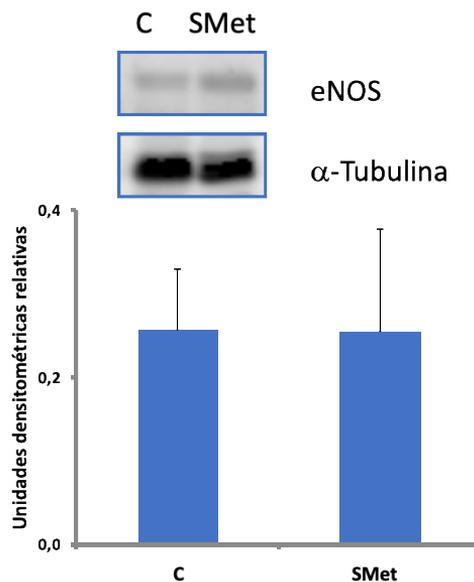


Figura 14: Expresión proteica de la óxido nítrico sintasa (eNOS) en aorta de conejos control (C) y con síndrome metabólico (SMet).

Otros factores endoteliales pueden estar liberándose en respuesta a la Ach, sin embargo, estudios preliminares de nuestro laboratorio mostraron que la relajación inducida por la Ach en aorta de conejo es debida fundamentalmente a NO (Figura 15). La incubación con indometacina ($10^{-5}M$), un inhibidor de la ciclooxigenasa, no modifica la relajación inducida por la Ach

Resultados

en aorta de conejo control. Como muestra la figura 15, la incubación conjunta de indometacina ($10^{-5}M$) más el inhibidor de la NOS, L-NAME ($10^{-4}M$) bloquea el 80% de la respuesta relajante. Al incubar con KCl 20 mM para bloquear inespecíficamente los canales de K^+ se obtiene un bloqueo ligeramente superior, pero no significativamente diferente, al obtenido con la incubación de indometacina + L-NAME. Aun así, medimos también la expresión proteica de los canales BK_{Ca} como elementos activos en la EDH, pero no se observaron diferencias entre control y SMet (Figura 16).

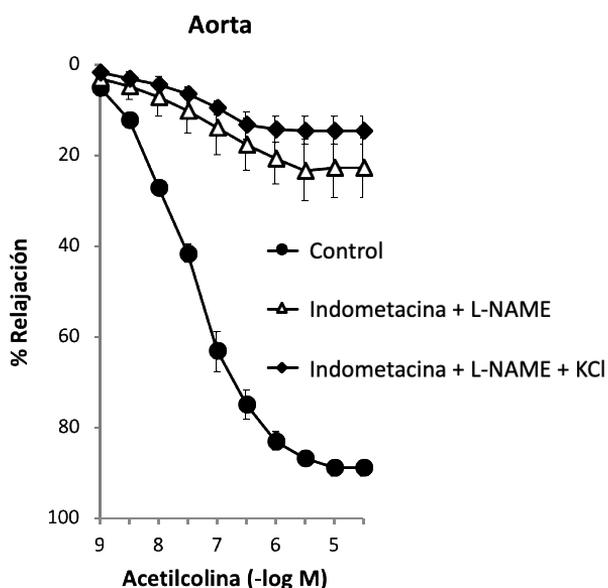


Figura 15: Curva concentración respuesta a la acetilcolina en segmentos de aorta procedentes de un grupo de experimentos preliminares realizados en conejos control en ausencia y en presencia de L-NAME ($10^{-4} M$) más indometacina ($10^{-5} M$) y L-NAME ($10^{-4} M$) más indometacina ($10^{-5} M$) más cloruro potásico (KCl) 20 mM.

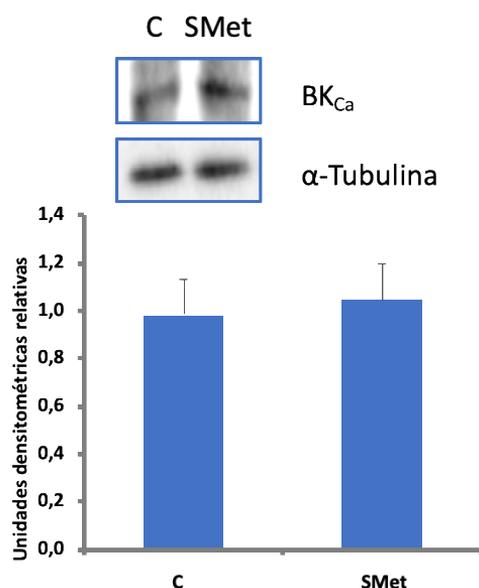


Figura 16: Expresión proteica de los canales de potasio activados por calcio de alta conductancia (BK_{Ca}) en aorta de conejos control (C) y con síndrome metabólico (SMet).

Por tanto, las diferencias observadas en la relajación a la Ach deben ser debidas a una menor biodisponibilidad de NO. Una de las principales causas es el estrés oxidativo. Con el fin de comprobar si existía estrés oxidativo a nivel local, es decir en la pared vascular, en nuestro modelo experimental, se determinó la expresión proteica de ambas isoformas de la SOD, encargadas de reflejar el estado de los mecanismos amortiguadores del estrés oxidativo, y de la Nox-4, la principal isoforma de la NADPH oxidasa a nivel vascular. Ninguno de estos sistemas se alteró con el SMet (Figuras 17 y 18).

Resultados

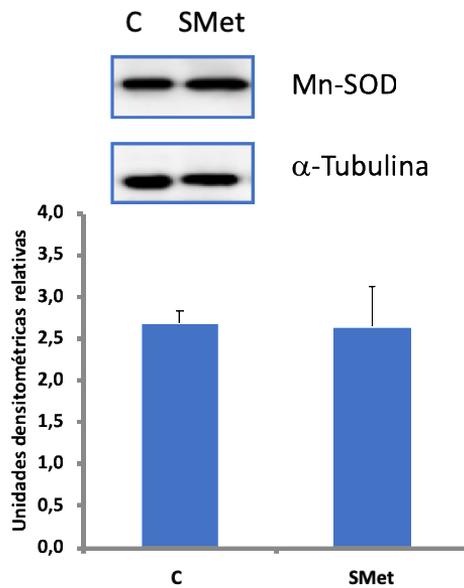
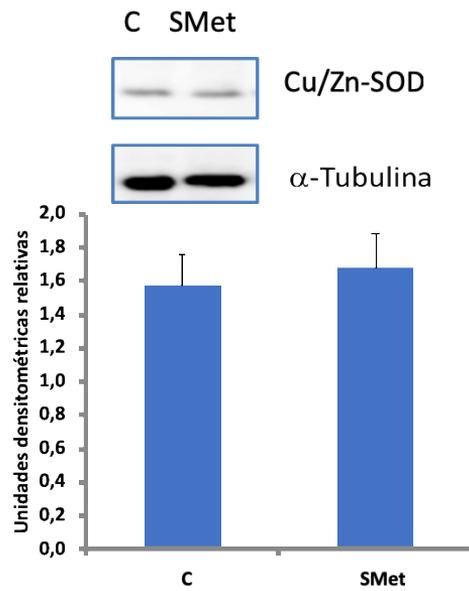


Figura 17: Expresión proteica de la superóxido dismutasa cobre /zinc (Cu/Zn-SOD) y manganeso (Mn-SOD) en aorta de conejos control (C) y con síndrome metabólico (SMet).

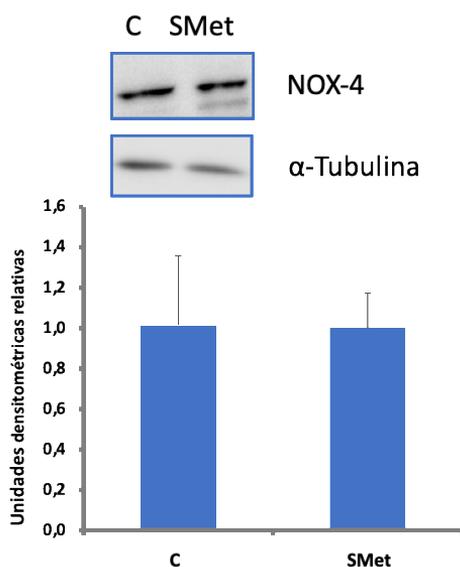


Figura 18: Expresión proteica de la NADPH oxidasa 4 (NOX-4) en aorta de conejos control (C) y con síndrome metabólico (SMet).

Como hemos mencionado al inicio de esta tesis, el SMet cursa con inflamación, por lo que medimos los niveles de expresión proteica de iNOS, COX-2 y PPAR γ a nivel vascular con la finalidad de comprobar si existía un estado pro-inflamatorio que explicase la disfunción endotelial. De nuevo, no hallamos diferencias significativas en los niveles de expresión de iNOS (Figura 19) y de COX-2 (Figura 20), mientras que los niveles de PPAR γ se redujeron a la mitad en las aortas procedentes de conejos con SMet (Figura 21). El PPAR γ es un regulador de la vía metabólica relacionada con la adipogénesis y la sensibilidad a la insulina¹⁶² y con funciones anti-inflamatorias que activa la AMP cinasa (AMPK) que fosforila el Akt que a su vez activa la eNOS. Por lo tanto, al encontrar un descenso significativo del PPAR γ , medimos los niveles de las proteínas Akt y Akt fosforilada (P-Akt). Los resultados mostraron una reducción

Resultados

de la P-Akt, sin cambios en la Akt en los segmentos de aorta de conejos con SMet (Figura 22).

Estos resultados indicarían que la vía Akt/eNOS/NO puede estar disminuida por una disminución de PPAR γ , lo cual explicaría la menor sensibilidad a la Ach observada en la aorta del SMet.

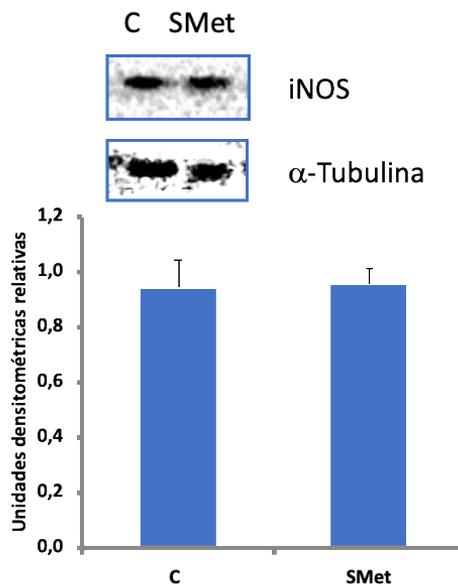


Figura 19: Expresión proteica de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en aorta de conejo control (C) y síndrome metabólico (SMet).

Figura 20: Expresión proteica de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) en aorta de conejo control (C) y síndrome metabólico (SMet).

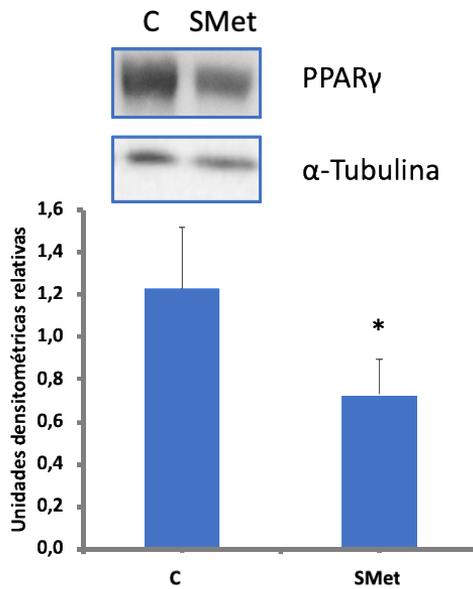
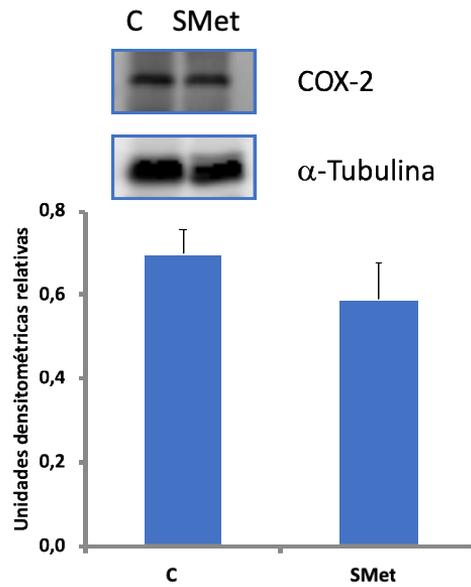


Figura 21: Expresión proteica del receptor gamma activado por proliferadores peroxisómicos (PPAR γ) en aorta de conejo control (C) y síndrome metabólico (SMet).

Resultados

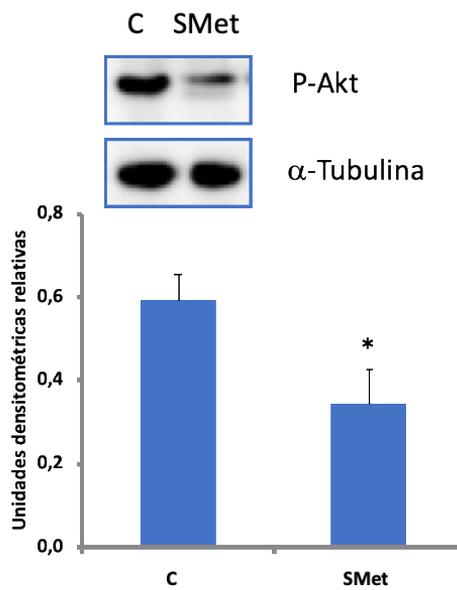
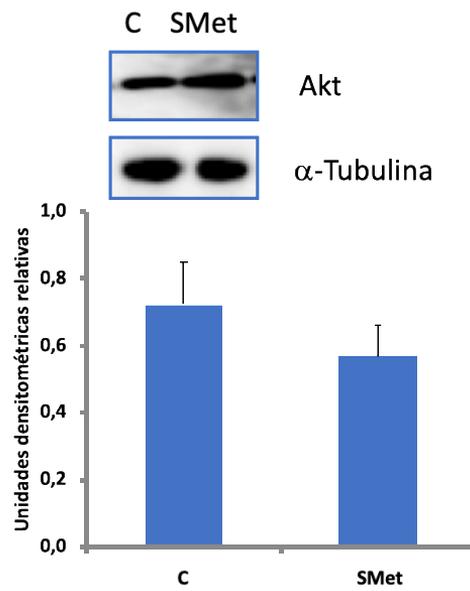


Figura 22: Expresión proteica de Akt y Akt fosforilado (P-Akt) en aorta de conejos control (C) y con síndrome metabólico (SMet).

Discusión

Ventajas y limitaciones

Una de las ventajas de realizar experimentos en órgano aislado es eliminar todas las regulaciones fisiológicas que no sean locales, es decir toda la regulación neurohumoral, de manera que lo observado en nuestros resultados corresponde a los mecanismos que se dan en la propia pared vascular. Precisamente, esto también constituye una limitación, ya que al extrapolar los resultados obtenidos “in vitro” a la situación “in vivo” nos encontraremos con más factores que podrían modificar la respuesta observada en el órgano aislado.

Por otra parte, como en cualquier otro estudio con animales de experimentación y con modelos de enfermedades humanas, hay que ser cautelosos a la hora de trasladar los resultados al ser humano.

Justificación de la elección de especie y de los vasos de estudio

El modelo experimental utilizado en la presente tesis obedece a la existencia de un modelo de SMet desarrollado por el grupo de Electrofisiología Cardíaca Experimental (GRELCA) del Departamento de Fisiología de la Universitat de València, liderado por el Prof. Such. Concretamente los animales utilizados en este trabajo procedían del proyecto titulado: *“Estudio del remodelado cardíaco producido en un modelo experimental de síndrome metabólico”*, cuyo investigador principal era el Dr. Zarzoso. Las muestras se obtuvieron haciendo uso de aprovechamiento de especie.

El conejo como animal de investigación traslacional fue de uso prioritario hasta la aparición de los ratones modificados genéticamente¹⁶³. Actualmente, sigue siendo habitual en estudios relacionados con la

Discusión

aterosclerosis debido a la semejanza con el ser humano en la formación de ésta¹⁶³, mayor que en ratas y ratones y mejor estudiado que en hámsteres y cobayas¹⁶⁴.

Los primeros estudios nutricionales en conejos para el estudio de daño vascular inducido por la dieta se remontan a 1908, cuando se comprobó que una dieta alta en proteínas producía lesiones sobre la capa íntima de la aorta ¹⁵⁷ en ¹⁵⁹⁻¹⁶¹. Años más tarde, Anitschkow realizó experimentos con conejos que desarrollaban aterosclerosis de un modo similar a los humanos^{168,169} en ¹⁶⁶.

A pesar de su idoneidad para el estudio de la aterosclerosis, hay que recordar que se trata de un animal herbívoro, lo que podría considerarse como una limitación. De hecho, la dieta que suelen seguir los conejos New Zealand White en condiciones de laboratorio suele contener un 15% de proteína, entre un 40-50% de carbohidratos, 2% de grasa vegetal y un 15-25% de fibra^{163,170}. El porcentaje de colesterol en estas dietas suele ser menor al 0,01%¹⁶³. En la presente tesis, el porcentaje de colesterol (proporcional al porcentaje de manteca de cerdo, que posee un 95% de colesterol) representaba un 5% de la ingesta total de calorías.

Por otra parte, la elección del sexo es fundamental puesto que los machos muestran menor variación en el colesterol plasmático que las hembras, por lo que son más comúnmente usados en este tipo de trabajos de investigación¹⁷¹.

La aorta es el vaso sanguíneo de mayor calibre que da origen a todas las arterias del sistema circulatorio. Es un vaso muy elástico que soporta grandes presiones con un papel importante en la regulación de la presión arterial. Los

segmentos utilizados en este trabajo corresponden a la aorta abdominal. De ella nacen las dos arterias renales, también estudiadas en esta tesis. El mantenimiento de la presión arterial depende de múltiples factores, pero indudablemente el riñón es un órgano crucial en la homeostasis de dicha función. El flujo sanguíneo hacia el riñón afectaría la función glomerular, pudiendo tener consecuencias en la regulación de la presión arterial. Por otra parte, las arterias carótidas constituyen el principal aporte sanguíneo al cerebro, por lo que alteraciones en este vaso podrían tener consecuencias en la irrigación cerebral.

En los seres humanos, los primeros signos y la mayor localización de aterosclerosis se dan en la aorta abdominal, mientras que en conejos alimentados con colesterol, los primeros signos aparecen en el arco aórtico y más tarde en la aorta torácica, emergiendo en la aorta abdominal cuando la lesión de toda la arteria es severa¹⁶³. Otros investigadores han hallado que en la aorta situada por encima de las arterias renales es más común encontrar placas tempranas (tipo I y II), mientras que placas más avanzadas se sitúan predominantemente por debajo de la arteria renal¹⁷².

Nuestros resultados indican que la primera arteria en afectarse por el SMet es la aorta, comparada con las arterias carótida y renal, por lo que se podría considerar como un marcador temprano de disfunción vascular.

Efectos de la dieta

El modelo experimental ha conseguido desarrollar un SMet inducido por una dieta hipercalórica, alta en grasa y fructosa, como muestran los parámetros morfológicos y bioquímicos obtenidos. El SMet inducido por la dieta ha

Discusión

conseguido provocar obesidad central, un estado de prediabetes, una ligera hipertensión y una alteración en el perfil lipídico con aumento plasmático de triglicéridos y colesterol LDL y reducción de cHDL. Por lo tanto, se cumplen los criterios para poder diagnosticarlo según el consenso de 2009 propuesto por la Federación Internacional de Diabetes, la Asociación Americana del Corazón/ Instituto Nacional del Corazón, Pulmón y Sangre, la Federación Mundial del Corazón y la Sociedad Internacional de la Aterosclerosis y la Asociación Internacional para el estudio de la Obesidad¹.

Respuesta contráctil

Hemos estudiado la respuesta contráctil independiente (inespecífica) y dependiente de receptor (específica). La primera mediante la administración de concentraciones crecientes y acumulativas de KCl y la segunda mediante las curvas concentración-respuesta a la NE, por la importancia del sistema adrenérgico en el control del tono vascular¹⁷³ y a la ET-1, por ser un factor de origen endotelial aumentado en el SMet¹⁷⁴.

Respuesta contráctil inespecífica

La administración de KCl al medio extracelular origina una vasoconstricción ya que actúa despolarizando la membrana del músculo liso y activando la entrada de Ca^{+2} a través de los canales de Ca^{+2} -voltaje dependientes^{175,176}.

En nuestros resultados, el SMet no modificó la respuesta contráctil al KCl en ninguno de los lechos vasculares estudiados, lo que indica que la capacidad contráctil del músculo liso vascular se mantuvo intacta. Esto concuerda con otros estudios en los que la obesidad inducida por la dieta no modificó la respuesta vascular al KCl. En arterias mesentéricas de tercer orden en ratas

hembra, una dieta rica en grasa no alteró la respuesta vascular al KCl¹⁷⁷. En el mismo sentido, otros autores demostraron que las dietas hipercalóricas, por aumento de grasas o dietas proobesidad, no alteraban la respuesta vascular al KCl en mesentéricas de tercer orden de rata^{178,179}, ni en mesentéricas de cuarto orden de rata¹⁸⁰.

Por el contrario, otros estudios han demostrado que la diabetes experimental o una dieta alta en grasas pueden alterar la respuesta vascular al KCl. Por ejemplo, en ratas con diabetes inducida se redujo la respuesta al KCl en aorta¹⁸¹. La dieta alta en grasas aumentó la respuesta al KCl en aorta torácica de conejo¹⁸². Un estudio realizado por Head y colaboradores¹⁸³, analizó los efectos la diabetes inducida en ratas y conejos. Los resultados mostraron que la respuesta contráctil al KCl no se afectó en la aorta torácica de conejo, mientras que se redujo en la aorta de rata. Estos resultados sugieren la existencia de mecanismos diferentes en función de la especie, modelo y lecho vascular.

Respuesta contráctil específica

El sistema nervioso simpático (SNS) es uno de los reguladores más importantes del flujo sanguíneo y la NE el neurotransmisor más influyente en la reactividad vascular, liberándose en función de la frecuencia de estimulación^{184,185} y produciendo una contracción dosis dependiente.

Diversos trabajos han descrito la relación entre SMet y SNS^{125,126,186-191}. Por ejemplo, hay mayor liberación y reabsorción de NE en personas delgadas que en obesas¹⁹² y la circunferencia abdominal¹⁹³ y el porcentaje de grasa corporal se relacionan directamente con la activación del SNS¹⁹³⁻¹⁹⁶. Concretamente la obesidad, en general, y el incremento en el perímetro

Discusión

abdominal, en particular, son los factores más influyentes en la activación del SNS¹⁹³.

En el presente trabajo, la respuesta a la NE no se modifica en ninguno de los tres vasos estudiados por la presencia de SMet. En consonancia con nuestros resultados, otros estudios realizados con ratas muestran resultados parecidos^{177,197}, donde la respuesta contráctil a la NE se mantuvo sin diferencias entre los grupos control y SMet¹⁷⁷. En esta misma línea, un estudio en pacientes comprobó, mediante el flujo sanguíneo en el antebrazo por pletismografía de oclusión venosa, que ni el sobrepeso ni la obesidad alteraban la respuesta a la NE¹⁹⁸. En contraste con lo anterior, se ha visto que en ratones alimentados con una dieta rica en grasas, la respuesta contráctil a la NE se reduce en aorta^{199,200}.

Un estudio reciente concluye que una dieta alta en grasa y sacarosa altera la señalización de los receptores adrenérgicos α_1 en aorta, reduciendo la respuesta a la fenilefrina. Cuando se elimina el endotelio, las arterias del SMet responden a la fenilefrina igual que el grupo control. Los autores también hallaron un aumento de epinefrina plasmática en SMet y una fosforilación de la eNOS-Ser¹⁷⁷ inducida por la fenilefrina. Este estudio concluye que el endotelio limita los efectos contráctiles inducidos por el SMet¹²⁴.

Otros estudios como el de Aoqui y colaboradores²⁰¹ muestran que el SMet inducido por la dieta, aumenta la sensibilidad a la NE en arteria mesentérica superior de primer y segundo orden de ratón. Según estos autores el aumento es independiente de endotelio debido a un menor efecto anticontráctil del PVAT en el SMet.

Por lo tanto, la respuesta a la NE puede estar modulada por factores endoteliales o derivados del PVAT que compensen la posible alteración inducida por el SMet a nivel vascular o que sean los causantes de la respuesta anómala.

Para completar el estudio de la respuesta adrenérgica se determinó la expresión proteica en aorta de los receptores adrenérgicos α_1 y β_2 . Los resultados no mostraron cambios en la expresión de los receptores α_1 , mientras que los β_2 se redujeron en el SMet. La estimulación de los receptores adrenérgicos β_2 se relaciona con una mayor producción de NO endotelial²⁰² a través de la vía Akt²⁰³. Según nuestros resultados, el SMet produciría menos NO en respuesta a la estimulación adrenérgica por tener menos expresados los β_2 , sin embargo, esta infraexpresión no es de suficiente magnitud como para alterar significativamente la curva a la NE exógena. Probablemente porque la expresión de los receptores α_1 es cuantitativamente mayor que la de los β_2 , los cuales muestran poca o ninguna actividad en la aorta abdominal de conejo²⁰⁴.

Otros autores han demostrado que ratones obesos y con diabetes presentan una mayor sensibilidad al agonista α -adrenérgico, fenilefrina, y una menor sensibilidad al agonista β -adrenérgico, dobutamina²⁰⁵. Aunque sus resultados podrían estar en consonancia con una menor expresión de los AR β_2 en diabetes y obesidad, estos autores no midieron los niveles de expresión de los adrenoreceptores.

En el SMet y el sobrepeso se han descrito niveles plasmáticos elevados de ET-1²⁰⁶, así como un aumento de la vasoconstricción inducida por ET-1 en estas patologías y en la hiperglucemia^{174,198,207}. En una revisión realizada por Campia y colaboradores, se sugiere que la vía de señalización vascular de la

Discusión

ET-1 está aumentada en obesidad, diabetes mellitus tipo 2 y SMet, contribuyendo a la disfunción vascular²⁰⁸. En el mismo sentido, Rocha y colaboradores miden por pletismografía de oclusión venosa el flujo sanguíneo en pacientes con SMet y concluyen que existe una reducción del flujo mayor que en controles en respuesta a la ET-1 y que es mediada por el receptor ET-A¹⁷⁴. No obstante, en nuestros resultados la respuesta contráctil a la ET-1 no se modificó en ninguno de los tres lechos de estudio. En consonancia, otros autores tampoco encontraron diferencias en la respuesta vascular a la ET-1 en carótida o ílica de ratones obesos. Aunque sí un aumento de la sensibilidad en la arteria renal²⁰⁹. En arterias coronarias de perros con SMet y estado de prediabetes, la administración de ET-1 no modificó ni el flujo sanguíneo ni la respuesta vascular²¹⁰. Sin embargo, estos autores observan una reducción en la expresión proteica y génica de los receptores ET-A, sugiriendo que una alteración en la señalización vascular de la ET-1 podría ser un marcador temprano de disfunción vascular en el SMet²¹⁰.

A pesar de que nuestros resultados no mostraron diferencias en la reactividad vascular, con el fin de profundizar en el estudio del sistema vascular de la ET-1, se cuantificó la expresión proteica de sus receptores. Nuestros resultados no mostraron diferencias entre grupos. En base a los estudios mencionados anteriormente, una posible explicación para la no alteración de la vía de la ET-1 podría ser que nuestros animales se encontrasen en una fase inicial del SMet.

Respuesta relajante

Entre los factores relajantes derivados del endotelio destaca el NO. Esta molécula se produce en respuesta a factores físicos y neurohumorales y a la Ach²¹¹⁻²¹³ que activa los receptores muscarínicos localizados en el endotelio. Estos receptores a su vez estimulan la eNOS aumentando la síntesis de NO y produciendo vasodilatación. Por eso, la respuesta a la Ach es comúnmente utilizada como prueba de funcionalidad endotelial²⁵. Así, la disminución en la respuesta relajante a la Ach se asocia a disfunción endotelial y es posible establecer una relación entre el grado de vasodilatación y la fase de disfunción endotelial. Por ejemplo, la vasodilatación inducida por el endotelio llega a reducirse entre un 40-50% con obesidad y diabetes insulino-independientes⁵⁷. También se ha visto que el sobrepeso y la obesidad comprometen la función endotelial, pero no la relajación independiente de endotelio, en humanos con o sin resistencia a la insulina¹⁹⁸.

Según Paul Vanhoutte¹⁶¹ no se puede concluir que exista una disfunción endotelial sin comprobar que la función del músculo liso vascular a dadores exógenos de NO esté inalterada. Por eso, es necesario comprobar la respuesta al nitroprusiato y así poder afirmar si hay daño endotelial o vascular.

Nuestros resultados indican que el SMet induce una disfunción vascular en la aorta, causando una menor sensibilidad a la Ach sin afectar al Emax y una menor capacidad relajante independiente de endotelio, como muestra el Emax reducido para el NP. Sin embargo, en las arterias carótida y renal no existen cambios en la respuesta a la Ach y en cuanto al NP la sensibilidad aumenta con el SMet. Estos resultados los interpretamos como una disfunción vascular en

Discusión

aorta, donde la capacidad del endotelio se ve afectada para producir NO y por tanto, aunque el Emax no se altera, sí lo hace la sensibilidad. Esta menor capacidad de respuesta al NO se ve reflejada en el menor Emax para el NP. Sin embargo, en las arterias carótida y renal no hay afectación endotelial porque la capacidad del músculo liso para responder al NO es mayor, como muestra la mayor sensibilidad al NP en el SMet y por tanto compensaría la función vasodilatadora. Además, estos resultados también indican que el SMet daña antes la aorta que las arterias carótida y renal. En consonancia con esto, otros autores han relacionado la aparición de los primeros síntomas en la aorta¹⁶³.

En la literatura encontramos cierta controversia con respecto al efecto que el SMet tiene sobre la vasodilatación. Algunos autores afirman que el SMet inducido en ratas puede reducir la vasodilatación dependiente e independiente de endotelio¹⁹⁷, mientras que otros investigadores no han encontrado alteraciones en la función endotelial²¹⁴. Dentro de esta enfermedad multifactorial, la obesidad parece tener un efecto mayor sobre la disfunción endotelial que la hiperglucemia, ya que la restauración de valores normales de glucosa no revierte los valores de relajación derivada del endotelio en obesos, con y sin resistencia a la insulina⁵⁷. De acuerdo con este estudio, otros autores han obtenido resultados similares relacionando la reducción en la respuesta a la Ach con la masa grasa¹⁹⁷ u obesidad¹⁷⁷.

En el mismo sentido que nuestros resultados obtenidos en arterias carótida y renal, otros autores han observado que una dieta alta en grasas produce en arterias coronarias una mayor sensibilidad al NP, sin alterar la respuesta a la Ach. La explicación propuesta es un aumento de actividad de la guanilato ciclasa soluble, ya que no observaron cambios en la expresión

proteica de la eNOS ni en la expresión de la subunidad β -1 de guanilato ciclasa soluble, pero sí se incrementaron los niveles de cGMP²¹⁵ en respuesta al NP. Estos autores concluyen que la obesidad incrementaría la actividad de la guanilato ciclasa soluble, constituyendo un mecanismo de compensación para preservar la señalización vascular de NO²¹⁵.

Centrándonos en la disfunción endotelial observada en la aorta y dado que el principal motivo de disfunción es la falta de NO^{216,217}, medimos la expresión proteica por WB de eNOS sin encontrar diferencias entre grupos, por lo que en nuestro modelo esa disfunción no parece estar mediada por una menor producción de NO en aorta. Este resultado estaría en concordancia con otros en los que ratas obesas sometidas a una dieta alta en grasas mostraron expresiones similares de eNOS²¹⁵. Mientras que en otros modelos de obesidad y dietas alta en grasas la expresión de eNOS se redujo²¹⁸.

Si bien es cierto que el NO es el principal vasodilatador en la aorta y que la respuesta a la Ach es mediada en gran parte por la activación de la eNOS, otros factores endoteliales podrían estar participando en esta respuesta, como las prostaciclina o la hiperpolarización derivada del endotelio que activa canales de K⁺ activados por Ca⁺². El hecho de que nuestro modelo de SMet altere la sensibilidad, pero no el Emax a la Ach en aorta, podría explicarse por un aumento de participación de otros factores endoteliales. En este sentido, medimos la expresión proteica de los canales de K⁺ activados por calcio de alta conductancia, sin observar cambios significativos entre grupos. Incluso así, la hipótesis seguiría siendo plausible, pues la actividad de estos canales o de otros similares podría estar aumentada sin necesidad de estarlo su expresión. Harían falta más estudios para corroborarlo.

Discusión

Nuestra primera hipótesis para explicar la disminución de la sensibilidad a la Ach en aorta procedente de SMet fue la menor biodisponibilidad de NO, pero al no hallar diferencias en la expresión proteica de eNOS nos planteamos si la menor biodisponibilidad pudiese estar relacionada con el aumento de estrés oxidativo. La principal especie reactiva de oxígeno es el O_2^- , producido principalmente a partir de la NADPH oxidasa. El O_2^- reduce la biodisponibilidad de NO convirtiéndolo en $ONOO^-$. Esta reacción se reduce gracias a los sistemas antioxidantes que contiene el vaso, como la SOD, la catalasa, la glutatión peroxidasa, el sistema de tioredoxina y las peroxidoxinas⁷⁹.

Algunos autores han sugerido que en ratas hipertensas alimentadas con dieta alta en grasas la disminución de respuesta a la Ach en aorta, pero no al NP, se debe a una disfunción endotelial provocada por aumento del estrés oxidativo y a una menor síntesis de NO²¹⁹. Sin embargo, en nuestro estudio, esta explicación no es plausible ya que ambas respuestas relajantes están afectadas en la aorta indicando una disfunción vascular que no podemos relacionar con estrés oxidativo fundamentalmente por dos motivos. Primero, porque si la causa fuera un aumento de estrés oxidativo en la pared vascular, la respuesta a la Ach disminuiría debido a la menor biodisponibilidad de NO por aumento de especies reactivas de oxígeno, pero esto no debería afectar a la respuesta al NP, pues no implica síntesis de NO. Segundo, hemos medido la expresión proteica de ambas isoformas de la SOD y no hay diferencias entre grupos. También hemos determinado la expresión proteica de la Nox-4, la principal isoforma de la NADPH oxidasa a nivel vascular y no varía en nuestro modelo.

Por tanto, el SMet inducido por la dieta afecta a la capacidad vasodilatadora tanto dependiente como independiente de endotelio en la aorta

de conejo. Sin embargo, no afecta a la relajación dependiente de endotelio en las arterias carótida y renal, donde un aumento en la sensibilidad al NO por parte del músculo liso compensaría el déficit de la función vasodilatadora preservando el flujo sanguíneo. Esto indicaría que los primeros signos de disfunción vascular inducidos por el SMet aparecerían en la aorta.

En este sentido, Kamimura et al.²²⁰ demostraron que en conejos macho New Zealand White una dieta rica en colesterol induce aterosclerosis antes en la arteria aorta que en carótida y renal. Aunque el estudio solo duraba 15 semanas y nuestro modelo es de 28, los efectos podrían ser extrapolables, debido a que el grado de agresión vascular es variable según la dieta²²¹. Por otro lado, Aoki y colaboradores²⁰¹ estudiaron la progresión del SMet en ratones, diferenciando entre SMet inicial, que se presenta a las 2 semanas con ligero aumento de peso, incremento de la grasa visceral, hipercolesterolemia e hipertensión, y SMet completamente desarrollado, que aparecería a las 8 semanas con inflamación sistémica y resistencia a la insulina, además de las anteriores. En base a estos estudios podemos especular que en nuestro modelo nos encontramos en una fase temprana del SMet.

Inflamación vascular y estrés oxidativo

El SMet se relaciona con inflamación²²²⁻²²⁴, pero tal y como hemos comentado en el apartado anterior, la inflamación sistémica aparecería en una fase tardía. En nuestro modelo, determinamos la expresión en aorta de iNOS y de COX-2 como proinflamatorios y no obtuvimos cambios con el SMet. También se midieron los niveles de expresión proteica de PPAR γ como factor capaz de reducir la inflamación, los factores de riesgo cardiovascular¹⁶² y consigo la

Discusión

aterosclerosis²²⁵. El único indicativo de un proceso de inflamación que encontramos en nuestro estudio fue el descenso en los niveles de expresión proteica de PPAR γ en aorta.

El SMet se relaciona con estrés oxidativo, como se ha comentado ampliamente en la introducción de la presente tesis^{226,227}. Nuestros resultados indican la no existencia de un desequilibrio relativo a la producción de RONS, probablemente porque nos encontremos en un estadio precoz de daño vascular. El SMet no modificó la expresión de Cu/Zn-SOD, Mn-SOD o Nox-4. Vale la pena resaltar el efecto cardioprotector que algunos autores le confieren a la NOX-4, ya que genera H₂O₂ en vez de O₂⁻, como lo hacen la NOX-1, 2 y 5, con lo cual puede favorecer la vasodilatación. No obstante, el H₂O₂ puede convertirse en agua si hay antioxidantes como la catalasa, pero si estos fallan dará lugar a la oxidación irreversible de proteínas²²⁸.

Se ha visto que el endotelio de aorta de ratón con diabetes mellitus tipo I tiene reducidos los genes que regulan la NOX-4, mientras que están aumentados en el músculo liso vascular²²⁹. Estos autores concluyen que la pérdida de NOX-4 es el mayor determinante para la aparición de la aterosclerosis.

Vía PPAR γ /Akt/eNOS/NO

El PPAR está involucrado en la fisiopatología de numerosas enfermedades como la obesidad, la diabetes o la aterosclerosis. Su función antiinflamatoria y su capacidad para disminuir la resistencia a la insulina, lo convierten en un factor antiaterogénico y protector cardiovascular. Por esta razón, los agonistas del

PPAR γ , como las tiazolidinedionas, se utilizan para tratar la diabetes mellitus tipo 2²³⁰

El PPAR γ activa la AMPK que fosforila el Akt. El P-Akt activa la eNOS por fosforilación de la Ser¹¹⁷⁷, incrementando la actividad enzimática y la producción de NO¹⁴⁸ (Figura 23). Por lo tanto, al encontrar un descenso significativo del PPAR γ en nuestro modelo de SMet, decidimos medir los niveles de las proteínas Akt y P-Akt. Los resultados mostraron una reducción de la P-Akt, sin cambios en la Akt en los segmentos de aorta de conejos con SMet. Estos resultados indicarían que la vía Akt/eNOS/NO puede estar disminuida por una disminución de PPAR γ , lo cual explicaría la menor sensibilidad a la Ach observada en la aorta del SMet. Resultados obtenidos por Peterson y colaboradores también muestran una menor expresión de P-Akt en aorta procedente de ratones con obesidad²³¹. En la misma línea, Li y colaboradores concluyen que la estimulación de células endoteliales de pulmón de rata con agonistas del PPAR γ aumentan el P-AKT y la actividad de la eNOS, aumentando el efecto vasodilatador de la Ach²³².

Así pues, nuestro modelo tiene reducida la sensibilidad a la Ach en aorta, probablemente por una disminución de la vía PPAR γ /Akt/eNOS, ya que no hay indicios de estrés oxidativo vascular, ni afectación de canales de K⁺ activados por calcio que pudieran estar participando en la vasodilatación mediada por hiperpolarización. Sin embargo, esto no explicaría la disminución de Emax observada en respuesta al NP. La explicación unificada de estos resultados sería que la vía PPAR γ /Akt/eNOS alterada en la aorta inicia la disfunción endotelial, que no es compensada por un aumento de la actividad de

Discusión

la GCs en el músculo liso, como ocurre probablemente en las arterias carótida y renal.

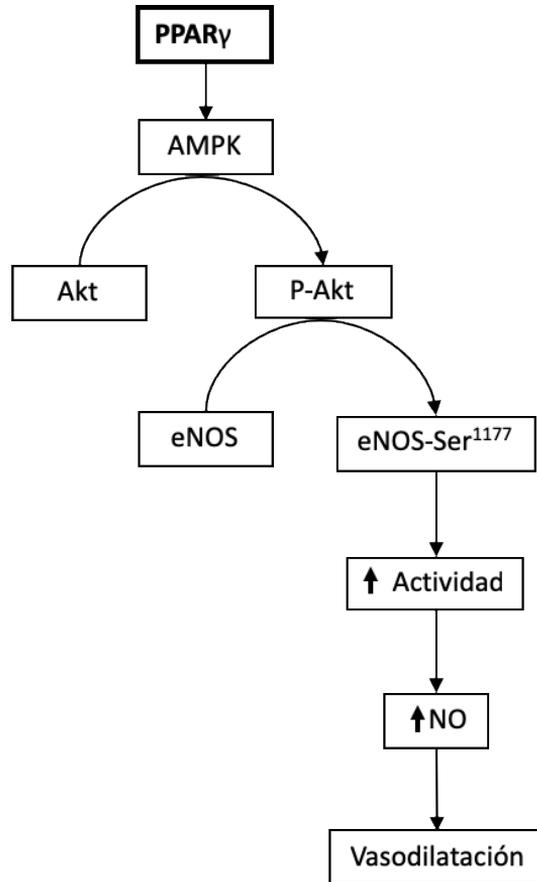


Figura 23: Vía de señalización del PPAR γ en la inducción de vasorrelajación. El receptor gamma activado por proliferadores peroxisómicos (PPAR γ) estimula la adenosina monofosfato cinasa (AMPK) que fosforilara el Akt (P-Akt). El P-Akt activa la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) mediante la fosforilación de la serina¹¹⁷⁷ (Ser¹¹⁷⁷). La eNOS activada (eNOS-Ser¹¹⁷⁷) produce un incremento en

la síntesis de óxido nítrico (NO), y por lo tanto, vasodilatación. El SMet disminuiría la vasodilatación en aorta abdominal por disminuir la vía PPAR γ /Akt/eNOS/NO.

Progresión del SMet y su relación con la disfunción vascular

En diversos estudios^{201,233} se ha analizado el efecto de la dieta sobre los vasos sanguíneos, buscando cómo este estímulo acaba por sobreponerse a los mecanismos de control vascular conduciendo a una disfunción. Ciertas dietas que inducen obesidad y resistencia a la insulina en primates no humanos, desarrollan en sus fases iniciales un mecanismo compensatorio a nivel vascular²³³.

Probablemente en nuestro modelo nos encontremos en una fase inicial, donde existe disfunción vascular en aorta y mecanismos de compensación que mantienen la vasodilatación en las arterias carótida y renal.

Por otra parte, los resultados en ratones de Aoqui y colaboradores muestran que, en etapas tempranas del SMet, la disfunción vascular aparece en forma de vasoconstricción aumentada. En estas fases, se visualiza un aumento ligero en el peso con un incremento de grasa visceral, hipercolesterolemia y presión sanguínea elevada, sin presencia de inflamación sistémica o resistencia a la insulina. Cuando el modelo de SMet se prolonga en el tiempo, además de los marcadores anteriores, presenta signos de resistencia a la insulina e inflamación, valores aumentados de TNF- α y reducidos de adiponectina²⁰¹.

Discusión

Nuestros resultados no muestran alteración en la respuesta contráctil a ninguno de los agonistas estudiados, pero sí alteraciones en la vasodilatación. Hay que tener en cuenta que estas diferencias pueden ser atribuidas a la especie animal. Sería más que probable que nos hallásemos en una fase inicial del SMet por el incremento de perímetro abdominal, ligera hipertensión, con incipiente inflamación y sin estrés oxidativo vascular. La ventaja de estudiar los estadios iniciales de una enfermedad es poder detectar las vías que se dañan más precozmente, pues constituyen unas perfectas dianas terapéuticas para ralentizar la evolución de la misma.

Conclusiones

1. El SMet no modifica la respuesta contráctil (al KCl, NE y ET-1) en ninguna de las tres arterias estudiadas, aorta abdominal, carótida y renal de conejo.
2. El SMet induce una disfunción vascular en la aorta, causando una menor sensibilidad a la Ach y una menor capacidad relajante independiente de endotelio.
3. La disfunción endotelial en la aorta procedente de conejos con SMet no está relacionada con una menor expresión de eNOS, ni de los canales BK_{Ca} ni con estrés oxidativo.
4. El SMet disminuye la expresión de los receptores β_2 adrenérgicos en la aorta, lo que podría explicar parcialmente la disfunción endotelial.
5. La disminución de la vía PPAR γ /Akt/eNOS, con un descenso en los niveles proteicos de PPAR γ y de P-Akt podría explicar la menor sensibilidad a la Ach y supondría el inicio de la disfunción endotelial en aorta.
6. Por el contrario, en las arterias carótida y renal procedentes de conejos con SMet no hay disfunción vascular, incluso se observa un aumento de sensibilidad al dador de NO. Probablemente, no se observa disfunción endotelial por la compensación que ejerce el músculo liso vascular, aumentando la capacidad vasodilatadora en respuesta al NO.

Conclusiones

7. Este mecanismo de compensación de la función vasodilatadora por parte del músculo liso no se observa en aorta, indicando que este vaso es el primero en dañarse en el modelo de SMet.

Bibliografía

1. Alberti, K. G. M. M. *et al.* Harmonizing the Metabolic Syndrome. *Circulation* **120**, 1640–1645 (2009).
2. Rössner, S. Eskil Kylin (1889–1975). *Obes. Rev.* **10**, 362 (2009).
3. Kylin, E. Studien ueber das Hypertonie-Hyperglyca “mie- Hyperurika” miesyndrom”. *Zentralblatt fuer Inn. Medizin* **44**, 105–127 (1923).
4. Vague, J. Sexual differentiation. A determinant factor of the forms of obesity. 1947. *Obes. Res.* **4**, 201–3 (1996).
5. Kaur, J. A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. *Cardiol. Res. Pract.* **2014**, 1–21 (2014).
6. Reaven, G. M. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* **37**, 1595–607 (1988).
7. Kaplan, N. M. The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch. Intern. Med.* **149**, 1514–20 (1989).
8. Haffner, S. M. *et al.* Prospective analysis of the insulin-resistance syndrome (syndrome X). *Diabetes* **41**, 715–22 (1992).
9. Alberti, K. & Zimmet, P. Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO Consultation. *Diabet. Med.* **15**, 539–553 (1998).
10. Balkau, B. & Charles, M. A. Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabet. Med.* **16**, 442–3 (1999).
11. *Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Final Report. Circulation*

Bibliografía

- 106**, (2002).
12. Eckel, R. H. *et al.* The metabolic syndrome. *Lancet (London, England)* **375**, 181–3 (2010).
 13. Ranasinghe, P., Mathangasinghe, Y., Jayawardena, R., Hills, A. P. & Misra, A. Prevalence and trends of metabolic syndrome among adults in the asia-pacific region: a systematic review. *BMC Public Health* **17**, 101 (2017).
 14. Sliem, H. A., Ahmed, S., Nemr, N. & El-Sherif, I. Metabolic syndrome in the Middle East. *Indian J. Endocrinol. Metab.* **16**, 67–71 (2012).
 15. Okafor, C. I. The metabolic syndrome in Africa: Current trends. *Indian J. Endocrinol. Metab.* **16**, 56–66 (2012).
 16. Scuteri, A. *et al.* Metabolic syndrome across Europe: different clusters of risk factors. *Eur. J. Prev. Cardiol.* **22**, 486–91 (2015).
 17. Cook, S., Weitzman, M., Auinger, P., Nguyen, M. & Dietz, W. H. Prevalence of a Metabolic Syndrome Phenotype in Adolescents. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* **157**, 821 (2003).
 18. Marcovecchio, M. L. & Chiarelli, F. Metabolic Syndrome in Youth: Chimera or Useful Concept? *Curr. Diab. Rep.* **13**, 56–62 (2013).
 19. Wong-McClure, R. A. *et al.* Prevalence of metabolic syndrome in Central America: a cross-sectional population-based study. *Rev. Panam. Salud Pública* **38**, 202–208 (2015).
 20. Escobedo, J. *et al.* Prevalence of the metabolic syndrome in Latin America and its association with sub-clinical carotid atherosclerosis: the CARMELA cross sectional study. *Cardiovasc. Diabetol.* **8**, 52 (2009).
 21. Moore, J. X., Chaudhary, N. & Akinyemiju, T. Metabolic Syndrome Prevalence by Race/Ethnicity and Sex in the United States, National

- Health and Nutrition Examination Survey, 1988–2012. *Prev. Chronic Dis.* **14**, 160287 (2017).
22. Cersosimo, E. & DeFronzo, R. A. Insulin resistance and endothelial dysfunction: The road map to cardiovascular diseases. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* **22**, 423–436 (2006).
 23. Galley, H. F. & Webster, N. R. Physiology of the endothelium. *Br. J. Anaesth.* **93**, 105–113 (2004).
 24. Félétou, M. *The Endothelium. The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells—Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators* (Morgan & Claypool Life Sciences, 2011).
 25. Furchgott, R. F. & Zawadzki, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373–376 (1980).
 26. Deanfield, J. E., Halcox, J. P. & Rabelink, T. J. Endothelial Function and Dysfunction. *Circulation* **115**, 1285–1295 (2007).
 27. Halcox, J. P. J., Narayanan, S., Cramer-Joyce, L., Mincemoyer, R. & Quyyumi, A. A. Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the human forearm microcirculation. *Am. J. Physiol. Hear. Circ. Physiol.* **280**, 2470–2477 (2001).
 28. Govers, R. & Rabelink, T. J. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* **280**, 193–206 (2001).
 29. Noris, M. *et al.* Nitric Oxide Synthesis by Cultured Endothelial Cells Is Modulated by Flow Conditions. *Circ. Res.* **76**, 536–543 (1995).
 30. Villar, I. C., Francis, S., Webb, A., Hobbs, a J. & Ahluwalia, A. Novel aspects of endothelium-dependent regulation of vascular tone. *Kidney Int.* **70**, 840–853 (2006).

Bibliografía

31. Félétou, M., Huang, Y. & Vanhoutte, P. M. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br. J. Pharmacol.* **164**, 894–912 (2011).
32. Mitchell, J. A., Ali, F., Bailey, L., Moreno, L. & Harrington, L. S. Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. *Exp. Physiol.* **93**, 141–147 (2008).
33. Félétou, M. Endothelium-Dependent Regulation of Vascular Tone. (2011).
34. Forstermann, U. & Sessa, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart J.* **33**, 829–837 (2012).
35. Kurihara, N. *et al.* Role of nNOS in Blood Pressure Regulation in eNOS Null Mutant Mice. *Hypertension* **32**, 856–861 (1998).
36. Bryan, R. M., You, J., Golding, E. M. & Marrelli, S. P. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a cousin to nitric oxide and prostacyclin. *Anesthesiology* **102**, 1261–1277 (2005).
37. Félétou, M. & Vanhoutte, P. M. EDHF: an update. *Clin. Sci.* **117**, 139–155 (2009).
38. Bellien, J., Thuillez, C. & Joannides, R. Contribution of endothelium-derived hyperpolarizing factors to the regulation of vascular tone in humans. *Fundamental and Clinical Pharmacology* **22**, 363–377 (2008).
39. Edwards, G., Félétou, M. & Weston, A. H. Endothelium-derived hyperpolarising factors and associated pathways: a synopsis. *Pflugers Arch.* **459**, 863–879 (2010).
40. Edwards, G., Dora, K. A., Gardener, M. J., Garland, C. J. & Weston, A. H. K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* **396**, 269–272 (1998).
41. Martínez-León, J. B. *et al.* Ca²⁺-activated K⁺ channels mediate relaxation

- of forearm veins in chronic renal failure. *J. Hypertens.* **21**, 1927–1934 (2003).
42. Garland, C. J. & Dora, K. A. EDH: endothelium-dependent hyperpolarization and microvascular signalling. *Acta Physiol.* **219**, 152–161 (2017).
 43. Mather, S., Dora, K. A., Sandow, S. L., Winter, P. & Garland, C. J. Rapid Endothelial Cell–Selective Loading of Connexin 40 Antibody Blocks Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor Dilation in Rat Small Mesenteric Arteries. *Circ. Res.* **97**, 399–407 (2005).
 44. Nava, E. & Llorens, S. The paracrine control of vascular motion. A historical perspective. *Pharmacol. Res.* **113**, 125–145 (2016).
 45. Luo, W., Liu, B. & Zhou, Y. The endothelial cyclooxygenase pathway: Insights from mouse arteries. *European Journal of Pharmacology* **780**, 148–158 (2016).
 46. Thorin, E. & Webb, D. J. Endothelium-derived endothelin-1. *Pflugers Arch.* **459**, 951–958 (2010).
 47. Mahmoud, A. M., Brown, M. D., Phillips, S. A. & Haus, J. M. Skeletal Muscle Vascular Function: A Counterbalance of Insulin Action. *Microcirculation* **22**, 327–347 (2015).
 48. Simionescu, M. & Simionescu, N. Proatherosclerotic events: pathobiochemical changes occurring in the arterial wall before monocyte migration. *FASEB J.* **7**, 1359–66 (1993).
 49. Kubes, P., Suzuki, M. & Granger, D. N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 4651–4655 (1991).
 50. Hamilton, S. J. & Watts, G. F. Endothelial dysfunction in diabetes:

Bibliografía

- pathogenesis, significance, and treatment. *Rev. Diabet. Stud. RDS* **10**, 133–156 (2013).
51. Gimbrone, M. A. & García-Cardeña, G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res* **118**, 620–636 (2016).
 52. Félétou, M. & Vanhoutte, P. M. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **291**, 985–1002 (2006).
 53. Davignon, J. & Ganz, P. Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis. **109**, 27–32 (2004).
 54. Bonetti, P. O., Lerman, L. O. & Lerman, A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 168–175 (2003).
 55. Ludmer, P. L. *et al.* Paradoxical Vasoconstriction Induced by Acetylcholine in Atherosclerotic Coronary Arteries. *N. Engl. J. Med.* **315**, 1046–1051 (1986).
 56. Maruhashi, T. *et al.* Relationship between flow-mediated vasodilation and cardiovascular risk factors in a large community-based study. *Heart.* **99**, 1837–1842 (2013).
 57. Steinberg, H. O. *et al.* Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **97**, 2601–2610 (1996).
 58. Kim, J., Montagnani, M., Chandrasekran, S. & Quon, M. J. Role of Lipotoxicity in Endothelial Dysfunction. *Heart Fail. Clin.* **8**, 589–607 (2012).
 59. Celermajer, D. S., Sorensen, K. E., Bull, C., Robinson, J. & Deanfield, J. E. Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of

- asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **24**, 1468–1474 (1994).
60. Hsueh, W. A. & Quiñones, M. J. Role of endothelial dysfunction in insulin resistance. *Am. J. Cardiol.* **92**, 10–17 (2003).
 61. World Health Organization. Obesity and overweight. *February* (2018). Available at: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. (Accessed: 25th November 2018)
 62. Jensen, M. D. Role of body fat distribution and the metabolic complications of obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**, 57–63 (2008).
 63. Waki, H. & Tontonoz, P. Endocrine Functions of Adipose Tissue. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2**, 31–56 (2007).
 64. Boydens, C., Maenhaut, N., Pauwels, B., Decaluwé, K. & Van de Voorde, J. Adipose tissue as regulator of vascular tone. *Curr. Hypertens. Rep.* **14**, 270–278 (2012).
 65. Trayhurn, P. & Beattie, J. H. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc. Nutr. Soc.* **60**, 329–339 (2001).
 66. Beftowski, J. Adiponectin and resistin--new hormones of white adipose tissue. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **9**, RA55-61 (2003).
 67. Yazıcı, D. & Sezer, H. Insulin Resistance, Obesity and Lipotoxicity. *Adv Exp Med Biol* **960**, 277–304 (2017).
 68. Engin, A. *Endothelial Dysfunction in Obesity. Obesity and Lipotoxicity* (2017). doi:10.1007/978-3-319-48382-5_15
 69. Klimčáková, E. *et al.* Worsening of Obesity and Metabolic Status Yields Similar Molecular Adaptations in Human Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Decreased Metabolism and Increased Immune Response.

Bibliografía

- J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, 73–82 (2011).
70. Meijer, K. *et al.* Human Primary Adipocytes Exhibit Immune Cell Function: Adipocytes Prime Inflammation Independent of Macrophages. *PLoS One* **6**, e17154 (2011).
 71. Fernández-Alfonso, M. S. *et al.* Role of Perivascular Adipose Tissue in Health and Disease. *Compr. Physiol.* **8**, 23–59 (2018).
 72. Hildebrand, S., Jasmin, S. & Pfeifer, A. PVAT and Its Relation to Brown, Beige, and White Adipose Tissue in Development and Function. *Front. Physiol.* **9**, 70 (2018).
 73. Ozen, G., Daci, A., Norel, X. & Topal, G. Human perivascular adipose tissue dysfunction as a cause of vascular disease: Focus on vascular tone and wall remodeling. *Eur. J. Pharmacol.* **766**, 16–24 (2015).
 74. Viridis, A. *et al.* Tumour necrosis factor- α participates on the endothelin-1/nitric oxide imbalance in small arteries from obese patients: role of perivascular adipose tissue. *Eur. Heart J.* **36**, 784–794 (2015).
 75. Campia, U., Tesouro, M. & Cardillo, C. Human obesity and endothelium-dependent responsiveness. *Br. J. Pharmacol.* **165**, 561–573 (2012).
 76. Sun, S., Ji, Y., Kersten, S. & Qi, L. Mechanisms of Inflammatory Responses in Obese Adipose Tissue. *Annu Rev Nutr.* **32**, 261–286 (2012).
 77. Karpe, F. & Pinnick, K. E. Biology of upper-body and lower-body adipose tissue link to whole-body phenotypes. *Nat. Rev. Endocrinol.* **11**, 90–100 (2015).
 78. Xu, A. & Vanhoutte, P. M. Adiponectin and adipocyte fatty acid binding protein in the pathogenesis of cardiovascular disease. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **302**, 1231–1240 (2012).

79. Mauricio, M. D. *et al.* Nanoparticles in Medicine: A Focus on Vascular Oxidative Stress. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, 6231482 (2018).
80. Viridis, A., Duranti, E. & Taddei, S. Oxidative Stress and Vascular Damage in Hypertension: Role of Angiotensin II. *Int. J. Hypertens.* **2011**, 1–7 (2011).
81. Bakker, S. J. *et al.* Cytosolic triglycerides and oxidative stress in central obesity: the missing link between excessive atherosclerosis, endothelial dysfunction, and beta-cell failure? *Atherosclerosis* **148**, 17–21 (2000).
82. Symons, J. D. & Abel, E. D. Lipotoxicity contributes to endothelial dysfunction: a focus on the contribution from ceramide. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **14**, 59–68 (2013).
83. Klop, B., Willem, J., Elte, F. & Cabezas, M. C. Dyslipidemia in Obesity: Mechanisms and Potential Targets. *Nutrients* **5**, 1218–1240 (2013).
84. Rizzo, V., McIntosh, D. P., Oh, P. & Schnitzer, J. E. In situ flow activates endothelial nitric oxide synthase in luminal caveolae of endothelium with rapid caveolin dissociation and calmodulin association. *J. Biol. Chem.* **273**, 34724–34729 (1998).
85. Blair, A., Shaul, P. W., Yuhanna, I. S., Conrad, P. A. & Smart, E. J. Oxidized low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation. *J. Biol. Chem.* **274**, 32512–32519 (1999).
86. Uittenbogaard, A., Shaul, P. W., Yuhanna, I. S., Blair, A. & Smart, E. J. High density lipoprotein prevents oxidized low density lipoprotein-induced inhibition of endothelial nitric-oxide synthase localization and activation in caveolae. *J. Biol. Chem.* **275**, 11278–11283 (2000).
87. Rämets, M. E. *et al.* High-density lipoprotein increases the abundance of

Bibliografía

- eNOS protein in human vascular endothelial cells by increasing its half-life. *J. Am. Coll. Cardiol.* **41**, 2288–97 (2003).
88. Uittenbogaard, A., Shaul, P. W., Yuhanna, I. S., Blair, A. & Smart, E. J. High density lipoprotein prevents oxidized low density lipoprotein-induced inhibition of endothelial nitric-oxide synthase localization and activation in caveolae. *J. Biol. Chem.* **275**, 11278–11283 (2000).
89. Hadi, H. A. & Suwaidi, J. Al. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Vasc. Health Risk Manag.* **3**, 853–876 (2007).
90. Goldberg, I. J. & Bornfeldt, K. E. Lipids and the Endothelium: Bidirectional Interactions. *Curr. Atheroscler. Rep.* **15**, 365 (2013).
91. Krogmann, A. *et al.* Inflammatory response of human coronary artery endothelial cells to saturated long-chain fatty acids. *Microvasc. Res.* **81**, 52–59 (2011).
92. Li, X. *et al.* Endothelial Acyl-CoA Synthetase 1 Is Not Required for Inflammatory and Apoptotic Effects of a Saturated Fatty Acid-Rich Environment. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 232–240 (2013).
93. Sawamura, T. *et al.* An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature* **386**, 73–77 (1997).
94. Pirillo, A., Norata, G. D. & Catapano, A. L. LOX-1, OxLDL, and atherosclerosis. *Mediators Inflamm.* **2013**, 152786 (2013).
95. Deanfield, J. *et al.* Endothelial function and dysfunction. Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular beds: a statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J. Hypertens.* **23**, 7–17 (2005).
96. Panza, J. A., García, C. E., Kilcoyne, C. M., Quyyumi, A. A. & Cannon, R. O. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with essential

- hypertension. Evidence that nitric oxide abnormality is not localized to a single signal transduction pathway. *Circulation* **91**, 1732–1738 (1995).
97. Taddei, S. *et al.* Defective L-arginine-nitric oxide pathway in offspring of essential hypertensive patients. *Circulation* **94**, 1298–1303 (1996).
 98. Landmesser, U. *et al.* Angiotensin II Induces Endothelial Xanthine Oxidase Activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 943–948 (2007).
 99. Mervaala, E. M. A. *et al.* Endothelial Dysfunction and Xanthine Oxidoreductase Activity in Rats With Human Renin and Angiotensinogen Genes. *Hypertension* **37**, 414–418 (2001).
 100. Gimenez, M., Schickling, B. M., Lopes, L. R. & Miller, F. J. Nox1 in cardiovascular diseases: regulation and pathophysiology. *Clin. Sci.* **130**, 151–165 (2015).
 101. Montezano, A. C. *et al.* Redox signaling, Nox5 and vascular remodeling in hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **24**, 425–433 (2015).
 102. Santilli, F., D'Ardes, D. & Davì, G. Oxidative stress in chronic vascular disease: From prediction to prevention. *Vascul. Pharmacol.* **74**, 23–37 (2015).
 103. Warnholtz, A. *et al.* Increased NADH-Oxidase–Mediated Superoxide Production in the Early Stages of Atherosclerosis. *Circulation* **99**, 2027–2033 (1999).
 104. Gatti, C. D. *et al.* Pulsatile Stretch Induces Release of Angiotensin II and Oxidative Stress in Human Endothelial Cells: Effects of ACE Inhibition and AT₁ Receptor Antagonism. *Clin. Exp. Hypertens.* **30**, 616–627 (2008).
 105. Tanito, M. *et al.* Enhanced Oxidative Stress and Impaired Thioredoxin Expression in Spontaneously Hypertensive Rats. *Antioxid. Redox Signal.* **6**, 89–97 (2004).

Bibliografía

106. Loukogeorgakis, S. P. *et al.* Role of NADPH Oxidase in Endothelial Ischemia/Reperfusion Injury in Humans. *Circulation* **121**, 2310–2316 (2010).
107. Rodrigo, R. *et al.* Relationship between Oxidative Stress and Essential Hypertension. *Hypertens. Res.* **30**, 1159–1167 (2007).
108. Ullrich, V., Daiber, A., Bachschmid, M. & Zou, M.-H. Nitration of prostacyclin synthase: mechanism and physiological implications. *Int. Congr. Ser.* **1233**, 405–414 (2002).
109. Parker, J., Lane, J. & Axelrod, L. Cooperation of adipocytes and endothelial cells required for catecholamine stimulation of PGI₂ production by rat adipose tissue. *Diabetes* **38**, 1123–1132 (1989).
110. Zou, M. H., Daiber, A., Peterson, J. A., Shoun, H. & Ullrich, V. Rapid reactions of peroxynitrite with heme-thiolate proteins as the basis for protection of prostacyclin synthase from inactivation by nitration. *Arch. Biochem. Biophys.* **376**, 149–155 (2000).
111. Widimsky, J., Horky, K. & Dvorakova, J. Plasma endothelin-1,2 levels in mild and severe hypertension. *J. Hypertens. Suppl.* **9**, 194–195 (1991).
112. Iglarz, M. & Schiffrin, E. L. Role of endothelin-1 in hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.* **5**, 144–148 (2003).
113. Kobayashi, T., Nogami, T., Taguchi, K., Matsumoto, T. & Kamata, K. Diabetic state, high plasma insulin and angiotensin II combine to augment endothelin-1-induced vasoconstriction via ETA receptors and ERK. *Br. J. Pharmacol.* **155**, 974–83 (2008).
114. Lin, Y.-J. *et al.* Endothelin-1 exacerbates development of hypertension and atherosclerosis in modest insulin resistant syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **460**, 497–503 (2015).

115. Tesouro, M. *et al.* Ghrelin Restores the Endothelin 1/Nitric Oxide Balance in Patients With Obesity-Related Metabolic Syndrome. *Hypertension* **54**, 995–1000 (2009).
116. Ottosson-Seeberg, A., Lundberg, J. M., Alvestrand, A. & Ahlberg, G. Exogenous endothelin-1 causes peripheral insulin resistance in healthy humans. *Acta Physiol. Scand.* **161**, 211–220 (1997).
117. Panza, J. A., Quyyumi, A. A., Brush, J. E. & Epstein, S. E. Abnormal Endothelium-Dependent Vascular Relaxation in Patients with Essential Hypertension. *N. Engl. J. Med.* **323**, 22–27 (1990).
118. Gao, Y. *Neurotransmitters. Biology of Vascular Smooth Muscle: Vasoconstriction and Dilatation* (Springer Singapore, 2017). doi:10.1007/978-981-10-4810-4_7
119. Ferro, A. *et al.* Activation of nitric oxide synthase by β 2-adrenoceptors in human umbilical vein endothelium *in vitro*. *Br. J. Pharmacol.* **126**, 1872–1880 (1999).
120. Chruscinski, A. *et al.* Differential distribution of beta-adrenergic receptor subtypes in blood vessels of knockout mice lacking beta(1)- or beta(2)-adrenergic receptors. *Mol. Pharmacol.* **60**, 955–62 (2001).
121. Broeders, M. A. W. *et al.* Nebivolol: A Third-Generation-Blocker That Augments Vascular Nitric Oxide Release Endothelial 2-Adrenergic Receptor-Mediated Nitric Oxide Production. *Circulation* **102**, 677–84 (2000).
122. Dawes, M., Chowienczyk, P. J. & Ritter, J. M. Effects of inhibition of the L-arginine/nitric oxide pathway on vasodilation caused by beta-adrenergic agonists in human forearm. *Circulation* **95**, 2293–7 (1997).
123. Grassi, G. *et al.* Adrenergic and reflex abnormalities in obesity-related

Bibliografía

- hypertension. *Hypertension* **36**, 538–42 (2000).
124. Battault, S. *et al.* Vascular endothelial function masks increased sympathetic vasopressor activity in rats with metabolic syndrome. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **314**, 497–507 (2018).
125. Schwartz, R. S., Jaeger, L. F. & Veith, R. C. The importance of body composition to the increase in plasma norepinephrine appearance rate in elderly men. *J. Gerontol.* **42**, 546–51 (1987).
126. Young, J. B. *et al.* Relationship of catecholamine excretion to body size, obesity, and nutrient intake in middle-aged and elderly men. *Am. J. Clin. Nutr.* **56**, 827–834 (1992).
127. Schalkwijk, C. G. & Stehouwer, C. D. A. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clin Sci (Lond).* **109**, 143–159 (2005).
128. Guo, D. *et al.* FGF21 protects human umbilical vein endothelial cells against high glucose-induced apoptosis via PI3K/Akt/Fox3a signaling pathway. *J. Diabetes Complications* **32**, 729–736 (2018).
129. Weidig, P., McMaster, D. & Bayraktutan, U. High glucose mediates pro-oxidant and antioxidant enzyme activities in coronary endothelial cells. *Diabetes, Obes. Metab.* **6**, 432–441 (2004).
130. Karaca, Ü., Schram, M. T., Houben, A. J. H. M., Muris, D. M. J. & Stehouwer, C. D. A. Microvascular dysfunction as a link between obesity, insulin resistance and hypertension. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **103**, 382–387 (2014).
131. Suwaidi, J. A. *et al.* Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation* **101**, 948–954 (2000).

132. Heitzer, T., Schlinzig, T., Krohn, K., Meinertz, T. & Münzel, T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* **104**, 2673–2678 (2001).
133. Bode-Böger, S. M., Scalera, F. & Ignarro, L. J. The L-arginine paradox: Importance of the L-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio. *Pharmacol Ther.* **114**, 295–306 (2007).
134. Hill, C. E., Phillips, J. K. & Sandow, S. L. Heterogeneous control of blood flow amongst different vascular beds. *Med. Res. Rev.* **21**, 1–60 (2001).
135. Wigg, S. J. *et al.* Comparison of effects of diabetes mellitus on an EDHF-dependent and an EDHF-independent artery. *Am J Physiol Hear. Circ Physiol* **281**, 232–240 (2001).
136. Ishii, H. *et al.* Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor. *Science* **272**, 728–731 (1996).
137. Jiang, J. *et al.* Differential contribution of endothelium-derived relaxing factors to vascular reactivity in conduit and resistance arteries from normotensive and hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens* **38**, 393–398 (2016).
138. Lemmey, H. A. L. *et al.* Hyperglycaemia disrupts conducted vasodilation in the resistance vasculature of db/db mice. *Vascul. Pharmacol.* **103–105**, 29–35 (2018).
139. Ellis, A. *et al.* Cardiovascular Pharmacology Effects of a Western diet versus high glucose on endothelium-dependent relaxation in murine micro-and macro-vasculature. *Eur. J. Pharmacol.* **601**, 111–117 (2008).
140. Climent, B., Simonsen, U. & Rivera, L. Effects of obesity on vascular potassium channels. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **12**, 438–52 (2014).
141. Lebovitz, H. E. Insulin resistance: definition and consequences. *Exp Clin*

Bibliografía

- Endocrinol Diabetes* **109 Suppl**, 135–148 (2001).
142. Lillioja, S. *et al.* Insulin Resistance and Insulin Secretory Dysfunction as Precursors of Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus: Prospective Studies of Pima Indians. *N. Engl. J. Med.* **329**, 1988–1992 (1993).
 143. Lillioja, S. *et al.* Impaired Glucose Tolerance as a Disorder of Insulin Action. *N. Engl. J. Med.* **318**, 1217–1225 (1988).
 144. DeFronzo, R. A. Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. The Claude Bernard Lecture 2009. *Diabetologia* **53**, 1270–87 (2010).
 145. Després, J. P. *et al.* Hyperinsulinemia as an independent risk factor for ischemic heart disease. *N. Engl. J. Med.* **334**, 952–957 (1996).
 146. Baron, A. D. Hemodynamic actions of insulin. *Am. J. Physiol.* **267**, 187–202 (1994).
 147. Tarkun, I. *et al.* Endothelial Dysfunction in Young Women with Polycystic Ovary Syndrome: Relationship with Insulin Resistance and Low-Grade Chronic Inflammation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 5592–5596 (2004).
 148. Koeppen, B. M. & Stanton, B. A. *Berne y Levy fisiología (6th edn)*. (Elsevier España, 2009).
 149. Eringa, E. C. *et al.* Vasoconstrictor effects of insulin in skeletal muscle arterioles are mediated by ERK1/2 activation in endothelium. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **287**, 2043–2048 (2004).
 150. Mudau, M., Genis, A., Lochner, A. & Strijdom, H. Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis. *Cardiovasc. J. Afr.* **23**, 222–231 (2012).
 151. Akiyama, T. E. *et al.* Conditional disruption of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene in mice results in lowered

- expression of ABCA1, ABCG1, and apoE in macrophages and reduced cholesterol efflux. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 2607–19 (2002).
152. Gbaguidi, F. G. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) agonists decrease lipoprotein lipase secretion and glycated LDL uptake by human macrophages. *FEBS Lett.* **512**, 85–90 (2002).
 153. Haraguchi, G. *et al.* PPAR α and PPAR γ activators suppress the monocyte-macrophage apoB-48 receptor. *J. Lipid Res.* **44**, 1224–1231 (2003).
 154. Olefsky, J. M. Treatment of insulin resistance with peroxisome proliferator-activated receptor γ agonists. *J. Clin. Invest.* **106**, 467–472 (2000).
 155. Fujiwara, T., Yoshioka, S., Yoshioka, T., Ushiyama, I. & Horikoshi, H. Characterization of new oral antidiabetic agent CS-045. Studies in KK and ob/ob mice and Zucker fatty rats. *Diabetes* **37**, 1549–58 (1988).
 156. Foryst-Ludwig, A. *et al.* PPAR γ activation attenuates T-lymphocyte-dependent inflammation of adipose tissue and development of insulin resistance in obese mice. *Cardiovasc. Diabetol.* **9**, 64 (2010).
 157. Wong, S. K., Chin, K.-Y., Suhaimi, F. H., Fairus, A. & Ima-Nirwana, S. Animal models of metabolic syndrome: a review. *Nutr. Metab. (Lond)*. **13**, 65 (2016).
 158. Carroll, J. F. *et al.* Hypertension, cardiac hypertrophy, and neurohumoral activity in a new animal model of obesity. *Am. J. Physiol.* **271**, 373–378 (1996).
 159. Arias-Mutis, O. J. *et al.* Development and characterization of an experimental model of diet-induced metabolic syndrome in rabbit. *PLoS One* **12**, 0178315 (2017).
 160. Mahmood, T. & Yang, P.-C. Western blot: technique, theory, and trouble

Bibliografía

- shooting. *N. Am. J. Med. Sci.* **4**, 429–34 (2012).
161. Vanhoutte, P. M. Nitric Oxide: From Good to Bad. *Ann. Vasc. Dis.* **11**, 41–51 (2018).
162. Pakala, R. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor γ : Its role in metabolic syndrome. *Cardiovasc. Radiat. Med.* **5**, 97–103 (2004).
163. Fan, J. *et al.* Rabbit models for the study of human atherosclerosis: from pathophysiological mechanisms to translational medicine. *Pharmacol. Ther.* **146**, 104–19 (2015).
164. Navarro, M. A. *et al.* Animales de experimentación utilizados como modelos en la investigación de la arteriosclerosis. *Clínica e Investig. en Arterioscler.* **17**, 82–93 (2005).
165. Ignatowski AC. Uber die Wirkung des Tierischen Eiweisses auf die Aorta und die paerenchymatosen Organe der Kaninchen. *Virchows Arch. Pathol. Anat* 248–270 (1908).
166. Steinberg, D. Thematic review series: The Pathogenesis of Atherosclerosis. An interpretive history of the cholesterol controversy: part I. *J. Lipid Res.* **45**, 1583–1593 (2004).
167. Fan, J. *et al.* Principles and Applications of Rabbit Models for Atherosclerosis Research. *J. Atheroscler. Thromb.* **25**, 213–220 (2018).
168. Anitschkow, N. N. & Chalатов, S. Ueber experimentelle Choleserinsteatose und ihre Bedeutung fur die Entstehung einiger pathologischer Prozesse. *Zentralbl. Allg. Pathol* **24**, 1–9 (1913).
169. Anitschkow, N. Ueber die Veranderungen der Kaninchen-aorta bei experimenteller Cholesterinsteatose. *Beitr. Pathol. Anat* **56**, 379–404 (1913).
170. Taylor, J. M. & Fan, J. Transgenic rabbit models for the study on

- atherosclerosis. *Front. Biosci.* **2**, 298–308 (1997).
171. Roberts, D. C. K., West, C. E., Redgrave, T. G. & Smith, J. B. Plasma cholesterol concentration in normal and cholesterol-fed rabbits: Its variation and heritability. *Atherosclerosis* **19**, 369–380 (1974).
 172. Phinikaridou, A., Hallock, K. J., Qiao, Y. & Hamilton, J. A. A robust rabbit model of human atherosclerosis and atherothrombosis. *J. Lipid Res.* **50**, 787–797 (2009).
 173. Sorriento, D., Trimarco, B. & Iaccarino, G. Adrenergic mechanism in the control of endothelial function. *Transl. Med.* **1**, 213–28 (2011).
 174. Rocha, N. G., Templeton, D. L., Greiner, J. J., Stauffer, B. L. & DeSouza, C. A. Metabolic syndrome and endothelin-1 mediated vasoconstrictor tone in overweight/obese adults. *Metabolism* **63**, 951–956 (2014).
 175. Amberg, G. C. & Navedo, M. F. Calcium Dynamics in Vascular Smooth Muscle. *Microcirculation* **20**, 281–289 (2013).
 176. Ratz, P. H., Berg, K. M., Urban, N. H. & Miner, A. S. Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. *Am. J. Physiol. Physiol.* **288**, 769–783 (2005).
 177. Naderali, E. K. *et al.* Dietary obesity in the rat induces endothelial dysfunction without causing insulin resistance: a possible role for triacylglycerols. *Clin. Sci. (Lond)*. **101**, 499–506 (2001).
 178. Naderali, E. K., Fatani, S. & Williams, G. Chronic withdrawal of a high-palatable obesity-inducing diet completely reverses metabolic and vascular abnormalities associated with dietary-obesity in the rat. *Atherosclerosis* **172**, 63–69 (2004).
 179. Naderali, E. K. & Williams, G. Prolonged endothelial-dependent and -independent arterial dysfunction induced in the rat by short-term

Bibliografía

- feeding with a high-fat, high-sucrose diet. *Atherosclerosis* **166**, 253–259 (2003).
180. Boustany-Kari, C. M., Gong, M., Akers, W. S., Guo, Z. & Cassis, L. A. Enhanced vascular contractility and diminished coronary artery flow in rats made hypertensive from diet-induced obesity. *Int. J. Obes.* **31**, 1652–1659 (2007).
181. Fulton, D. J., Hodgson, W. C., Sikorski, B. W. & King, R. G. Attenuated responses to endothelin-1, KCl and CaCl₂, but not noradrenaline, of aortae from rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Br. J. Pharmacol.* **104**, 928–32 (1991).
182. Alarcon, G. *et al.* High fat diet-induced metabolically obese and normal weight rabbit model shows early vascular dysfunction: mechanisms involved. *Int. J. Obes.* **42**, 1535–1543 (2018).
183. Head, R. J., Longhurst, P. A., Panek, R. L. & Stitzel, R. E. A contrasting effect of the diabetic state upon the contractile responses of aortic preparations from the rat and rabbit. *Br. J. Pharmacol.* **91**, 275–86 (1987).
184. Kirpekar, S. M. & Misu, Y. Release of noradrenaline by splenic nerve stimulation and its dependence on calcium. *J. Physiol.* **188**, 219–34 (1967).
185. Briant, L. J. B., Paton, J. F. R., Pickering, A. E. & Champneys, A. R. Modelling the vascular response to sympathetic postganglionic nerve activity. *J. Theor. Biol.* **371**, 102–116 (2015).
186. Tataranni, P. A., Young, J. B., Bogardus, C. & Ravussin, E. A low sympathoadrenal activity is associated with body weight gain and development of central adiposity in Pima Indian men. *Obes. Res.* **5**, 341–

- 347 (1997).
187. Tuck, M. L. Obesity, the sympathetic nervous system, and essential hypertension. *Hypertension* **19**, 67–77 (1992).
 188. Kjeldsen, S. E., Eide, I., Aakesson, I. & Leren, P. Influence of body weight on plasma catecholamine patterns in middle-aged, normotensive men. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **43**, 339–342 (1983).
 189. Schutz, Y., Bessard, T. & Jéquier, E. Diet-induced thermogenesis measured over a whole day in obese and nonobese women. *Am. J. Clin. Nutr.* **40**, 542–552 (1984).
 190. Pal, G. K. *et al.* Sympathovagal Imbalance Contributes to Prehypertension Status and Cardiovascular Risks Attributed by Insulin Resistance, Inflammation, Dyslipidemia and Oxidative Stress in First Degree Relatives of Type 2 Diabetics. *PLoS One* **8**, 78072 (2013).
 191. Lambert, E. *et al.* Dyslipidemia Is Associated With Sympathetic Nervous Activation and Impaired Endothelial Function in Young Females. *Am. J. Hypertens.* **26**, 250–256 (2013).
 192. Coppack, S. W. *et al.* Whole body, adipose tissue, and forearm norepinephrine kinetics in lean and obese women. *Am J Physiol.* **275**, 830–4. (1998).
 193. Jones, P. P., Snitker, S., Skinner, J. S. & Ravussin, E. Gender differences in muscle sympathetic nerve activity: effect of body fat distribution. *Am. J. Physiol. Metab.* **270**, 363–366 (1996).
 194. Jones, P. P., Davy, K. P. & Seals, D. R. Relations of total and abdominal adiposity to muscle sympathetic nerve activity in healthy older males. *Int J Obes Relat Metab Disord.* **21**, 1053–1057 (1997).
 195. Schwartz, R. S., Jaeger, L. F. & Veith, R. C. The Importance of Body

Bibliografía

- Composition to the Increase in Plasma Norepinephrine Appearance Rate in Elderly Men. *J. Gerontol.* **42**, 546–551 (1987).
196. Poehlman, E. T. *et al.* Sympathetic nervous system activity, body fatness, and body fat distribution in younger and older males. *J. Appl. Physiol.* **78**, 802–806 (1995).
197. Naderali, E. K., Pickavance, L. C., Wilding, J. P. & Williams, G. Diet-induced endothelial dysfunction in the rat is independent of the degree of increase in total body weight. *Clin. Sci. (Lond).* **100**, 635–641 (2001).
198. Weil, B. R. *et al.* Enhanced endothelin-1 system activity with overweight and obesity. *Am J Physiol Hear. Circ Physiol* **301**, 689–695 (2011).
199. Soares, A. G., Carvalho, M. H. C. de & Akamine, E. Obesity Induces Artery-Specific Alterations: Evaluation of Vascular Function and Inflammatory and Smooth Muscle Phenotypic Markers. *Biomed Res. Int.* **2017**, 1–10 (2017).
200. Mauricio, M. D. *et al.* Bifidobacterium pseudocatenulatum CECT 7765 supplementation restores altered vascular function in an experimental model of obese mice. *Int. J. Med. Sci.* **14**, 444–451 (2017).
201. Aouï, C. *et al.* Microvascular dysfunction in the course of metabolic syndrome induced by high-fat diet. *Cardiovasc. Diabetol.* **13**, 13:31 (2014).
202. Ferro, A. *et al.* Activation of nitric oxide synthase by β 2-adrenoceptors in human umbilical vein endothelium in vitro. *Br. J. Pharmacol.* **126**, 1872–1880 (1999).
203. Ciccarelli, M. *et al.* Endothelial β 2 adrenergic signaling to AKT: Role of G i and SRC. *Cell Signal.* **19**, 1949–1955 (2007).
204. Flesich, J. H., Moling, H. M. & Brodie, B. B. Beta-Receptor Activity in

- Aorta. *Circ. Res.* **26**, 151–162 (1970).
205. Bussey, C. T., de Leeuw, A. E. & Lamberts, R. R. Increased haemodynamic adrenergic load with isoflurane anaesthesia in type 2 diabetic and obese rats in vivo. *Cardiovasc. Diabetol.* **13**, 161 (2014).
206. Ferri, C. *et al.* Circulating endothelin-1 levels in obese patients with the metabolic syndrome. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **105**, 38–40 (2009).
207. Diehl, K. J. *et al.* Impaired fasting blood glucose is associated with increased endothelin-1 vasoconstrictor tone. *Atherosclerosis* **229**, 130–133 (2013).
208. Campia, U., Tesauro, M., Di Daniele, N. & Cardillo, C. The vascular endothelin system in obesity and type 2 diabetes: Pathophysiology and therapeutic implications. *Life Sci.* **118**, 149–155 (2014).
209. Baretella, O., Chung, S. K., Xu, A. & Vanhoutte, P. M. Endothelial overexpression of endothelin-1 modulates aortic, carotid, iliac and renal arterial responses in obese mice. *Acta Pharmacol. Sin.* **38**, 498–512 (2017).
210. Knudson, J. D. *et al.* Coronary Vasomotor Reactivity to Endothelin-1 in the Prediabetic Metabolic Syndrome. *Microcirculation* **13**, 209–218 (2006).
211. Morita, T., Okada, M., Hara, Y. & Yamawaki, H. Mechanisms underlying impairment of endothelium-dependent relaxation by fetal bovine serum in organ-cultured rat mesenteric artery. *Eur. J. Pharmacol.* **668**, 401–406 (2011).
212. Doyle, M. P. & Duling, B. R. Acetylcholine induces conducted vasodilation by nitric oxide-dependent and-independent mechanisms. *Am J Physiol.* **272**, 1364–1371 (1997).

Bibliografía

213. Kellogg, D. L., Zhao, J. L., Coey, U. & Green, J. V. Acetylcholine-induced vasodilation is mediated by nitric oxide and prostaglandins in human skin. *J. Appl. Physiol.* **98**, 629–632 (2005).
214. Wendelhag, I., Fagerberg, B., Hulthe, J., Bokemark, L. & Wikstrand, J. Endothelium-dependent flow-mediated vasodilatation, insulin resistance and the metabolic syndrome in 60-year-old men. *J. Intern. Med.* **252**, 305–13 (2002).
215. Jebelovszki, E. *et al.* High-fat diet-induced obesity leads to increased NO sensitivity of rat coronary arterioles: role of soluble guanylate cyclase activation. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **294**, 2558–2564 (2008).
216. Böger, R. H. Association of Asymmetric Dimethylarginine and Endothelial Dysfunction. *Clin. Chem. Lab. Med.* **41**, 1467–1472 (2003).
217. Gkaliagkousi, E., Gavriilaki, E., Triantafyllou, A. & Douma, S. Clinical Significance of Endothelial Dysfunction in Essential Hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.* **17**, 85 (2015).
218. Kubota, T. *et al.* Article Impaired Insulin Signaling in Endothelial Cells Reduces Insulin-Induced Glucose Uptake by Skeletal Muscle. *Cell Metab.* **13**, 294–307 (2011).
219. Aubin, M.-C. *et al.* Female Rats Fed a High-Fat Diet Were Associated with Vascular Dysfunction and Cardiac Fibrosis in the Absence of Overt Obesity and Hyperlipidemia: Therapeutic Potential of Resveratrol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **325**, 961–968 (2008).
220. Kamimura, R. *et al.* Development of atherosclerotic lesions in cholesterol-loaded rabbits. *Exp. Anim.* **48**, 1–7 (1999).
221. Kleemann, R. *et al.* Atherosclerosis and liver inflammation induced by increased dietary cholesterol intake: a combined transcriptomics and

- metabolomics analysis. *Genome Biol.* **8**, 200 (2007).
222. Ahluwalia, N., Andreeva, V. A., Kesse-Guyot, E. & Hercberg, S. Dietary patterns, inflammation and the metabolic syndrome. *Diabetes Metab.* **39**, 99–110 (2013).
223. McCracken, E., Monaghan, M. & Sreenivasan, S. Pathophysiology of the metabolic syndrome. *Clin. Dermatol.* **36**, 14–20 (2018).
224. Sutherland, J. P., McKinley, B. & Eckel, R. H. The Metabolic Syndrome and Inflammation. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* **2**, 82–104 (2004).
225. Han, L., Shen, W.-J., Bittner, S., Kraemer, F. B. & Azhar, S. PPARs: regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part II: PPAR- β/δ and PPAR- γ . *Futur. Cardiol* 279–296 (2017). doi:10.2217/fca-2017-0019
226. Carrier, A. Metabolic Syndrome and Oxidative Stress: A Complex Relationship. *Antioxid. Redox Signal.* **26**, 429–431 (2017).
227. Spahis, S., Borys, J.-M. & Levy, E. Metabolic Syndrome as a Multifaceted Risk Factor for Oxidative Stress. *Antioxid. Redox Signal.* **26**, 445–461 (2017).
228. Drummond, G. R. & Sobey, C. G. Endothelial NADPH oxidases: which NOX to target in vascular disease? *Trends Endocrinol. Metab.* **25**, 452–463 (2014).
229. Hu, P. *et al.* Endothelial Nox4-based NADPH oxidase regulates atherosclerosis via soluble epoxide hydrolase. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1863**, 1382–1391 (2017).
230. Derosa, G. & Maffioli, P. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) agonists on glycemic control, lipid profile and cardiovascular risk. *Curr. Mol. Pharmacol.* **5**, 272–281 (2012).

Bibliografía

231. Peterson, S. J. *et al.* The L-4F mimetic peptide prevents insulin resistance through increased levels of HO-1, pAMPK, and pAKT in obese mice. *J Lipid Res.* **50**, 1293–1304 (2009).
232. Li, H. *et al.* Telmisartan attenuates monocrotaline-induced pulmonary artery endothelial dysfunction through a PPAR gamma-dependent PI3K/Akt/eNOS pathway. *Pulm Pharmacol Ther.* **28**, 17–24 (2014).
233. Chadderdon, S. M. *et al.* Temporal Changes in Skeletal Muscle Capillary Responses and Endothelial-Derived Vasodilators in Obesity-Related Insulin Resistance. *Diabetes* **65**, 2249–2257 (2016).